

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

**Untersuchung tumorassoziierter  
Immunprozesse nach Behandlung mit neuartigen  
Methoden bei Krebspatienten**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
Sebastian Carsten Peter Haen

2007

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. H.-G. Rammensee
2. Berichterstatter: Frau Professor Dr. C. Müller

Für  
meine Großeltern  
Dr. Charlotte Mackensen  
und  
Prof. Dr. Dr. Günter Mackensen  
in liebevollem Andenken

Diese Dissertation wurde angefertigt am Interfakultären Institut für Zellbiologie, Abteilung Immunologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen unter der Leitung von Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee und Dr. Cécile Gouttefangeas von Oktober 2003 bis August 2005.

**Die durchgeführten Untersuchungen wurden im Rahmen von Projekten durchgeführt, die der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät und des Universitätsklinikums Tübingen vorgelegt und durch diese genehmigt wurden. Dies waren im Einzelnen:**

- Nr. 234/2001 Individuelle antigenspezifische Immuntherapie von Patienten mit fortgeschrittenen malignen Erkrankungen mit Peptid-beladenen autologen dendritischen Zellen
- Nr. 297/2002 Untersuchung der Immunantwort gegen tumorassoziierte Antigene bei Krebspatienten, die mit perkutaner Radiofrequenzablation behandelt wurden
- Nr. 242/2003 Präoperative perkutane Thermoablation maligner Nierentumoren
- Nr. 284/2003 Evaluierung der Effektivität der präoperativen perkutanen Radiofrequenzablation von primären und sekundären Lungentumoren.
- Nr. 169/2005V Untersuchung der Immunantwort von Krebspatienten gegen individuelle tumorassoziierte Antigene nach präoperativer perkutaner Radiofrequenzablation (RFA) primärer und sekundärer Lebertumoren

Die Studien wurden durchgeführt in Zusammenarbeit mit:

- Medizinische Universitätsklinik Abteilung II, Eberhard-Karls-Universität Tübingen (Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Lothar Kanz): PD Dr. Peter Brossart
- Universitätsklinik für Urologie, Eberhard-Karls-Universität Tübingen (Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Arnulf Stenzl): Jörg Hennenlotter, Prof. Dr. Markus Kuczyk
- Universitätsklinik für Radiologie, Eberhard-Karls-Universität Tübingen (Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Claus D. Claussen): Prof. Dr. Philippe Pereira, Dr. Andreas Boss, Dr. Stephan Clasen, Dr. Diethard Schmidt
- Chirurgische Klinik: Abteilung für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie, Eberhard-Karls-Universität Tübingen (Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Gerhard Ziemer): Prof. Dr. Hermann Aebert, Dr. Bora Kosan
- Institut für Immunologie, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz: Prof. Dr. Hansjörg Schild, Dipl. Biol. Sylvia Herter
- Molecular Medicine Institute, Pittsburgh, Pennsylvania, USA: Michael T. Lotze
- Center of Molecular Medicine, Moscow State University, Moscow: Sergej A. Nedospasov
- Universitätsspital Zürich, Klinik und Poliklinik für Onkologie: Dr. Dirk Jäger

Für Patientenproben in Kontrollgruppen wurde zusammengearbeitet mit:

- Universitätsklinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie, Eberhard-Karls-Universität Tübingen (Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Alfred Königsrainer): Dr. Jasmin Dittmann
- Medizinische Universitätsklinik Abteilung I, Eberhard-Karls-Universität Tübingen (Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Michael Gregor): PD Dr. Alexandra von Herbay

# Inhaltsverzeichnis

<b>Titelblatt</b> .....	1
<b>Berichterstatter</b> .....	2
<b>Widmung</b> .....	3
<b>Anfertigung der Dissertation</b> .....	4
<b>Studien</b> .....	5
<b>Kooperationen</b> .....	6
<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	7
<b>1. Einleitung</b> .....	13
<b>1.1. Das Immunsystem</b> .....	13
1.1.1. Historisches .....	13
1.1.2. Die Komponenten des Immunsystems .....	15
1.1.3. Das Angeborene Immunsystem .....	18
1.1.4. Das Adaptive oder Spezifische Immunsystem ..	21
1.1.5. MHC-Genlocus .....	24
1.1.6. MHC Klasse I und II Moleküle .....	25
1.1.7. Der ( $\alpha$ : $\beta$ ) T-Zell-Rezeptor .....	29
1.1.8. Dendritische Zellen .....	33
1.1.9. Synaptische Verbindung zwischen T-Zellen und Dendritischen Zellen .....	34
<b>1.2. Alarmsignale des Immunsystems</b> .....	36
1.2.1. Hitzeschockproteine .....	36
1.2.2. Harnsäure .....	40
<b>1.3. Das Immunsystem bei Tumorerkrankungen</b> .....	41
<b>1.4. Möglichkeiten der Immuntherapie</b> .....	46
<b>1.5. Das Nierenzellcarcinom (NZK, RCC)</b> .....	49
<b>1.6. Hepatische Metastasierung</b> .....	56
<b>1.7. Radiofrequenzablation (RF-Ablation)</b> .....	58
1.7.1. Historisches .....	58
1.7.2. Technik .....	59

1.7.3. Definition der verwendeten Energie .....	61
1.7.4. Mechanismen der Radiofrequenzablation .....	61
1.7.5. Radiofrequenzablation und die Aktivierung des Immunsystems .....	63
<b>2. Zielsetzung der Arbeit .....</b>	<b>65</b>
<b>3. Theoretischer Hintergrund der Methoden .....</b>	<b>66</b>
<b>3.1. Isolierung von PBMCs aus peripherenvenösem Blut             mittels Dichtegradientenzentrifugation .....</b>	<b>66</b>
<b>3.2. Multimerisierung mittels Streptavidin .....</b>	<b>66</b>
<b>3.3. Durchflußzytometrie: FACS .....</b>	<b>67</b>
<b>3.4. Tetramer-Staining mit MHC-I-Tetrameren .....</b>	<b>68</b>
<b>3.5. IFN<math>\gamma</math>-ELISPOT .....</b>	<b>70</b>
<b>3.6. ELISA .....</b>	<b>71</b>
<b>3.7. SDS-PAGE .....</b>	<b>72</b>
<b>3.8. Western Blot .....</b>	<b>73</b>
3.8.1. Theoretischer Hintergrund .....	73
3.8.2. Diskussion der Probleme .....	74
<b>3.9. Quantitative RT-PCR in Echtzeit .....</b>	<b>75</b>
<b>3.10. Box &amp; Whisker Plots .....</b>	<b>82</b>
<b>4. Multiplex RT-PCR .....</b>	<b>83</b>
<b>4.1. Zielsetzung .....</b>	<b>83</b>
<b>4.2. Ergebnisse .....</b>	<b>84</b>
4.2.1. Primerlimitierungen .....	84
4.2.2. Vergleich Singleplex- und Multiplex-PCR .....	85
<b>4.3. Diskussion .....</b>	<b>89</b>
<b>5. Materialien und Methoden .....</b>	<b>90</b>
<b>5.1. Allgemein verwendete Materialien und Geräte .....</b>	<b>90</b>
5.1.1. Verzeichnis der verwendeten Geräte .....	90
5.1.2. Verzeichnis der Hersteller der verwendeten Substanzen .....	93
5.1.3. Verzeichnis der verwendeten Lösungen .....	97
5.1.4. Sequenzen der verwendeten Primer .....	99

5.2.	Lymphozytenseparation aus peripherenösem Blut .....	100
5.3.	Plasma-Isolation aus Blut .....	102
5.4.	Serum-Isolation aus Blut .....	102
5.5.	Separation von adhaerenten und nicht-adhaerenten Zellen .....	103
5.6.	Auftauen von Zellen .....	103
5.7.	Zellkultur .....	104
5.8.	HLA-Typisierung auf Thrombozyten .....	106
5.9.	Herstellung von Tetrameren – Multimerisierung mit Streptavidin .....	108
5.10.	Tetramerfärbung .....	108
5.11.	Kombiniertes Tetramer- und intrazelluläres IFN $\gamma$ - Staining .....	111
5.12.	HSP70-ELISA .....	113
5.13.	Harnsäure-Bestimmung im Serum .....	115
5.14.	Restimulation von Zellen vor RNA-Isolation .....	115
5.15.	RNA-Isolation mit TRIzol <sup>®</sup> .....	116
5.16.	Reverse Transkriptase PCR .....	118
5.17.	Real Time PCR mit Taqman <sup>®</sup> -Detektion in Singleplex- PCR .....	119
5.18.	Real Time PCR mit Taqman <sup>®</sup> -Detektion in Multiplex-PCR	122
5.19.	gp96 Western Blot .....	124
5.20.	ELISPOT .....	128
6.	<b>Ergebnisse und Diskussion</b> .....	131
6.1.	<b>Nierenzellcarcinom</b> .....	131
6.1.1.	Studienpopulation und Zielsetzung .....	131
6.1.2.	Ergebnisse .....	135
6.1.2.1.	Übersicht über Studie und Patienten .....	135
6.1.2.2.	Übersicht der verwendeten Peptide .....	137
6.1.2.3.	Negativ- und Positivkontrollen .....	141

6.1.2.4.	RCC68 .....	142
6.1.2.5.	RCC70 .....	149
6.1.2.6.	RCC75 .....	154
6.1.2.7.	RCC98 .....	157
6.1.2.8.	RCC112 .....	163
6.1.2.9.	RCC115 .....	168
6.1.2.10.	RCC116 .....	172
6.1.2.11.	RCC135 .....	176
6.1.2.12.	RCC149 .....	180
6.1.2.13.	Übersicht über die Ergebnisse ....	183
6.1.3.	Diskussion .....	183
<b>6.2.</b>	<b>Radiofrequenzablation</b> .....	<b>189</b>
6.2.1.	Studienpopulation und Zielsetzung .....	189
6.2.2.	Übersicht über die Studie .....	190
6.2.3.	Kontrollgruppen .....	192
6.2.4.	Ergebnisse .....	194
6.2.4.1.	HLA-Typisierung .....	194
6.2.4.2.	Untersuchung antigenspezifischer T-Zellen .....	196
6.2.4.2.1.	Zielsetzung .....	196
6.2.4.2.2.	Übersicht über die Patienten .....	197
6.2.4.2.3.	Übersicht der verwendeten Peptide .....	198
6.2.4.2.4.	Negativ- und Positivkontrollen .....	204
6.2.4.2.5.	Anmerkung zur Beschriftung .....	205
6.2.4.2.6.	RFA001 .....	206
6.2.4.2.7.	RFA009 .....	212
6.2.4.2.8.	RFA012 .....	217
6.2.4.2.9.	RFA015 .....	222

6.2.4.2.10.	RFA016 .....	227
6.2.4.2.11.	RFA022 .....	232
6.2.4.2.12.	RFA024 .....	235
6.2.4.2.13.	RFA025 .....	242
6.2.4.2.14.	RFA026 .....	245
6.2.4.2.15.	RFA027 .....	250
6.2.4.2.16.	RFA031 .....	252
6.2.4.2.17.	RFA046 .....	254
6.2.4.2.18.	RFA047 .....	257
6.2.4.2.19.	RFA048 .....	261
6.2.4.2.20.	RFA054 .....	264
6.2.4.2.21.	Übersicht über die Ergebnisse .....	267
6.2.3.3.	Harnsäure .....	270
6.2.3.3.1.	Zielsetzung .....	270
6.2.3.3.2.	Ergebnisse .....	270
6.2.3.3.3.	Statistische Auswertung der Harnsäurebestimmung	277
6.2.3.4.	Hitzeschockproteine .....	281
6.2.3.4.1.	Zielsetzung .....	281
6.2.3.4.2.	gp96 .....	281
6.2.3.4.3.	HSP70 .....	284
6.2.3.4.3.1.	Ergebnisse .....	284
6.2.3.4.3.2.	Statistische Auswertung der Hitzeschockprotein- Detektion .....	294
6.2.4.	Diskussion .....	298
<b>7.</b>	<b>Schlussfolgerung</b> .....	<b>312</b>
<b>8.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>315</b>
<b>9.</b>	<b>Referenzen</b> .....	<b>316</b>
<b>10.</b>	<b>Veröffentlichungen</b> .....	<b>355</b>

<b>11. Abkürzungen</b> .....	356
<b>Anhang: Chemotherapie Protokolle</b> .....	362
<b>Danksagungen</b> .....	365
<b>Lebenslauf</b> .....	367

# 1. Einleitung

## 1.1. Das Immunsystem

### 1.1.1. Historisches:

Die erste Beschreibung einer *Immunität* geht bereits auf den Römer **Marcus Annaeus Lucanus** (39 – 65 n. Chr.) zurück. Er erwähnt in seiner epischen Dichtung *Pharsalia* die Immunität eines nordafrikanischen Stammes gegen Schlangenbisse. Der lateinische Begriff *immunis* (lat. Immunis: frei, unberührt) taucht erstmalig im 14. Jahrhundert im Zusammenhang mit Krankheiten auf. **Colle** beschreibt in seiner Schrift *Equibus Die gratia ego immunis evasi* erstmalig eine Immunität gegen eine Krankheit.

Die moderne Immunologie, die Kenntnis von etwas, das wir heute als Immunsystem bezeichnen und die Fähigkeiten, dieses Wissen medizinische zu nutzen, ist allerdings erst eine relativ junge Wissenschaft.



Abb. 1:  
Edward Jenner

© University of  
South Carolina,  
USA

Sie wird **Edward Jenner** (1749-1823, Abb. 1) zugeschrieben, der 1796 entdeckte, dass die Inkorporation von Kuhpocken (oder Vakzinien) Schutz bot vor den gefürchteten Pocken, einer für den Menschen häufig tödlichen Erkrankung. Nicht wissend, wie

seine Entdeckung zu erklären sei, geschweige denn, welches die Erreger oder Auslöser beider Erkrankungen waren, nannte Jenner seine Technik *Vakzinierung*, einen Terminus, der auch heute noch – allerdings für alle Impfungen – verwendet wird [Jenner 1798].



Abb. 2:  
Louis Pasteur

© Murray State  
University, USA

**Louis Pasteur** (1822-1895, Abb. 2) entwickelte Ende des 19. Jahrhunderts erste Impfungen gegen Cholera und Tollwut. Diese ersten Triumphe riefen



Abb. 3:  
Emil von  
Behring

© Clendening  
History of  
Medicine  
Library and  
Museum

Wissenschaftler auf den Plan, um herauszufinden, welche Mechanismen im Organismus für diesen Schutz verantwortlich waren. Daraus entstand die Wissenschaft der Immunologie.

1890 entdeckten **Emil von Behring** (1854-1917, Abb. 3) und **Shibasaburo Kitasato** (1852-1931, Abb. 4) gemeinsam, dass im Serum von geimpften Personen Substanzen vorkommen, die ganz spezifisch an ein relevantes Pathogen banden. Diese Substanzen nannten die beiden *Antikörper*.

Diese spezifische Immunantwort (wie die Produktion spezifischer Antikörper) wird als das *Adaptive Immunsystem* bezeichnet.

Es entwickelt sich im Laufe des Lebens durch Auseinandersetzung des Individuums mit einem Pathogen. Häufig führt dieses Adaptive Immunsystem zu einem lebenslangen Schutz gegen eine Neuinfektion mit einem bestimmten

Pathogen, indem es eine Art „Gedächtnis“ ausbildet, das bei Reinfektion sich an die Pathogene „erinnern“ kann.

Im Unterschied dazu bedarf das *Angeborene Immunsystem* keines Lernprozesses. Zur gleichen Zeit, als Behring und Kitasato die Antikörper entdeckt hatten, beschrieb **Élie Metchnikoff** (1845-1916, Abb. 5), dass viele

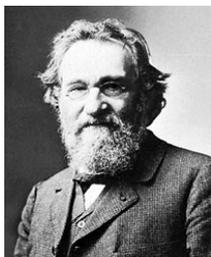


Abb. 5:  
Élie Metchnikoff

© Enzyklopedia  
Brittanica

Mikroorganismen einfach von bestimmten Zellen aufgenommen und zerstört werden konnten, die er nach dieser Fähigkeit *Makrophagen* nannte. Diese

waren auch ohne den vorher einmal bereits durchgemachten Kontakt mit einem Antigen<sup>1</sup> vorhanden.



Abb. 4:  
Shibasaburo  
Kitasato

© historiadelamedicina.  
Org

<sup>1</sup> Antigen leitet sich ab von *Generation* von *Antikörpern*.

Sowohl das Angeborene als auch das Adaptive Immunsystem hängen von der Funktion weißer Blutzellen, der Leukozyten, ab. Granulozyten und Makrophagen gehören zum Angeborenen Immunsystem. Die Antworten des Adaptiven Immunsystems werden durch Lymphozyten vermittelt. Zwischen Angeborenem und Adaptivem Immunsystem bestehen enge Interaktionen.

Beide, Angeborenes und Adaptives Immunsystem, haben die wichtige Funktion, Körpereigenes von Körperfremdem zu unterscheiden und das Körperfremde effektiv durch Zusammenspiel vieler Faktoren zu bekämpfen.

### **1.1.2. Die Komponenten des Immunsystems:**

Die Zellen des Immunsystems leiten sich aus einer pluripotenten hämatopoietischen Stammzelle ab (Abb. 6). Die Reifung der Stammzellen zu ihren Tochterzellen findet im Knochenmark statt, wo auch einige der Immunzellen ihren Reifeprozess vollenden. Aus der myeloiden Stammzelle entwickeln sich die Granulozyten, Makrophagen, Dendritische Zellen (DCs) und Mastzellen. DCs dienen der Präsentation von Antigenen für Lymphozyten und deren Erstaktivierung (T-Zell-Priming).

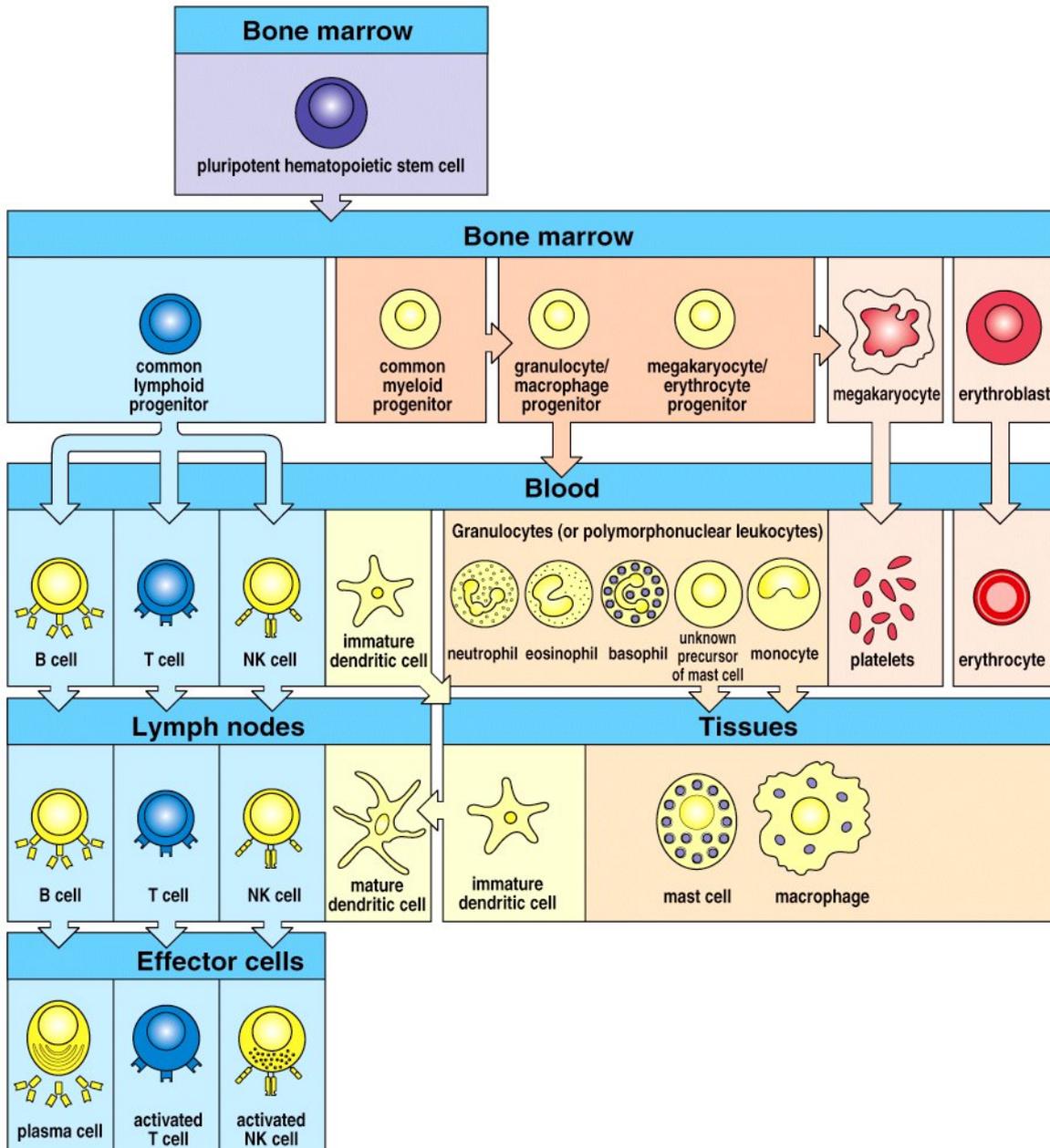


Abb. 6: Hämatopoiese  
 aus: Janeway: Immunobiology 6<sup>th</sup> Edition, © Garland Publishing 2005

Die lymphoide Progenitor-Zelle ist die Vorläuferzelle für die B<sup>2</sup> (die sich zu Antikörper produzierenden Plasma-Zellen ausdifferenzieren können) und T<sup>3</sup>Lymphozyten.

<sup>2</sup> B-Zellen: B steht für **B**ursa Fabricii, einem lymphoiden Organ, das bei Vögeln vorkommt.

<sup>3</sup> T-Zellen: T steht für **T**hymus

B- und T-Zellen entstehen im Knochenmark, ihre Reifung findet aber an unterschiedlichen Orten statt. B-Zellen reifen am Ort ihrer Entstehung. T-Zellen wandern aus dem Knochenmark in den Thymus, um dort zu reifen.

Das Knochenmark und den Thymus verlassen kleine, naive Lymphozyten, die noch keinen Kontakt mit einem für sie potentiellen spezifischen Antigen gehabt haben.

Die immunkompetenten Zellen zirkulieren im Blut und in einem hoch spezialisierten Gefäßsystem, dem Lymphatischen System. Zum Lymphatischen System gehören die Milz, die Lymphgefäße (oder Lymphbahnen) und die Lymphknoten. Die Lymphozyten bewegen sich kontinuierlich in diesem System, in dem auch Antigene von der Eintrittsstelle primär in Makrophagen oder DCs in die Lymphknoten transportiert werden. Im Lymphknoten werden Antigene durch hoch spezialisierte Zellen wie reife DCs an die Lymphozyten präsentiert.

Lymphknoten sind hoch organisierte Strukturen, die sich an zentralen Stellen des Lymphgefäßsystems finden. Zu ihnen führt eine große Anzahl von Lymphgefäßen, die Flüssigkeit aus den Geweben aufnehmen. Mit dieser Flüssigkeit werden auch Antigen-präsentierende Zellen und Antigene von durch Viren oder Bakterien infizierten Geweben zu den Lymphknoten gebracht. Lymphknoten dienen somit als Filterstationen für die Lymphe auf deren Weg zurück ins Blut der Vena cava superior.

In den Lymphknoten gibt es bestimmte Bereiche, in denen sich die einzelnen Immunzellen finden. So findet man die B-Zellen in den Follikeln, während T-Zellen eher diffus über die Randbereiche des Lymphknotens, den so genannten T-Zell-Zonen, lokalisiert sind. Einige der Follikel haben Keimzentren, wo B-Zellen einer immensen Proliferation unterliegen, nachdem sie mit ihrem spezifischen Antigen und ihren T-Helfer-Zellen in Kontakt gekommen sind.

Dendritische Zellen, die in der Peripherie Antigenkontakt hatten, es aufgenommen haben und Fragmente davon nun an der Oberfläche präsentieren, wandern in die Lymphknoten ein, wo sie die Erst- oder Reaktivierung antigenspezifischer T-Lymphozyten induzieren [Kupiec-Weglinski et al. 1988].

Im Laufe der Evolution hat sich dieses Immunsystem der Vertebraten zu einem komplexen Zusammenspiel vieler Abwehrmechanismen entwickelt, deren zwei Hauptsysteme das Angeborene Immunsystem und das Adaptive Immunsystem sind.

### **1.1.3. Das Angeborene Immunsystem:**

Die angeborene Immunität ist für die akute, von einem früheren Kontakt mit einem Pathogen unabhängigen Erkennung von Krankheitserregern zuständig, die durch die natürlichen Barrieren des Organismus, wie die Epithelien von Haut und Schleimhäuten, eingedrungen sind.

Die angeborene Immunität kann auch Pathogene erkennen, mit denen der Körper früher noch nicht in Kontakt gekommen ist, das heißt sie kann diese bereits beim ersten Kontakt eliminieren. Das angeborene Immunsystem bedient sich dabei humoraler und zellulärer Faktoren.

Zu den humoralen Faktoren gehören Substanzen, wie zum Beispiel Verdauungsenzyme (Lysozym, griech. λυσεω: lösen) oder die mehr als 20 verschiedenen Proteine des Komplementsystems, die bakterizid wirken und zur Elimination körperfremder Zellen führen können. Bei viralen Infektionen sind die Interferone wirksame Komponenten der humoralen Abwehr.

Das Komplementsystem verstärkt die Opsonierung von Bakterien durch Antikörper, kann aber auch ohne Beteiligung von Antikörpern Bakterien zerstören. Es besteht aus einer größeren Anzahl von Plasmaproteinen, die in einer bestimmten Kaskade aktiviert werden und so zur Zerstörung von Bakterien führen. Einige dieser Proteine sind Proteasen, die ihrerseits durch proteolytische Spaltung aktiviert werden. Diese Proteine nennt man Zymogene. Sinn des Komplementsystems ist es, Interaktionen mit Pathogenen einzugehen, um diese für die Aufnahme durch Phagozyten zu markieren. Es gibt zwei verschiedene Wege, das Komplementsystem zu aktivieren, die sich jeweils im auslösenden Faktor unterscheiden. So wird der so genannte „Klassische Weg“ durch Antikörper-Antigen-Komplexe ausgelöst, während der „Alternative Weg“ durch Kontakt mit der Oberfläche von Pathogenen, der „MB-Lectin Weg“ durch Lectin, das an Oberflächen von Pathogenen gebunden wird, aktiviert werden [Frank and Fries, 1991; Tomlinson 1993].

Die Infektion von Zellen durch ein Virus führt zur Ausschüttung von Interferonen. Interferone inhibieren die Replikation von Viren. Diese Stoffe tragen den Namen „Interferone“, weil sie bei *in vitro* Experimenten mit der Replikation von Viren „interferiert“ hatten. *In vivo* haben sie den gleichen Effekt. Sie blockieren die Ausbreitung von Viren auf uninfizierte Zellen [Bogdan 2000].

IFN $\alpha$  ist eigentlich eine Gruppe eng verwandter Proteine. IFN $\beta$  ist hingegen das Produkt eines einzigen Gens. Beide werden von unterschiedlichen Zelltypen synthetisiert, wenn diese durch ein Virus infiziert sind. IFN $\alpha$  wird von Lymphozyten [Andreotti and Cresswell 1981], IFN $\beta$  von Fibroblasten gebildet. Man glaubt, die Interferon-Produktion sei eine Folge der Anwesenheit doppelsträngiger RNA, weil synthetische doppelsträngige RNA eine Produktion von Interferonen zur Folge hat [Balachandran et al. 2000].

Doppelsträngige RNA kommt normalerweise in Säugetierzellen nicht vor, ist aber elementarer Bestandteil einiger Viren. Sie wird durch sogenannte *Pattern Recognition Receptors* auf der Oberfläche bestimmter Zellen des Immunsystems erkannt (siehe unten).

Einmal von der infizierten Zelle ausgeschüttet binden die Interferone an den Interferon-Rezeptor der infizierten und der umliegenden Zellen. Bindung an diesen Rezeptor führt zu einer starken Induktion von Proteinen der Wirtes, die die Virusreplikation hemmen können. Zusätzlich aktivieren die Interferone die zelluläre Immunantwort gegen das Pathogen [Durbin et al. 2000]. Die Antwort des Adaptiven Immunsystems hängt von der effektiven Präsentation von Peptiden, die Bruchstücke von Antigenen sind, auf beiden Klassen der MHC Moleküle an der Zelloberfläche ab. Die Interferone unterstützen dies, indem sie eine verstärkte Expression von MHC Molekülen induzieren [Kadowaki et al. 2000].

Interferone aktivieren außerdem Natürliche Killerzellen (NK-Zellen), damit diese Virus infizierte Zellen töten und Zytokine sezernieren. NK-Zellen besitzen keine adaptierten antigen-spezifischen Rezeptoren. Sie sind zwar nicht in dem Sinne unspezifisch, weil sie durchaus bestimmte Strukturen, die nicht dem Selbst zuzuordnen sind, erkennen können. Somit gehören sie zum Angeborenen Immunsystem. Es ist nicht geklärt, was sie dazu befähigt, zwischen

körpereigenem und körperfremdem Material zu unterscheiden. Es ist auch nicht bis ins Letzte geklärt, welche Antigene sie aktivieren und welche physiologische Rolle sie wirklich haben [Biron et al. 1999; Salazar-Mather et al. 2000; Kronenberg 2005]. Ältere Studien hatten die Hypothese aufgestellt, dass NK-Zellen diejenigen Zellen gezielt abtöten, die keine MHC-I-Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimierten, also letztlich ein Fehlen von Selbstmerkmalen aufwiesen. Neuerdings wird darüber diskutiert, dass wohl ein sehr komplexes System von Rezeptoren und Liganden, wie zum Beispiel NKG2D und seine Liganden MICA und MICB, für die Aktivierung dieser Zellen verantwortlich sind [Bauer et al. 1999]. NK-Zellen produzieren Zytokine, die für die Vermittlung verschiedener Immunantworten und pathogener Prozesse verantwortlich sind. Sie beeinflussen damit die Funktion von Dendritischen Zellen und anderen Zellen der adaptiven spezifischen Abwehr [Kronenberg 2005].

Interferon- $\gamma$  ist ein Sonderfall der Gruppe der Interferone. IFN $\gamma$  wird von zytotoxischen CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten [Wang et al. 2000], sowie von NK-Zellen [Handa et al. 1983] gebildet. Es inhibiert direkt die Virusreplikation und induziert eine erhöhte Expression von MHC Klasse I und anderen Molekülen, die an der Bindung von Peptiden an MHC Klasse I Moleküle beteiligt sind [Wedgwood et al. 1988]. Dadurch wird die Chance erhöht, dass infizierte oder mutierte Zellen als Zielzellen durch Komponenten des Immunsystems erkannt werden können. IFN $\gamma$  aktiviert zusätzlich Makrophagen und lockt sie an die infizierte Stelle [Kleinschmidt et al. 1982]. Makrophagen fungieren hier als Effektoren und Antigen präsentierende Zellen (APCs). Diese Aktivierung von Makrophagen durch IFN $\gamma$  ist der zentrale Punkt in der Immunantwort des Wirtes bei Infektionen mit *Toxoplasma gondii* [Meraz et al. 1996]. IFN $\gamma$  senkt außerdem sekundär die Tryptophan-Konzentration in aktivierten Zellen und kann somit intrazelluläre Parasiten regelrecht durch Verhungern abtöten.

Den zellulären Teil der angeborenen Immunität bilden Granulozyten, Makrophagen, Monozyten, Mastzellen und die Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen). Auf der Oberfläche dieser Zellen gibt es Rezeptoren, die so genannten *Pattern Recognition Receptors* (PRRs), die bestimmte konservierte Struktur motive auf der Oberfläche von Mikroorganismen erkennen können, die

auf den Zellen von Eukaryonten nicht zu finden sind [Janeway 1989; Ezekowitz et al., 1990; Gordon, 1995; Medzhitov and Janeway, 2000; Aderem and Ulevitch, 2000]. Wenn diese Zellen ein solches Antigen erkannt haben, können sie es phagozytieren und den Organismus durch die Ausschüttung von Zytokinen in einen generellen Alarmzustand versetzen. Diese Zytokine sind inflammatorische Mediatoren, die eine Entzündungsreaktion auslösen [Aderem and Underhill, 1999].

Im Zuge dieser allgemeinen Immunreaktion kommt es schließlich auch Aktivierung des Adaptiven Immunsystems.

#### **1.1.4. Das Adaptive oder spezifische Immunsystem:**

Im Unterschied zur angeborenen Abwehr ist das Adaptive Immunsystem nicht von Geburt an vorhanden. Vielmehr entwickelt es sich im Laufe des Lebens eines Organismus durch Kontakt mit Pathogenen und Antigenen, die in Wechselwirkung mit dem Organismus treten. Das Adaptive Immunsystem wird daher auch als „erworbene Immunität“ bezeichnet. Die gesamte adaptive Immunantwort und ihre antigenspezifische selektive Wirkung basiert auf dem Prinzip der klonalen Selektion antigenspezifischer Zellen. Durch diese Lernprozesse entwickelt sich ein immunologisches Gedächtnis, das bei erneutem Eindringen oder Vorkommen eines Patho- oder Antigens es erneut erkennt und somit den Körper gegen eine erneute Infektion schützt.

Während die Zellen des Angeborenen Immunsystems Pathogene über eine bestimmte Zahl von keimbahnkodierten Rezeptoren erkennen, erkennen die Zellen der spezifischen Abwehr Antigene mittels einer Vielzahl hochspezifischer Rezeptoren. Diese Antigenrezeptoren (T-Zell-Rezeptoren, B-Zell-Rezeptoren, bzw. Antikörper) gehören zur Superfamilie der Immunglobuline und entstehen durch somatische Rekombination von keimbahnkodierten Genfragmenten [Tonegawa 1983; Tonegawa 1988; Tonegawa 1988 b; Davis and Bjorkman, 1988]. Im Falle von Antikörpern gibt es eine Vielfalt von  $10^{11}$  Antigenspezifitäten [Tonegawa 1983].

Zentrales Prinzip des Adaptiven Immunsystems ist die klonale Selektion von Lymphozyten [Burnet 1959]. Diese Theorie besagt zum einen, dass potentiell autoreaktive Lymphozyten durch klonale Deletion vernichtet werden; zum

anderen werden nur diejenigen Zellen, die einen für das vorliegende Antigen spezifischen Rezeptor tragen, selektiv zur Teilung aktiviert. Diese vermehren sich dann klonal. Die Zusammensetzung der Zellen des Adaptiven Immunsystems hängt also von den anwesenden Fremd- und Selbstantigenen ab, denen der Organismus ausgesetzt ist. Die spezifische Abwehr „adaptiert“ sich an die jeweilige Situation.

Die Adaptive Immunantwort beginnt nicht direkt mit einer Antwort ihrer zellulären beziehungsweise humoralen Komponente, sondern bedarf zuerst einer Aufnahme von Pathogenen in Dendritische Zellen (DCs). Sie nehmen im infizierten Gewebe Pathogene auf und präsentieren sie an ihrer Oberfläche. DCs sind die zentrale Verbindung zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem, weil sie durch Sekretion von Zytokinen beide Systeme stimulieren (siehe dazu das Kapitel „Dendritische Zellen“).

Wie auch das angeborene Immunsystem besteht die Adaptive Abwehr aus humoralen und zellulären Komponenten:

Die zelluläre Immunantwort wird durch T-Zellen vermittelt. T-Zellen erkennen Antigene als Peptide gebunden an so genannte *Major Histocompatibility Complexes* (MHC-Moleküle) [Zinkernagel and Doherty 1974; Falk et al. 1991]. Sie entwickeln sich nach Kontakt mit dem für sie spezifischen Antigenepitop, das auf APCs gezeigt wird, zu T-Effektorzellen. Die präsentierten Antigene können sich entweder von Pathogenen ableiten, die intrazellulär repliziert werden, wie zum Beispiel Viren oder Intrazelluläre Bakterien, oder die durch Endozytose aus der Extrazellularflüssigkeit aufgenommen wurden. T-Zellen erkennen intrazelluläre Pathogene anhand der auf der Oberfläche präsentierten Peptid-Fragmente, die an MHC-Molekülen (meistens an MHC Klasse I Moleküle) gebunden sind, die an die Zelloberfläche der antigenpräsentierenden Zelle gebracht und dort gebunden werden.

T-Effektorzellen werden aufgrund ihrer unterschiedlichen Oberflächenstrukturen und Funktionen in zwei Klassen eingeteilt. Die beiden Gruppen besitzen die Oberflächenmarker CD4 und CD8. Diese Strukturen waren schon bekannt, bevor man wusste, dass sie sich auch darin unterscheiden, welche Art von MHC-Molekülen sie erkennen. CD4<sup>+</sup> T-Zellen binden an MHC-Klasse-II-

Moleküle. Sie erkennen also Peptide, die an diese Klasse gebunden sind. CD8<sup>+</sup> T-Zellen binden an MHC-Klasse-I-Moleküle und erkennen die darauf gebundenen Antigenpeptide. Während der Antigen-Erkennung assoziiert sich das CD4- bzw. CD8-Molekül an der Oberfläche der T-Zelle mit dem T-Zell-Rezeptor und bindet dann an die unterschiedlichen Strukturen des MHC-Anteils des MHC-Peptid-Komplexes. Diese Bindung ist wichtig für die Aktivierung von T-Zellen. CD4 und CD8 sind also Co-Rezeptoren.

CD4 findet seine Bindungsstelle an der gleichen Untereinheit des MHC-Peptid-Komplexes wie der T-Zell-Rezeptor. Dadurch wird die Sensitivität der Erkennung eines Antigens erhöht. In diesem Fall benötigt eine T-Zelle etwa 100 Mal weniger Antigen zur Aktivierung [Gay et al. 1987].

Die Bindung von CD4 an das MHC-Klasse II-Molekül selbst ist sehr schwach. Es ist daher nicht klar, ob diese Bindung überhaupt zu einer Signaltransduktion ins Innere der T-Zelle ausreichen würde. Daher bildet CD4 Homodimere. So kann CD4 zwei MHC-Moleküle verbinden und so auch zwei damit verbundene T-Zell-Rezeptoren [Wu et al. 1997].

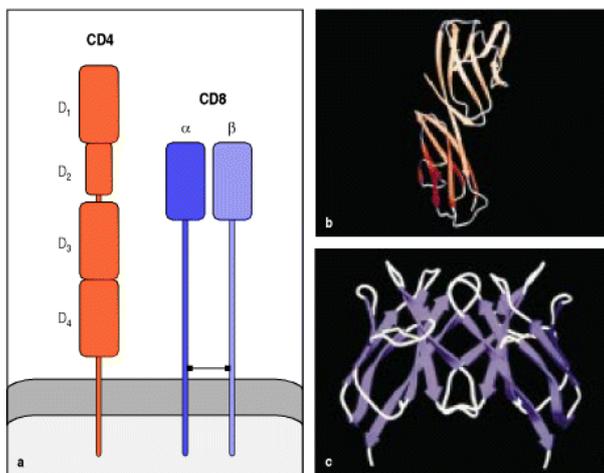


Abb. 7:  
Strukturen der CD4-  
und CD8-Moleküle:  
a + b: CD4  
a + c: CD8

aus: Janeway,  
Travers, Walport,  
Shlomchik:  
Immunobiology, 5<sup>th</sup>  
Edition

Beide, CD4  
und CD8, sind  
Co-  
Rezeptoren,  
unterscheiden  
sich (Abb. 7)  
aber sehr stark  
in ihrer Struktur  
[Hendrickson et  
al. 1992]. CD8

kann ebenso wie CD4 Homodimere bilden [Norment and Littman 1988].

CD8 bindet schwach an MHC Klasse I Moleküle. Die Bindungsstelle ist äquivalent zu der, an die CD4 bindet. Durch seine Bindung an das MHC-Molekül lässt CD8 die Oberfläche des Moleküls frei. Dort bindet dann der T-Zell-Rezeptor [Gao et al. 1997].

CD8<sup>+</sup>-T-Zellen entwickeln sich zu zytotoxischen T-Zellen (CTLs). Sie erkennen Antigen-Epitope wie oben beschrieben im Kontext von MHC-Klasse I-Molekülen. CD8<sup>+</sup>-T-Zellen können Zellen direkt abtöten, die virusinfiziert oder onkogen-transformiert sind [O'Rourke and Mescher 1992; Squier and Cohen 1994; Kägi et al. 1994]. CD4<sup>+</sup>-T-Zellen benötigen MHC-Klasse II-Moleküle für die Antigenerkennung und entwickeln sich zu T-Helferzellen vom Typ T<sub>H</sub>1 oder T<sub>H</sub>2 [Abbas et al. 1996]. Die Hauptaufgabe von T<sub>H</sub>1-Zellen liegt in der Aktivierung von Makrophagen und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen und in der Auslösung inflammatorischer Prozesse. T<sub>H</sub>2-Zellen aktivieren prinzipiell B-Lymphozyten und hemmen im Gegensatz zu T<sub>H</sub>1-Zellen die Entzündung.

Für den humoralen Aspekt der adaptiven Immunantwort sind B-Zellen zuständig. Diese nehmen Antigene über membranständige Antikörper (B-Zell-Rezeptoren) auf und können sie auf MHC II-Molekülen den T-Zellen präsentieren [Parker 1993]. Nachdem die B-Zellen durch T-Helfer-Zellen aktiviert worden sind, können sie weiter zu Plasmazellen differenzieren, die große Mengen an neutralisierenden und opsonierenden Antikörpern synthetisieren und freisetzen. Diese Antikörper schützen vor extrazellulären Pathogenen und Toxinen. Sie aktivieren das Komplementsystem auf dem klassischen Weg. Durch den Fc-Teil des IgG wird ebenfalls die Abtötung der Zelle, an die der Antikörper gebunden hat, durch NK-Zellen vermittelt, die den FC<sub>γ</sub>RIII-Rezeptor exprimieren und damit den Fc-Teil erkennen. Dieser Vorgang wird als *Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC)* bezeichnet.

#### **1.1.5. MHC-Genlocus:**

Der Genlocus der MHC-Moleküle liegt auf dem kurzen Arm des Chromosom 6 (6p21.33) und umfasst etwa 4 Millionen Basenpaare. In diesem Bereich wurden über 200 Gene identifiziert. Etwa 40% der Gene, die in diesem Bereich lokalisiert sind, codieren für andere immunologisch relevante Moleküle außer den MHC-Molekülen [The MHC sequencing consortium 1999].

Der MHC-Genlocus kann in drei Regionen für die drei Klassen (I-III) von MHC-Molekülen unterteilt werden.

In der Klasse-I-Region finden sich drei Gene für die schweren Ketten der MHC-I-Moleküle ( $\alpha$ -Ketten). Diese werden auch als HLA-A, -B und -C bezeichnet.

Die Klasse-II-Region codiert ebenfalls für drei Gene der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten von MHC-II. Diese drei werden als HLA-DP, -DQ und -DR bezeichnet. Der Genlocus für HLA-DR codiert meist für eine zweite  $\beta$ -Kette. Außerdem finden sich im Klasse-II-Locus noch Gene für diverse Chaperone und Proteasomuntereinheiten.

Die Klasse-III-Region codiert für Zytokine wie zum Beispiel TNF- $\alpha$ . Auf sie soll hier nicht näher eingegangen werden.

#### **1.1.6. MHC Klasse I und II Moleküle:**

Die beiden Klassen von MHC-Molekülen sind auf den Oberflächen von Zellen unterschiedlich verteilt. Diese Verteilung spiegelt die Effektorfunktionen von T-Zellen wieder, die die MHC-Moleküle erkennen.

Auf beiden Klassen von MHC-Molekülen werden Fragmente von Stoffwechselprodukten und aufgenommenen Pathogenen präsentiert. Der Mechanismus des *Antigen-Processings* ist sehr komplex und soll hier nicht näher dargelegt werden.

MHC-Klasse I-Moleküle präsentieren Peptide von Pathogenen (meist viraler Genese) an CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Diese zytotoxischen T-Lymphozyten (CTLs) sind hoch spezialisiert, genau dieses Antigen zu erkennen und die infizierte Zelle zu töten. Da Viren prinzipiell jede kernhaltige Zelle befallen können, sind MHC-I-Moleküle auf nahezu jeder kernhaltigen Zelle zu finden. Leberzellen exprimieren relativ geringe Mengen an MHC-I-Molekülen. Zellen ohne Zellkern, wie zum Beispiel die Erythrozyten der Säugetiere, exprimieren keine MHC-I-Moleküle. Eine Infektion, die das Innere von roten Blutzellen befällt, kann daher vom Immunsystem unbemerkt vonstatten gehen.

Im Gegensatz dazu ist die Hauptaufgabe von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, andere Zellen und Komponenten des Immunsystems zu aktivieren. Sie benötigen zur Aktivierung Peptide, die in der Bindungstasche von MHC-II-Molekülen verankert sind. Daher werden MHC-II-Moleküle normalerweise auf B-Lymphozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert. Sie finden sich nicht auf Zellen anderer Gewebe.

Die Expression beider Klassen MHC-Moleküle wird durch Zytokine reguliert, besonders durch Interferone. IFN $\gamma$  erhöht die Expression beider Klassen auf

den Zelloberflächen [Wedgwood et al. 1988] und kann auch dazu führen, dass MHC-II-Moleküle auf Zellen exprimiert werden, die normalerweise keine Moleküle dieser Klasse zeigen [Steimle et al. 1994] (siehe oben).

Durch genetische Variabilität entstehen verschiedene Arten von MHC-Molekülen, die jeweils individuell unterschiedlich sind. Man spricht hier vom MHC-Polymorphismus. Dieser Polymorphismus ist der am stärksten ausgeprägte im Genom des Menschen und der Maus überhaupt. Aufmerksam wurde man darauf, weil nach Transplantation von Knochenmark oder Organen diese vom Empfängerorganismus abgestoßen wurden [Snell 1964].

Auf dem MHC-Genlocus werden die verschiedenen Ketten der beiden Klassen von MHC-Molekülen kodiert (siehe oben). Die Loci haben eine hohe Variabilität, das heißt, es finden sich viele unterschiedliche Allele. Man findet für bestimmte Ketten mehrere hundert verschiedene Allele.

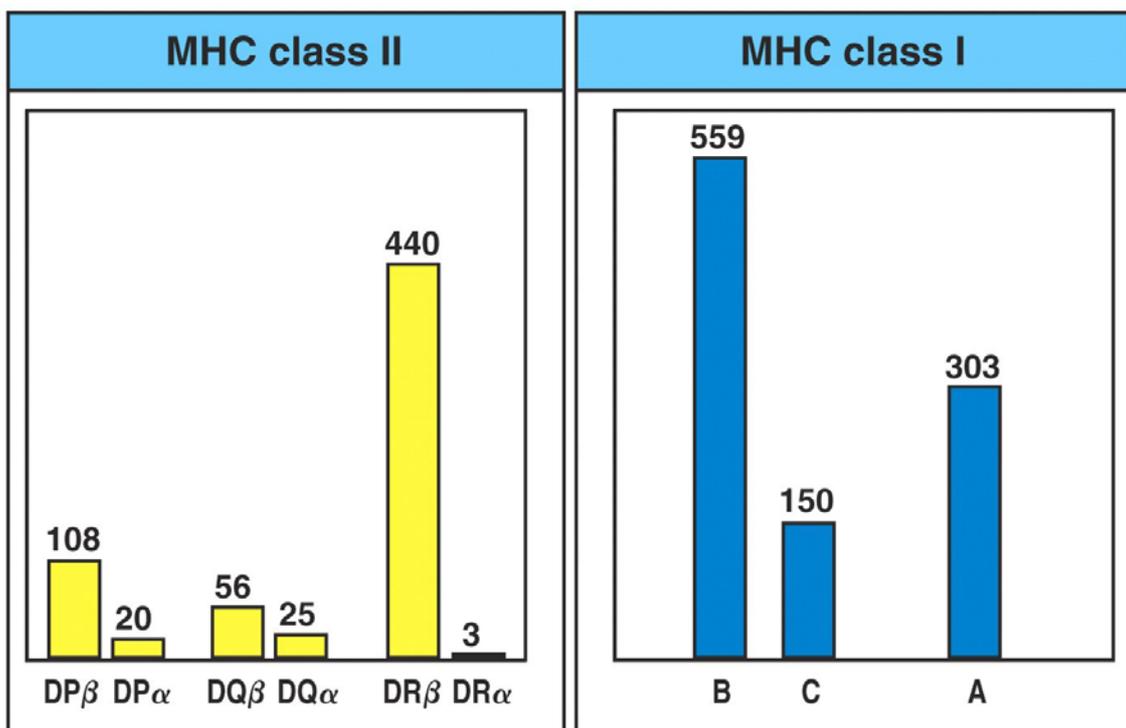


Abb. 8: Polymorphismus der MHC-Gene. Alle Loci haben eine große Anzahl verschiedener Allele. Einzige Ausnahme bildet der DR $\alpha$ -Locus, der funktionell de facto monomorph ist. Gezeigt werden die von der WHO 2004 veröffentlichten Zahlen der bekannten Allele pro Genlocus.

aus: Janeway: Immunobiology 6<sup>th</sup> Edition, © Garland Publishing 2005

Die dreidimensionalen Strukturen der beiden Klassen sind sich sehr ähnlich, wohingegen sie aus unterschiedliche Untereinheiten bestehen (Abb. 9 a+b).

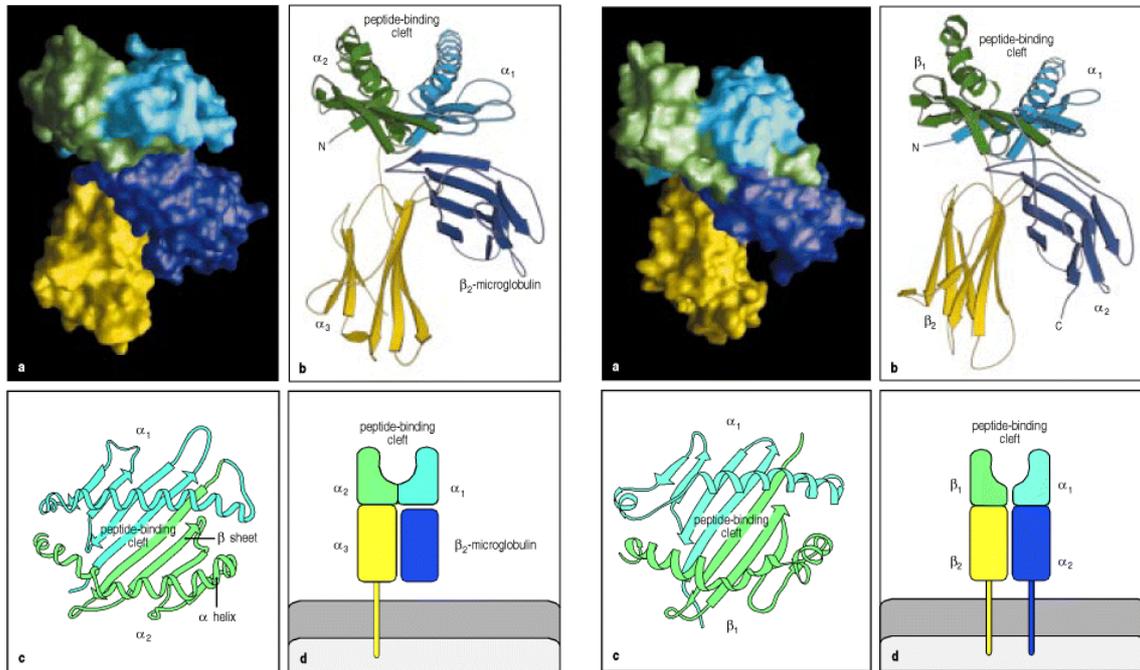


Abb. 9a: MHC-Klasse I

Abb. 9b: MHC-Klasse II

aus: Janeway, Travers, Walport, Shlomchik: Immunobiology, 5<sup>th</sup> Edition

aus: Janeway, Travers, Walport, Shlomchik: Immunobiology, 5<sup>th</sup> Edition

MHC-I besteht aus zwei Ketten aus Polypeptiden, einer längeren, schweren  $\alpha$ -Kette, für die im MHC-Gen codiert wird, und eine nicht kovalent gebundene leichte Kette, das  $\beta_2$ -Mikroglobulin, das nicht auf dem MHC-Gen-Locus codiert wird. Nur die  $\alpha$ -Kette hat eine Transmembrandomäne. Das gesamte Molekül hat vier Domänen, von denen drei von der  $\alpha$ -Kette, eine durch das  $\beta_2$ -Mikroglobulin gebildet wird. Die Untereinheiten  $\alpha_1$  und  $\alpha_2$  bilden die Peptidbindungstasche des MHC-Moleküls. Hier findet die Antigenpräsentation statt. Die Peptidbindungstasche bindet Peptide, die bestimmten Mustern unterliegen, das heißt die Peptide müssen bestimmte Ankeramino-säuren haben, die den Vorgaben für die Peptidbindung an das MHC-Molekül entsprechen [Falk et al. 1991; Rammensee et al. 1993]. Aufgrund dieser Gemeinsamkeiten können Liganden und Epitope der MHC-I-Moleküle vorhergesagt werden [SYFPEITHI 1991; Stevanovic and Rammensee 1994].

Die Peptide liegen meist in gestreckter Konformation in der geschlossenen Bindungstasche vor [Madden et al. 1993]. Aufgrund dieser Voraussetzungen ist die Länge der Peptide, die auf MHC-I-Molekülen präsentiert werden, auf acht bis zehn Aminosäuren beschränkt [Bouvier and Wiley 1994].

MHC-II-Moleküle bestehen aus zwei nicht kovalent gebundenen Ketten  $\alpha$  und  $\beta$ , die beide die Zellmembran durchziehen [Fremont et al. 1996; Dessen et al. 1997]. Beide sind im MHC-Gen-Locus codiert. Kristallographische Strukturanalysen zeigen eine dem MHC-I-Molekül sehr ähnliche Struktur. Der Hauptunterschied liegt in der Peptidbindungstasche, die beim MHC-II-Molekül deutlich weiter ist als bei der Klasse I. Das hat zur Folge, dass die Enden eines Peptides bei MHC-Klasse I in der Bindungstasche verschwinden [Fremont et al. 1992], bei MHC-Klasse II nicht. Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass die Bindungstasche bei MHC-Klasse II-Molekülen durch sowohl die  $\alpha$ - als auch die  $\beta$ -Kette gebildet wird. Aufgrund der offenen Konformation der Bindungstasche bei MHC-II-Molekülen können die Peptide dort deutlich länger sein. Ihre Länge ist außerdem sehr variabel und bewegt sich im Bereich zwischen 13 und 25 Aminosäuren [Srinivasan et al. 1993].

Um eine Immunantwort auszulösen, müssen die Peptide stabil an das MHC-Molekül gebunden sein. Außerdem müssen an ein MHC-Molekül viele verschiedene Peptide gebunden werden können [Madden et al. 1992].

Ein wichtiger Punkt der Peptidbindung an MHC ist die Tatsache, dass MHC-Moleküle ohne gebundenes Peptid instabil sind und ihre Stabilität erst durch die Peptidbindung erhalten. Wären MHC-Moleküle ohne gebundenes Peptid stabil, wäre eine Peptidbindung deutlich unwahrscheinlicher. Isoliert man MHC-Moleküle von den Zellen, sind immer noch die Peptide an das Molekül gebunden und können analysiert werden. Die Peptide können durch Denaturierung des Komplexes mit Säure vom MHC-Molekül getrennt und dann mittels Massenspektrometrie sequenziert werden [Hunt et al. 1981; Stern and Wiley 1994; Murthy and Stern 1997]. Dies kann entweder in einem Peptidpool geschehen, bei dem dann Überlappungen gesucht werden, oder – sehr viel aufwändiger – als Einzelsequenz von Peptiden.

### 1.1.7. Der ( $\alpha$ : $\beta$ ) T-Zell-Rezeptor:

Die Erkennung von MHC-gebundenen Antigenenfragmenten geschieht durch den T-Zell-Rezeptor. Jede einzelne T-Zelle exprimiert etwa  $3 \times 10^5$  identische dieser Rezeptoren an ihrer Oberfläche. Diese erkennen die (MHC:Peptid) Komplexe auf der Oberfläche der Zielzellen und überprüfen somit das exprimierte Peptid. Kommt es zu einer aktivierenden Bindung zwischen dem TCR und dem (MHC:Peptid) Komplex wird eine Signalkaskade in der T-Zelle aktiviert, die zur Antwort des Immunsystems führt.

Der T-Zell-Rezeptor besteht aus zwei Ketten, der  $\alpha$ -Kette (ca. 50 kDa) und der  $\beta$ -Kette (ca. 39 kDa). Somit wird ein heterodimeres Glykoprotein gebildet, das dem Fab-Fragment von Immunglobulinen ähnelt. Beide Ketten sind durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden.

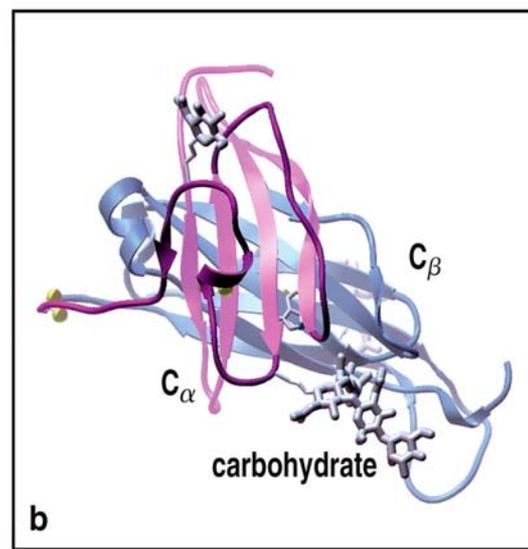
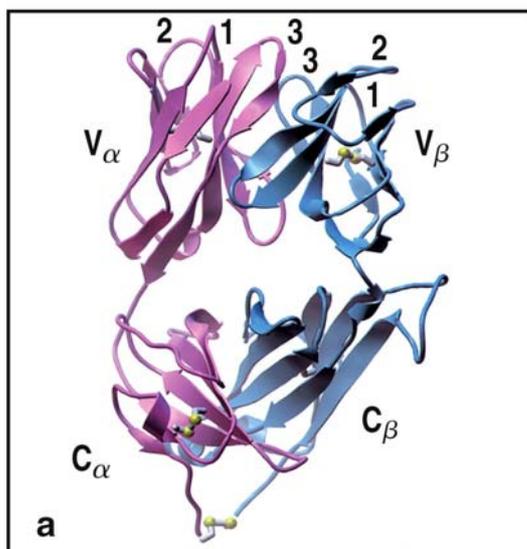


Abb. 10: Kristallstruktur des T-Zell-Rezeptors. Die Bilder a und b zeigen die  $\alpha$ -Kette in rosa, die  $\beta$ -Kette in blau. Disulfidbrücken sind grün eingezeichnet. Bild a zeigt den T-Zell-Rezeptor von der Seite, wie er auf der Zelloberfläche zu sehen wäre. Die CDR Loops (bezeichnet mit 1, 2 und 3) bilden die Antigenbindungsstelle und sind auf der relativ flachen Oberfläche des Rezeptors angeordnet. Auf Bild b werden die beiden konstanten Abschnitte des Rezeptors ( $C_\alpha$  und  $C_\beta$ ) gezeigt. Die Interaktion dieser beiden Domänen werden durch Carbohydrat unterstützt. Eine Zuckerseitenkette der  $\alpha$ -Domäne interagiert über Wasserstoffbrückenbindungen mit der  $\beta$ -Domäne.

aus: Janeway: Immunobiology 6<sup>th</sup> Edition, © Garland Publishing 2005

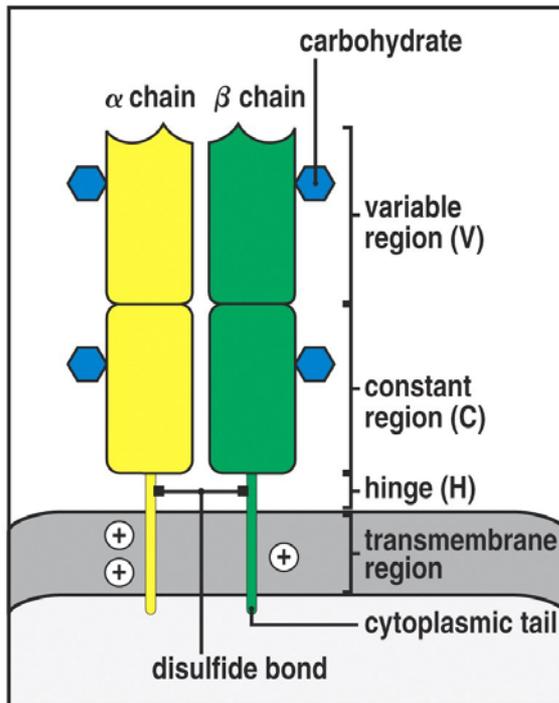


Abb. 11: Schematische Struktur des T-Zell-Rezeptors. Das Heterodimer des T-Zell-Rezeptors setzt sich zusammen aus zwei Glykoproteinketten, die die Transmembrandomäne bilden. Der extrazelluläre Anteil besteht aus zwei Domänen, bestehend aus konstanten (c) und variablen (v) Regionen. Beide Domänen haben Carbohydrat-Seitenketten. Die beiden Domänen werden durch eine Disulfidbrücke miteinander kovalent verknüpft.

aus: Janeway: Immunobiology 6<sup>th</sup> Edition, © Garland Publishing 2005

Eine kleine Anzahl von T-Zellen trägt einen anderen, aber strukturell ähnlichen Typ von T-Zell-Rezeptoren. Sie bestehen aus den Polypeptidketten  $\gamma$  und  $\delta$ . Diese  $\gamma:\delta$  Rezeptoren scheinen andere Eigenschaften in der Erkennung von Antigenen zu haben als die  $\alpha:\beta$  Rezeptoren. Die Funktionen der  $\gamma:\delta$  T-Zellen sind aber bis heute noch nicht vollständig geklärt. Zu ihren Funktionen gehören die frühe Abwehr von Infektionen [Janeway et al. 1988], die Regulation kutaner Entzündungen [Girardi et al. 2002], Epithelproliferation und Epithelersatz [Chen et al. 2002; Jameson et al. 2004]. Ihre Aktivierung wird wahrscheinlich durch Stoffe, die durch Streß induziert werden [Havran et al. 1991], einschließlich den beiden humanen MIC-Proteinen [Wu et al. 2002] getriggert.

Im Gegensatz zu B-Zell-Rezeptoren haben beide Typen von T-Zell-Rezeptoren nur eine Antigenbindungsstelle und werden nie sezerniert. Antikörper hingegen können freigesetzt werden.

Beide Ketten der T-Zell-Rezeptoren haben N-terminale variable Regionen und eine konstante Region. Diese Regionen sind denen auf einem Immunglobulin vergleichbar. Zwischen der konstanten Region und der Transmembrandomäne findet sich eine cysteinreiche Region, in der die Disulfidbrücke zwischen den beiden Ketten ausgebildet wird. Die Ketten durchziehen mit einer hydrophoben

Transmembrandomäne die Zellmembran und enden in einem kurzen zytoplasmatischen Schwanz.

Die Faltung der Ketten ergibt eine sehr ähnliche Struktur wie die von Immunglobulinen. Allerdings ist die endgültige Struktur insgesamt ein bisschen kürzer und breiter [Garboczi et al. 1996]. Wie bei Immunglobulinen gibt es zwei konstante ( $C_\alpha/C_\beta$ ) und zwei variable Regionen ( $V_\alpha/V_\beta$ ). Letztere sind für die Bindung an das (MHC:Peptid) Antigen verantwortlich.

Auf Ebene des Genoms werden die variablen (V-)Regionen durch V-/J-Elemente (V = variable; J = joining) kodiert. Diese werden bei  $V_\alpha$  durch ein drittes, das D-Element (D = diversity) getrennt [Rowen et al. 1996]. Zwischen diesen Segmenten findet eine beabsichtigte genetische Umlagerung statt. Durch diese Ungenauigkeit und die Tatsache, dass es mehrere V-, D- und J-Segmente gibt, entsteht eine große Variabilität von T-Zell-Rezeptoren. Diese Gesamtdiversität liegt bei etwa  $10^{18}$  verschiedenen Spezifitäten. Die genetische Umlagerung wird in ähnlicher Weise auch beim *Editing* der Antikörper beobachtet.

Da die C-Regionen des T-Zell-Rezeptors nicht mit dem Antigen interagieren, besteht hier keine Notwendigkeit einer großen Variabilität. Es gibt daher auch nur ein Gen für die Segmente  $C_\alpha$  und lediglich zwei Gene für  $C_\beta$ . Diese beiden Gene sind homologe und zeigen keine funktionelle Diversität.

Die Regionen, die wie bei Immunglobulinen nach der Umlagerung für die Spezifität des Rezeptors verantwortlich sind, werden als *Complementarity-Determining Regions* (CDR) bezeichnet. Die CDRs bilden Schleifen (sogenannte Loops) am N-terminalen Ende des TCR. Diese Schleifen werden mit den Zahlen 1-3 bezeichnet (CDR1, CDR2, CDR3). Die  $\beta$ -Kette bildet zusätzlich noch eine vierte Schleife (HV4).

Die Achse, mit der der ( $\alpha:\beta$ ) TCR an den (MHC:Peptid) Komplex bindet, verläuft entlang der CDR Schleifen diagonal. Die Hauptinteraktion wird durch HV4 vermittelt [Ding et al. 1998; Garcia et al. 1998]. Weniger variable Regionen des MHC-Moleküls interagieren mit den Schleifen CDR1 und CDR2.

Die wichtigste Wechselwirkung zwischen (MHC:Peptid) Komplex und dem TCR findet mit Seitenketten und dem Rückgrad des exprimierten Peptides statt. Unterschiedliche Konformationen des Peptides spielen hier eine zentrale Rolle. Der TCR alleine kann die Antigenerkennung nicht leisten. Er benötigt eine Reihe eng assoziierter Moleküle, die an seiner Oberflächenexpression und Signaltransduktion beteiligt sind. Diese Gruppe von Molekülen wird unter dem Namen *CD3 Komplex* subsummiert. Sie setzt sich aus CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$  und CD3 $\zeta$  zusammen. CD3 $\zeta$  bildet ein Homodimer. Je ein CD3 $\gamma$  oder ein CD3 $\delta$  bildet zusammen mit einem CD3 $\epsilon$  eine immunoglobulin-ähnliche extrazelluläre Domäne. Jede einzelne Kette trägt ein *immunoreceptor tyrosine-based activation motif* (ITAM) auf der zytosolischen Seite. Beim CD3 $\zeta$  Homodimer besitzt jede  $\zeta$ -Kette auf der zytosolischen Seite jeweils drei ITAMs. Dadurch ergibt sich eine Gesamtzahl von zehn ITAMs pro TCR [Malissen and Malissen 1996; Kersh et al. 1998].

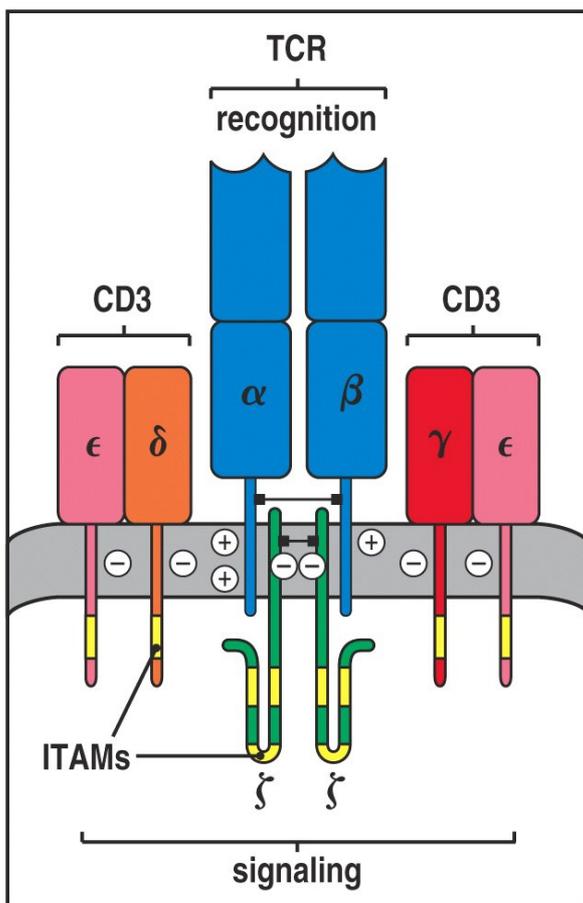


Abb. 12: Schematische Darstellung des T-Zell-Rezeptorkomplexes. Die drei Proteine des CD3 Komplexes  $\gamma, \delta, \epsilon$  besitzen eine extrazelluläre Domäne, die strukturell einem Immunglobulin gleicht, und ein intrazelluläres Signalmotiv (ITAM). Das  $\zeta$ -Protein des CD3 Komplexes besitzt intrazellulär drei ITAMs, die eine sehr flexible Signalgebung des T-Zell-Rezeptors ermöglichen.

aus: Janeway: Immunobiology 6<sup>th</sup> Edition, © Garland Publishing 2005

Die ITAMs haben wichtige Funktion in der Signaltransduktion der T-Zelle. Sie erfolgt durch Phosphorylierung dieser Domänen.

#### **1.1.8. Dendritische Zellen:**

Die Induktion einer Antwort des adaptiven Immunsystems beginnt mit der Aufnahme eines Pathogens in eine unreife Dendritische Zelle (DC). DCs sind spezialisierte phagozytische Zellen, die in den meisten Geweben vorkommen und relativ langlebig sind. Sie stammen von derselben Vorläuferzelle im Knochenmark ab wie Makrophagen. DCs wandern aus dem Knochenmark in die Gewebe, in dem sie als Hüter vor Pathogenen wirken. Wenn sie aktiviert sind, das heißt, ein Pathogen aufgenommen haben, migrieren DCs auch über das Lymphsystem in Lymphknoten, wo sie mit zirkulierenden naiven und antigenspezifischen T-Zellen über MHC-I- und -II-Moleküle und TCRs in Kontakt treten. Ist eine dendritische Zelle aktiviert, differenziert sie sich zu einer APC und exprimiert eine große Anzahl von Molekülen beider MHC-Klassen, die dann zur Differenzierung und Expansion von T-Zellen führt [Pulendran et al. 2001; Moser 2003] und Zytokine wie IL-12 oder Interferone sezerniert [Siegal et al. 1999, Cella et al. 1999], die dann sowohl das angeborene als auch das adaptive Immunsystem aktivieren.

Die unreife dendritische Zelle trägt auf ihrer Oberfläche Rezeptoren, die einheitliche Merkmale von Pathogenen erkennen können, wie zum Beispiel Proteoglykane der Bakterienzellwand. Mikroorganismen zeigen bestimmte Merkmale, die dazu führen, dass sie auch bei Erstkontakt als fremd erkannt werden können. Dazu gehören bestimmte repetitive Sequenzen ihrer Nukleinsäure und bestimmte Oberflächenstrukturen. Bakterien zeigen zum Beispiel unmethylierte repetitive Sequenzen des Dinukleotids CpG in ihrem Genom, Viren zeigen fast immer doppelsträngige RNA während ihres Lebenszyklus, die bei Säugetieren nicht vorkommt. Das angeborene Immunsystem erkennt solche Motive durch Rezeptoren. Diese Rezeptoren nennt man *pattern recognition receptors* (PRR) [Medzhitov and Janeway 2000]. Unreife DCs können außerdem extrazelluläres Material, wie zum Beispiel Viren, ohne Verwendung dieses Rezeptors durch Makropinozytose aufnehmen. Sie

dienen danach dem Transport in periphere lymphatische Organe und der Antigen-Präsentation an T-Lymphozyten.

Weitere Funktionen der DCs sind die Induktion von Toleranz in peripheren lymphatischen Organen [Stockinger 1999; Mellman and Steinman 2001; Steinman and Nussenzweig 2002; Steinman et al. 2003] und die Aktivierung von NK- und NKT-Zellen [Gerosa et al. 2002].

Diese Aufgaben von DCs sind vielfältig und teilweise konträr. Dies erklärt man sich mit dem *Konzept der funktionellen Plastizität*, das besagt, dass die gleiche Linie von DCs je nach Aktivierungsstatus und Entwicklungsstufe unterschiedliche Funktionen wahrnehmen kann [Kalinski et al. 1999; Liu et al. 2000; Shortman and Liu 2002].

### 1.1.9. Synaptische Verbindung zwischen T-Zellen und DCs:

T-Lymphozyten reagieren auf ein Fremdantigen, indem sie eine spezielle Verbindung mit antigen-präsentierenden Zellen eingehen. Da diese Verbindung wie ein neurologische Synapse funktioniert, wird sie *Immunologische Synapse* [Norcross 1984] oder *Supramolecular Activation Cluster (SMAC)* genannt [Monks et al. 1998]. Diese Synapse bildet sich direkt, wenn T-Zellen und APCs miteinander in Interaktion treten. Die Moleküle in der Synapse gruppieren sich in zwei Bereiche, in einen zentralen (cSMAC) und einen peripheren (pSMAC) Abschnitt [Monks et al. 1998].

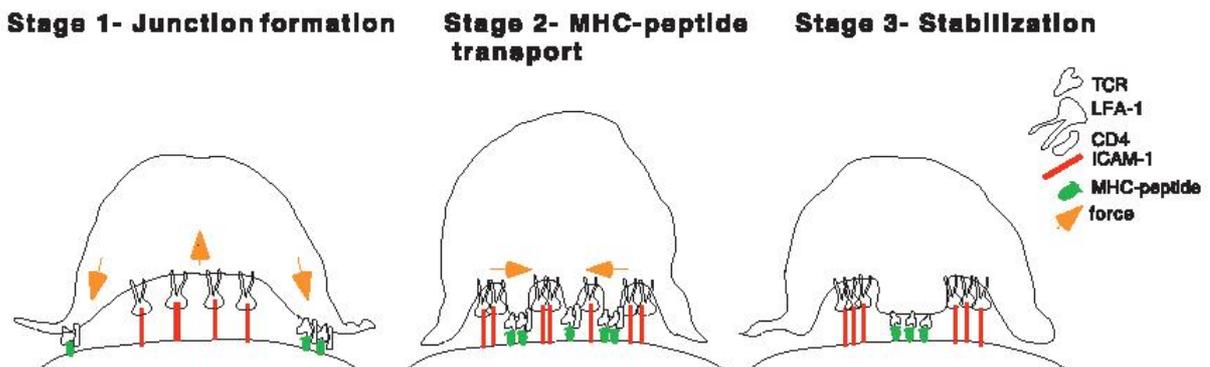


Abb. 13: Die Immunologische Synapse

aus: Grakoui et al. 1999

Die immunologische Synapse besteht aus einem zentralen Cluster von T-Zell-Rezeptoren und einem umliegenden Ring von Adhäsions-Molekülen [Grakoui et al. 1999]. Im cSMAC reichern sich TCR-CD3-Komplexe, MHC-Peptid-

Komplexe, CD4, CD28-CD80/CD86-Interaktionen, CD2-CD58-Komplexe (Cosignal-Moleküle für den T-Zell-Rezeptor) und intrazelluläre Signalmoleküle wie Lck, Fyn und ZAP-70 an. Um den cSMAC herum bildet sich ein Ring aus ICAM1 (CD54). ICAM1 interagiert mit LFA-1 (CD11a/CD18). Diese Interaktion zwischen beiden stellt den pSMAC dar [Grakoui et al. 1999; Bromley et al. 2001; Bromley et al. 2001b].

Im pSMAC findet die Adhäsion zwischen den beiden Zellen statt. Im cSMAC geschieht die Antigenpräsentation und Signalweiterleitung.

Anfänglich wird der Kontakt zwischen den beiden Zellen durch die Interaktion zwischen ICAM3 und seinem Liganden, sowie zwischen ICAM1 und LFA-1 hergestellt. Diese Interaktionen wandern im Laufe der Maturierung der Synapse in den pSMAC [Montoya et al. 2002; Grakoui et al. 1999].

Während des gesamten T-Zell-Primings, das heißt während der gesamten Interaktion zwischen reifen DCs und naiven T-Zellen, kommt es zur Ausbildung einer stabilen immunologischen Synapse. Diese Synapsen haben die gleiche Struktur wie die Synapsen, die sich bilden, wenn T- und B-Zellen miteinander interagieren [Benvenuti et al. 2004]. Ob sich diese Synapsen nur in Anwesenheit eines Fremdantigens [Benvenuti et al. 2004] oder sich auch in Abwesenheit eines Antigens bilden können [Revy et al. 2001], ist unklar. Die Wechselwirkungen, die in diesen Synapsen stattfinden, führen aber offensichtlich auch dann zu einer Signaltransduktion, wenn kein Fremdantigen gebunden ist [Kondo et al. 2001; Revy et al. 2001].

## 1.2. Alarmsignale des Immunsystems:

Viele Alarmsignale wirken über *Toll Like Rezeptoren*. Zur Beschreibung dieser Gruppe von Rezeptoren siehe Kapitel 1.1.8. „Dendritische Zellen“.

### 1.2.1. Hitzeschockproteine:

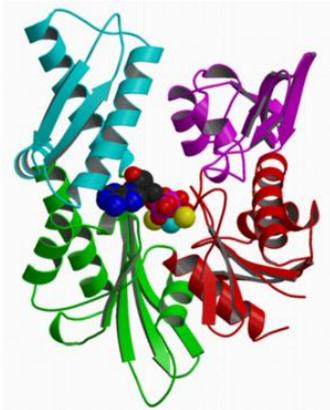


Abb. 14: Raumstruktur von HSP70 mit gebundenem Peptidfragment im Zentrum

© 2002 Dave McKay Lab, University of Stanford

Hitzeschockproteine sind Alarmsignale des Immunsystems, die in Stresssituationen an der Oberfläche von Zellen exprimiert oder systemisch ausgeschüttet werden (siehe unten).

Sie werden in sechs Familien unterteilt (HSP10, HSP40, HSP60, HSP70, HSP90 und HSP100) basierend auf ihrem jeweiligen Molekulargewicht. Jede Familie hat mindestens einen Vertreter, meist aber mehrere. Die HSP-Familien sind hoch konserviert in der Evolution. Manche dieser Proteine haben in Mikroorganismen ähnliche Verwandte. Daher kann es zu Kreuzreaktionen zwischen

Säugetieren und diesen Mikroorganismen kommen [Van Eden et al. 2005].

HSP70 bildet eine große Familie eng verwandter Proteine, die alle Chaperon-Aktivität besitzen. Proteine dieser Gruppe finden sich in allen Gruppen von Organismen [Young et al. 2004]. Bakteriell HSP70 liegt immer nur in einer Form vor. Eukaryonten hingegen besitzen mehrere homologe Formen. Diese verschiedenen Formen sind jeweils für bestimmte Zellorganellen spezifisch. HSP70-Homologe binden transient an ungefaltete Strukturen aus Polypeptiden.

HSP Familie	Vertreter in Säugetieren	Ort in der Zelle	Funktion	Mikrobiologische Homologe
HSP70	HSP70	Zytosol, Nucleus	Chaperon für wachsende Polypeptidketten, (Rück-)	DnaK (E. coli)
	HSC70	Zytosol, Nucleus	Faltung von Proteinen,	Ssa1, Ssa2, Ssa3, Ssa4 und Kar2 (S. cerevisiae)
	BiP (GRP78)	ER	Transport durch Membranen von Zellorganellen	
	mHSP70 (GRP75)	Mitochondrium		

Tab. 1: Vertreter der HSP70-Familie. Modifiziert nach Van Eden et al. 2005

Hitzeschockproteine aktivieren sowohl in Säugetieren als auch in Bakterien auf direktem Weg APCs [Srivastava 2002]. Dazu zählen sowohl Makrophagen als auch Dendritische Zellen. HSPs aktivieren diese Zellen durch Bindung an Oberflächenrezeptoren wie CD14 (LPS- und LBP-Rezeptor), CD40 (TNF-Rezeptor Superfamilie Mitglied Nr. 5), Toll-like-Rezeptoren und den Scavenger-Rezeptoren CD36 (Glykoprotein IV auf Thrombozyten), CD91 (Hitzeschockproteinrezeptor) und LOX1 (LDL-Rezeptor) [Binder et al. 2004; Delneste 2004].

Eine Besonderheit der Hitzeschockproteine ist, dass man spezifische T- und B-Zellen nachweisen kann, die gegen HSPs gerichtet sind, obwohl die Hitzeschockproteine ja eigentlich nicht körperfremd, sondern dem Selbst zuzuordnen sind. Solche Zellen finden sich nicht nur in Patienten mit chronischen Entzündungen, sondern auch in gesunden Individuen [Cohen 1991]. In diesen Fällen sind sowohl Antikörper als auch MHC-I- und MHC-II-restringierte T-Zell Reaktionen nachzuweisen. Es ist anzunehmen, dass diese T-Zellen, die für Hitzeschockproteine spezifisch sind, bestimmte Überlebenssignale erhalten müssen, um der Selektion im Thymus zu entgehen. Diese Mechanismen sind bislang unbekannt [Minter and Osborne 2003].

Im Tierexperiment konnte nachgewiesen werden, dass CD4<sup>+</sup> Zellen *in vitro* gegen APCs reagieren, die vorher mit hochkonservierten Sequenzen von bakteriellem HSP60 inkubiert wurden [Anderton et al. 1995]. Nach Expansion dieser T-Zellen wurden sie in Mäuse transferiert. Dies führte zu einem Schutz gegen Arthritis in diesen Mäusen. Es wurde gezeigt, dass die T-Zellen IFN $\gamma$ , IL-4 und IL-10 produzierten als Marker für die Aktivierung. Die Erkennung von HSP könnte bedeuten, dass diese Zellen eine immunregulatorische Funktion ausüben. In anderen Studien reagierten T-Zellen gegen APCs, die Hitzeeinwirkungen ausgesetzt waren [Durai et al. 2004].

Die Expression von Hitzeschockproteinen auf der Oberfläche von Zellen kann durch Stressfaktoren deutlich nach oben reguliert werden. Zu diesen Stressfaktoren zählen körperliche Betätigung, erhöhte Körpertemperatur (Fieber), Mangelernährung, vermehrter Einfluss entzündungsfördernder Mediatoren wie TNF and  $IFN\gamma$ , oxidativer Stress, eine Therapie mit nicht-steroidalen

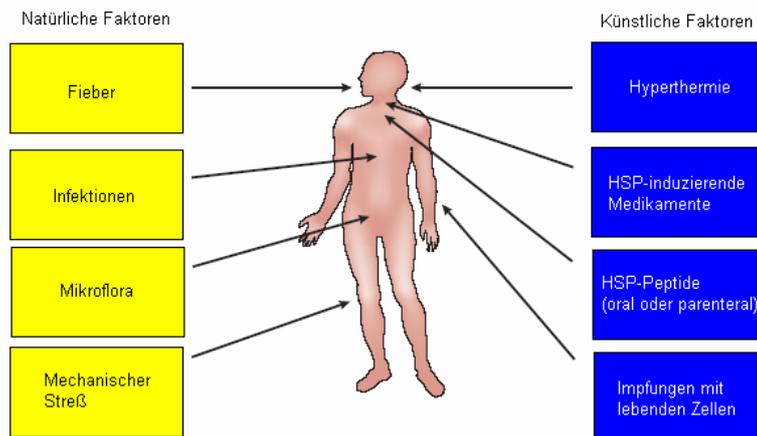


Abb. 15: Einflussgrößen der Freisetzung von Hitzeschockproteinen modifiziert nach van Eden et al. 2005

Antirheumatika und virale Infektionen [Kaufman 1990; Morimoto and Santoro 1998; Fink 1999; Naylor and Hartl 2001; Fehrenbach et al. 2001; Van Eden et al. 2005].

Erste Anzeichen für eine Beteiligung

von Hitzeschockproteinen in einer Entzündungsreaktion wurden bereits in den 80er Jahren des 20. Jahrhunderts beobachtet. Es wurde gezeigt, dass T-Zellen, die aus Ratten isoliert wurden, die an einer so genannten „Adjuvant induced arthritis“ litten, auf HSP60 aus Mykobakterien reagierten [Van Eden et al. 1988]. In neuen Studien wurde beschrieben, dass HSPs – speziell HSP60 und HSP70 – eine Gruppe von Autoantigenen bilden, die immunregulatorische Mechanismen auslösen, die Entzündungsreaktionen unterdrücken können, wie zum Beispiel die Rheumatoide Arthritis [Hogervorst et al. 1991], den juvenilen Diabetes mellitus [Caplen et al. 1990], Arteriosklerose [Xu et al. 1992] und bestimmte Allergien [Polla et al. 1993].

Hitzeschockproteine wirken aber nicht nur wie Zytokine [Tsan and Gao 2004], sondern können auch direkt Antigene präsentieren. Sie sind intrazelluläre Proteine, die in Stresssituationen auf MHC Klasse I Molekülen an der

Zelloberfläche für zytotoxische T-Lymphozyten präsentiert werden [Farkas et al. 2003].

Hitzeschockproteine, die aus Tumor- oder virusinfizierten Zellen hervorgehen, können eine Immunantwort auslösen. In Tumorpatienten wurden in der Population der Lymphozyten, die den Tumor infiltrieren (Tumor Infiltrating Lymphocytes, TILs) spezifische T-Zellen gegen Peptide, die aus Hitzeschockproteinen hervorgehen, gefunden [Faure et al. 2004].

Diese Eigenschaft wird der Tatsache zugeschrieben, dass HSPs mit Peptiden aus den Mutterzellen assoziiert sind. Diese Komplexe von HSP70 mit Peptiden können auch *in vitro* generiert werden. Ähnlich den MHC-Molekülen kann ein Hitzeschockprotein nur ein bestimmtes Peptid binden. Andere synthetisch hergestellte Peptide werden nicht gebunden. Auch die *in vitro* generierten Protein-Peptid-Komplexe sind immunologisch aktiv und können Immunantworten gegen den Tumor stimulieren und spezifische Antworten von CD8<sup>+</sup> Zytotoxischen T-Zellen induzieren [Blachere et al. 1997]. Hitzeschockproteine fungieren dabei als potente Adjuvantien in der Induktion von antigenspezifischen T-Zellen, wenn sie in Kombination mit Peptid-beladenen dendritischen Zellen gegeben werden [Wu et al. 2005]. Allerdings können Hitzeschockproteine allein nicht direkt T-Zellen *in vivo* primen. Vielmehr benötigen sie die Anwesenheit antigenpräsentierender Zellen [Udono et al. 1994]. Dies legt die Vermutung nahe, dass der Transfer von Peptiden aus Hitzeschockproteinen auf das MHC-Klasse I-Molekül in APCs stattfindet. Sowohl HSP70 als auch HSP60 werden ausschließlich in CD14<sup>-</sup>, TLR4<sup>-</sup> DCs, die sich aus Monozyten differenziert haben, über Rezeptor-vermittelte Endozytose internalisiert. Die genauen Mechanismen der Aktivierung von DCs sind allerdings bisher unbekannt [Lipsker et al. 2002].

HSP70 hat somit eine Doppelfunktion. Zum einen fungiert es als potentes Adjuvanz bei der Aktivierung von Dendritischen Zellen. Zum anderen spielt es eine wichtige Rolle im Transport von Peptiden.

### 1.2.2. Harnsäure:

Die Harnsäure (auch Purin-2,6,8-triol) ist das Endprodukt des

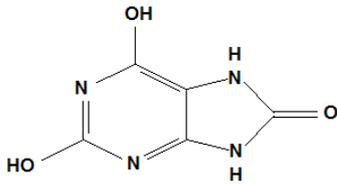


Abb. 16: Strukturformel der Harnsäure

© Wikipedia

Nucleinsäureabbaus bei Reptilien, Vögeln, Primaten und dem Menschen. Sie bildet weiße Kristalle. Harnsäure ist eine schwache Säure und nur sehr schlecht wasserlöslich, aber sehr gut in basischen Lösungsmitteln.

Harnsäure wird zu 75% renal eliminiert. Sie kann auch über Schweiß, Speichel und intestinale

Sekretion ausgeschieden werden. Dabei beträgt die tägliche Ausscheidung bis zu 1 g. Bei Störungen der Elimination kommt es zu Erkrankungen wie der Gicht, Harnsteinen oder Harnsäureinfarkten.

Die Harnsäure ist ein weiteres Alarmsignal für das Immunsystem. Sie wird von sterbenden Zellen ausgeschüttet und stimuliert die Reifung von Dendritischen Zellen und das Priming von CD8<sup>+</sup> T-Zellen [Shi et al. 2003].

Bei der Zerstörung größerer Tumormassen durch Zytostatika und ionisierenden Strahlen wird Harnsäure ins Blut abgegeben. Dort kann dann ein deutlich erhöhter Harnsäurespiegel gemessen werden.

### **1.3. Das Immunsystem bei Tumorerkrankungen:**

Krebs ist in der heutigen Gesellschaft ein immer größer werdendes Problem. Mit 25% aller Todesfälle ist Krebs schon die zweithäufigste Todesursache. Es gibt bis heute keine wirklich wirksame Therapie. Standardmäßig werden die Tumoren chirurgisch reseziert und mit Chemo- und Strahlentherapie vor- und nachbehandelt. Diese Therapien haben sehr viele Entwicklungen erfahren in den letzten Jahren, sind aber immer noch von schweren Nebenwirkungen, die die Lebensqualität der Patienten deutlich reduzieren, begleitet. Auch sind sie bei bestimmten Tumorarten nicht wirksam.

Ein Ziel experimenteller Immuntherapien ist es, eine Immunreaktion gegen den Tumor zu stimulieren und wie bei einer herkömmlichen Impfung, das Immunsystem zu lehren, die Tumoren zu erkennen, also zwischen wirklichem „Selbst“ und dem anormalen „Selbst“ der Tumoren zu unterscheiden [Coley 1893; Ehrlich, Pergamon, London 1956].

Tumorzellen sind keine körperfremden Zellen, sondern Zellen des Selbst, deren Genom aus verschiedenen Gründen mutiert ist. Sie ähneln daher dem Selbst und werden vom Immunsystem auch als solches erkannt. In Studien mit immundeprimierten Mäusen wurde keine erhöhte Tumorzinzidenz festgestellt [Stutman 1975]. Daraus wurde gefolgert, dass es wohl keine tumorspezifischen Abwehrmechanismen geben würde. Ebenfalls im Tiermodell hatte aber gezeigt werden können, dass Tumoren durchaus immunogen sind. Nach vorheriger Immunisierung mit Tumorzellen zeigte sich in den Mäusen, dass kein Wachstum der später implantierten Tumoren stattfand und dass zudem vermehrt tumorspezifische CTLs nachweisbar waren [Prenn and Main 1957; Klein et al. 1960].

Bei Untersuchungen von TILs wurde gezeigt, dass auch humane Zellen Tumorzellen erkennen und zerstören können [Itoh 1987; Topalian et al. 1989; Lee et al. 1999].

Die Überwachung von Tumoren durch das Immunsystem nennt man *Immune Surveillance* (Immunüberwachung) [Burnet 1967]. Metastasierung und unkontrolliertes Wachstum hängen offensichtlich stark davon ab, wie gut die Mechanismen sind, der Überwachung durch das Immunsystem zu entgehen.

Dass das Immunsystem aber überhaupt Tumorzellen erkennen kann, setzt voraus, dass auf deren Oberfläche Determinanten vorhanden sind, die immunogen sind.

Die maligne Transformation ist ein vielschichtiger Prozess. Sie ist eine Folge von Mutationen in Tumorsuppressor-Genen, Transkriptionsregulatoren, Proto-Oncogenen und anderen Genen, die für die Regulation der Proliferation und des Überlebens der Zellen zuständig sind. Außerdem kommt es zu einer breiten Veränderung von intrazellulären Proteinen [Fearon and Vogelstein 1990]. Das Proteom einer Tumorzelle unterscheidet sich also von dem einer gesunden Zelle. Diese veränderten Proteine, die immunogene Determinanten hervorbringen, die dann vom Immunsystem erkannt werden können, nennt man Tumorantigene. Abbauprodukte werden dann an den Zelloberflächen auf MHC-Molekülen präsentiert. Es gibt verschiedene Klassen von Tumorantigenen (siehe Tabelle). Stevanović hat innerhalb dieser unterschiedlichen Klassen Antigene definiert [Stevanovic 2002].

Klasse der Antigene	Beispiele
Cancer Testis Antigene	MAGE, BAGE, GAGE, NY-ESO-1, SSX
Differenzierungsantigene	Melan A / MART-1, Tyrosinase, gp100, CEA, NY-BR-1, rab38
Punktmutationen	$\beta$ -Catenin, MUM-1, CDK-4, p53, ras
Überexprimierte Antigene	Her2/neu, p53, MUC-1
Virale Antigene	LMP1, LMP2, HTLV-1

Tab. 2: Klassen der Tumorassoziierten T-Zell-Antigene mit Beispielen.

Modifiziert nach: Jager et al. 2003.

Diese Tumorantigene könnten prinzipiell vom Immunsystem erkannt werden [Itoh 1987; Rosenberg et al. 1988; van der Bruggen et al. 1991; Rosenberg et al. 1994]. Die Erkennung findet aber aus verschiedenen Gründen nicht oder nur sehr begrenzt statt:

Viele Tumorantigene sind gar keine mutierten Proteine, sondern normale Produkte des Zellstoffwechsels, die in der Tumorzelle gehäuft vorkommen, das heißt überexprimiert sind. Sie sind daher nur sehr schwach immunogen und damit nicht in der Lage, eine starke Immunantwort auszulösen. Die thymische Selektion bewirkt, dass das Immunsystem lernt, zwischen dem Selbst und dem

Nicht-Selbst zu unterscheiden. Diese überexprimierten Peptide werden also toleriert, weil sie vom Immunsystem als körpereigen erkannt werden.

Tumorzellen unterliegen zusätzlich einer starken genetischen Veränderung, so dass sich die Oberflächenstrukturen ständig mit verändern. Eine einmal vorhandene Immunantwort kann dadurch einfach wieder ausgelöscht werden [Boon et al. 1994]. In einigen Fällen kann es auch zu einem Verlust von MHC-Molekülen kommen, sodass keine Antigene mehr präsentiert werden können [Ferrone and Marincola 1995; Yee et al. 2000].

Manche Tumoren entgehen dem Immunsystem auch durch den Verlust von costimulatorischen Molekülen, sodass potentiell reaktive T-Zellen nicht aktiviert werden können [Harding et al. 1992]. Manche Tumoren sezernieren Zytokine wie VEGF [Gabilovich et al. 1996], TGF- $\beta$  [Tada et al. 1991] und IL-10 [Elgert et al. 1998] oder beeinträchtigen das Reifungspotential der Dendritischen Zellen [Gabilovich et al. 1998; Ishida et al. 1998; Shurin et al. 2002].

Weitere Studien haben gezeigt, dass auch regulatorische T-Zellen eine Rolle spielen, dass Tumoren dem Immunsystem entgehen [Sutmuller et al. 2001; Van Elsas et al. 2001].

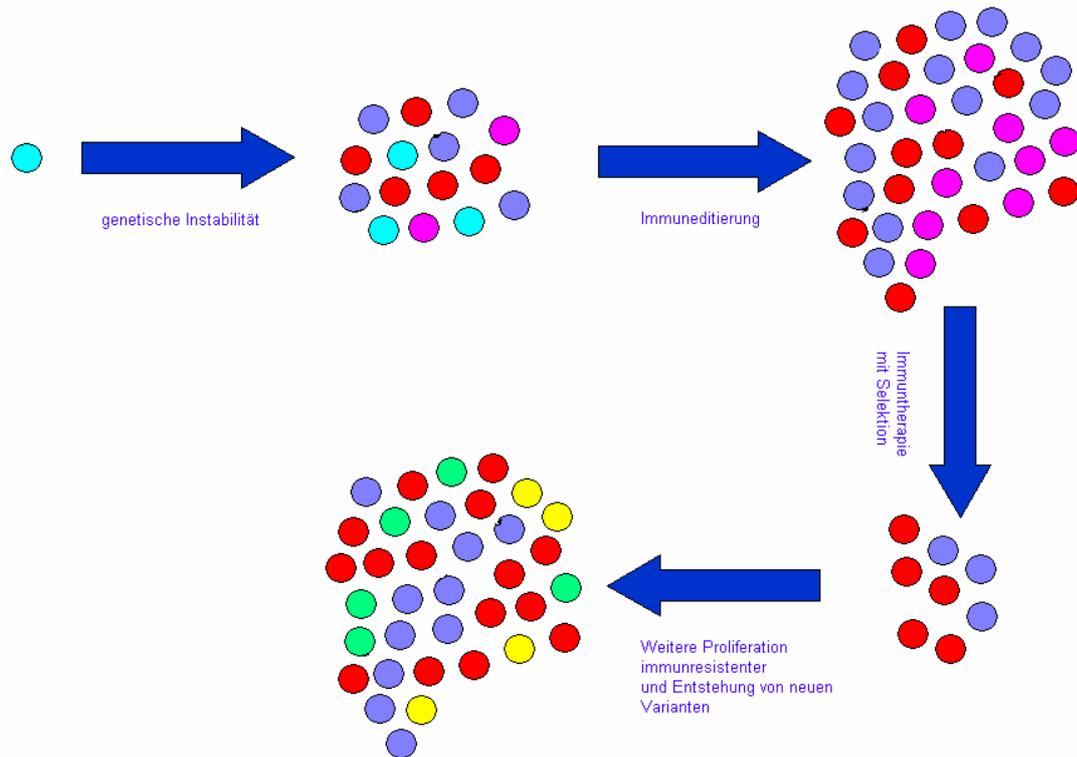


Abb. 17: Hypothese der Immuneditoring: Die unkontrollierte Zellteilung von Tumorzellen führt zu einer genetischen Variabilität von Tumorzellen. Die Überwachung durch das Immunsystem führt zur Elimination einiger Klone, andere Klone werden aber nicht erkannt und können weiter proliferieren. Durch Immuntherapien wird diese Selektion verstärkt, weil auch hier nur Zellen eliminiert werden, die bestimmte Antigene tragen. Die Klone, die nicht durch das Immunsystem erkannt werden konnten, können dann weiter ungehemmt wachsen. Dieser Mechanismus ist äquivalent zur Resistenzbildung gegen Antibiotika. (Abb. nach Khong and Restifo 2002).

Eine weitere Theorie, warum Tumoren dem Immunsystem entgehen, ist die der sogenannten Stromabarriere [Spitto et al. 2002]. Dabei gibt es eine der Basalmembran ähnliche Struktur, die den Tumor umgibt. Diese Membran verhindert die Infiltration immunkompetenter Zellen in den Tumor [Menon et al. 2003]. Auf der anderen Seite wird in anderen Studien beschrieben, dass es bestimmte Zytokine und Oberflächenmarker auf den Zellen des Stromas gibt, die eine verstärkte Infiltration von Lymphozyten in den Tumor erlauben würden.

Dazu zählen der TNFSF-14 [Yu et al. 2004] oder das Glycoprotein gp33 (KAVYNFATM) [Spiotto and Schreiber 2005].

Tumoren unterliegen einer steten Veränderung, das heißt ihre genetische Struktur ändert sich ständig und damit auch das Proteom der Zellen. So werden auch immer neu unterschiedliche Fragmente der Proteine auf der Zelloberfläche präsentiert. Während der Auseinandersetzung eines Tumors mit dem Immunsystem kommt es zu einer Selektion der Zellen, deren Oberflächenstrukturen vom Immunsystem nicht erkannt werden können. Dieser Prozeß wird als Immuneditierung [Dunn et al. 2002] bezeichnet. Aus diesem Grund kann das Ziel einer Immuntherapie sein, die Immunogenität eines Tumors zu erhöhen, beziehungsweise dafür zu sorgen, dass sie aufrechterhalten wird.

#### **1.4. Möglichkeiten der Immuntherapie:**

Heute schon werden Immuntherapien in der Klinik eingesetzt. Bei Tumoren sind dies meist passive Immuntherapien mit Antikörpern wie Herceptin gegen Her2/neu-Rezeptoren bei Mammacarcinomen [McNeil 1998], dem EGFR-Antikörper Cetuximab bei soliden Tumoren [Huang et al. 1999], dem monoklonalen Antikörper CAMPATH 1, der bei Lymphomen T- und B-Zellen durch Bindung an CD52 bindet [Hale et al. 1982; Hertenstein et al. 1995], oder dem anti-CD20 Antikörper Rituximab, der ebenfalls zur Therapie von Lymphomen eingesetzt wird [Anderson et al. 1997].

Aktive Immuntherapien wie zum Beispiel Impfungen haben in der Klinik auch schon lange ihren Platz.

Der Schwerpunkt der Forschung in Richtung Immuntherapien liegt darin, die Toleranz von T-Zellen zu durchbrechen und damit eine spezifische zytotoxische Antwort gegen den Tumor zu stimulieren.

Eine Möglichkeit ist dabei der Einsatz von Zytokinen wie IL-2 [Beldegrun et al. 1993; Bronte et al. 1995; McLaughlin et al. 1996] und IL-12 [Brunda et al. 1993; Rao et al. 1996]. Die Wirkung dieser Zytokine liegt in der Differenzierung und Proliferation von T-Zellen. Der Einsatz von Zytokinen kann entweder systemisch erfolgen, oder *in vitro* stimulierte TILs werden dem Patienten zurückgegeben [Dudley et al. 2002]. Neue Studien zeigen, dass eine Therapie mit diesen Zytokinen nicht so effektiv sein könnte wie Therapien, die auf eine Stimulation von NK- und NKT-Zellen abzielen [Smyth et al. 2005].

Der Einsatz von GM-CSF als Adjuvanz wurde ebenfalls als günstig beschrieben für die Verstärkung von antigenspezifischen Reaktionen [Disis et al. 1996]. GM-CSF wird daher heute in Vakzinierungsstudien mit Dendritischen Zellen zur Stimulation von CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen eingesetzt [Nencioni et al. 2003]. Im Gegensatz zu G-CSF, das nur die Ausdifferenzierung von Granulozyten stimuliert, ist GM-CSF an der Differenzierung verschiedener Zellen beteiligt. Besonders bewirkt GM-CSF eine Entwicklung von Vorläuferzellen zu Makrophagen. Außerdem hat GM-CSF eine stimulierende Wirkung auf bereits ausdifferenzierte Granulozyten und Makrophagen [Hamilton and Anderson 2004].

Weitere Möglichkeiten einer Immuntherapie liegen in der Applikation costimulatorischer Signale oder die Blockierung inhibitorischer Signale. Dazu werden Tumorzellen mit costimulatorischen Molekülen transfiziert [Townsend and Allison 1993; Townsend et al. 1994; Allison et al. 1995] und anti-CTLA-4 Antikörper zur Inhibition inhibitorischer Signale und somit einer Aktivierung von T-Zellen verabreicht [Leach et al. 1996; Kwon et al. 1997; Mokyr et al. 1998; Blank et al. 2005].

Es können auch anti-CD28-anti-Tumorantigen bispezifische Antikörper gegeben [Renner et al. 1994; Grosse-Hovest et al. 2003; Grosse-Hovest et al. 2004] oder entsprechende Fusionsproteine generiert werden [Marshall and Marks 2001]. Ein weiterer Zweig forscht an Endotoxinen von gram-negativen Bakterien. Dabei wird LPS systemisch appliziert [Engelhardt et al. 1990]. **William Coley** (1860-1918) beobachtete 1893, dass bei Tumorpatienten, die zusätzlich an einer bakteriellen Infektion litten, eine deutliche Regression der soliden Tumoren stattfand [Coley 1893]. Dies führte zu einer Behandlung mit Bakterien [Coley 1894]. Heute wird in klinischen Studien untersucht, welche Dosen verwendet werden können und welche Wege der Aktivierung des Immunsystems bei dieser Therapie eine Rolle spielen [Mackensen et al. 1991; Engelhardt et al. 1991; Finberg et al. 2004].

Wie oben beschrieben kann das Immunsystem mikrobiotische DNA anhand bestimmter Muster (den sogenannten CpG Motiven) über PRRs erkennen. Im Tiermodell wurde beschrieben, dass CpG DNA eine potentes Adjuvanz für die Tumorthherapie ist, weil es T- und B-Zell-Antworten induziert [Weiner et al. 1997; Chu et al. 1997]. Dies liegt daran, dass CpG DNA ein potentes Signal für Wachstum, Aktivierung und Reifung von Dendritischen Zellen ist [Hartmann et al. 1999]. Es gibt bereits auch eine Reihe klinischer Studien, die CpG als Adjuvanz für Vakzinierungstherapien verwenden [Speiser et al. 2005].

Einen großen Bereich in der Entwicklung von Immuntherapien stellt die Forschung an Krebsvakzinen dar. Sie wurde ermöglicht durch die Beschreibung des Cancer-Testis-Antigens MAGE Anfang der 90er Jahre [van der Bruggen et al. 1991]. Diese Krebsvakzinen bestehen aus Antigenpeptiden, die entweder alleine [Jaeger et al. 1996] oder in Kombination mit Zytokinen [Fallarino et al.

1999; Jaeger et al. 1996b; Tuting et al. 1998; Jaeger et al. 2000] appliziert werden.

Diese Applikation von Peptid alleine ist nicht der einzige Ansatz, an dem im Bereich der Vakzinen geforscht wird. Besonderes Augenmerk bekommen die Dendritischen Zellen als professionelle antigen-präsentierende Zellen, die von sich aus die Fähigkeit haben, T-Zellen zu primen und zu stimulieren. Sie werden mit tumorspezifischen Peptiden beladen oder mit tumorspezifischer RNA transfiziert [Brossart 2002]. Diese beladenen DCs werden dann subkutan unter die Haut des Patienten gegeben. In einigen Studien konnte nach dieser Therapie eine Tumorregression beobachtet werden [Nestle et al. 1998; Rosenberg et al. 1998; Thurner et al. 1999; Wiernecky et al. 2005]. Diese Regression war aber zeitlich nicht von Dauer. Eine vollständige Elimination der Herde konnte nicht beobachtet werden [Panelli et al. 2000; Panelli et al. 2000b]. Der Erfolg aller dieser Ansätze ist sehr limitiert. Die Gründe dafür könnten neben dem Auftreten immunresistenter Mutanten die ineffektive Aktivierung von T-Zellen sein [Yee et al. 2000]. Der Focus der Forschung lag bisher auf der Aktivierung von T-Zellen durch eine immer größer werdende Anzahl von tumorspezifischen MHC-I-restringierten Epitopen. MHC-II-restringierte Epitope sind in Immuntherapien bisher nur sehr selten eingesetzt worden [Brossart et al. 2000; Slingluff et al. 2001].

Langfristig muss die Tendenz dahin gehen, geeignete Adjuvantien zu finden [Yu et al. 2004; Spiotto and Schreiber 2005], um CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen gemeinsam zu stimulieren, weil CD4<sup>+</sup> Zellen wichtige Aktivatoren des Immunsystems sind [Topalian 1994; Wang 2001; Stevanovic 2002].

### 1.5. Das Nierenzellcarcinom (NZK, RCC)

Das Nierenzellcarcinom steht bei der Häufigkeit der Tumoren in der Bundesrepublik Deutschland bei Männern an 10., bei Frauen an 14. Stelle, das Verhältnis Männer : Frauen verhält sich 2:1 [Wechsel et al. 2000]. Jährlich erkranken bundesweit etwa 12.200 Menschen an einem Nierenzellcarcinom, was einer Inzidenz von 6-7 pro Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner pro Jahr entspricht. Die Tendenz dabei ist steigend [Wunderlich et al. 1998].

Risikofaktoren für die Entstehung des Nierenzellcarcinoms sind Nikotinabusus [Asal et al. 1988], Phenacetinabusus [Outzen and Maguire 1983] und der Genuss von entkoffeiniertem Kaffee [Goodman et al. 1986]. Diese in Tierexperimenten beschriebenen Risikofaktoren konnten am Menschen nicht verifiziert werden. Außer diesen exogenen Faktoren gibt es zusätzlich noch genetische Determinanten für die Entwicklung eines Nierenzellcarcinoms wie

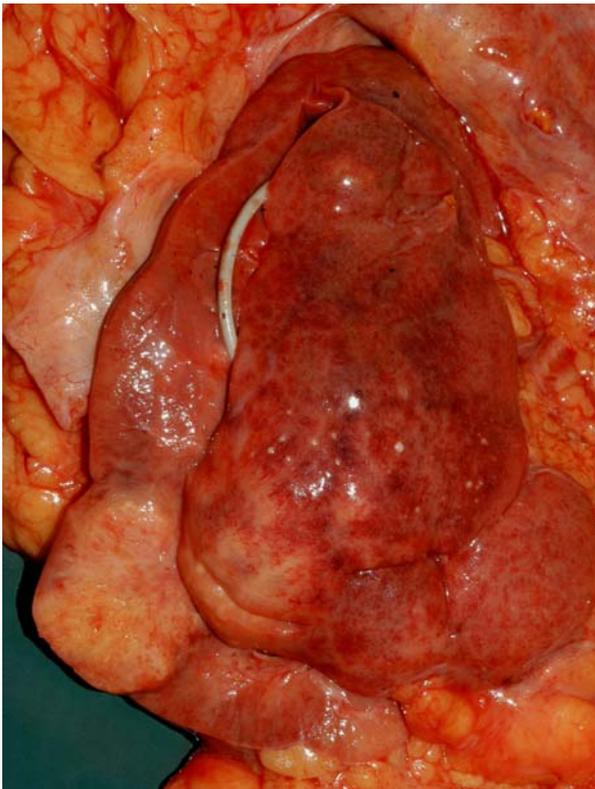


Abb. 18: RCC makroskopisch

© Dr. Heidemarie Kendziorra, Institut für Pathologie, Universität Tübingen

zum Beispiel die polyzystische Nierendegeneration und das von Hippel-Lindau Syndrom [Goodman et al. 1990].

Die Diagnose ist häufig ein Zufallsbefund. Die Patienten sind meist beschwerdefrei. Häufig machen erst die Metastasen Symptome. Bei der Suche nach dem Primärtumor wird dann ein Nierenzellcarcinom diagnostiziert. Zur Diagnosesicherung ist keine Biopsie notwendig. Die bildgebenden Verfahren sind so aussagekräftig, dass intraoperativ die Diagnose per Schnellschnitt bestätigt werden kann. Eine

Biopsie sollte sogar nicht erfolgen, da aufgrund der Heterogenität der Nierenzellcarcinome keine sichere Aussage erwartet werden kann [Wechsel et al. 2000].

In Ermangelung eines Tumormarkers kann die Frühdiagnose eines Nierenzellcarcinoms nur über regelmäßige renale Sonographie-Untersuchungen gestellt werden, die heute noch nicht Standard in der Vorsorge sind. Allerdings ist die Diagnoserate durch die weitere Verbreitung des Ultraschalls immer höher geworden und liegt heute schon bei 48% [Sweeney et al. 1996].

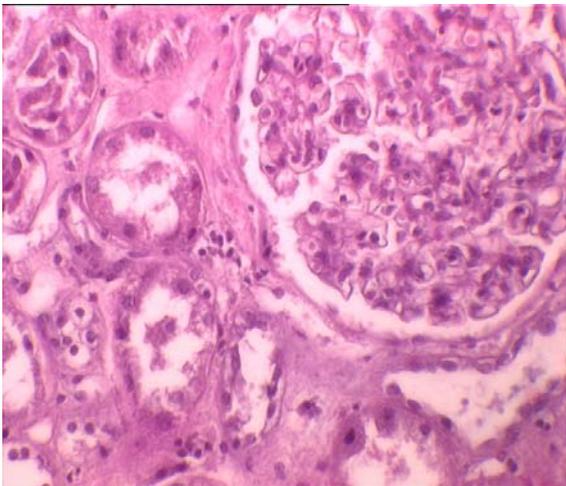


Abb. 19a: Histologie eines normalen Nierenparenchyms mit Glomerulum und Tubulusapparat.

© Jörg Hennenlotter, Universitätsklinik für Urologie, Tübingen

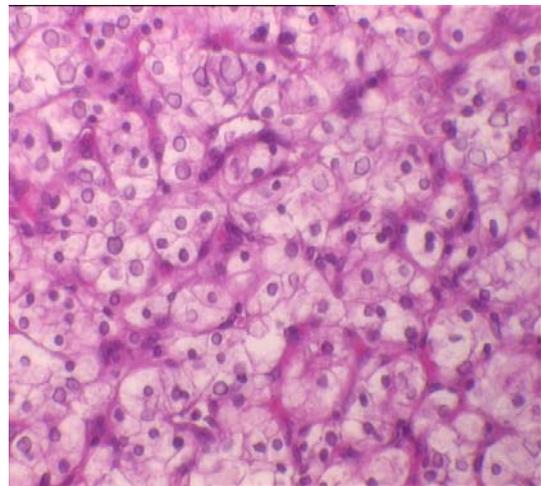


Abb. 19b: Histologie eines klarzelligen Nierenzellcarcinoms. Normale renale Strukturen sind nicht mehr zu erkennen.

© Jörg Hennenlotter, Universitätsklinik für Urologie, Tübingen

Wenn das Nierenzellcarcinom Symptome zeigt, ist eine Trias klassisch: Flankenschmerz, Hämaturie und tastbare Raumforderung. Diese kommen allerdings erst im höheren Tumorstadium vor. Nur in 3-10% der Fälle ist diese Trias vollständig ausgebildet. In 70% der Fälle findet sich mindestens eines dieser Symptome. Meist sind die Symptome unspezifisch wie Gewichtsverlust, Fieber oder Hypertonie [Wechsel et al. 2000].

Zum Zeitpunkt der Diagnose sind etwa 40% der Patienten in einem lokalisierten Stadium, 30% befinden sich in einem scheinbar lokalisierten Stadium mit metachroner Metastasierung. Weitere 30% weisen bereits zum Zeitpunkt der

Diagnose Fernmetastasen auf [Thrasher and Paulson 1993; Chan and Marshall 1998].

Die Einteilung des Nierenzellcarcinoms erfolgt nach histologischen Kriterien.

Subtyp	Häufigkeit	Beschreibung
Klarzelliges RCC	75%	Helles transparentes Zytoplasma im HE-Schnitt
Chromophilzelliges RCC	11%	Geht im Wesentlichen vom proximalen Tubulus aus, ebenso wie klarzellige Carcinome.
Chromophobzelliges RCC	5%	Dieses in erster Linie vom distalen Tubulus bzw. dem Verbindungsstück zwischen Metanephros und Ureterknospe ausgehende Carcinom zeigt sich im HE-Schnitt ebenfalls mit hellen und transparenten Zytoplasmen, die elektronenmikroskopisch auf der Ansammlung zahlreicher membranöser Vesikel im Zytoplasma beruht. Im Gegensatz dazu zeigt das klarzellige RCC elektronenmikroskopisch als Ursache der Transparenz des Zytoplasmas die Herauslösung von Glykogen und Fett.
Duct-Bellini-Carcinom	1%	Dieser insgesamt seltene Tumor geht von den Hauptzellen, insbesondere des medullären Sammelrohrs aus.

Tab. 3: Modifiziert nach Wechsel et al. 2000; Thoenes and Stoerckel 1991, 5% der Nierentumoren sind Onkozytome, die nicht als maligner Nierentumor angesehen werden.

Das Nierenzellcarcinom metastasiert pulmonal (55%), in Lymphknoten (34%) und Leber (33%). Zusätzlich gibt es Metastasen in Knochen (32%), die kontralaterale

Niere (11%), das Zentralnervensystem (6%) und das Herz (5%) [Wechsel et al. 2000].

Das Nierenzellcarcinom wird nach dem TNM-System und nach Robson wie folgt klassifiziert:

Robson	TNM	Beschreibung
I	T1, N0, M0	Tumor $\leq$ 2 cm (Robson) bzw. $\leq$ 4 cm (TNM) in seiner größten Ausdehnung, begrenzt auf eine Niere. Keine regionären Lymphknoten-, keine Fernmetastasen.
	T2, N0, M0	Tumor $\leq$ 2 cm (Robson) bzw. 4-7 cm (TNM) in seiner größten Ausdehnung, begrenzt auf eine Niere. Keine regionären Lymphknoten-, keine Fernmetastasen.
II	T3a, N0, M0	Tumor infiltriert Nebenniere oder perirenales Gewebe (Fettkapsel), aber nicht über die Faszie von Gerota hinaus. Keine regionären Lymphknoten-, keine Fernmetastasen.
IIIa	T3b, N0, M0	Tumor mit Ausbreitung in Nierenvene(n) oder Vena cava unterhalb des Zwerchfells. Keine regionären Lymphknoten-, keine Fernmetastasen.
	T3c, N0, M0	Tumor mit Ausbreitung in Vena cava oberhalb des Zwerchfells. Keine regionären Lymphknoten-, keine Fernmetastasen.
	T4, N0, M0	Tumor infiltriert über die Faszie von Gerota hinaus (Robson: ohne Beteiligung von Nachbarorganen) Keine regionären Lymphknoten-, keine Fernmetastasen.

IIIb	T1-3a, N1-2, M0	Metastase in einem oder mehreren regionären Lymphknoten. Keine Fernmetastasen.
IIIc	T3b-4, N1-2, M0	Veneninvasion zusammen mit regionären Lymphknotenmetastasen. (Kombination von Robson IIIa und IIIb)
IVa	T4, N1-2, M0	Organüberschreitendes Tumorwachstum mit Infiltration in Nachbarorgane.
IVb	T1-4, N1-2, M1	Fernmetastasen

Tab. 4: Klassifikation und Stadieneinteilung des Nierenzellcarcinoms.

aus Wechsel et al. 2000, nach Robson et al. 1969 und Holland 1973

Für die genetische Ursache der Entstehung eines klarzelligen Nierenzellcarcinoms ist Verlust von genetischem Material vom kurzen Arm auf



Abb. 20: Lebermetastasen eines RCC

Chromosom 3  
(Chromosom 3p25)  
verantwortlich. Dort  
liegt das von Hippel-  
Lindau-Gen, das an  
der Entstehung dieser  
Carcinom beteiligt  
sein könnte. Diese  
Genmutation wird in  
etwa 75% der  
sporadischen  
klarzelligen

© Dr. Heidemarie Kendziorra, Institut für Pathologie, Universität  
Tübingen

Nierenzellcarcinome  
gefunden [van

Houwelingen et al. 2005]. Es ist ein Tumorsuppressorgen. Das von Hippel  
Lindau Protein reguliert die Expression des Transkriptionsfaktors HIF-1  
(hypoxia inducible factor), der wiederum die Produktion von Erythropoitin und  
VEGF überwacht. Bei Bindung des von Hippel Lindau Proteins an HIF-1 wird

dieser degradiert. Bei Dysfunktion des von Hippel Lindau Proteins kann HIF-1 nicht weiter abgebaut werden. So kommt es zu einer verstärkten Produktion von VEGF, was ein weiteres Tumorwachstum begünstigt [Genbacev et al. 2001; Maranchie et al. 2002; Corn et al. 2003].

Weitere genetische Aberrationen werden diskutiert wie Trisomien der Chromosomen 7, 8, 12 oder 17, sowie der Verlust des Y-Chromosoms [Kovacs et al. 1991; Mirghomizadeh et al. 1999; Feil et al. 1999; Feil et al. 1999b]. Eine genetische Diagnostik des Nierenzellcarcinoms ist aber nur dann sinnvoll, wenn eine nachgewiesene genetische Belastung, das heißt ein deutlich gehäuftes Auftreten von Nierenzellcarcinomen in einer Familie vorliegt. Da nicht wirklich ein Gen bekannt ist, das sicher bei Mutation zu einem Nierenzellcarcinom führt, ist die Risikoabschätzung für folgende Generationen schwierig [Wechsel et al. 2000].

Eine präoperative Behandlung mit neoadjuvanter Chemotherapie, Bestrahlung oder Embolisation der Arteria renalis bewirkt beim Nierenzellcarcinom keinen klinischen oder operativen Vorteil. Die Standardtherapie der Nierenzellcarcinoms ist die radikal Tumornephrektomie, sofern die kontralaterale Niere gesund ist. Bei der Resektion werden Nebenniere und Nierenfettkapsel mit entfernt [Kozak et al. 1996]. Ist der Tumor nur zwischen 3 und 5 cm groß, solide und der Niere aufsitzend, kann trotz gesunder kontralateraler Niere auch nur eine Tumorenukleation durchgeführt werden, wenn ein Sicherheitsabstand eingehalten werden kann.

Neuere Studien haben gezeigt, dass sich bei fortgeschrittenem Nierenzellcarcinom (pT3) eine postoperative Strahlenbehandlung positiv auf die Überlebenszeit auswirkt [Stein et al. 1992; Kao et al. 1994]. Im palliative Setting sind eine Strahlenbehandlung und eine Nierenarterienembolisation angezeigt [Wechsel et al. 2000].

Das Nierenzellcarcinom gilt zusammen mit dem malignen Melanom als der Tumor des Menschen, der am meisten immunogen ist. Eine kleine Anzahl von Spontanremissionen wurde beobachtet. Es gibt auch eine kleine Gruppe von Patienten, die gut auf eine Therapie mit IFN $\alpha$  und IL-2 anspricht [Bukowski 2000]. Es ist bekannt, dass Nierentumoren immer von Zellen des

Immunsystems infiltriert sind, speziell von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen (TILs), die Eigenschaften aktivierter Lymphozyten zeigen [Angevin et al. 1997; Jantzer and Schendel 1998; Elsasser-Beile et al. 2000].

Tumorantigene sind beschrieben worden, die in Nierentumoren exprimiert werden. Einige davon werden natürlich auch auf anderen Tumoren detektiert (zum Beispiel Her2/neu, PRAME oder RAGE-1), andere sind mehr spezifisch für das Nierenzellcarcinom (zum Beispiel G250) [Neumann et al. 1998; Vissers et al. 1999; Grabmaier et al. 2000]. Gegen diese Tumorantigene kommen Antworten *in vivo* vor. Antigenspezifische Zellen können dabei entweder im peripheren Blut [Gaugler et al. 1996; Kawagoe et al. 2000] oder in TILs nachgewiesen werden [Probst-Kepper et al. 2001].

Darüberhinaus wurde gezeigt, dass die meisten Patienten Antikörper gegen Strukturen der Tumorantigene bilden [Scanlan et al. 1999].

Aus diesen Gründen wird eine Immuntherapie beim Nierenzellcarcinom als potentiell erfolgversprechend angesehen.

## **1.6. Hepatische Metastasierung:**

Der häufigste Primärtumor, der in die Leber metastasiert, ist das Colorectale Carcinom (CRC) [Greenlee et al. 2000]. Bei etwa einem Viertel der Patienten ist bei Diagnosestellung schon eine Lebermetastasierung nachweisbar. Bei 60% kommt es im Verlauf zur metachronen Metastasierung [Landis et al. 1999]. Die Leber ist bei einem Viertel der Patienten mit colorectalem Carcinom das einzige Manifestationsorgan der Metastasierung [Pereira et al. 2004].

Die chirurgische Resektion von Leberherden bewirkt beim Pankreas- oder Magencarcinom keine Prognoseverbesserung. Allerdings kann sie bei Metastasen eines colorectalen Carcinoms zu einer Verbesserung der Überlebensrate führen. Zusätzliche Faktoren für die 5-Jahres-Überlebensrate sind das Stadium des Primärtumors, das Geschlecht (günstiger bei Frauen) und die vollständige Resektion von Lebermetastasen [Wagner et al. 1984; Pawlik et al. 2005].

Weitere seltenere Primärtumoren, die hepatisch metastasieren können, sind pankreatische neuroendokrine Tumoren [Touzios et al. 2005], das gastrointestinale Sarkom [Patel and Benjamin 2000] und Melanome, sowie Mamma- und Nierenzellcarcinome.

Patienten, deren Lebermetastasen primär nicht resektabel sind, haben eine deutliche schlechtere Prognose. Die Lebenserwartung liegt für sie nur bei wenigen Monaten. Wenige Patienten überleben mit Lebermetastasen unbehandelt drei Jahre [Lehnert and Golling 2001].

Hepatische Metastasierung kann ausgesprochen schlecht mit einer systemischen Chemotherapie behandelt werden. Moderne Kombinationstherapien haben zwar eine Ansprechrates von 50-60%, können aber die Metastasen nicht zum Verschwinden bringen. Außerdem bewirkt eine systemische Chemotherapie für die Patienten nur eine Verschlechterung der Lebensqualität [Kemeny et al. 1999].

Die chirurgische Resektion von Leberfiliae ist mit einer Fünfjahresüberlebensrate von 31% der Goldstandard [Lehnert and Golling 2001]. Viele Patienten sind aber in der ungünstigen Situation, dass sie nicht R0 reseziert werden können, weil die Herde ungünstig liegen oder zu diffus verteilt

sind. Auch haben die Patienten häufig Begleiterkrankungen, die eine Resektion unmöglich machen. Daher wurden Techniken entwickelt, die trotz der palliativen Situation mit durchaus kurativer Intention eingesetzt werden können. Dazu gehören die Radiofrequenzablation [Gillams and Lees 2000; Solbiati et al. 2001] und andere Thermoverfahren, die perkutane Alkoholinstillation (PEI) [Livraghi et al. 1986] und die Chemoembolisation [Wallace et al. 1984].

## 1.7. Radiofrequenz-Ablation (RF-Ablation)

### 1.7.1. Historisches:

Die Anfänge der Radiofrequenz-Ablation gehen auf **Jaques-Arsène D'Arsonval** (1851-1940, Abb. 21) zurück, der 1891 erstmalig Versuche über die Hitzeokoagulation von Geweben



Abb. 21:  
Jaques-Arsène  
D'Arsonval

© Institute of  
Chemistry, Hebrew  
University of  
Jerusalem, Israel

durchführte [D'Arsonval 1891]. Er hatte herausgefunden, dass weder eine neuromuskuläre Übertragung noch ein elektrogener Schock einsetzte, wenn die Frequenz auf über  $10^4$  Hz gesetzt wurde. Seine Forschungen basierten auf neuen Erkenntnissen der Physiker **James C.**

**Maxwell** (1831-1879) und **Heinrich Hertz** (1857-1894), die erstmals elektromagnetische Energie charakterisiert hatten [Hertz 1887].

Um 1900 erprobte der kroatische Physiker **Nikola Tesla** (1856-1943) die Koagulation biologischer Gewebe mit Radiofrequenz-Energie [Ni et al. 2005].

**Meinrad Beer** behandelte 1908 Harnblasentumoren mittels Radiofrequenz-Ablation. Damit wurde diese Technik erstmals als Therapie für Tumoren eingesetzt. Wenige Jahre später wurden auch Haut- und Mammacarcinome mit Radiofrequenz-Ablation behandelt. Seit Anfang der 20er Jahre wurde die RF-Ablation als Therapie für Hirntumoren, aber erst Anfang der 90er Jahre zur Behandlung von Lebertumoren eingesetzt [Siperstein and Gitomirski 2000]. Heute ist die Radiofrequenz-Ablation eine immer mehr in den Vordergrund rückende Alternative zur chirurgischen Resektion, die immer noch der Goldstandard für die Therapie von primären und sekundären Lebertumoren, Nierencarcinomen und Lungenherden ist [Pereira et al. 2004; Gervais et al. 2000; Lui et al. 2003; Lencioni et al. 2004]. Auch andere Organe werden mittlerweile diskutiert, wie zum Beispiel die Nebenniere, Lymphknoten oder das Pankreas [Lees and Gilliams 2005], sowie der Einsatz beim Mammacarcinom [Mirza et al. 2001] und Prostatatumoren [Jindal et al. 2005].

„Ablation“ muss in diesem Zusammenhang wie eine chirurgische Resektion verstanden werden, ohne dass das „entfernte“, also behandelte Gewebe aus

dem Körper reseziert wird. Es wird aber genauso Gewebe von einem vitalen in einen nekrotischen Zustand überführt [Ni et al. 2005].

Neue Studien zeigen, dass die Überlebensraten nach Radiofrequenz-Ablation sogar besser sind als die nach chirurgischer Resektion. Zusätzlich wird RF-Ablation als neuer Goldstandard für die Therapie maligner Neoplasien der Leber gehandelt. [Lencioni et al. 2005]. Tierexperimente haben gezeigt, dass die Eradikationsrate deutlich höher ist als bei der chirurgischen Resektion und auch die Überlebenszeiten ohne Rezidiv deutlich länger sind, wenn RF-Ablation als primäre Therapie beim Hepatozellären Carcinom eingesetzt wird [Miao et al. 2000; Lee et al. 2003].

Die Vorteile der RF-Ablation gegenüber der chirurgischen Therapie liegen zum einen im minimal invasiven Charakter der Methode. Die Patienten müssen keine langwierigen Operationen über sich ergehen lassen. Durch den Einsatz von Lokalanästhetika kann das Narkose-Risiko gesenkt werden, weil eine Vollnarkose nur in Ausnahmefällen zum Einsatz kommt. Zusätzlich scheint die RF-Ablation weitergehende Effekte zu haben, die über die lokale Tumordestruktion hinausgehen. Es gibt Hinweise darauf, dass durch RF-Ablation das Immunsystem aktiviert wird, zum einen durch Ausschüttung immunmodulatorischer Substanzen [Schueller et al. 2004; Yang et al. 2004; Schueller et al. 2004b; Rai et al. 2005]. Im Tiermodell ist außerdem berichtet worden, dass Radiofrequenzablation eine Antwort von tumorspezifischen T-Zellen induziert [Wisniowski et al. 2003; Haen et al. 2005].

#### **1.7.2. Technik:**

Unter CT-, Ultraschall- [Meloni et al. 2001] oder MRT-Kontrolle [Huppert et al. 2000] Kontrolle werden bei der RF-Ablation Nadeln in das zu behandelnde Organ perkutan eingestochen. Die Elektroden werden unter Bildgebung im Tumor platziert. Sie sind mit einem Radiofrequenzgenerator und einer Wasserkühlung verbunden.

Bei der Radiofrequenz-Ablation kommen verschiedene Elektroden zum Einsatz. Zum einen gibt es bipolare Elektroden, bei denen der Strom von einer

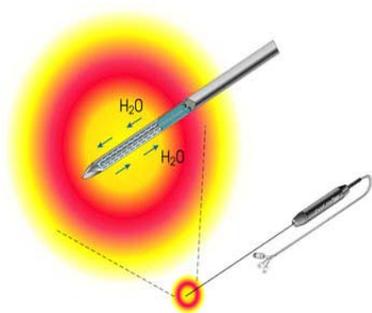


Abb. 22a: Einzel-Elektrode mit Wasserkühlung



Abb. 22b: Cluster-Elektrode

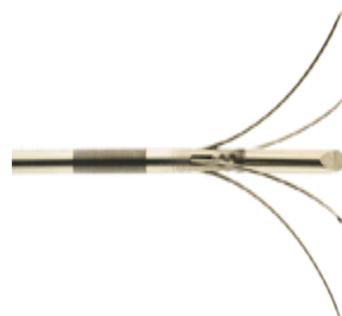


Abb. 22c: Elektrode mit expandierbarer Spitze

© Valleylab, Division of Tyco Healthcare, Burlington, Massachusetts, USA

© Diethard Schmidt, Universitätsklinik für Radiologie, Tübingen

Schmidt, für Universität

© RITA Medical Systems, Fremont, California, USA

aktiven Zone zur anderen läuft [McGahan et al. 1996]. Im Gegensatz dazu benötigt eine monopolare Elektrode eine Neutralelektrode auf der Haut des Patienten.

Zusätzlich gibt es die Möglichkeit nicht eine einzige, sondern gleich mehrere Elektroden in das Erfolgsorgan einzubringen. Auch gibt es Nadeln, die an ihrer Spitze entfaltbare Schirme tragen, um das Ablationsvolumen zu vergrößern. Kommerziell erhältlich ist ein weites Spektrum an verschiedenen Nadeln von unterschiedlichen Herstellern [Ni et al. 2005]. In der Studie, über die hier berichtet wird, kamen ausschließlich Nadeln von Radionics (Division of Tyco Healthcare, Burlington, Massachusetts, USA) zum Einsatz.

Das Tumorgewebe, in das die Elektrode eingeführt wurde, wird nun für eine definierte Zeitspanne durch Radiofrequenzenergie erhitzt. Somit wird eine Koagulationsnekrose des Gewebes erzeugt. Die Größe der Nekrose wird unter CT-, MRT- oder Ultraschallkontrolle evaluiert.

Manche Elektroden haben Kanäle, über die während der Ablation Kochsalzlösung zugeführt werden kann. Diese Elektrolytzufuhr verbessert die Erfolge der Therapie [Livraghi et al. 1997] Im Vergleich zu Elektroden, die keine solche Vorrichtungen haben, ist mit diesen Nadeln eine größere Nekrose zu erzielen [Pereira et al. 2004b].



Abb. 23a: MRT-Aufnahme der platzierten Elektrode im Lebergewebe.

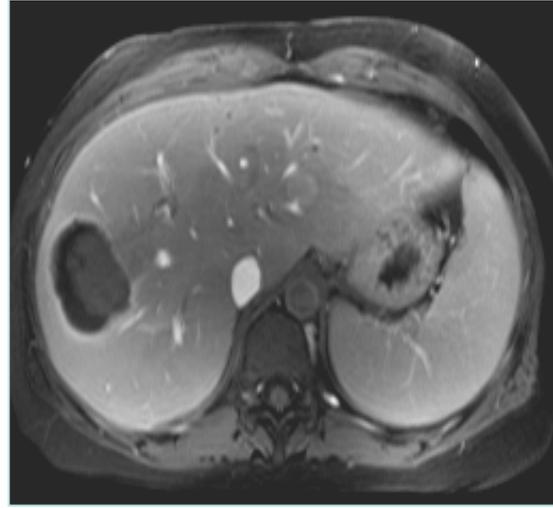


Abb. 23b: MRT-Aufnahme der induzierten Nekrose 3 Wochen nach RF-Ablation.

© Diethard Schmidt, Universitätsklinik für Radiologie, Universität Tübingen

© Diethard Schmidt, Universitätsklinik für Radiologie, Universität Tübingen

### 1.7.3. Definition der verwendeten Energie:

Radiofrequenz hat eine elektromagnetische Wellenlänge, die zwischen dem hörbaren Bereich und Infrarot liegt. Dieser Bereich liegt zwischen  $10^4$  und  $3 \times 10^{12}$  Hz.

RF-Ablation ist die lokale Zerstörung von Gewebe hervorgerufen durch Strom von einer unmodulierten Sinuswelle, Wechselstrom im Bereich der Wellenlänge herkömmlicher Radiosendungen (30-300 KHz bei Langwelle, 300-3000KHz bei Mittelwelle, 3-30 MHz für Kurzwelle). RF-Ablation wird vorzugsweise bei 500 KHz durchgeführt [Ni et al. 2005]. Damit liegt die Frequenz im Bereich der Mittelwelle. Sie ist hoch genug, dass sie eine lokale Nekrose des Gewebes induziert, aber keine neuromuskuläre Stimulation auslöst. Diese Frequenz hat außerdem den Vorteil, dass man das Volumen des ablatierten Gewebes besser kontrollieren kann [Organ 1976; Hand and ter Haar 1981, Hand 1981].

Radiofrequenz gehört zur nicht-ionisierenden Strahlung und hat bei korrekter Anwendung keine weiteren unerwünschten Wirkungen.

### 1.7.4. Mechanismen der Radiofrequenzablation:

Während der Ablation wird eine Elektrode durch die Haut in das Zielgewebe eingestochen. Radiofrequenz-Energie fließt aus dem Generator über die unisolierte Spitze dieser Elektrode ins umliegende Gewebe in Richtung einer

auf den Körper des Patienten aufgeklebten Neutralelektrode. Dadurch entsteht ein geschlossener Stromkreis. Die Neutralelektrode muss zur Vermeidung von Schäden durch die Hitze eine große Fläche überspannen [Ni et al. 2005]. Dadurch wird die Elektrode im Zielgewebe die eigentliche Hitzequelle. Während der Ablation wird das Gewebe auf bis zu 60°C erhitzt, wobei es zu einer Koagulationsnekrose kommt.

Die meisten RF-Elektroden sind unipolar, das heißt, sie besitzen nur eine aktive Spitze und benötigen daher eine Neutralelektrode. Es gibt aber auch bipolare Methoden, bei denen dann die Energie von einer aktiven Zone zu einer anderen im Gewebe wandert. Der Stromfluss findet dann in einem umschriebenen Areal zwischen den aktiven Zonen statt [McGahan et al. 1996].

Die biologischen Effekte von Therapien, die mit Hitzeeinwirkung auf Gewebe arbeiten, hängen von der Temperatur und Dauer der Einwirkung ab, sowie von den unterschiedlichsten Faktoren wie der Perfusion des Organs, der Dichte des Gewebes und der Konzentration von Elektrolyten. Unterschiedliche Effekte auf das Gewebe können bei verschiedenen Temperaturen beobachtet werden [Ni et al. 2005].

Schäden durch Hitzeeinwirkungen gibt es ab 42°C [Dickson and Calderwood 1980]. Wird die Temperatur über einen Zeitraum von drei bis fünfzig Stunden langsam von 42°C auf 45°C erhöht, wie es in der Hyperthermie bei Strahlentherapie durchgeführt wird [Dickson and Calderwood 1980], beginnt eine langsame fortschreitende zelluläre Degeneration, die dem programmierten Zelltod oder der Apoptose sehr ähnlich ist. Dabei kommt es zur Konformationsänderung von Makromolekülen, Schäden an Membranen, Chromosomen und des Zytoskeletts, Verlangsamung des Energiestoffwechsels, Kernpyknose und einer Inhibition von DNA-, RNA- und Proteinbiosynthese [Haines 1993]. Allerdings kann man auch bei längerer Einwirkung dieser Temperatur nicht alle Zellen töten und ein weiteres Tumorwachstum verhindern, weil immer noch Zellteilungen und Zellstoffwechsel beobachtet werden kann [Seegenschmiedt et al. 1990].

Steigert man die Temperatur, nimmt die Zeit, die für einen irreversiblen Zellschaden notwendig ist, exponentiell ab [Seegenschmiedt et al. 1990; Haines

et al. 1987]. Bei Temperaturen über 60°C kommt es zur Koagulation von Proteinen im Zytosol, in Mitochondrien und in DNA-Histon-Komplexen. Dadurch kommt es zum Zelltod [Allain et al. 1978].

Bei Temperaturen über 100°C wird Gewebswasser zum Kochen gebracht. Das Wasser verdunstet, und es kommt zur Ablagerung von Salzen im Gewebe. Deshalb ist für die Thermoablation eine Temperatur zwischen 50°C und 100°C ideal [Haines and Verow 1990; Nath and Haines 1995]. Hitze hat einen direkt zytotoxischen Effekt auf die Tumorzellen und Einfluss auf die Vaskularisation des Tumors. Gefäßschädigung ist ein weiterer Effekt der Thermoablation. Die üblichen histologischen Zeichen sind Zell-Schwellungen in kleinen Gefäßen und Gefäß-Unterbrechungen. Nach RF-Ablation wurde gezeigt, dass die mikrovaskuläre Durchblutung deutlich abnimmt [Ni et al. 2005]. Dieser Umstand könnte erklären, warum es nach RF-Ablation zu einem weiteren Fortschreiten der Nekrose kommt.

Die Größe der induzierten Nekrose hängt von der eingesetzten Energie ab. Bei RF-Ablation gilt ähnlich wie bei radioaktiver Strahlung das Abstandsgesetz. Das heißt, die Hitze um die Elektrode nimmt exponentiell mit zunehmender Entfernung von der Elektrode ab. Dabei gilt die Formel  $H \sim I^2R$ , wobei H die Hitze, I der Strom und R der Widerstand des Gewebes ist [Le Veen 1997]. Die induzierte Nekrose erreicht eine Zerstörung von 70-100% der Tumorzellen und ist nach spätestens zwölf Monaten vollständig organisiert. Die Nekrose wird histologisch charakterisiert durch Durchbrechung von Zellmembranen und homogener zytoplasmatischer Eosinophilie. Außerdem kann einsträngige DNA mittels Antikörpern detektiert werden [Itoh et al. 2002; Goldberg 2002].

#### **1.7.5. Radiofrequenzablation und die Aktivierung des Immunsystems**

Nekrose ist ein potenter Stimulus für das Immunsystem. Durch die Abtötung von Zellen wird das Immunsystem aktiviert, um das nicht vitale Gewebe abzuräumen. Dabei kommt es zu einer Infiltration immunkompetenter Zellen in diesen Bereich [Ryan and Geczy 1987]. Das kann sekundär zu einer Aktivierung von dendritischen Zellen führen, zum Beispiel durch die Freisetzung von Alarmsignalen wie Hitzeschockproteinen [Hilf et al. 2002] oder Harnsäure [Shi et al. 2003].

Zusätzlich wurde im Tiermodell beschrieben, dass Radiofrequenz-Ablation sekundär einen Anti-Tumor-Effekt durch die Aktivierung von tumor-spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten hat [Wissniowski et al. 2003].

Neuere Publikationen berichten außerdem, dass nach RF-Ablation eine verstärkte Expression von Hitzeschock-Proteinen (HSP70) auf der Membran von Hepatozyten zu sehen ist [Schueller et al. 2004; Yang et al. 2004; Schueller et al. 2004b; Rai et al. 2005].

## 2. Zielsetzung der Arbeit

Durch neuartige Methoden wird in der Krebsforschung versucht, eine Immunantwort gegen die Tumoren der Patienten zu entwickeln, beziehungsweise neue minimalinvasive Techniken zu entwickeln, die den Patienten große operative Eingriffe erspart.

Ziel dieser Arbeit war, die Induktion einer Immunantwort zu untersuchen. Dies war im ersten Teil dieser Arbeit die Untersuchung von Antworten antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch Einsatz von peptid-beladenen dendritischen Zellen, wobei bei Patienten mit Nierenzellcarcinom die Peptide auf individueller, das heißt patienten-spezifischer Basis ausgewählt wurden.

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Induktion einer Immunantwort von CD8<sup>+</sup> T-Zellen, sowie der systemischen Ausschüttung von Alarmsignalen für das Immunsystem durch ein thermoablatives Verfahren zur Behandlung maligner Neoplasien in Leber, Niere und Lunge, der Radiofrequenzablation. Untersucht werden sollte eine mögliche Aktivierung antigenspezifischer T-Zellen und die Ausschüttung von Hitzeschockproteinen (HSP70, gp96) und Harnsäure ins Serum der Patienten durch RF-Ablation.

## 3. Theoretischer Hintergrund der Methoden

### 3.1. Isolierung von PBMCs aus Blut mittels Dichtegradientenzentrifugation:

PBMCs (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) setzen sich aus B- und T-Lymphozyten, Monozyten und NK-Zellen des peripheren Blutes zusammen. Durch Dichtezentrifugation über einen Stufengradienten aus dem Polysaccharid Ficoll und Metrizimid, einer jodhaltigen Verbindung, werden die PBMCs von den anderen korpuskulären Bestandteilen getrennt [Noble et al. 1968]. Zu diesen korpuskulären Bestandteilen zählen die Blutplättchen, Erythrozyten und die polymorphkernigen Leukozyten (Granulozyten).

Über eine Lösung von Ficoll-Hypaque wird mit PBS verdünntes Vollblut geschichtet. Die Ficoll-Lösung ist mit einem Dichtegradienten von 1.077 g/ml schwerer als Blut. Somit ist eine Phasentrennung zwischen Blut und Ficoll möglich.

Während der Zentrifugation verteilen sich die unterschiedlichen Zellpopulationen in die einzelnen Phasen. Erythrozyten und Granulozyten pelletieren, Thrombozyten verbleiben im Plasma. Die PBMCs sammeln sich in der Phasengrenze zwischen Ficoll und Plasmaüberstand.

### 3.2. Multimerisierung mittels Streptavidin:

Sowohl das Protein Avidin aus dem Hühnerei, als auch Streptavidin verfügen über jeweils vier Bindungsstellen für Biotin. Ihre Bindungskonstante ist mit  $10^{15} \text{ mol}^{-1}$  eine der höchsten natürlichen Bindungskonstanten. Biotinylierte Proteine können daher leicht an Avidin oder Streptavidin binden und somit in eine tetramere Form gebracht werden.

Probleme mit Streptavidin und Avidin liegen in hydrophoben Wechselwirkungen. Sie binden dabei unspezifisch an Zelloberflächen (bei Avidin und Streptavidin) oder an Glycanketten von Oberflächen (nur bei Avidin). Da bei Streptavidin (60 kDa) die Wahrscheinlichkeit einer unspezifischen Bindung niedriger ist als bei Avidin, ist Streptavidin für die Durchflußzytometrie das Reagenz der Wahl. Streptavidin ist kommerziell in Konjugation mit diversen Fluorochromen erhältlich. Dazu zählen die im Rahmen dieser Arbeit

verwendeten Fluorochrome R-Phycoerythrin (PE, 240 kDa, Exzitation 480 nm, Emission 575 nm) und Allophycocyanin (APC, 104 kDa, Exzitation 650 nm, Emission 660 nm).

### **3.3. Durchflußzytometrie: FACS:**

Mit Fluorochromen gefärbte Zellen werden mit hoher Geschwindigkeit durch eine Kapillare gesaugt und passieren dabei einen Laser. Das hier verwendete Becton Dickinson FACScalibur enthält einen Argonlaser (Wellenlänge 488 nm) und einen Diodenlaser (635 nm). Die Laserstrahlen werden in Photomultipliern aufgenommen. Detektiert werden folgende Parameter:

- a) FSC: Vorwärtsstreuung als Maß für die Zellgröße
- b) SSC: Seitwärtsstreuung als Maß für die Zellgranularität
- c) FL-1: FITC (389 Da; Exzitation: 495 nm; Emission: 520 nm)
- d) FL-2: PE (240 kDa; Exzitation: 480 nm; Emission: 575 nm)
- e) FL-3: PerCP (35 kDa; Exzitation: 488 nm; Emission: 675 nm)
- f) FL-4: APC (104 kDa; Exzitation: 650 nm; Emission: 660 nm)

Die Messung des vierten Fluorochroms APC verlangt den zweiten Laser im FACScalibur. Die vier Fluorochrome haben Fluoreszenzsignale unterschiedlicher Wellenlänge.

Vor jeder Messung werden die Photomultiplier in ihrer Empfindlichkeit durch Einstellen einer geeigneten Anodenspannung abgeglichen. Bei Färbungen mit mehreren Fluorochromen muss zusätzlich noch die Kompensation eingestellt werden, um Überlagerungen in den Spektren der Fluoreszenzemission zu eliminieren. Für die Kompensation stehen kommerziell erhältliche Fluorochromgekoppelte Kügelchen zur Verfügung. Es bietet sich aber an, Zellen des zu messenden Spenders mit einzelnen Antikörpern zu färben, die an die verschiedenen Fluorochrome gekoppelt sind. Damit kann gleichzeitig die Kompensation auf die aktuellen Zellverhältnisse angepasst werden [Fulwyler 1974].

### **3.4. Tetramer-Staining mit MHC-I-Tetrameren:**

CD8<sup>+</sup> T-Zellen binden mit ihrem T-Zell-Rezeptor spezifisch an das ihnen eigene Antigen. Diese spezifische Bindung einer T-Zelle an den Peptid-MHC-I-Komplex macht man sich bei der Markierung mittels Tetrameren zu Nutze.

Versuche, einzelne fluoreszenzmarkierte Peptid-MHC-I-Komplexe einzusetzen, scheiterten in der Entwicklung allerdings an der hohen Dissoziationsrate des Komplexes vom TCR [Matsui et al. 1994; Corr et al. 1994].

Die Lösung dieses Problems war die Multimerisierung der Komplexe. Die gleichzeitige Bindung an mehrere T-Zell-Rezeptoren wies deutlich geringere Dissoziationsraten auf [Altman et al. 1996].

Die rekombinant produzierte schwere und leichte Kette von MHC-I wird dafür in Anwesenheit des entsprechenden Peptids, das als Zielepitop erkannt werden soll, rückgefaltet. Der entstandene Komplex wird biotinyliert, damit er nachher an Fluoreszenz-markiertes Streptavidin binden kann (Abb. 24).

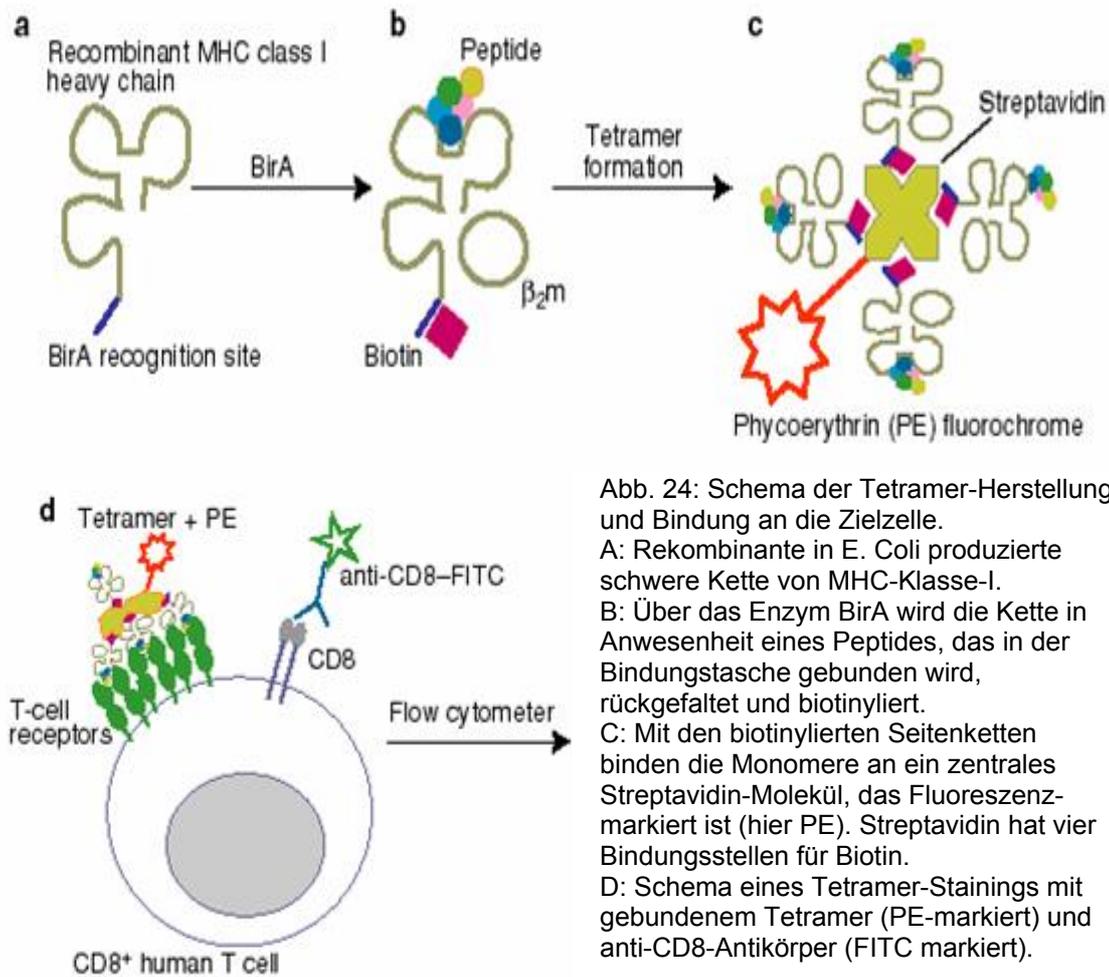


Abb. 24: Schema der Tetramer-Herstellung und Bindung an die Zielzelle.  
 A: Rekombinante in E. Coli produzierte schwere Kette von MHC-Klasse-I.  
 B: Über das Enzym BirA wird die Kette in Anwesenheit eines Peptides, das in der Bindungstasche gebunden wird, rückgefaltet und biotinyliert.  
 C: Mit den biotinylierten Seitenketten binden die Monomere an ein zentrales Streptavidin-Molekül, das Fluoreszenzmarkiert ist (hier PE). Streptavidin hat vier Bindungsstellen für Biotin.  
 D: Schema eines Tetramer-Stainings mit gebundenem Tetramer (PE-markiert) und anti-CD8-Antikörper (FITC markiert).

© Arnaud Moris, Interfakultäres Institut für Zellbiologie, Abteilung Immunologie, Tübingen

Die Bindung von MHC-I-Tetrameren an den TCR ist hochspezifisch [Burrows et al. 2000], allerdings ist sie nicht temperaturstabil [Whelan et al. 1999].

Markiert man die Zellen zuerst mit einem Antikörper gegen das CD8-Oberflächenmolekül, kann dieser die spätere Bindung des Tetramers verhindern. Auf der anderen Seite kann dieser Antikörper auch ein bereits gebundenes Tetramer wieder vom TCR verdrängen [Daniels and Jameson 2000; Denkberg et al. 2001].

Die Tetramerfärbung ist damit eine Nachweismethode auf Einzelzellebene. Es wird die absolute Anzahl spezifischer Zellen gemessen. Bezogen auf die Gesamtzahl der CD8<sup>+</sup> Zellen kann dadurch die Frequenz antigenspezifischer T-Zellen bestimmt werden. Die Nachweisgrenze für tetramerpositive Zellen

bezogen auf die Gesamtzahl der CD8<sup>+</sup> Zellen wird mit 0,1 % angegeben [Nepom et al. 2002].

Die Tetramerfärbung kann mit anderen Färbemethoden kombiniert werden, wie zum Beispiel der Markierung von Oberflächenmarkern (CD8 oder CD4 bei T-Zellen, etc.) [Lee et al. 1999], intrazellulären Zytokinfärbungen [Appay et al. 2000] oder extrazellulären Zytokinfärbungen [Pittet et al. 2001].

### **3.5. IFN $\gamma$ -ELISPOT:**

Zwei Arbeitsgruppen haben diese Technik 1983 unabhängig voneinander entwickelt [Czerkinsky et al. 1983; Sedgwick and Holt 1983]. Sie ermöglicht die Detektion der IFN $\gamma$ -Sekretion einzelner Zellen und erlaubt eine hochspezifische und sensitive quantitative Analyse von T-Zell-Antworten gegen definierte Antigene.

Mit dem ELISPOT (*enzyme linked immunospot assay*) kann man direkt *ex vivo* Analysen durchführen. Die geringe Nachweisgrenze von 1/10<sup>5</sup> PBMCs ermöglicht im Prinzip auch die Detektion von Zellen, die *in vitro* nicht expandierbar sind [Scheibenbogen et al. 2000].

Das Prinzip des IFN $\gamma$  ELISPOTs beruht auf der spezifischen Erkennung des sekretierten Zytokins durch immobilisierte Antikörper.

Die Platten, die beim ELISPOT verwendet werden, haben einen Boden aus Nitrozellulose- oder Polyvinylidenfluorid-Membranen. Sie wurden ursprünglich für die Sterilfiltration entwickelt. Die Anfänge des ELISPOTs wurden mit Plastikplatten durchgeführt. Da aber die Technik von ELISPOT und Western Blot identisch ist, wurde in Analogie zu den Nitrozellulosemembranen beim Western Blot auf Platten mit Membranen zurückgegriffen.

Die ELISPOT-Platten werden dazu mit einem Antikörper gegen IFN $\gamma$  beschichtet. Die zu untersuchenden Zellen werden in die Platte gegeben. Beim Einsatz von PBMCs müsste theoretisch nur noch Peptid zugegeben werden, da sich in der Fraktion Monozyten befinden, die die Peptide, die im Überstand zugegeben wurden, auf MHC-I-Molekülen präsentieren könnten [Treves et al. 1981]. Trotzdem sollten aber noch antigenpräsentierende Zellen zugegeben werden, da eine Präsentation der Peptide dann besser gewährleistet ist. Als

antigenpräsentierende Zellen können dabei DCs oder Tumorzellen wie T2 oder K562-A2 dienen [Pass et al. 1998; Britten et al. 2002].

In den Versuchen dieser Arbeit kamen K562-A2-Zellen zum Einsatz. K562-A2 Zellen sind Zellen, die an sich weder Klasse-I noch Klasse-II MHC-Moleküle auf der Oberfläche exprimieren. Sie werden dann mit HLA-A\*0201 transfiziert. Diese Zellen können dementsprechend nur für die Untersuchung HLA-A2<sup>+</sup> Spender und Patienten verwendet werden.

Die Platten werden für 24 Stunden bei +37°C inkubiert. Dabei kommt es zur Aktivierung der für das zugegebene Peptid spezifischen T-Zellen, deren Aktivierung durch ihre IFN $\gamma$ -Sekretion gemessen wird. Die immobilisierten Antikörper auf dem Boden der Platte binden das sezernierte Zytokin. Die Zellen werden später entfernt und ein Enzym-gekoppelter zweiter anti-IFN $\gamma$  Antikörper zugegeben. Dieser bindet ebenfalls an das sezernierte IFN $\gamma$ . Das gebundene Enzym katalysiert eine Farbreaktion (BCIP und NBT), die an jeder Stelle, an der IFN $\gamma$  an den Plattenboden gebunden ist, einen Fleck (= Spot) hinterlässt. Jeder dieser Spots entspricht einer Zelle, die im Verlauf des Versuchs IFN $\gamma$  produziert hat. Die Auszählung erfolgt entweder manuell am Mikroskop oder in einem automatisierten Lesegerät. Damit kann die Frequenz spezifischer Zellen, die IFN $\gamma$  produzieren, ermittelt werden.

### **3.6. ELISA:**

Der ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) dient seit Anfang der 70er Jahre dem Nachweis und der Quantifizierung von Proteinen in Flüssigkeiten, Sera und Sekreten [Engvall and Perlman 1971; Hoffman 1973]. Meist wird die Methode in Form eines so genannten „Sandwich-ELISA“ durchgeführt. Dabei ist der Primärantikörper unspezifisch auf dem Boden der Kunststoff-ELISA-Platte fixiert. Der restliche Boden wird mit einem Protein (z.B. BSA) blockiert. In die Platte wird die Testlösung gegeben. Das Protein, das detektiert werden soll, bindet spezifisch an den auf der Platte fixierten Antikörper. Die Zugabe eines Sekundärantikörpers, der ein anderes Epitop des zu untersuchenden Proteins bindet, startet die Nachweisreaktion. Der Sekundärantikörper kann direkt an ein Nachweisenzym gekoppelt oder nur biotinyliert sein. Im zweiten Fall wird Streptavidin-gekoppelte Meerrettich-Peroxidase zugegeben. Dabei wird die

spezifische Biotin-Streptavidin-Bindung genutzt [Kendall et al. 1983]. Die Meerettich-Peroxidase katalysiert eine Farbreaktion: Sie setzt TMB in Anwesenheit von  $H_2O_2$  in ein blaues Produkt um [Goka and Farthing 1987]. Die Reaktion wird durch Zugabe von Säure gestoppt. Die Farbreaktion ist nun – im sauren Milieu – gelb. Die gelbe Farbe wird im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Korrekturwellenlänge von 540 nm gemessen.

### **3.7. SDS-PAGE:**

Die SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) ist eine Methode der elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen zur Bestimmung ihrer molekularen Masse. Das zu untersuchende Protein-Gemisch wird dabei mit einem ionischen Detergenz (SDS) inkubiert. Dabei lagert sich das Detergenz an die Proteine im Verhältnis 1,4 g SDS pro Gramm Protein an und denaturiert diese zu einer gestreckten Konformation. Der Quotient Ladung / Masse wird durch diesen Eingriff konstant. Daher wandern nun die denaturierten Proteine in einem quervernetzten Polyacrylamidgel nur noch in Abhängigkeit von ihrer Länge, wenn ein elektrisches Feld angelegt wird. Da durch den Quotienten die Länge in direktem Zusammenhang mit der Masse steht, kann die Molekülmasse anhand der Laufstrecke mit Markerproteinen bekannter Länge bestimmt werden. Als Voraussetzung müssen dabei allerdings die Disulfidbrücken in den Proteinen reduziert werden. Dies geschieht mit DTT oder 2-Mercaptoethanol [Grabar and Williams 1955].

Die Gelelektrophorese von Proteinen ist limitiert durch die Porengröße des Gels und die Art des Antigens oder eines Antikörpers, die eine physikalisch unbewegliches Aggregat bilden [Towbin et al. 1979].

Die Proteine werden für den Western Blot nach der elektrophoretischen Auftrennung auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Sie könnten aber auch direkt sichtbar gemacht werden, indem man sie mit einem Farbstoff wie Coomassie Brilliant Blue R-250 anfärbt.

### 3.8. Western-Blot:

#### 3.8.1. Theoretischer Hintergrund

1971 entwickelte Edwin Southern eine Methode zur Auftrennung von DNA-Fragmenten, die nach ihm Southern Blot getauft wurde [Southern and Mitchell 1971]. In Anlehnung an diese Namensgebung wurde eine analoge Methode zur Auftrennung von RNA-Fragmenten Northern-Blot und die Methode zur Auftrennung von Proteinen Western-Blot [Burnette 1981] getauft. Bei allen diesen Methoden werden aufgetrennte Fragmente auf Membranen übertragen und dort mit spezifischen Antikörpern sichtbar gemacht.

Die meisten Proteine oder Proteinkomplexe binden direkt an Nitrozellulosemembranen [Kuno and Kihara 1967]. Salze, kleinere Moleküle und RNA werden nicht zurückgehalten. Proteine werden genauso an die Membranen gebunden, wenn sie in ein elektrisches Feld gebracht werden. Wird

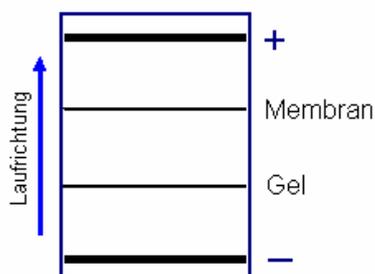


Abb. 25: Prinzip des Western Blots. Die Proteine wandern, da negativ geladen, von der Kathode zur Anode und werden dabei vom Gel auf die Membran übertragen.

ein elektrisches Feld senkrecht zu einem Gel angebracht, in dem Proteine aufgetrennt wurden, wandern diese Proteine vom Gel in die Membran, das heißt von der Kathode zur Anode. Proteine sind prinzipiell negativ geladen und wandern daher zum Pluspol (Abb. 25).

Auf der Membran wird ein gleiches Muster an Proteinen gefunden, wie man es auf dem Gel bei Anfärbung der Proteine findet. Färbt man das Gel erst nach dem Transfer an, sind keine Proteinrückstände zu detektieren. Beim Transfer geht die Menge an Protein nicht verloren, vorausgesetzt die Kapazität der Membran reicht für die zu transferierende Proteinmenge aus. Das heißt, die Proteinmenge auf der Membran ist prinzipiell quantifizierbar [Towbin et al. 1979]. Die spezifische Detektion eines Proteins auf der Membran geschieht über zwei Antikörper. Der erste bindet an das Protein auf der Membran. Der Sekundärantikörper ist peroxidase- oder fluoreszein-konjugiert und bindet an den ersten. So kann die Antikörperbindung an das Protein über eine Farbreaktion sichtbar gemacht werden [deBlas and Cherwisnski 1983].

Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass selektiv einzelne Proteine nachgewiesen werden können. Würde man nur eine Gelelektrophorese durchführen, müsste man die Banden aus dem Gel heraustrennen und dann einzeln sequenzieren, um die Proteine zu bestimmen. Ein spezifisch bindender Antikörper weist nur ein Protein nach. Das bedeutet, die Bande, die auf der Membran sichtbar ist, steht direkt für das zu messende Protein.

### **3.8.2. Diskussion der Probleme**

Die Detektion von gp96 im Serum mittels Western Blot gestaltete sich schwieriger als erwartet. Es gab im Wesentlichen drei Probleme. Zum einen waren die unterschiedlichen eingesetzten Antikörper untereinander nicht vergleichbar. Der Primärantikörper konnte zwar mehrfach verwendet werden. Allerdings veränderte sich durch die Mehrfachverwendung der Hintergrund immer deutlich von Versuch zu Versuch. Das bedeutet, dass die bei der Messung im Image-Reader die Membran zu Beginn deutlich dunkler darstellte als bei späterer Verwendung des Antikörpers. Zweitens war die Quantifizierung der Blots schwierig. Es wurde zwar ein gp96-Standard in definierter Stoffmenge auf das Gel aufgetragen, auf den die anderen Werte normiert werden konnten. Die Schwärzung der Bande entsprach somit einer definierten Stoffmenge (z.B. 1 ng). Das Problem dabei waren aber die Seitenbahnen, aus denen immer grundsätzlich eine größere Menge der Proteine verloren ging, da sie bei der Gelelektrophorese seitlich aus dem Gel herausgezogen wurden, und somit nicht mehr nachvollziehbar war, ob die Menge, die letztendlich auf der Membran zu messen war, wirklich mit der eingesetzten Ausgangskonzentration übereinstimmte. Da der Transfer auf die Membran prinzipiell die gesamte Menge an Protein umfassen sollte [Towbin et al. 1979], war der Fehler, der beim Transfer entstehen könnte, zu vernachlässigen.

Prinzipiell wäre es natürlich möglich gewesen, die Seitenbahnen einfach nicht zu beladen. Dies würde oben beschriebenen Fehler eliminieren. Allerdings führte diese Lösung zu einem weiteren Problem. Pro Gel standen per se nur jeweils zehn Bahnen zur Verfügung. Bei Auslassen der Seitenbahnen blieben noch acht Bahnen übrig. In jedem Versuch mussten ein Protein-Standard definierter Stoffmenge, damit überhaupt quantifiziert werden konnte, und ein

Protein-Marker, der eine Überprüfung der Längenfragmente erlaubte, mitlaufen. Blieben also sechs Bahnen für die Patientenproben. Eigentlich sollte auch für jedes Gel noch eine interne Kontrolle aus zwei Proben aufgetragen werden, deren Menge an gp96 und Quotient d1/d0 bekannt war. Dies ist nötig, um die Konsistenz der Ergebnisse zwischen den einzelnen Versuchen zu messen. Dies bedeutete zwei weitere belegte Bahnen. Blieben vier Bahnen. Idealerweise sollten die Proben dann noch in Doppelbestimmungen gemessen werden. Dabei könnte man pro Gel nur zwei Serumproben untersuchen.

Wollte man aber einen der gesunden Kontrollspender (Kontrollgruppe HD) in Einfachbestimmungen untersuchen, würde man sofort fünf Bahnen benötigen, bei einem Patienten, der vier Mal mit Radiofrequenzablation behandelt wurde (z.B. RFA026), acht. Bei einem Patienten mit drei Ablationen und einer konsekutiven Probe (wie zum Beispiel RFA023) wäre die Messung in einem Gel auch nicht möglich. Die Messung in einem Gel mit vier freien Bahnen erlaubte grundsätzlich daher nur eine sehr begrenzte Aussage. Die Versuche wären mit dieser Technik extrem langwierig und kostenintensiv gewesen.

Der Versuch, einen ELISA für gp96 zu etablieren, wurde nicht durchgeführt, weil dies schon im Labor früher vergeblich versucht worden war. Aus diesen Gründen wurde die Messung von gp96 im Serum letztendlich nicht weiter verfolgt.

### **3.9. Quantitative RT-PCR in Echtzeit:**

Es ist beschrieben worden, dass die Polymerase Ketten Reaktion eine geeignete Methode ist, spezifische Immunantworten gegen Peptide nach Vakzinierung zu messen [Kammula et al. 2000].

Eine Quantifizierung aller Genprodukte in einer Zelle ist extrem schwierig, weil sie sehr unterschiedlich in ihren Eigenschaften (Hydrophilie, Lokalisation in oder auf der Zelle) sind. Die meisten Informationen zur Genexpressionsanalyse werden heute durch Analyse der mRNA in den Zellen gewonnen. Die Quantifizierung ist durch quantitative Echtzeit RT-PCR möglich. Diese Methode wurde erstmals 1992 unter Verwendung eines DNA-Sequenziergerätes mit Fluoreszenzdetektion angewendet [Porcher et al. 1992].

Die Geräte heute sind kommerziell erhältlich. Die quantitative Echtzeit RT-PCR gilt zunehmend als die sensitivste Methode zur Detektion geringer Mengen mRNA aus Zellen, Körperflüssigkeiten und Geweben [Wang et al. 1999; Vandesompele et al. 2002].

Der Vorteil dieser Methode ist, dass man die Amplifikation während der Reaktion in Echtzeit verfolgen kann. Dies geschieht mittels fluoreszenzmarkierten Sonden (TaqMan<sup>®</sup>-Verfahren) [Heid et al. 1996] oder Farbstoffen, die doppelsträngige DNA binden. In jedem Zyklus wird die Fluoreszenz gemessen. Dabei interessiert nicht, welche Menge des PCR-Produktes nach einer bestimmten Anzahl von Zyklen vorhanden ist, sondern wann es zum ersten Mal detektiert werden kann. Je größer die Menge der Kopien des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts zu Beginn der Reaktion ist, desto früher wird das PCR-Produkt detektiert. Die initiale Kopienzahl im Ansatz kann genau quantifiziert werden, wenn ein Standard mit bekannter Kopienzahl (zum Beispiel ein Plasmid, das für das zu untersuchende Gen kodiert, in einer Titrationsreihe) eingesetzt wird. Aufgrund dessen Amplifikationsrate kann auf die initiale Kopienzahl der Proben rückgeschlossen werden.

Die zelluläre mRNA wird zuerst mit TRIzol<sup>®</sup> isoliert [Chomczynski and Sacchi 1987]. Anschließend wird sie durch Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben, was das Ausgangsprodukt für die quantitative PCR-Analyse bietet.

Das Prinzip beruht auf der Verwendung von zwei IFN $\gamma$ -Primern und einer mit

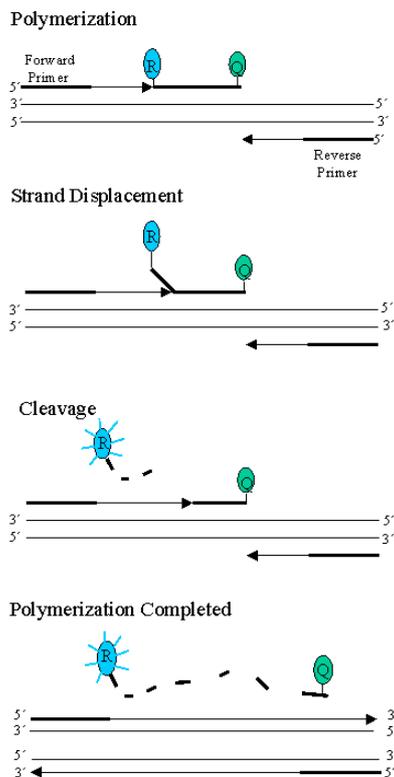


Abb. 26: Prinzip der TaqMan-Detektion

© Universitätsklinikum Freiburg, Core-Facility

zwei Fluoreszenzfarbstoffen markierten Sonde, die an einem definierten Genbereich zwischen den beiden Primerbindungsstellen hybridisiert [Kammula et al. 1999]. Sind beide Farbstoffe an der Sonde gebunden, absorbiert der Reporterfarbstoff (FAM) die Energie nach Anregung mit einem Argonlaser definierter Wellenlänge und emittiert bei längerer Wellenlänge. Die Emissionswellenlänge des Reporterfarbstoffs stimmt mit der Absorptionswellenlänge des Quencherfarbstoffs (TAMRA) überein. Damit wird die Energie auf den Quencherfarbstoff übertragen. Der Quencherfarbstoff emittiert nun Licht längerer Wellenlänge, das detektiert werden kann.

Im Verlauf der Reaktion wird DNA an den Primern synthetisiert. Irgendwann trifft die Polymerase auf die an die cDNA hybridisierte Sonde, die sie als Fehler erkennt und durch die 5'-Nukleaseaktivität abbaut. Dadurch werden die beiden Fluoreszenzfarbstoffe voneinander getrennt. Nun wird nur noch der Reporterfarbstoff vom Argonlaser angeregt.

Die nun meßbare Fluoreszenz wird in jedem Zyklus detektiert und nach Abschluss der Messung mit Hilfe der ABI Prism Software ausgewertet [Heid et al. 1996].

Da es sich bei der PCR um eine zyklisch wiederholte Produktakkumulation handelt, wird die Menge an Produkt in jedem Zyklus um einen Faktor  $E$  ( $0 \leq E \leq 1$ ) erhöht. Daraus ergibt sich:

$$X_n = X_0 \cdot (1 + E)^n$$

wobei:  $X_0$  = Zahl der Moleküle bei Reaktionsbeginn;  $X_n$  = Zahl der Moleküle nach Zyklus  $n$ ;  $n$  = Zykluszahl;  $E$  = Amplifikationseffizienz

und die Gesamtproduktmenge nach  $n$  Zyklen und  $X_0$  initialen Kopien:

$$X_n = X_0 + \sum_{n=1}^n X_{n-1} \cdot E$$

Bei einer Amplifikationseffizienz von 1 verdoppelt sich mit jedem Zyklus die Zahl der Kopien des PCR-Produktes. Die Anzahl der Moleküle steigt in diesem Idealfall exponentiell. Dieser Anstieg dauert so lange an, bis die Reagenzien nicht mehr im Überschuss vorhanden sind. In der exponentiellen Phase ist die Produktzunahme nahezu konstant. Hierzu muss aber bestimmt werden, bis zu welchem Amplifikationszyklus die Produktzunahme noch exponentiell ist. Dazu wird die Fluoreszenz gemessen, die proportional zur Produktmenge ist. Dies geschieht in Echtzeit während der Amplifizierung [Higuchi et al. 1993; Heid et al. 1996; Nazarenko et al. 1997].

Das Ergebnis einer RT-PCR ist ein Diagramm, in dem die Zykluszahl gegen die Fluoreszenz aufgetragen wird. Man wählt einen Schwellenwert, der einerseits alle Hintergrundfluoreszenz eliminiert, aber die Kurve immer noch im exponentiellen Bereich schneidet.

Abbildung 27 zeigt ein Beispiel für eines dieser Diagramme. Im vorliegenden Fall beginnt die exponentielle Amplifikation bereits zu Beginn der Messung. Der Schwellenwert wird aber erst bei Zyklus 25 (27) erreicht. Der Schnittpunkt des Schwellenwertes mit der Kurve ist der  $C_T$ -Wert. Ab Zyklus 29 (31) ist der Bereich der exponentiellen Amplifikation bereits beendet. Die Fluoreszenz folgt nun linearen Gesetzen, bis sie sich einem Plateau annähert. Dieses Plateau wird durch Primerlimitierung erreicht.

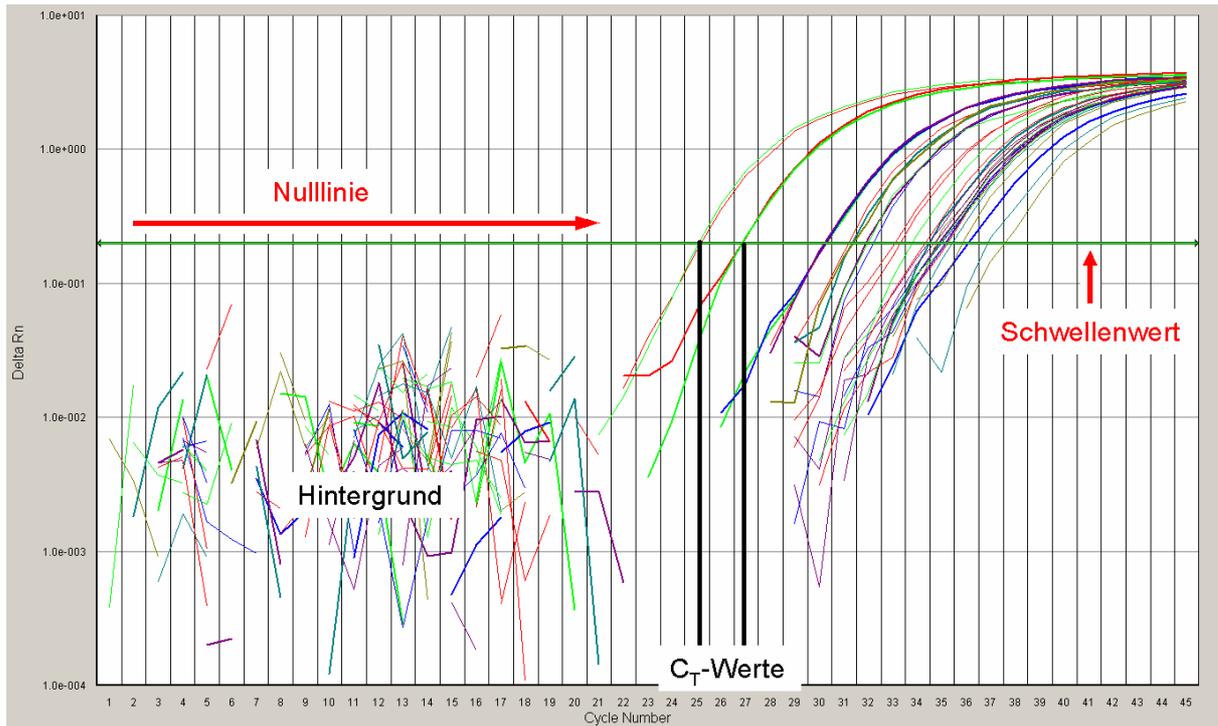


Abb. 27: Verlauf einer Echtzeit RT-PCR

Der  $C_T$ -Wert ist abhängig von der initialen Kopienzahl der cDNA in der Probe, das heißt je größer die Anzahl von mRNA-Molekülen initial ist, desto geringer ist der  $C_T$ -Wert. Ist der  $C_T$ -Wert bei zwei Proben gleich (bei identischer Amplikonlänge) haben beide Proben die gleiche initiale Kopienzahl von cDNA enthalten.

Die Exponentialgleichung sieht für die PCR-Reaktion nach Setzen des Schwellenwerts wie folgt aus:

$$X_T = X_0 \cdot (1 + E)^{C_T}$$

Nach  $C_T$  aufgelöst ergibt sich:

$$C_T = \frac{\log X_T - \log X_0}{\log(1 + E)}$$

In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten wurden keine absoluten Quantifizierungen durchgeführt, sondern die Kopienzahlen als relative Kopienzahlen eines so genannten Kalibrators berechnet. Dieser Kalibrator war eine Probe, deren Kopienzahlen von  $IFN\gamma$  als konstant angesehen wurden. Die anderen Proben wurden als Vielfaches dieses

Kalibrators angegeben. Die Probleme mit dieser Vorgehensweise liegen darin, dass die Probengewinnung, die Probenmenge, die RNA-Isolation und die Reverse Transkription eigentlich nie ganz genau identisch sein können. Daher wurden alle Proben auf eine endogene Referenz normiert, die in allen Proben identisch war. Diese Referenz muss ebenfalls eine RNA-Spezies sein. Als Referenzen dienen Haushaltsgene wie GAPDH [Bustin 2000; Neuvians et al. 2005], Strukturgene wie Actin [Funato et al. 1998] oder ribosomale RNA. Im vorliegenden Fall wurde die Expression von CD8 als Referenz gesetzt. Für jede Probe wird die endogene Kontrolle ebenfalls amplifiziert.

Am Ende erhält man durch Subtraktion der  $C_T$ -Werte für die endogene Referenz von denen für das untersuchte Gen die sogenannten  $\Delta C_T$ -Werte, die damit auf gleiche Ausgangsbedingungen in allen Proben normiert sind.

Bei der Auswertung wird die  $\Delta\Delta C_T$ -Methode verwendet:

Für die zu untersuchende Sequenz X und die Referenz R gelten wie oben erwähnt folgende Gleichungen:

$$X_T = X_0 \cdot (1 + E_X)^{C_{T,X}} = K_X$$

$$R_T = R_0 \cdot (1 + E_R)^{C_{T,R}} = K_R$$

Bei  $K_X$  und  $K_R$  handelt es sich um Konstanten, die vom Schwellenwert und der Länge des Amplikons abhängen. Die Konstanten sind somit für jede Gensequenz und Referenz unterschiedlich.

Die Normalisierung auf die endogene Referenz erfolgt durch Division der Gleichungen:

$$\frac{X_T}{R_T} = \frac{X_0 \cdot (1 + E_X)^{C_{T,X}}}{R_0 \cdot (1 + E_R)^{C_{T,R}}} = \frac{K_X}{K_R}$$

Man kann annehmen, dass die Amplifikationseffizienzen für die endogene Kontrolle und die zu untersuchende Gensequenz gleich sind [Zimmermann and Mannhalter 1996; Schnell and Mendoza 1997]. Daher lautet dann die Gleichung vereinfacht:

$$\frac{X_0}{R_0} \cdot (1 + E_X)^{C_{T,X} - C_{T,R}} = X_{D,N} \cdot (1 + E_X)^{C_{T,X} - C_{T,R}} = K$$

( $X_{0,N}$ : Normalisierte Anfangsmenge)

Durch Umstellen der Gleichung ergibt sich:

$$X_{0,N} = K(1 + E)^{\Delta C_T}$$

$$(\Delta C_T = C_{T,X} - C_{T,R})$$

Die normalisierte Startkopienzahl der zu untersuchenden Gensequenz (Probe = P) wird abschließend durch eine Division auf den Kalibrator (Kb) bezogen:

$$\frac{X_{0,N,P}}{X_{0,n,Kb}} = \frac{K(1 + E)^{\Delta C_{T,P}}}{K(1 + E)^{\Delta C_{T,Kb}}} = (1 + E)^{-\Delta \Delta C_T}$$

$$(\Delta \Delta C_T = \Delta C_{T,P} - \Delta C_{T,Kb})$$

Bei Experimenten, die eine sehr hohe Amplifikationseffizienz haben, kann diese Gleichung weiter vereinfacht werden, sodass schließlich keine Standardkurve mehr erstellt werden muß, um die Daten auswerten zu können [Livak and Schmittgen 2001].

$$\frac{X_{0,N,P}}{X_{0,N,Kb}} = 2^{-\Delta \Delta C_T}$$

Vorraussetzung für diese Methode ist allerdings, dass die Amplifikationseffizienzen für die Zielsequenz und die endogene Referenz annähernd gleich sind. Dies kann durch ein weiterführendes Experiment überprüft werden:

Eine Verdünnungsreihe der Probe wird auf die Platte aufgetragen. Sowohl Zielgen als auch Referenz werden amplifiziert und die  $C_T$ -Werte gegen den Logarithmus der Verdünnungsstufen aufgetragen. Es ergibt sich dann eine Gerade durch die Messpunkte, die bei einer Amplifikationseffizienz von 100% eine Steigung von -3,32 aufweist. Die Steigungen für beide Geraden von Zielgen und Referenz sollten möglichst nahe bei -3,32 liegen und sich maximal um 0,1 unterscheiden [Liss 2002].

Wenn das Ergebnis dieses Tests in dem angegebenen Rahmen bleibt, kann die  $\Delta \Delta C_T$ -Methode in der Auswertung für das getestete Paar Zielsequenz/Referenz angewandt werden. Bleibt dieser Test nicht im Rahmen des oben genannten, muss die Standardkurvenmethode bei der Auswertung angewendet werden [Johnson et al. 2000].

### 3.10. Box & Whisker Plots:

Für einen schnellen Überblick, ob sich zwei Gruppen voneinander unterscheiden, ist es zweckmäßig eine *beschreibende Statistik* anzuwenden. Im Gegensatz zur *beurteilenden Statistik* kann damit keine Aussage darüber getroffen werden, ob sich die Ergebnisse *signifikant* unterscheiden.

Box & Whisker Plots sind solch eine beschreibende Statistik. Die Grenzen der Box bilden der obere und untere Median. Die Linie in der Box markiert den Gesamtmedian. Die Whiskers geben den Median zwischen kleinstem Wert der Stichprobe und unterem Median, beziehungsweise größtem Wert und oberem Median an. Liegen die Messwerte außerhalb der Whiskers, werden sie als Punkte abgebildet.

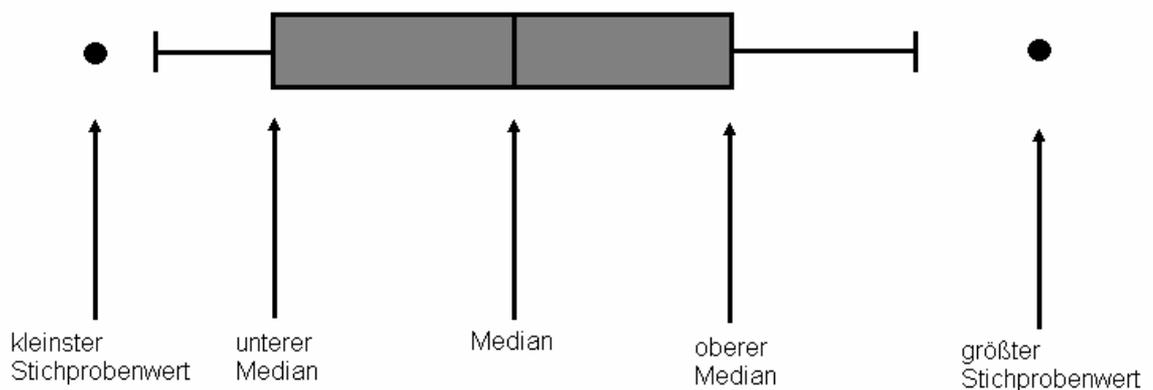


Abb. 28: Schema eines Box & Whisker Plots.

## 4. Multiplex RT-PCR

### 4.1. Zielsetzung:

Um sowohl Verbrauchsmittel als auch cDNA-Proben zu sparen, sollte getestet werden, ob es möglich ist, die Genprodukte CD8 und IFN $\gamma$  in einem Ansatz mit zwei verschiedenen Fluorochromen zu messen.

Von Applied Biosystems sind dafür verschiedene Fluorochrome kommerziell

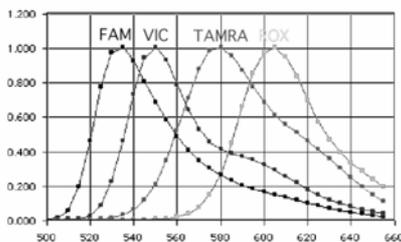


Abb. 29: Spektren der Fluoreszenzfarbstoffe FAM, VIC, TAMRA und ROX

aus: User Bulletin #5: Multiplex PCR with TaqMan<sup>®</sup> VIC Probes: Applied Biosystems 2001

erhältlich. Zum Einsatz kamen hier die Farbstoffe VIC (Extinktion 530 nm, Emission 575 nm) und FAM (Extinktion 490 nm, Emission 530 nm).

Da die Spektren der Sonden sich deutlich überlagern (Abb. 29), musste zuerst evaluiert werden, wie weit die Konzentration an Primern

für das Haushaltsgen CD8 reduziert werden konnte, damit sich die beiden PCR-Produkte

nicht stören, weil sie in zu hoher Kopienzahl im Ansatz vorlagen. Damit kann die Amplifikation des in der Überzahl vorliegenden Genproduktes gestoppt werden, bevor sie die Amplifikation und Detektion des in kleinerer Kopienzahl vorliegenden Genproduktes limitieren kann.

Dazu wurden Titrationen der CD8-Primer durchgeführt. Es wurde getestet, bei welcher Primerkonzentration es erstmalig zu einer C<sub>T</sub>-Wert-Verschiebung kam. Die geringste Konzentration, bei der noch keine Verschiebung des C<sub>T</sub>-Wertes zu beobachten war, sollte für die weiteren Versuche eingesetzt werden. In einem zweiten Schritt wurde getestet, ob getrennte Ansätze für CD8 und IFN $\gamma$  und das Multiplex-Setup gleiche Amplifikationsraten ergeben würden.

## 4.2. Ergebnisse:

### 4.2.1. Primer-Limitierungen

Die CD8-Primer wurden in den Konzentrationen 400 nmol (wie im getrennten Setup), 200 nmol, 100 nmol, 50 nmol und 25 nmol angesetzt. Der Test wurde mit Proben mit geringer Kopienzahl von IFN $\gamma$  (stimuliert mit einem HIV-Epitop) und hoher Kopienzahl von IFN $\gamma$  (stimuliert mit einem CMV- bzw. Influenza-Matrix-Epitop) durchgeführt. Gemessen wurde in Dreifachbestimmungen.

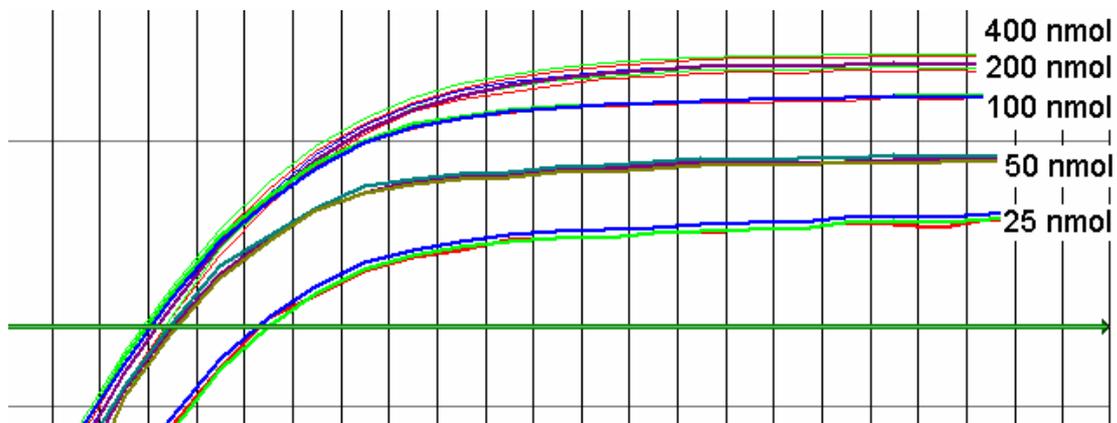


Abb. 30: Primer-Limitierung für HIV-stimulierte Proben (Daten: 14.01.2004). In diesen Proben der Negativkontrolle wurde mit einer geringen Kopienzahl von IFN $\gamma$  gerechnet.

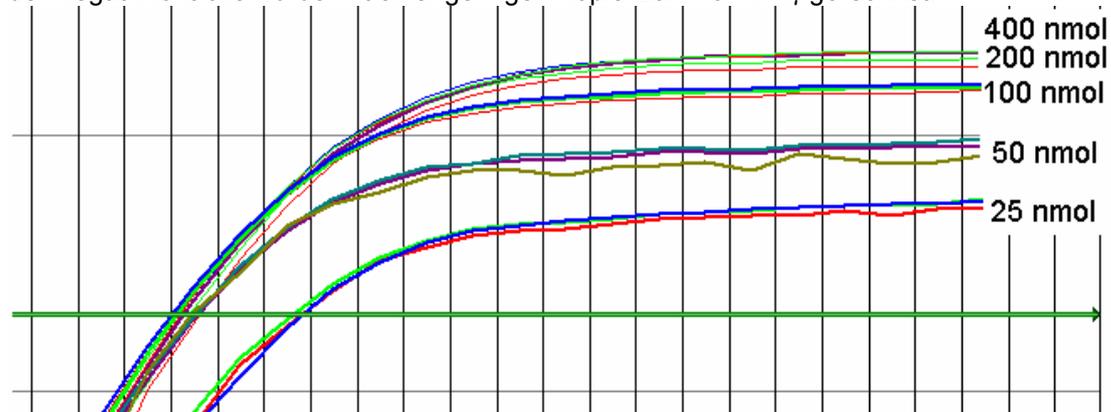


Abb. 31: Primer-Limitierung für mit Influenza Matrix stimulierte Proben (Daten: 14.01.2004), das heißt Proben, in denen eine höhere Kopienzahl von IFN $\gamma$  zu erwarten ist. Der Spender hatte in zuvor durchgeführten Experimenten eine Antwort gegen Influenza Matrix, aber keine Antwort gegen CMV gezeigt.

Diese Kurven zeigen, dass Konzentrationen von 400 nmol und 200 nmol zu keinen Veränderungen in der Amplifikationsrate und dem C<sub>T</sub>-Wert führen. Konzentrationen von 100 nmol und 50 nmol führen zu einer Limitierung der Kopienzahl. Erst bei einer Konzentration von 25 nmol kommt es zu einer

deutlichen Verschiebung des  $C_T$ -Werts. Die Kopienzahl von  $IFN\gamma$  in der Probe schien die Reaktion nicht zu beeinflussen, da die Ergebnisse sowohl für HIV-, als auch für CMV-stimulierte Proben identisch waren.

Diese Ergebnisse waren in mehreren Experimenten reproduzierbar. Eine andere, davon abweichende Konzentration, bei der erstmalig eine  $C_T$ -Wert-Verschiebung zu beobachten war, wurde nicht gemessen.

Für die weiterführenden Experimente wurde nach diesen Versuchen eine CD8-Primer Konzentration von 50 nmol eingesetzt.

#### **4.2.2. Vergleich von Singleplex- und Multiplex-PCR:**

In ersten Experimenten zeigte sich, dass der Einsatz von 50 nmol CD8 Primern im Multiplex-Setup in Anwesenheit von  $IFN\gamma$ -Primern auch schon zu einer  $C_T$ -Wert-Verschiebung für CD8 führte. Offensichtlich erforderte die Messung zweier Genprodukte doch eine höhere Konzentration von CD8-Primern, weil sonst dessen Amplifikation durch die Synthese des in geringerer Kopienzahl vorliegenden Genproduktes ( $IFN\gamma$ ) gestört würde. In der Folge wurde daher eine CD8-Primer Konzentration von 100 nmol eingesetzt.

Durchgeführt wurden zwei Gruppen von Experimenten:

- a) eingesetzte Primer-Konzentrationen: 100 nmol CD8-Primer, 400 nmol  $IFN\gamma$ -Primer
- b) eingesetzte Primer-Konzentrationen: 100 nmol CD8-Primer, 200 nmol  $IFN\gamma$ -Primer

In beiden Gruppen wurde jeweils für CD8 und  $IFN\gamma$  getrennt (jeweils mit FAM markiert, beziehungsweise CD8 mit VIC markiert und  $IFN\gamma$  mit FAM markiert) und im Multiplex-Setup (CD8 mit VIC markiert,  $IFN\gamma$  mit FAM markiert) gemessen. Dabei sollte gemessen werden, in wie weit die VIC-Sonde selbst oder auch die unterschiedlichen Primer-Konzentrationen die Messung stören würden. Verglichen wurden sowohl die  $C_T$ -Werte, als auch die relativen Kopienzahlen nach Anwendung der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode.

Well	Sample Name	Detector	CT
B1	CD8 FAM HIV 100nM	CD8	25,37
B2	CD8 FAM HIV 100nM	CD8	25,30
C1	CD8 VIC HIV 100nM	CD8 VIC	25,27
C2	CD8 VIC HIV 100nM	CD8 VIC	25,22

Tab. 5: Vergleich von VIC- und FAM-Sonden im getrennten Setup: Die  $C_T$ -Werte zeigen keine Unterschiede (Test: 14.01.04)

Die  $C_T$ -Werte für die beiden Proben zeigten keine bedeutenden Unterschiede bei Einsatz der VIC-Sonde im Vergleich zur FAM-Sonde. Diese Daten waren reproduzierbar.

Im Multiplex-Setup zeigte sich sowohl für CD8 als auch für  $IFN\gamma$  eine Verschiebung der  $C_T$ -Werte bei allen Primer-Konzentrationen. Diese Verschiebungen waren bei der Berechnung der relativen Kopienzahlen aber offensichtlich nicht erheblich. Die Anstiege im Vergleich von HIV-stimulierten und Influenza-Matrix-stimulierten Proben waren vergleichbar. Offensichtlich wurde die Amplifikation beider Proben durch die Multiplex-Messung gestört. Allerdings störten sich beide Genprodukte in gleichem Maße, dass zwar die Nachweisgrenze höher war, dennoch aber die Verhältnisse der Kopienzahlen gleich blieben.

Die Störungen in den  $C_T$ -Werten traten allerdings nicht bei allen Proben auf. Die Messergebnisse waren zusätzlich in unterschiedlichen Experimenten nicht stabil.

Well	Sample Name	Detector	CT	Well	Sample Name	Detector	CT
B1	CD8 FAM HIV 100nM	CD8	25,37	B3	IFNg FAM HIV 400nM	IFNg	30,84
B2	CD8 FAM HIV 100nM	CD8	25,30	B4	IFNg FAM HIV 400nM	IFNg	31,16
				B5	IFNg FAM HIV 200nM	IFNg	31,27
				B6	IFNg FAM HIV 200nM	IFNg	31,42
B7	CD8 FAM Mat. 100nM	CD8	25,46	B9	IFNg FAM Mat. 400nM	IFNg	29,73
B8	CD8 FAM Mat. 100nM	CD8	25,42	B10	IFNg FAM Mat. 400nM	IFNg	29,82
				B11	IFNg FAM Mat. 200nM	IFNg	30,25
				B12	IFNg FAM Mat. 200nM	IFNg	30,63
C1	CD8 VIC HIV 100nM	CD8 VIC	25,27				
C2	CD8 VIC HIV 100nM	CD8 VIC	25,22				
C3	CD8 VIC HIV 100/400	CD8 VIC	26,11				
C4	CD8 VIC HIV 100/400	CD8 VIC	25,92				
C5	CD8 VIC HIV 100/200	CD8 VIC	25,92				
C6	CD8 VIC HIV 100/200	CD8 VIC	25,79				
C7	CD8 VIC Mat. 100nM	CD8 VIC	25,38				
C8	CD8 VIC Mat. 100nM	CD8 VIC	25,81				
C9	CD8 VIC Mat. 100/400	CD8 VIC	26,26				
C10	CD8 VIC Mat. 100/400	CD8 VIC	26,20				
C11	CD8 VIC Mat. 100/200	CD8 VIC	26,27				
C12	CD8 VIC Mat. 100/200	CD8 VIC	26,23				
D1	CD8/IFNg HIV VIC/FAM 100/400	CD8 VIC	26,40	D1	CD8/IFNg HIV VIC/FAM 100/400	IFNg	31,16
D2	CD8/IFNg HIV VIC/FAM 100/400	CD8 VIC	26,38	D2	CD8/IFNg HIV VIC/FAM 100/400	IFNg	31,06
D3	CD8/IFNg HIV VIC/FAM 100/200	CD8 VIC	25,86	D3	CD8/IFNg HIV VIC/FAM 100/200	IFNg	33,60
D4	CD8/IFNg HIV VIC/FAM 100/200	CD8 VIC	25,92	D4	CD8/IFNg HIV VIC/FAM 100/200	IFNg	33,52
D7	CD8/IFNg Mat. VIC/FAM 100/400	CD8 VIC	26,74	D7	CD8/IFNg Mat. VIC/FAM 100/400	IFNg	30,43
D8	CD8/IFNg Mat. VIC/FAM 100/400	CD8 VIC	26,50	D8	CD8/IFNg Mat. VIC/FAM 100/400	IFNg	30,06
D9	CD8/IFNg Mat. VIC/FAM 100/200	CD8 VIC	25,93	D9	CD8/IFNg Mat. VIC/FAM 100/200	IFNg	32,37
D10	CD8/IFNg Mat. VIC/FAM 100/200	CD8 VIC	26,38	D10	CD8/IFNg Mat. VIC/FAM 100/200	IFNg	32,42

Tab. 6: Gemessene  $C_T$ -Werte: Vergleich von getrenntem Setup und Multiplex-Detektion: Die  $C_T$ -Werte sind im Vergleich zum getrennten Setup bei Multiplex-Detektion verschoben. Rot markiert sind die  $C_T$ -Werte der Messungen mit FAM-Sonde alleine (oben), VIC-Sonde alleine (Mitte) und in Multiplex-PCR (unten). Die Messung in Multiplex-PCR bewirkt eine  $C_T$ -Wert-Verschiebung um einen Zyklus. Blau markiert sind die Messwerte der IFN $\gamma$ -Detektion in Singleplex-PCR (oben) und Multiplex-PCR (unten). Die  $C_T$ -Werte sind hier um zwei Zyklen verschoben. Die Kombination aus beiden  $C_T$ -Wert-Verschiebungen machte eine verlässliche Messung unmöglich.

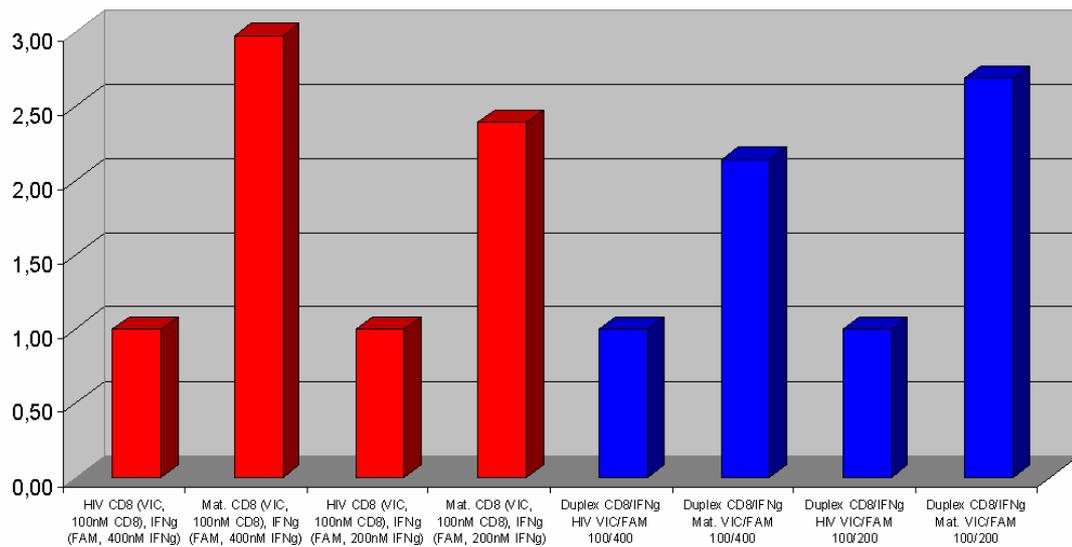


Abb. 32: Relative Kopienzahlen im Vergleich von getrenntem Setup (rot) und Multiplex-Detektion (blau) für jeweils zwei Primer-Konzentrationen CD8/IFN $\gamma$ : 100 nmol / 400 nmol und 100 nmol / 200 nmol. Nach dieser Berechnung der relativen Kopienzahlen schien die Detektion zweier Genprodukte im gleichen Ansatz möglich und die C<sub>T</sub>-Wert-Verschiebung unerheblich für die Normierung auf die Negativkontrolle zu sein.

Da die Berechnung der relativen Kopienzahlen keine großen Differenzen zeigten, sollte die Multiplex-Bestimmung zur Untersuchung einiger Patienten eingesetzt werden. Dabei zeigten sich allerdings Probleme: Wenn in einer Probe eine größere Menge an IFN $\gamma$ -cDNA vorlag, störte die Amplifikation dieses Genproduktes die Detektion von CD8 im gleichen Ansatz. Dadurch wurden die Ergebnisse stark verfälscht im Vergleich zu den Proben, in denen IFN $\gamma$  in geringerer Kopienzahl vorlag.

Sample Name	Detector	CT (CD8)	Detector	CT (IFN $\gamma$ )
HIV VIC/FAM CD8/IFN $\gamma$	CD8 VIC	24,93	IFN $\gamma$	28,68
HIV VIC/FAM CD8/IFN $\gamma$	CD8 VIC	24,98	IFN $\gamma$	27,77
posmix VIC/FAM CD8/IFN $\gamma$	CD8 VIC	27,28	IFN $\gamma$	21,78
posmix VIC/FAM CD8/IFN $\gamma$	CD8 VIC	26,57	IFN $\gamma$	21,91

Tab. 7: Daten einer Patientenprobe: Der C<sub>T</sub>-Wert für CD8 liegt für die Positivkontrolle drei Zyklen nach dem C<sub>T</sub>-Wert der Negativkontrolle. Die IFN $\gamma$ -Produktion in der Positivkontrolle ist sechs Zyklen früher detektierbar. Dadurch kommt es zu einer deutlichen Verschiebung bei Berechnung der relativen Kopienzahlen (IFN $\gamma$  / CD8). Je später CD8 detektierbar ist, desto höher wird der positive Wert, wenn IFN $\gamma$  messbar ist. Die Berechnung der relativen Kopienzahlen erfolgte über die  $\Delta\Delta C_T$ -Methode (siehe dazu den Abschnitt 3.9. „Quantitative RT-PCR in Echtzeit“).

### 4.3. Diskussion:

Detektion mehrerer Genprodukte in einem Ansatz ist grundsätzlich möglich. Allerdings stören sich die Amplifikationen der beiden Produkte dahingehend, dass die Detektion des einen die Messung des anderen inhibiert. War in einer Probe eine größere Menge des Genproduktes vorhanden, das in geringerer Menge vorhanden war (also das Zielgen  $IFN\gamma$ ), störte es die Detektion des Haushaltsgens CD8, was zu einer  $C_T$ -Wert-Verschiebung führte. Die  $C_T$ -Werte für CD8 waren daher nicht konsistent. Die mit verschiedenen Peptiden stimulierten Proben waren daher untereinander nicht vergleichbar. Die Messung bewirkte artifiziell eine Situation, die vergleichbar damit war, als ob die Expression der Referenz nicht konstant wäre. Damit konnten keine relativen Kopienzahlen berechnet werden und keine  $\Delta\Delta C_T$ -Methode mehr angewendet werden, weil die Amplifikationseffizienz für CD8 nicht ideal war.

Diese Probleme können mit der Überlappung der Spektren der beiden Sonden VIC und FAM zusammenhängen. Die Peaks der beiden liegen nur 20 nm auseinander, was eine Diskrimination im Bereich um die beiden Peaks schwierig macht. Liegen nun die Amplifikationsraten der beiden Genprodukte nah beieinander, kann die Fluoreszenz nicht mehr einem der beiden Produkte zugeordnet werden. Ist die Amplifikationsrate für ein Genprodukt zusätzlich durch Primerlimitierung begrenzt, sinkt die Nachweisgrenze für das Produkt doppelt.

Die Detektion in Multiplex-PCR wurde daher auch auf Anraten von Applied Biosystems wieder verlassen, weil eine Etablierung dieser Methode in keiner Relation zur erhofften Ersparnis stehen würde (weder in Bezug auf Zeitaufwand noch auf Kosten).

## 5. Materialien und Methoden

### 5.1. Allgemein verwendete Materialien und Geräte:

#### 5.1.1. Verzeichnis der verwendeten Geräte:

##### Pipetten:

- Becton Dickinson Falcon™: Pipetten 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml
- Multichannel Pipette: Costar®, Corning Incorporated™, Corning, New York, USA

##### Gefäße:

- Cryo-Röhrchen: 1,8 ml Cryo.S, Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland
- Eppendorf-Cups 1,5 ml, 2 ml: Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- PCR-Tubes 0,5 ml, Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
- FACS-Röhrchen: 5 ml Polystyrene Round Bottom Tube, BD Falcon™, BD Labware, Franklin Lake, New Jersey, USA
- 50 ml Röhrchen: Cellstar®, Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland
- 14 ml Polypropylene Round-bottom tube: BD Falcon™, BD Labware, Franklin Lake, New Jersey, USA
- 5 ml Polystyrene Round Bottom Tube: BD Falcon™, BD Labware, Franklin Lake, New Jersey, USA
- 6 ml, 7,5 ml, 9 ml Serum Monovette®, Sarstedt AG & Co., Nürnberg, Deutschland
- 9 ml EDTA KE Monovette®: Sarstedt AG & Co., Nürnberg, Deutschland
- Blue Max™ Jr., 15 ml Polystyrene Conical Tube: BD Falcon™, BD Labware, Franklin Lake, New Jersey, USA
- Kulturflaschen 50 ml, 250 ml, 550 ml, Cellstar®: Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland
- Kulturflaschen 50 ml, 250 ml, 550 ml: Nunclon™ Δ Surface, Nunc™ A/S, Roskilde, Dänemark

**Platten:**

- Multiwell™ 6 Well Tissue Culture Plate: BD Labware, Franklin Lakes, New Jersey, USA
- 96 Well Cell Culture Cluster Round Bottom with Lid: Costar® 3799, Corning Incorporated, Corning, New York, USA
- Nitrocellulose Platte: Millipore GmbH, Schwalbach, Deutschland
- PCR-Platte, Thermo-Fast® 96 Detection Plate: ABgene, Advanced Biotechnologies, Epsom, Surrey, UK

**Geräte:**

## FACS:

- Becton Dickinson FACSCalibur™: BD Biosciences, San Jose, California, USA

## Zentrifugen:

- Megafuge 1.0: Heraeus Instruments, Langenselbold, Deutschland
- Megafuge 1.0R: Heraeus Instruments, Langenselbold, Deutschland
- Megafuge 2.0R: Heraeus Instruments, Langenselbold, Deutschland
- Labofuge 400: Heraeus Instruments, Langenselbold, Deutschland
- Biofuge fresco: Heraeus Instruments, Langenselbold, Deutschland
- Eppendorf Centrifuge 5415R: Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

## ELISA:

- ELISA-Reader: SPECTRA-MAX 340: Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, California, USA

## ELISPOT:

- ELISPOT-Reader: Immunospotreader Series 3: Cellular Technology Ltd., Cleveland, Ohio, USA

## PCR:

- PCR-Maschine: PTC-100 Programmable Thermal Controller: MJ Research Inc., Waltham, Massachusetts, USA
- ABIPrism 7000® Sequence Detection System: Applied Biosystems, Foster City, California, USA

Western Blot:

- Fuji-Film LAS 1000: Fujifilm Photo Film Europe GmbH, Düsseldorf, Deutschland
- Gellaufkammer: Dual Plate Vertical Electrophoresis Unit: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
- Electrophoresis Power Supply EPS 3500: Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
- Graphitelektrode: Siemens/CTI, Knoxville, Tennessee, USA

Heizblöcke:

- Blockthermostat BT-10: Kleinfeld Labortechnik, Gehrden, Deutschland
- Thermomixer: Eppendorf Thermomixer 5436: Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Inkubatoren:

- Inkubator BB 16: Heraeus Instruments, Langenselbold, Deutschland
- Water Jacketed Incubator 3250: Labotect Labor-Technik, Göttingen, Deutschland

Mixer:

- MS1 Minishaker: IKA<sup>®</sup>, Staufen, Deutschland
- Vortex Genie 2<sup>™</sup>: Scientific Industries, Bohemia, New York, USA
- Vortex Genie 2<sup>®</sup>: Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz

Kühlschränke (+4°C):

- Liebherr Profi Line ES: Liebherr Hausgeräte, Ochsenhausen, Deutschland

Kühlschränke (-20°C):

- Liebherr ECC: Liebherr Hausgeräte, Ochsenhausen, Deutschland

Kühlschränke (-80°C):

- Revco Pult 2186-3-V12: Revco Scientific Inc., Asheville, North Carolina, USA
- Colora E80-450-S: Colora Messtechnik GmbH, Lorch, Deutschland

**Kits:**

- HSP70 ELISA Kit: StressXpress: StressGen, Victoria, Canada

**Software:**

- Cell Quest Pro™: BD Biosciences, San Jose, California, USA
- IMAGE-READER LAS-1000 Version 1.1: Fuji Photo Film Co., Ltd., Tokyo, Japan
- Microsoft® Excel 2002: Microsoft Corporation, Unterschleißheim, Deutschland
- SOFTmax Pro 2.1. (1997): Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, California, USA

**Sonstiges:**

- Nitrozellulosemembran: Amersham Biotech, Freiburg, Deutschland
- Optical Adhesive Covers: Applied Biosystems, Foster City, California, USA
- Parafilm: American National Can™, Greenwich, Connecticut, USA
- Sterican: B. Braun Medical AG, Emmenbrücke, Schweiz
- Whatman-Papiere: Whatman plc, Brentford, Middlesex, United Kingdom

**5.1.2. Verzeichnis der Hersteller der verwendeten Substanzen:****Antikörper:**

- Antikörper OKT-8, W6.32, BB7.2, GAP-A3: Claudia Falkenburger, Abteilung für Immunologie, Universität Tübingen
- anti-Gp96 SPA850: StressGen Biotechnologies Corp., Victoria, Canada
- Anti-IFN $\gamma$  mAb 1-D1K: MabTech AB, Hamburg, Deutschland
- Anti-IFN $\gamma$  7-B6-1 biotin: MabTech AB, Hamburg, Deutschland
- B10C-Antikörper: Amersham Biotech, Freiburg, Deutschland
- FITC-conjugated mouse anti-human IFN $\gamma$  monoclonal Antibody: BD Biosciences, San Diego, California, USA
- GAM-FITC: Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, Pennsylvania, USA
- Goat anti-Rat IgG, HRP-conjugated sc2006: Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California
- Monoklonaler Antikörper mouse anti-human CD4 FITC: AL-Immunotools, Friesoythe, Deutschland

- Monoklonaler Antikörper mouse anti-human CD8 FITC: BD Biosciences, San Jose, California, USA
- Monoklonaler Antikörper mouse anti-human CD8 PE: AL-Immunotools, Friesoythe, Deutschland
- Monoklonaler Antikörper mouse anti-human CD8 PerCP: BD Biosciences, San Jose, California, USA
- Monoklonaler Antikörper mouse anti-human CD8 APC: BD Biosciences, San Jose, California, USA

#### **Chemikalien:**

- Acrylamid/BIS: Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
- Ammoniumpersulfat (APS): Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
- Bromphenolblau: Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
- Chloroform: Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
- Dimethylsulfoxid (DMSO): Rotipuran®: Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- ECL-Substrat: Amersham Biotech, Freiburg, Deutschland
- EDTA: Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- Ethanol: Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- Formaldehyd: Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
- Glycerol: Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- Glycin: Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- Glykogen: Roche Diagnostics GmbH, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland
- Mercaptoethanol (2-Mercaptoethanol): Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
- Methanol: Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- Isopropanol: Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- Kaliumchlorid (KCl): Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- Kaliumdihydrogenphosphat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>): Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
- Na-Azid: Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

- Natriumborat: Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
- Natriumchlorid (NaCl): Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- Natriumhydrogenkarbonat (NaHCO<sub>3</sub>): Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
- Di-Natriumhydrogenphosphat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>): Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- Natriumkarbonat (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>): Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
- Natrium-Pyruvat: c.c.pro GmbH, Neustadt, Deutschland
- Nonidet P-40 (= IGEPAL C630): Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
- Nuclease-free Water: Promega GmbH, Madison, Wisconsin, USA
- PMA: Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
- Salzsäure: Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- SDS: Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
- TEMED: Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
- Tris: Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
- Trypan Blau: Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- Tween20: Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland

**Enzyme:**

- M-MLV Reverse Transkriptase: RT Promega: Promega GmbH, Madison, Wisconsin, USA
- RNase-Inhibitor: Promega GmbH, Madison, Wisconsin, USA

**Kits:**

- Elite Kit: Vectastain-Elite, Wiesbaden, Deutschland

**Lösungen:**

- 5x Puffer: Promega GmbH, Madison, Wisconsin, USA

**Medium:**

- IMDM (mit Glutamin): Cambrex Bioscience Verviers, Verviers, Belgien
- Lymphozyten-Separationsmedium: PAA Laboratories, Pasching, Österreich

- RPMI (with 25 mM HEPES and L-Glutamin): Cambrex Bioscience Verviers, Verviers, Belgien
- PBS: Claudia Falkenburger, Abteilung für Immunologie, Universität Tübingen
- X-Vivo Medium: Bio Whitaker's X-Vivo Medium, Cambrex Bioscience Verviers, Verviers, Belgien

**Medikamente:**

- Gentamycin: Cambrex Bioscience Walkersville, Walkersville, Maryland, USA
- MEM-NEAA: c.c.pro GmbH, Neustadt, Deutschland
- Pen-Strep: Cambrex Bioscience Verviers, Verviers, Belgien

**Primer und Sonden (Sequenzen siehe unten):**

- CD8-FAM-Sonde: Thermo Electron Corporation, Erlangen, Deutschland
- CD8-FP: Thermo Electron Corporation, Erlangen, Deutschland
- CD8-RP: Thermo Electron Corporation, Erlangen, Deutschland
- CD8-VIC-Sonde: Applied Biosystems, Foster City, California, USA
- dNTP-Mix: Promega GmbH, Madison, Wisconsin, USA
- IFN $\gamma$ -FAM-Sonde: Thermo Electron Corporation, Erlangen, Deutschland
- IFN $\gamma$ -FP: Thermo Electron Corporation, Erlangen, Deutschland
- IFN $\gamma$ -RP: Thermo Electron Corporation, Erlangen, Deutschland
- Random Hexamers: Roche Diagnostics GmbH, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland
- Streptavidin-PE: Invitrogen – Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
- Streptavidin-APC: Invitrogen – Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA

**Proteine:**

- BSA: Sigma Aldrich GmbH, München, Deutschland
- gp96-Standard: Immatics Biotechnologies, Tübingen, Deutschland
- HLA-Monomere: Stefan Stevanović, Steffen Walter, Abteilung für Immunologie, Tübingen, Deutschland
- SeeBlue<sup>®</sup> Plus2 Pre-Stained Standard: Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, California, USA

**Reagenzien:**

- CNBr-aktivierte Sepharose: Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
- $\beta_2$ -Mikroglobulin: Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
- BCIP: Roche Diagnostics GmbH, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland
- CNBr-aktivierte Sepharose 4B: Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
- ECL-Substrat: Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
- NBT: Roche Diagnostics GmbH, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland
- TRIzol<sup>®</sup>: Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, California, USA

**Zytokine:**

- IL-2: Promocell GmbH, Heidelberg, Deutschland
- IL-7: Promocell GmbH, Heidelberg, Deutschland
- IL-15: Promocell GmbH, Heidelberg, Deutschland

**5.1.3. Verzeichnis der verwendeten Lösungen:**

- Anodenpuffer: 50 mM Natriumborat pH 9,0; 20% Methanol
- DIGI-III: 12,1g Tris; 5,84g NaCl; 4,75g MgCl<sub>2</sub> in 1000 ml Aqua dest.
- ELISPOT-Puffer: 100 ml Aqua dest.; 293 mg NaHCO<sub>3</sub>; 159 mg Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 0,2% (200 mg) Na-Azid
- Einfriermedium: FCS; 10% DMSO
- FACS-Puffer: PBS; 0,01% Na-Azid
- Kathodenpuffer: 50 mM Natriumborat pH 9,0; 0,05% SDS
- Puffer zum Fixieren der FACS-Färbungen: PBS; 0,01% Na-Azid; 1% Formaldehyd
- Kulturmedium für T-Lymphozyten: RPMI (mit Glutamin); Pen-Strep (100 U/ml Penicillin und 100 U/ml Streptomycin final); Gentamycin (0,05 mg/ml) final; 10% Humanserum

- Kulturmedium für Tumorzellen: RPMI (mit Glutamin); Pen-Strep (100 U/ml Penicillin und 100 U/ml Streptomycin final); 1% MEM-NEAA; Natrium-Pyruvat (1 mM final); 10% FCS
- Kulturmedium für Tumorzellen: IMDM (mit Glutamin); Pen-Strep (100 U/ml Penicillin und 100 U/ml Streptomycin final); 1% MEM-NEAA; Natrium-Pyruvat (1 mM final); 10% FCS
- PBS: Dulbecco's PBS: 200 mg/l KCl; 200 mg/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 8000 mg/l NaCl; 2160 mg/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O in Aqua dest.
- Perm-Wash Puffer: PBS; 0,5% FCS; 0,1% Saponin (S7900-25G); 0,02% Na-Azid
- SDS-Ladepuffer (2x): 125 mM Tris pH 6,8; 3,5% SDS; 20% Glycerol; 10% β-Mercaptoethanol; 0,2% Bromphenolblau
- SDS-Laufpuffer: 0,25 M Tris; 1,9 M Glycin; 1% SDS
- TBB: 0,1% Nonidet P-40; 3% BSA; 5 mM EDTA in 1x TBS
- TBS (10x): 500 nM Tris-HCl pH 8,0; 1,5 M NaCl
- Tetramerpuffer: PBS + 0,01% Na-Azid; 2% FCS; 2mM EDTA
- Tetramer-Staining-Puffer: 50% FCS; 50% Tetramer-Puffer
- Tris-HCl-Puffer 1,5 M pH 8,6: 181,65 g/l Tris in H<sub>2</sub>O bidest, mit HCl auf einen pH von 8,6 titriert.
- Tris-HCl-Puffer 0,5 M pH 6,8: 60,55 g/l Tris in H<sub>2</sub>O bidest, mit HCl auf einen pH von 6,8 titriert.
- Trypanblau: 0,05% Trypan Blau; 0,02% Na-Azid, PBS
- TWB: 0,1% Nonidet P-40 in 1x TBS

#### 5.1.4. Sequenzen der verwendeten Primer:

- CD8-FP: 5'-CCC TGA GCA ACT CCA TCA TGT-3'
- CD8-RP: 5'-GTG GGC TTC GCT GGC A-3'
- CD8-FAM: 5'-TCA GCC ACT TCG TGC CGG TCT TC-3'  
5': 6-FAM; 3': TAMRA
- CD8-VIC: 5'-TCA GCC ACT TCG TGC CGG TCT TC-3'  
5': 6-VIC; 3': TAMRA
- IFN $\gamma$ -FP: 5'-AGC TCT GCA TCG TTT TTG GTT-3'
- IFN $\gamma$ -RP: 5'-GTT CCA TTA TCC GCT ACA TCT GAA-3'
- IFN $\gamma$ -FAM: 5'-TCT TGG CTG TTA CTG CCA GGA CCC A-3'  
5': 6-FAM; 3': TAMRA

## 5.2. Lymphozytenseparation aus peripherenvenösem Blut:

### Materialien:

- 50 ml Tube (Cellstar<sup>®</sup>, Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland)
- Lymphozytenseparationsmedium (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich)
- PBS (Claudia Falkenburger, Abteilung für Immunologie, Universität Tübingen)
- Trypanblau (0,05% Trypan Blau (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), 0,02% Na-Azid (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), PBS)
- Cellstar<sup>®</sup> Cryo.s, 1,8 ml (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland)
- FCS (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) mit 10% DMSO (Rotipuran<sup>®</sup>, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
- Einfriercontainer (Nalgene<sup>™</sup> Cryo 1°C Freezing Container, RPI Corp., Chicago, Illinois, USA)

### Durchführung:

Die Blutproben wurden bei 1800 U/min für sechs Minuten zentrifugiert. Das Plasma wurde abgenommen und in einem separaten Gefäß erneut für sechs Minuten bei 1800 U/min zentrifugiert. Das verbleibende Blut wurde etwa 1:1 mit PBS verdünnt und dann in ein neues Gefäß (50 ml) überführt. Die Abnahmeröhrchen (9 ml EDTA KE, Monovette<sup>®</sup>, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland) wurden anschließend mit jeweils 3 ml PBS gewaschen.

Das Plasma wurde wiederum abgenommen. Die im Röhrchen verbliebenen Zellen wurden mit 3 ml PBS aus dem Röhrchen gespült und dem Blut zugesetzt.

Unter das verdünnte Blut wurden 10 ml Lymphozyten-Separationsmedium gegeben, so dass eine saubere Trennung zwischen Blut und Separationsmedium gegeben war. Dies wurde für 20 Minuten bei 2000 U/min in ungebremster Zentrifuge zentrifugiert.

Die Lymphozyten wurden aus der Trennschicht mit einer Pipette (10 ml, BD Falcon<sup>™</sup>, BD Labware, Franklin Lake, New Jersey, USA) entnommen und in

ein neues Röhrchen überführt. Diese Zelllösung wurde mit PBS auf ein finales Volumen von 50 ml verdünnt und dann bei 1500 U/min für sechs Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde danach in ein neues Röhrchen überführt, die Zellen erneut in Lösung gebracht und wiederum auf 50 ml mit PBS aufgefüllt. Beide Gefäße wurden danach erneut bei 1500 U/min zentrifugiert.

Aus dem Überstand wurde gegebenenfalls ein Teil entnommen für eine HLA-Typisierung auf Thrombozyten. Der Rest des Überstandes wurde verworfen. Der komplette Überstand auf den gewaschenen Lymphozyten wurde verworfen. Die beiden Zell-Pellets wurden in einem Röhrchen zusammengeführt und mit PBS auf 20 ml aufgefüllt. Entnommen wurden 30  $\mu$ l, die wiederum mit 30  $\mu$ l Trypanblau versetzt wurden. Danach wurde diese Lösung in eine Neubauer-Zählkammer (Tiefe 0,1 mm, Paul Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen, Deutschland) zum Zählen gegeben. Ausgezählt wurden zwei Mal sechzehn Quadrate. Die Menge der Lymphozyten wurde wie folgt berechnet:

(Anzahl der Zellen in 4 x 4 Quadraten) x (Verdünnung) x (Volumen der Kammer) x  $10^4$  = (Anzahl der Zellen pro ml)

Die Zellen wurden erneut bei 1500 U/min für sechs Minuten zentrifugiert, der Überstand wurde abgenommen, und die Zellen wurden anschließend eingefroren zu jeweils  $10 \times 10^6$  Zellen für HLA-A2-negative Spender, beziehungsweise  $5 \times 10^6$  für HLA-A2-positive Spender. Eine entsprechende Anzahl Cryo-Röhrchen (Cellstar<sup>®</sup> Cryo.s, 1,8 ml, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) wurde beschriftet und bis zum Einfrieren der Zellen bei +4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Die Zellen wurden eingefroren in Einfriermedium in einem Einfriercontainer. Dieser Container erlaubt eine Kühlung der Zellen um -1°C pro Minute. Die Zellen wurden bis auf -80°C eingefroren und dann in einer Pappbox bei -80°C, beziehungsweise später in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert.

### **5.3. Plasma-Isolation aus Blut:**

#### Materialien:

- 14 ml Polypropylene Round-bottom tube (BD Falcon™, BD Labware, Franklin Lake, New Jersey, USA)

#### Durchführung:

Plasma wurde aus Blutproben entnommen (siehe dazu Kapitel 5.2.). Es wurde erneut bei 1800 U/min für sechs Minuten zentrifugiert und anschließend in ein neues Röhrchen überführt. Die Zellen, die bei der Zentrifugation als Pellet auf dem Boden des Gefäßes zurück blieben, wurden mit PBS aus dem Röhrchen gespült und dem restlichen Blut zugeführt. Das Plasma wurde bei 2000 U/min für weitere fünf Minuten zentrifugiert und danach in eine beschriftetes, skaliertes Röhrchen überführt und darin auf -80°C eingefroren.

### **5.4. Serum-Isolation aus Blut:**

#### Materialien:

- 5 ml Round Bottom Tube (Becton Dickinson Falcon™, Franklin Lake, New Jersey, USA)
- 1,5 ml Eppendorf Tubes (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)

#### Durchführung:

Vor der Serum-Isolation wurden die Blutproben bis zur vollen Koagulation bei Raumtemperatur für vier Stunden gelagert.

Die Serum-Röhrchen (6 ml, 7,5 ml, 9 ml, Monovette®, Sarstedt AG & Co., Nürnberg, Deutschland) wurden bei 1800 U/min zentrifugiert. Das Serum wurde mit einer Pipette (2 ml, Becton Dickinson Falcon™, BD Labware, Franklin Lake, New Jersey, USA) in ein weiteres Gefäß (5 ml) überführt. Dieses Serum wurde bei 2000 U/min für 5 Minuten zentrifugiert und danach ohne die Blutkoagel in ein weiteres gleiches Röhrchen pipettiert. Das Serum wurde dann erneut bei 2000 U/min für weitere 5 Minuten zentrifugiert, anschließend in 1,5 ml Eppendorf Tubes zu je 500 µl aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

## **5.5. Separation von adhaerenten und nicht adhaerenten Zellen:**

### Materialien:

- X-Vivo Medium (Cambrex Bioscience Verviers, Verviers, Belgien)
- Multiwell™ 6 Well Tissue Culture Plate (BD Labware, Franklin Lake, New Jersey, USA)
- PBS (Claudia Falkenburger, Abteilung für Immunologie, Tübingen)

### Durchführung:

In eine 6-well Platte wurden pro Well 100.000 PBMCs in 1 ml X-Vivo Medium gegeben. Dazu wurden jeweils weitere 2 ml X-Vivo Medium pipettiert. Die Platten wurden für 2 Stunden bei +37°C im Inkubator gelagert. Danach wurden die 3 ml Medium zusammen mit den Zellen, die nicht am Boden der Platte adhaeriert waren, entnommen. Die Platte wurde zwei Mal mit jeweils 2 ml PBS gewaschen. Das PBS wurde mit den anderen Zellen gepoolt. Anschließend wurden die Zellen für sechs Minuten bei 1600 U/min zentrifugiert, dann gezählt und schließlich eingefroren oder weiter bearbeitet.

## **5.6. Auftauen von Zellen:**

### Materialien:

- T-Zell-Medium
- Kulturmedium für Tumorzellen
- Blue Max™ Jr. (BD Falcon™, BD Labware, Franklin Lake, New Jersey, USA)

### Durchführung:

Ein Wasserbad wurde auf +37°C vorgewärmt. Ebenfalls vorgewärmt wurde Kulturmedium:

- a) T-Zell-Medium für PBMCs von Patienten
- b) Kulturmedium für Tumorzellen bei Auftauen von Tumorzellen

Von dem vorgewärmten Medium wurden jeweils 6 ml in ein Röhrchen gegeben. Die Vials wurden entweder aus der Stickstofflagerung (-196°C) oder aus dem Tiefkühlschrank (-80°C) geholt.

Die eingefrorenen Zellen wurden im Wasserbad (+37°C) so weit aufgetaut, dass noch ein kleiner Rest Eis in der Flüssigkeit zu sehen war. Danach wurde steril tropfenweise 1 ml des Kulturmediums zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden aus dem Vial entnommen und in die verbleibenden 5 ml Medium gegeben. Das Cryo-Gefäß wurde danach mit 1 ml Medium gespült.

Die Zellen wurden anschließend bei 1400 U/min für vier Minuten zentrifugiert. Die Überstand wurde verworfen, und die Zellen in 5 ml Medium resuspendiert. Danach wurden sie gezählt und entsprechend des jeweiligen Protokolls weiter verwendet.

## **5.7. Zellkultur:**

### Materialien:

- 96 Well Cell Culture Cluster Round Bottom with Lid (Costar® 3799, Corning Incorporated, Corning, New York, USA)
- T-Zell-Medium
- Peptide (AG Stevanović, Abteilung für Immunologie, Tübingen, Deutschland)
- IL-7 (Promocell GmbH, Heidelberg, Deutschland)
- IL-15 (Promocell GmbH, Heidelberg, Deutschland)
- IL-2 (Promocell GmbH, Heidelberg, Deutschland)
- Kulturmedium für Tumorzellen
- Kulturflaschen (50 ml, 250 ml, 550 ml): Cellstar® (Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland)  
oder Nunclon™ Δ Surface (Nunc™ A/S, Roskilde, Dänemark)
- Trypsin-EDTA : Cambrex Bioscience Verviers, Verviers, Belgien

### Durchführung:

#### a) Tests von Zellen *ex vivo*

Aufgetaute oder frisch separierte PBMCs wurden in einer entsprechenden Menge T-Zell-Medium resuspendiert, dass für jedes benötigte Well die jeweilige Menge Zellen in 100 µl gelöst waren. Die Zellen wurden in eine 96-well Platte gegeben. Pro Well wurden bis 350.000 Zellen ausplattiert.

Die Platten wurden über Nacht bei +37°C inkubiert.

RT-PCR:

Am nächsten Morgen wurde zu den Zellen 50 µl Lösung mit 15 µg/ml Peptid (finale Konzentration 5 µg/ml) in T-Zell-Medium zugegeben. Die Medien wurden in den Wells mit einer Multichannel-Pipette gemischt. Anschließend wurde die Platte für drei Minuten bei 1200 U/min zentrifugiert und dann für 3 Stunden bei +37°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation wurde RNA isoliert.

Tetramer-Staining:

Die Zellen wurden am nächsten Morgen (nach maximal 15 Stunden Inkubation) ohne weitere Behandlung nach dem üblichen Protokoll gefärbt.

Kombiniertes Tetramer- und intrazelluläres IFN $\gamma$ -Staining:

Die Zellen wurden am nächsten Morgen nach dem üblichen Protokoll (siehe dort) stimuliert und gefärbt.

b) Tests mit Prästimulation

Die Zellen wurden in gleicher Anzahl auf 96-well Platten ausplattiert wie oben beschrieben. Sie wurden aber in T-Zell-Medium mit 10 ng/ml IL-7 und 10 ng/ml IL-15 final resuspendiert. Die Zellen wurden über Nacht bei +37°C inkubiert und am nächsten Morgen mit 5 µg/ml final Peptid in 50 µl T-Zell-Medium mit wieder je 10 ng/ml IL-7 und IL-15 stimuliert, gemischt und bei 1200 U/min für drei Minuten zentrifugiert.

Die Platten wurden danach bei +37°C inkubiert.

Am dritten Tag wurden 20 U/ml final IL-2 in 50 µl T-Zell-Medium zugegeben (bei einer 1:4-Verdünnung hatte die Stammlösung eine Konzentration von 80 U/ml).

c) Kultur von non-adhaerenten Tumorzelllinien

Die Tumorzellen (T2, K562-A2) wurden in einem speziellen Kulturmedium bei +37°C im Brutschrank inkubiert. Zwei- bis dreimal pro Woche wurden das Medium durchgemischt und die Hälfte des Mediums samt Tumorzellen abgenommen und verworfen, beziehungsweise in eine weitere Kulturflasche überführt zur weiteren Kultur. Die abgenommene Menge wurde durch frisches Kulturmedium ersetzt.

#### d) Kultur von adhaerenten Tumorzelllinien

Bei adhaerenten Tumorzelllinien (RCC68) wurde ebenfalls zwei- bis dreimal pro Woche das Kulturmedium gewechselt. Dazu wurde das Medium in den Kulturflaschen vollständig abgenommen. Auf die Zellen wurde je nach Größe der Flasche 2 ml bis 8 ml Trypsin-EDTA gegeben. Die Zellen wurden anschließend für acht bis zwölf Minuten bei +37°C inkubiert. Wenn im Trypsin-EDTA die Tumorzellen in weißen Flocken sichtbar waren, wurden die Reaktion durch Zugabe von 10 ml RPMI mit 10% FCS gestoppt. Die Tumorzellen wurden samt dem Medium entnommen, bei 1500 U/min für fünf Minuten zentrifugiert und danach in 10 ml RPMI mit FCS resuspendiert. Von diesen 10 ml wurden 5 ml entweder verworfen oder in eine neue Flasche überführt zur weiteren Kultur. Die übrigen Zellen wurden in die Originalflasche zurückgegeben. Anschließend wurden die Flaschen wieder auf 20 ml mit Medium aufgefüllt und anschließend bei +37°C inkubiert.

### 5.8. HLA-Typisierung auf Thrombozyten:

#### Materialien:

- FACS-Puffer
- FACS-Röhrchen: 5 ml Polystyrene Round Bottom Tube (BD Falcon™, BD Labware, Franklin Lake, New Jersey, USA)
- OKT-8-Antikörper (Claudia Falkenburger, Abteilung für Immunologie, Tübingen)
- W6.32-Antikörper (Claudia Falkenburger, Abteilung für Immunologie, Tübingen)
- BB7.2-Antikörper (Claudia Falkenburger, Abteilung für Immunologie, Tübingen)
- GAP-A3-Antikörper (Claudia Falkenburger, Abteilung für Immunologie, Tübingen)
- GAM-FITC (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, Pennsylvania, USA)
- FACS-Puffer mit 1% Formaldehyd (Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz)

### Durchführung:

Thrombozyten wurden aus dem Überstand bei Lymphozytenseparation entnommen. Dazu wurden etwa 14 ml Überstand in ein neues Röhrchen überführt und bei 1900 U/min für sechs Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Thrombozyten wurden resuspendiert und in 3 ml FACS-Puffer gelöst. Danach wurden jeweils 100 µl in ein FACS-Röhrchen (5 ml) überführt.

Auf die Thrombozyten wurden dann folgende Antikörper gegeben:

1. OKT-8: 10 µl
2. W6.32: 100 µl einer 1:100 Verdünnung
3. BB7.2: 100 µl einer 1:100 Verdünnung
4. GAP-A3: 100 µl einer 1:200 Verdünnung

Die Mischungen wurden gevortext und dann für 30 Minuten bei +4°C in Dunkelheit inkubiert.

Danach wurden die Thrombozyten mit jeweils 2 ml FACS-Puffer gewaschen und bei 1900 U/min für drei Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Dem Pellet wurden darauf 50 µl einer 1:100 Verdünnung von GAM-FITC zugesetzt. Die Mischung wurde erneut gevortext und für weitere 20 Minuten bei +4°C inkubiert.

Die Thrombozyten wurden dann erneut mit 2 ml FACS-Puffer gewaschen und bei 1900 U/min für drei Minuten zentrifugiert. Hier wurde ebenfalls der Überstand verworfen und die Antikörper-Markierung mit 300 µl FACS-Puffer mit 1% Formaldehyd fixiert.

Die Messung wurde am Becton Dickinson FACSCalibur™ (BD Biosciences, San Jose, California, USA) durchgeführt. Einstellungen in Cell Quest Pro™ (BD Biosciences, San Jose, California, USA) wurden überprüft und den aktuellen Verhältnissen abgepasst. Eine *Region of interest* (ROI) wurde um die zu messenden Zellen gelegt. Die Messung erfolgte im Kanal FL-1 (FITC). Gemessen wurden 10.000 Ereignisse. Die Auswertung erfolgte anschließend ebenfalls mit Cell Quest Pro™. Die Daten wurden sowohl in elektronischer als auch in gedruckter Form archiviert.

## 5.9. Herstellung von Tetrameren – Multimerisierung mit Streptavidin:

### Materialien:

- HLA-Monomere (Stefan Stevanović, Steffen Walter, Abteilung für Immunologie, Tübingen, Deutschland)
- Streptavidin-PE (Invitrogen – Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA)
- Streptavidin-APC (Invitrogen – Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA)

### Durchführung:

Die bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerten rückgefalteten Monomere wurden bei  $+4^{\circ}\text{C}$  aufgetaut. Der Komplex lag in Aliquots von  $50\ \mu\text{g}$  vor. Er wurde im stöchiometrisch molaren Verhältnis von 4:1 mit konjugiertem Streptavidin-PE oder Streptavidin-APC versetzt. Die benötigte Menge Streptavidin wurde in 10 gleichen Fraktionen von jeweils 10% zugesetzt. Zwischen den Zugaben wurden die Aliquots 30 Minuten bei  $+4^{\circ}\text{C}$  und Dunkelheit rotiert. Anschließend wurden sie bei  $+4^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Von den Streptavidin-Konjugaten wurden folgende Mengen eingesetzt:

Konjugat	Hersteller	Einsatz je $50\ \mu\text{g}$ HLA-A*0201
Streptavidin-PE	Molecular Probes	$78,5\ \mu\text{g}$ Konjugat
Streptavidin-APC	Molecular Probes	$43,5\ \mu\text{g}$ Konjugat

(HLA-A\*0201 MW = 45 kDa, Streptavidin MW = 60 kDa, Phycoerythrin MW = 240 kDa, Allophycocyanin MW = 104 kDa)

Tab. 8: Eingesetzte Mengen der Streptavidin-Konjugate

## 5.10. Tetramerfärbung:

### Materialien:

- 5 ml Polystyrene Round Bottom Tube, BD Falcon™ (BD Labware, Franklin Lake, New Jersey, USA)
- Tetramer-FACS Puffer
- Monoklonaler Antikörper mouse anti-human CD8 FITC (AL-Immunotools, Friesoythe, Deutschland)
- Monoklonaler Antikörper mouse anti-human CD8 PE (AL-Immunotools, Friesoythe, Deutschland)

- Monoklonaler Antikörper mouse anti-human CD8 PerCP (BD Biosciences, San Jose, California, USA)
- Monoklonaler Antikörper mouse anti-human CD8 APC (BD Biosciences, San Jose, California, USA)
- Monoklonaler Antikörper mouse anti-human CD4 FITC (AL-Immunotools, Friesoythe, Deutschland)
- Tetramere
- Tetramer-Staining Puffer
- 1,5 ml Eppendorf Cup (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- Tetramer-Puffer mit 1% Formaldehyd (Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz)

Durchführung:

Das gesamte Protokoll wird bei +4°C, das heißt auf Eis durchgeführt. Die PBMCs (etwa  $1 \times 10^6$  Zellen für Tetramerfärbungen, etwa  $0,4 \times 10^6$  für Single Stainings) wurden in ein FACS-Röhrchen (5 ml) überführt und einmal mit jeweils 2 ml Tetramer-Puffer gewaschen und anschließend bei 1400 U/min für vier Minuten in einer auf +4°C gekühlten Zentrifuge (Megafuge 2.0R, Heraeus Instruments, Langenselbold, Deutschland) zentrifugiert. Der Überstand wurde möglichst vollständig abgegossen. Anschließend wurden auf die Zellen Antikörper wie folgt gegeben:

a) Single Staining:

- Monoklonarer Antikörper mouse anti-human CD8 FITC: 1 µl pro Färbung
- Monoklonarer Antikörper mouse anti-human CD8 PE: 1 µl pro Färbung
- Monoklonaler Antikörper mouse anti-human CD8 PerCP: 5 µl pro Färbung
- Monoklonaler Antikörper mouse anti-human CD8 APC: 1 µl pro Färbung

b) Tetramerfärbungen:

- Monoklonaler Antikörper mouse anti-human CD4 FITC: 0,6 µl pro Färbung
- Monoklonaler Antikörper mouse anti-human CD8 PerCP: 9 µl pro Färbung

Die Mischungen wurden gevortext und dann für 30 Minuten bei +4°C in Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit jeweils 2 ml Tetramer-Puffer gewaschen und für vier Minuten bei 1400 U/min zentrifugiert.

Es wurde eine Lösung mit Tetrameren vorbereitet (zur Herstellung von Tetrameren siehe Kapitel 5.9.). Diese Lösung hatte jeweils die finale Konzentration 5 µg/ml. Die Stammlösungen der Tetramere waren wie folgt:

- a) PE-markiert: 480 µg/ml
- b) APC-markiert: 730 µg/ml

Die Tetramere für die Tumorantigene wurden grundsätzlich mit PE markiert. Kontrolltetramere (Influenza Matrix, CMV) wurden an APC-Fluorochrome gekoppelt.

Von der Tetramer-Lösung wurden 200 µl pro Probe auf Eis unter der Sterilbank bei größtmöglicher Dunkelheit angesetzt. Die Tetramere wurden in Tetramer-Staining Puffer verdünnt und dann in Eppendorf-Cups (1,5 ml) für fünf Minuten bei 13.000 U/min in einer auf +4°C gekühlten Zentrifuge (Biofuge fresco, Heraeus Instruments, Langenselbold, Deutschland) zentrifugiert.

Von den gewaschenen Zellen wurde der Überstand möglichst vollständig entfernt. Auf die Zellpellets wurden jeweils 150 µl der entsprechenden Tetramerlösung gegeben, die Röhrchen gevortext und anschließend für weitere 30 Minuten bei +4°C in Dunkelheit inkubiert.

Anschließend wurden die Zellen ein- bis zweimal (abhängig von der Zahl der Zellen in der Lösung: Bei wenigen Zellen einmal, um zu vermeiden, dass viele Zellen beim Waschen verloren gehen) mit jeweils 2 ml Tetramer-Puffer gewaschen und bei 1400 U/min für vier Minuten bei +4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde jeweils möglichst vollständig abgenommen.

Anschließend wurden die Zellen mit 300 µl Tetramer-Puffer mit 1% Formaldehyd fixiert und bis zur Messung bei +4°C in Dunkelheit gelagert.

Die Messung erfolgte am Becton Dickinson FACSCalibur™ (BD Biosciences, San Jose, California, USA) in Vier-Farben-Messung.

### **5.11. Kombiniertes Tetramer- und intrazelluläres IFN $\gamma$ -Staining:**

#### Materialien:

- 96 Well Cell Culture Cluster Round Bottom with Lid: Costar® 3799 (Corning Incorporated, Corning, New York, USA)
- Golgi-Stop: BD Golgi Stop™ (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, California, USA)
- Peptide (AG Stevanović, Abteilung für Immunologie, Tübingen, Deutschland)
- 5 ml Polystyrene Round Bottom Tube (BD Falcon™, BD Labware, Franklin Lake, New Jersey, USA)
- Tetramer-FACS-Puffer
- CD8-PerCP Antikörper (BD Biosciences, San Jose, California, USA)
- Tetramere
- Tetramer-Staining Puffer
- 1,5 ml Eppendorf Cup (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- BD Cytotfix/Cytoperm™ (BD Pharmingen, San Diego, California, USA)
- Perm-Wash-Puffer
- FITC-conjugated mouse anti-human IFN $\gamma$  monoclonal Antibody (BD Biosciences, San Diego, California, USA)
- Tetramer-Puffer mit 1% Formaldehyd

#### Durchführung:

Von den 200  $\mu$ l Überstand in den Wells der Platte wurden 100  $\mu$ l abgenommen und verworfen. Die Zellen wurden mit 5  $\mu$ g/ml Peptid final und Golgi-Stop (1:1300 Finalverdünnung) in einem finalen Volumen von 150  $\mu$ l für sechs Stunden bei +37°C restimuliert.

Alle folgenden Arbeitsschritte finden bei +4°C auf Eis und bei möglichst geringer Lichteinstrahlung statt.

Die Zellen wurden aus den Kulturplatten in FACS-Röhrchen (5 ml) überführt, mit 600  $\mu$ l Tetramer-FACS-Puffer verdünnt und anschließend bei 1400 U/min für vier Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und die Zellen erneut in Tetramer-FACS-Puffer gewaschen (1400 U/min, 4 Minuten).

Auf das Zellpellet wurden 9  $\mu$ l CD8-PerCP Antikörper gegeben. Die Röhrchen wurden gevortext und bei +4°C für zwanzig Minuten in Dunkelheit inkubiert.

Die Zellen wurden in 2 ml Tetramer-FACS-Puffer gewaschen und bei 1400 U/min für 4 Minuten zentrifugiert. Während der Zentrifugation wurde die Tetramer-Lösung vorbereitet. Dazu wurde die benötigte Menge Tetramer unter der Sterilbank in Tetramer-Staining Puffer gegeben, die Lösungen gevortext und dann bei 13.000 U/min für 5 Minuten zentrifugiert. Diese Lösung hatte jeweils die Konzentration 5  $\mu$ g/ml. Die Stammlösungen der Tetramere waren wie folgt:

c) PE-markiert: 480  $\mu$ g/ml

d) APC-markiert: 730  $\mu$ g/ml

Pro Probe wurden 150  $\mu$ l dieser Lösung nach Abnahme des Überstands auf die Zellpellets gegeben. Die Röhrchen wurden gevortext und dann bei +4°C in Dunkelheit für dreißig Minuten inkubiert.

Die Proben wurden wiederum mit 2 ml Tetramer-FACS-Puffer gewaschen, zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Es wurden 250  $\mu$ l Cytofix/Cytoperm auf die Zellen gegeben. Die Röhrchen wurden gevortext und wiederum bei +4°C in Dunkelheit für zwanzig Minuten inkubiert.

Am Ende der Inkubation wurden die Zellen mit Perm-Wash-Puffer gewaschen. Während der Zentrifugation wurde der Anti-IFN $\gamma$ -Antikörper 1:100 zu einer unbekanntem Konzentration in Perm-Wash-Puffer verdünnt. Von dieser Verdünnung wurden 100  $\mu$ l auf die Zellpellets gegeben. Die Proben wurden gevortext und bei +4°C in Dunkelheit für dreißig Minuten inkubiert.

Anschließend wurden die Proben ein- bis zweimal mit Tetramer-FACS-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden mit 300  $\mu$ l Tetramer-FACS-Puffer mit 1% Formaldehyd fixiert.

Die Proben wurden bis zur Messung bei +4°C in Dunkelheit gelagert.

Die Messung erfolgte am Becton Dickinson FACSCalibur™ (BD Biosciences, San Jose, California, USA) unter Nutzung der Cell Quest Pro™ Software.

## **5.12. HSP70-ELISA:**

### Materialien:

- ELISA-KIT (StressXpress Hsp70 ELISA Kit, EKS-700, StressGen Biotechnologies Corp., Victoria, Canada)
- Parafilm (American National Can™, Greenwich, Connecticut, USA)

### Durchführung:

Verwendet wurde ein für induziertes HSP70 spezifischer ELISA-KIT. Dieser Kit hat laut Angabe des Herstellers eine Sensitivität von  $\leq 540$  pg/ml und einen Messbereich von 0,78 – 50 ng/ml.

Die Reagenzien und Materialien des Kits wurden auf Raumtemperatur gebracht.

Ein HSP70-Standard wurde zentrifugiert und mit 35  $\mu$ l destilliertem und steril filtriertem Wasser rehydriert, gevortext und danach 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Standard kurz zentrifugiert und aliquotiert. Die Konzentration der HSP70-Standard-Stammlösung betrug nun 10  $\mu$ g/ml. Von dieser Stammlösung wurde eine Verdünnungsreihe angefertigt. Dazu wurden 5  $\mu$ l Stammlösung in 995  $\mu$ l „Sample Diluent“ (Part # 700-P4) verdünnt. Dadurch entstand eine Lösung von 50 ng/ml. Von dieser Lösung wurden dann 500  $\mu$ l entnommen und mit 500  $\mu$ l Sample Diluent verdünnt. Dieses wurde sechs Mal wiederholt, sodass Lösungen von 25 ng/ml, 12,5 ng/ml, 6,25 ng/ml, 3,125 ng/ml, 1,56 ng/ml und 0,78 ng/ml entstanden. Schließlich wurden 500  $\mu$ l Sample Diluent als Negativkontrolle aliquotiert.

Der 10x Wasch-Puffer (Part # 700-P5) wurde leicht geschüttelt, um etwaige kristalline Reste in Lösung zu bringen. 100 ml Waschpuffer wurden danach mit 900 ml destilliertem Wasser verdünnt.

Der biotinylierte Antikörper Biotin Anti-HSP70 (Part # 700-P6) wurde zentrifugiert, um sämtlichen Antikörper im Gefäß verwenden zu können. Anschließend wurden 22  $\mu$ l Biotin Anti-HSP70 in 11 ml Biotin Anti-HSP70-

Diluent (Part # 700-P7) verdünnt. Dieses Volumen wurde für die volle Nutzung einer 96-well ELISA-Platte gewählt. Bei anteiliger Nutzung war das Volumen entsprechend geringer.

Das Avidin-ARP Konjugat (Part # 700-P8) wurde ebenfalls zentrifugiert und 1  $\mu$ l davon in 11 ml Avidin-HRP Conjugate Diluent (Part # 700-P9) verdünnt und leicht geschüttelt. Auch hier sind die genannten Volumina für eine volle 96-well Platte. Bei Nutzung von weniger als 96 wells wurde entsprechend weniger Avidin-HRP Konjugat gelöst.

Serumproben von Patienten wurden von  $-80^{\circ}\text{C}$  aufgetaut. Nach dem Auftauen wurden die Serumproben 1:2 in Sample Diluent verdünnt. 125  $\mu$ l Serum wurden dazu mit 125  $\mu$ l Sample Diluent gemischt und danach gevortext. Die Proben wurden während des Versuchs bei Raumtemperatur gelagert.

Es wurden jeweils 100  $\mu$ l der HSP70 Verdünnungsreihe, der Negativkontrolle und der vorbereiteten Serumproben in die HSP70 ELISA Platte (Part # 700-P10) pipettiert. Die Platte wurde mit Parafilm verschlossen und für zwei Stunden bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert.

Anschließend wurde die Platte gewaschen. Dazu wurden jeweils 300  $\mu$ l 1x Wasch-Puffer mit einer Multichannel Pipette (Costar<sup>®</sup>, Corning Incorporated<sup>™</sup>, Corning, New York, USA) in die Wells pipettiert. Insgesamt wurde die Platte sechs Mal gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurden die Wells möglichst vollständig getrocknet.

Danach wurden den Wells jeweils 100  $\mu$ l des vorbereiteten Biotin Anti-HSP70 zugesetzt. Die Platte wurde wiederum mit Parafilm verschlossen und unter leichtem Schütteln für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Platte wieder wie oben beschrieben gewaschen.

Danach wurden jeweils 100  $\mu$ l des Avidin-HRP Konjugats in die Wells pipettiert, die Platte wurde erneut verschlossen und noch einmal für eine Stunde bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Dann wurde sie erneut sechs Mal gewaschen.

Der gewaschenen Platte wurden jeweils 100  $\mu$ l TMB-Substrat (Part # 700-P10) zugesetzt. Die Farbreaktion wurde nach etwa einer Minute sichtbar. Mit dem TMB-Substrat wurde die Platte für etwa zehn Minuten inkubiert. Die Reaktion

wurde gestoppt, indem jeweils 100 µl der Acid Stop Solution (Part # 700-P11) in der gleichen Reihenfolge in die Wells pipettiert wurde, in der auch das TMB-Substrat in die Wells gegeben worden war.

Danach wurde die Platte im ELISA-Reader (SPECTRA-MAX 340, Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, California, USA) bei verschiedenen Wellenlängen gemessen:

- a) bei 450 nm
- b) bei 450 nm mit einer Korrektur-Wellenlänge von 540 nm.

Anschließend wurden die gemessenen Daten mit der Software SOFTmax Pro 2.1. ausgewertet. Die HSP70-Konzentrationen wurden anhand der Verdünnungsreihe berechnet. Nach Berechnung durch die Software wurden die gemessenen Konzentrationen mit zwei multipliziert, um der Verdünnung der Proben Rechnung zu tragen.

Die Daten wurden elektronisch und auf Papier archiviert.

### **5.13. Harnsäure-Bestimmung im Serum:**

Die Messung der Harnsäure im Serum wurde durch das Zentrallabor des Universitätsklinikums Tübingen durchgeführt. Dabei wurde photometrisch die Absorption im Bereich von 290 nm im Enzymtest unter Verwendung der Uratoxidase gemessen.

### **5.14. Restimulation von Zellen vor RNA-Isolation:**

#### Materialien:

- Peptide (AG Stevanović, Abteilung für Immunologie, Tübingen, Deutschland)
- T-Zell-Medium

#### Durchführung:

Der Überstand in den Kulturplatten wurde jeweils auf 100 µl gebracht, das heißt, bei Zellen, die eine Woche prästimuliert worden waren, wurden 100 µl Überstand abgenommen und verworfen.

Auf die Zellen wurden 50 µl Peptidlösung (5 µg/ml final) gegeben. Die Zellen wurden gemischt, bei 1300 U/min für drei Minuten zentrifugiert und anschließend für drei Stunden bei +37°C inkubiert.

### **5.15. RNA-Isolation mit TRIzol®:**

#### Materialien:

- 1,5 ml Eppendorf Cups (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- TRIzol® (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, California, USA)
- Glykogen (Roche Diagnostics GmbH, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland)
- Chloroform (Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz)
- Isopropylalkohol (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- Ethanol (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- DEPC-Wasser
- RNase freies Wasser (Promega GmbH, Madison, Wisconsin, USA)

#### Durchführung:

Die Zellen wurden im Kulturmedium resuspendiert und in beschriftete 1,5 ml Eppendorf Cups überführt. Die Zellen wurden für vier Minuten bei 4000 U/min in einer auf +4°C gekühlten Zentrifuge (Eppendorff Centrifuge 5415R, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) zentrifugiert. Das Medium wurde abpipettiert.

Die Zellpellets wurden in TRIzol® homogenisiert. Dabei wurden die Volumina wie folgt gewählt:

- a) für weniger als  $1 \times 10^6$  Zellen: 800 µl TRIzol®
- b) für mehr als  $1 \times 10^6$  Zellen: 1000 µl TRIzol® (im folgenden Text werden die Volumina, die sich auf diese Menge TRIzol® beziehen, in Klammern gesetzt)

Die Proben wurden gevortext und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Jeder Probe wurden 10 µl Glykogen zugegeben. Die Proben wurden erneut gevortext und für weitere fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Nun wurden die Proben entweder bei -80°C eingefroren und dann nach dem Auftauen oder sofort wie folgt weiterbearbeitet. Dies war abhängig von der

Menge der Proben. Waren mehr als 24 Proben zu bearbeiten, also mehr als eine Füllung der Zentrifuge, wurden die Proben eingefroren und dann in geeigneten Anteilen wieder aufgetaut und weiter bearbeitet.

Nach den fünf Minuten Inkubation wurden den Proben jeweils 160 µl (200 µl) Chloroform zugegeben. Die Proben wurden 15 Sekunden von Hand geschüttelt und dann für drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 15 Minuten bei 12.000 g in einer auf +4°C gekühlten Zentrifuge zentrifugiert. Während der Zentrifugation wurde für jede Probe ein neues 1,5 ml Eppendorf-Cup vorbereitet und beschriftet. Die wässrige Phase (etwa 470 µl (500 µl)) wurde abgenommen und in das vorbereitete Gefäß pipettiert. Zu jeder Probe wurden dann 400 µl (500 µl) Isopropylalkohol, also 50% des eingesetzten TRIzol<sup>®</sup>s zugefügt. Die Proben wurden gründlich gevortext und dann für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Danach wurden sie für zehn Minuten bei 12.000 g bei +4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Auf die RNA-Pellets wurde jeweils 1 ml 75%-Ethanol (hergestellt aus 30 ml Ethanol und 10 ml DEPC-Wasser) zum Waschen gegeben. Die Pellets wurden durch Schütteln des Gefäßes vom Boden abgelöst. Die kompletten Proben wurden anschließend gevortext und bei 7.600 g und +4°C für fünf Minuten zentrifugiert.

Der Überstand wurde drei Mal abgenommen:

- a) mit einer 1000 µl Pipette
- b) mit einer 100 µl Pipette
- c) mit einer 10 µl Pipette

Zwischen den einzelnen Schritten wurden die Proben kurz zentrifugiert. Während der Überstand der anderen Proben abgenommen wurden, wurden die übrigen Proben in der Zentrifuge bei +4°C gelagert.

Nach dem Abpipettieren mit der 10 µl Pipette wurden die Cups geöffnet auf Eis gelagert und das RNA-Pellet so lange getrocknet, bis es durchsichtig war (im Allgemeinen dauerte dies etwa 10 – 20 Minuten). Die RNA wurde danach in RNase freiem Wasser gelöst und über Nacht bei +4°C im Kühlschrank inkubiert. Die RNA wurde anschließend bei -80°C gelagert.

Vor Weiterverarbeitung der RNA wurde sie für zehn Minuten bei +60°C im Heizblock (Blockthermostat BT-100, Kleinfeld Labortechnik, Gehrden, Deutschland) inkubiert.

### **5.16. Reverse-Transkriptase PCR:**

#### Materialien:

- PCR-Tubes 0,5 ml (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland)
- Random Hexamers (Roche Diagnostics GmbH, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland)
- 5x Puffer (Promega GmbH, Madison, Wisconsin, USA)
- dNTP-Mix (Promega GmbH, Madison, Wisconsin, USA)
- RNase-Inhibitor (Promega GmbH, Madison, Wisconsin, USA)
- Reverse Transkriptase: M-MLTV Reverse Transkriptase Promega (Promega GmbH, Madison, Wisconsin, USA)
- Nuclease-freies Wasser (Promega GmbH, Madison, Wisconsin, USA)

#### Durchführung:

Für jede Probe wurde ein 500 µl Cup (PCR-Tubes 0,5 ml) vorbereitet und beschriftet. In jedes Cup wurden 2,5 µl Random Hexamers und 4,5 µl der Proben-RNA pipettiert. Die Proben wurden dann für fünf Minuten bei +70°C in der PCR-Maschine (PTC-100 Programmable Thermal Controller, MJ Research Inc., Waltham, Massachusetts, USA) inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf +4°C gekühlt, um die Aktivität von RNAsen zu inhibieren.

Während dieser Inkubation wurde der PCR-Mastermix wie folgt pipettiert (die Angaben beziehen sich auf einzelne Proben, sie wurden allerdings gepoolt angesetzt und dann auf die Proben verteilt):

- 4 µl 5x Puffer
- 1 µl dNTP-Mix: finale Konzentration 10 µM
- 1 µl RNase-Inhibitor, vorher 1:4 in 1x Puffer (5x Puffer 1:5 in Nuclease freiem Wasser gelöst) verdünnt: finale Konzentration 10U/µl

- 0,25 µl Reverse Transkriptase: finale Konzentration 2,5 U/µl, hier in der Stammlösung 200 U/µl
- 6,75 µl Nuclease-freies Wasser

Zusätzlich wurde für jeweils eine Probe pro Untersuchungszeitpunkt eine Negativkontrolle ohne Reverse Transkriptase angesetzt. Das fehlende Volumen in obigem Pipettierschema wurde dabei durch Wasser ersetzt.

Von diesem Master Mix wurden auf jede Probe 13 µl gegeben, was ein finales Volumen von 20 µl ergab.

In der PCR-Maschine wurden die Proben wie folgt inkubiert:

- 10 Minuten bei +25°C
- 60 Minuten bei +42°C
- 5 Minuten bei +93°C
- anschließend wurden die Proben auf +4°C gekühlt.

In diesen Schritten wurde aus der mRNA in der Probe cDNA synthetisiert. Diese cDNA-Synthese war nicht spezifisch für ein bestimmtes Genprodukt. Die Detektion bestimmter Genprodukte geschah mittels Real-Time-PCR mit spezifischen Primern (siehe dazu Kapitel 5.17. und 5.18.).

Bis zur Messung wurde die cDNA bei -80°C gelagert.

### **5.17. Real Time PCR mit Taqman<sup>®</sup>-Detection in Single-Plex-PCR:**

#### Materialien:

- Nuclease-freies Wasser (Promega GmbH, Madison, Wisconsin, USA)
- IFN $\gamma$  Forward Primer (Thermo Electron Corporation, Erlangen, Deutschland)
- CD8 Forward Primer (Thermo Electron Corporation, Erlangen, Deutschland)
- IFN $\gamma$  Reverse Primer (Thermo Electron Corporation, Erlangen, Deutschland)
- CD8 Reverse Primer (Thermo Electron Corporation, Erlangen, Deutschland)
- IFN $\gamma$ -FAM-Sonde (Thermo Electron Corporation, Erlangen, Deutschland)

- CD8-FAM-Sonde (Thermo Electron Corporation, Erlangen, Deutschland)
- Taqman<sup>®</sup>-PCR-Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, California, USA)
- Thermo-Fast<sup>®</sup> 96 Detection Plate (ABgene, Advanced Biotechnologies, Epsom, Surrey, UK)
- Optical Adhesive Covers (Applied Biosystems, Foster City, California, USA)

#### Durchführung:

Für die Taqman<sup>®</sup>-Detektion (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) wurde zunächst der Master-Mix für alle Wells der Platte zusammen pipettiert. Es wurde je ein Master-Mix für CD8 und IFN $\gamma$  angesetzt, weil beide PCR-Produkte getrennt detektiert werden sollten. Für die Detektion in Multiplex-PCR siehe Kapitel 5.18..

Der Master-Mix setzte sich wie folgt zusammen:

- pro Ansatz 4,81  $\mu$ l Nuclease-freies Wasser
- pro Ansatz 0,08  $\mu$ l IFN $\gamma$ , beziehungsweise CD8 Forward Primer
- pro Ansatz 0,08  $\mu$ l IFN $\gamma$ , beziehungsweise CD8 Reverse Primer
- pro Ansatz 0,03  $\mu$ l IFN $\gamma$ , beziehungsweise CD8 Sonden, FAM markiert
- pro Ansatz 10  $\mu$ l Taqman<sup>®</sup>-PCR-Master Mix

IFN $\gamma$  war hierbei das Ziel-Gen, CD8 wurde als Housekeeping Gen zur Normalisierung verwendet. Da die Expression von CD8 in der aktivierten Zelle gleich bleibt, wurde in diesen Versuchen die IFN $\gamma$ -Expression auf CD8 normalisiert und damit eine relative Zunahme gemessen. Dies hat den Vorteil, dass man nicht wissen muß, wie viel cDNA absolut in der Probe vorhanden war und an der Reaktion teilgenommen hat.

Die cDNA-Proben wurden mit 80  $\mu$ l Nuclease freiem Wasser auf 100  $\mu$ l verdünnt.

In die Wells einer 96-Well PCR-Platte wurden 15  $\mu$ l des jeweiligen Master-Mixes pipettiert. Alle Proben wurden in Doppelbestimmungen gemessen. Die

CD8- und IFN $\gamma$ -Tests wurden nach folgendem Schema nebeneinander aufgetragen:

	1	2	3	4
A	Probe 1 CD8	Probe 1 CD8	Probe 1 IFN $\gamma$	Probe 1 IFN $\gamma$

Tab. 9: Schema der Verteilung der Wells auf einer RT-PCR-Platte.

Von den verdünnten Proben wurden dann 5  $\mu$ l in jeweils vier Wells pipettiert. Aufgetragen wurden ebenfalls die Proben, die in der RT-PCR ohne Reverse Transkriptase inkubiert wurden und bei denen somit keine cDNA in der Probe vorhanden sein sollte, und pro Platte jeweils ein Well mit Nuclease freiem Wasser für CD8 und IFN $\gamma$ . Diese Proben dienten als Kontrolle für Kontaminationen der verwendeten Reagenzien.

Die Platte wurde mit einer Klebefolie versiegelt und bei 1200 U/min für zwei Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde die Platte in Alufolie bis zur Messung bei +4°C gelagert. Diese Lagerung dauerte maximal neunzig Minuten.

Die Messung geschah in einem ABIPrism 7000<sup>®</sup> Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). Dabei wurden die Detektoren wie folgt gesetzt:

Name	Reporter Dye	Quencher Dye	Passive
CD8	FAM	TAMRA	ROX
IFN $\gamma$	FAM	TAMRA	ROX

Tab. 10: Detektoren der RT-PCR.

Jedem Well wurde hier ein Detektor zugeordnet. Obwohl hier jeweils der gleiche Farbstoff verwendet wurde, wurden dennoch zwei verschiedene Detektoren definiert, um während Messung und Auswertung die Kurven der beiden PCR-Produkte getrennt betrachten zu können.

Die Messung folgte nachstehendem Schema:

- 2 Minuten 50°C
- 10 Minuten 95°C

- 45 Zyklen: 1 Sekunde 95°C  
1 Minute 60°C

Unter Verwendung der  $\Delta$ CT-Methode wurden die Rohdaten berechnet. Der Schwellenwert wurde für alle Proben auf 0,2, beziehungsweise bei sehr unruhigem Kurvenverlauf auf 0,3 gesetzt. Die Nulllinie wurde für CD8 auf die Zyklen 2 bis 20, für IFN $\gamma$  auf die Zyklen 2 bis 21 gesetzt.

Für die Auswertung wurde Microsoft Excel (Microsoft® Excel 2002, Microsoft Corporation, Unterschleißheim, Deutschland) verwendet.

Berechnet wurden relative Kopienzahlen von IFN $\gamma$  bezogen auf CD8.

Die errechneten Werte wurden zusätzlich auf die Negativkontrolle normiert und in Vielfachen dieser Negativkontrolle ausgedrückt.

Nach der Messung wurden die Platten auf -20°C eingefroren.

#### **5.18. Real Time PCR mit Taqman®-Detection in Multi-Plex-PCR:**

##### Materialien:

- Nuclease-freies Wasser (Promega GmbH, Madison, Wisconsin, USA)
- IFN $\gamma$  Forward Primer (Thermo Electron Corporation, Erlangen, Deutschland)
- CD8 Forward Primer (Thermo Electron Corporation, Erlangen, Deutschland)
- IFN $\gamma$  Reverse Primer (Thermo Electron Corporation, Erlangen, Deutschland)
- CD8 Reverse Primer (Thermo Electron Corporation, Erlangen, Deutschland)
- IFN $\gamma$ -FAM-Sonde (Thermo Electron Corporation, Erlangen, Deutschland)
- CD8-VIC-Sonde (Thermo Electron Corporation, Erlangen, Deutschland)
- Taqman®-PCR-Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, California, USA)
- Thermo-Fast® 96 Detection Plate (ABgene, Advanced Biotechnologies, Epsom, Surrey, UK)
- Optical Adhesive Covers (Applied Biosystems, Foster City, California, USA)

Durchführung:

Die Prozedur war im Wesentlichen gleich wie bei Messung in Single-Plex-PCR. Hier wurde allerdings nur ein Master-Mix für beide PCR-Produkte angesetzt:

- pro Ansatz 4,81 µl Nuclease-freies Wasser (Promega GmbH, Madison, Wisconsin, USA)
- pro Ansatz 0,08 µl IFN $\gamma$ - und CD8-Foward Primer (Thermo Electron Corporation, Erlangen, Deutschland)
- pro Ansatz 0,08 µl IFN $\gamma$ - und CD8-Reverse Primer (Thermo Electron Corporation, Erlangen, Deutschland)
- pro Ansatz 0,03 µl IFN $\gamma$ - (Thermo Electron Corporation, Erlangen, Deutschland) und CD8-Sonden (Applied Biosystems, Foster City, California, USA), IFN $\gamma$  FAM gelabelled, CD8 VIC markiert
- pro Ansatz 10 µl Taqman<sup>®</sup>-PCR-Master Mix (Applied Biosystems, , Deutschland)

Die Messung erfolgte auch hier in Doppelbestimmungen. Pro Probe wurden hier je zwei Wells nach folgendem Schema pipettiert:

	1	2
A	Probe 1 CD8/IFN $\gamma$	Probe 1 CD8/IFN $\gamma$

Tab. 11: Schema der Verteilung der Wells auf einer RT-PCR-Platte bei Detektion in Multiplex-PCR.

Die Messung erfolgte in Multi-Plex-PCR, ebenfalls mit dem ABIPrism 7000<sup>®</sup> Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). Dabei wurden die Detektoren wie folgt gesetzt:

Name	Reporter Dye	Quencher Dye	Passive
CD8	VIC	TAMRA	ROX
IFN $\gamma$	FAM	TAMRA	ROX

Tab. 12: Detektoren der Multiplex-RT-PCR.

Die Detektoren wurden den Wells zugeordnet. Ein Well wurde hier mit zwei Detektoren belegt.

Messung und Auswertung folgten dem Schema der Single-Plex-PCR.

Ausführliche Anmerkungen zur Verwendung der Multi-Plex-Methode entnehmen Sie bitte dem Kommentar in Kapitel 4.

### **5.19. gp96 Western Blot:**

#### Materialien:

- CNBr-aktivierte Sepharose 4B (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland)
- B10C-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland)
- SDS-Ladepuffer
- gp96-Standard (Immatics Biotechnologies, Tübingen, Deutschland)
- ddH<sub>2</sub>O
- 1,5M TRIS pH 8,6
- 0,5M TRIS pH 6,8
- SDS (Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)
- Acrylamid/Bis (Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)
- APS (Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)
- TEMED (Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)
- SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, California, USA)
- Nitrozellulosemembran (Amersham Biotech, Freiburg, Deutschland)
- Whatman-Papiere (Whatman plc, Brentford, Middlesex, United Kingdom)
- Anoden-Puffer
- Kathoden-Puffer
- anti-gp96 SPA850 (StressGen Biotechnologies Corp., Victoria, Canada)
- TBB
- TWB
- Goat anti-Rat IgG, HRP-conjugated sc2006 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California)
- TBS

- ECL-Substrat (Amersham Biotech, Freiburg, Deutschland)

#### Durchführung:

##### a) Preclearing der Serumproben mit BSA-Sepharose

Pro Ansatz wurden 500  $\mu$ l BSA-Sepharose (CNBr-aktivierte Sepharose 4B) in ein 1,5 ml Eppendorf-Cup pipettiert und 3 mal mit jeweils 1 ml PBS gewaschen. Zwischen den einzelnen Waschschritten wurde der Überstand abpipettiert.

Zur gewaschenen Sepharose wurden 500  $\mu$ l Serum und 500  $\mu$ l PBS zugegeben. Diese Mischung wurde für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf einem Rollator rotiert.

Die Proben wurden kurz zentrifugiert und die Überstände abgenommen.

##### b) gp96-Präzipitation

In ein neues Eppendorf-Cup wurden jeweils 250  $\mu$ l B10C-Sepharose gegeben und auch hier 3-mal mit PBS gewaschen. Die Überstände wurden wieder abpipettiert, Die vorgereinigten Überstände (ca. 1 ml) wurden auf die B10C-Sepharose gegeben und dann für 2,5 Stunden bei Raumtemperatur rotiert.

Die Proben wurden zentrifugiert, die Überstände abgenommen. Die Sepharose-Pellets wurden wieder 3 mal mit PBS gewaschen, die Überstände zwischen den Waschschritten abgenommen.

Auf die Sepharose wurde 50  $\mu$ l 2-fach SDS-Ladepuffer gegeben. Der gp96-Standard wurde 1:2 in 2-fach SDS-Ladepuffer verdünnt.

Die Proben und der Gp96-Standard wurden vor dem Auftragen auf das SDS-Gel für fünf Minuten bei 95°C im Thermomixer (Eppendorf Thermomixer 5436, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) unter leichtem Schütteln erhitzt.

##### c) SDS-PAGE

Die Gießkammer des Gels wurde aus zwei Glasplatten mit Gummiabdichtung, zwei dicken Spacern und Klammern zusammengebaut. Ein 10-Taschen-Kamm wurde eingesetzt. 1 cm unterhalb des Kammes wurde eine Markierung auf der Glasplatte angebracht.

Die Gele wurden wie folgt hergestellt:

Material	10% Trenngel	4% Sammelgel
ddH <sub>2</sub> O	4,8 ml	3,2 ml
1,5M TRIS pH 8,6	2,5 ml	---
0,5M TRIS pH 6,8	---	1,2 ml
10% SDS	100 µl	50 µl
40% Acrylamid/Bis	2,5 ml	0,5 ml
10% APS	50 µl	25 µl
TEMED	10 µl	5 µl

Tab. 13: Zusammensetzung der Gele für die Gelelektrophorese beim Western Blot.

Die Lösung für das Trenngel wurde mit einer 10 ml Pipette bis zur Markierung zwischen die Glasplatten gebracht und mit destilliertem Wasser überschichtet. Die Reste der Lösung wurden aufgehoben, um den Polymerisierungsprozeß zu beobachten. Nach Auspolymerisierung wurde das Wasser abgegossen, die Reste mit einem Filterpapier abgesaugt und anschließend das Sammelgel auf das auspolymerisierte Trenngel gegeben. Der Kamm wurde in das Sammelgel eingesetzt.

Nachdem auch das Sammelgel auspolymerisiert war, wurde das Gel zusammen mit den Glasplatten in die Gellaufkammer (Dual Plate Vertical Electrophoresis Unit, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) eingesetzt. Die Kammer wurde mit 1-fach SDS-Ladepuffer gefüllt. Der Kamm wurde gezogen und die Taschen mit einer Kanüle (Sterican, B. Braun Medical AG, Emmenbrücke, Schweiz) ebenfalls mit SDS-Laufpuffer gespült. Weiterhin wurden Luftblasen unterhalb des Gels zwischen den Glasplatten mit einer Kanüle entfernt.

Jeweils 20 µl der fertigen Proben, sowie der gp96-Standard und ein Protein-Standard (SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard) wurden auf das Gel aufgetragen. Die Gellaufkammer wurde an einen Transformator (Electrophoresis Power Supply EPS 3500, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) angeschlossen. Die Gelelektrophorese wurde bei 110V

im Sammelgel und bei 140V im Trenngel durchgeführt. Sie war abgeschlossen, als die Lauffront das Ende des Gels erreicht hatte.

d) gp96-Western Blot

Pro Gel wurden eine Nitrozellulosemembran und acht Whatman-Papiere zugeschnitten. Jeweils vier Whatman-Papiere wurden in Anoden- und Kathoden-Puffer eingeweicht. Von unten nach oben wurden auf die Graphitelektrode (Siemens/CTI, Knoxville, Tennessee, USA) geschichtet: Whatman-Papiere in Anoden-Puffer, Nitrozellulose-Membran, Gel, Whatman-Papiere in Kathoden-Puffer. Der Aufbau wurde mit einer 25 ml Pipette ausgestrichen, die Apparatur geschlossen und mit 2 kg beschwert. Der Transfer erfolgte für 17 Stunden über Nacht bei 20 mA für ein Gel, beziehungsweise 40 mA für zwei Gele.

Nach dem Transfer wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur in 50 ml TBB geschwenkt. Danach wurde der Primärantikörper (anti-Gp96 SPA850) zugegeben und für zwei Stunden bei Raumtemperatur geschwenkt. Der Primärantikörper wurde nach Gebrauch abgenommen und zur erneuten Verwendung bei +4°C gelagert.

Die Membran wurde anschließend drei Mal für fünf Minuten mit jeweils 50 ml TWB bei Raumtemperatur gewaschen.

Danach wurde die Membran mit dem Sekundärantikörper (Goat anti-Rat IgG, HRP-conjugated sc2006; 1:5000 in TBB verdünnt) unter leichtem Schwenken inkubiert. Der Sekundärantikörper wurde nach Gebrauch verworfen. Die Membran wurde anschließend wie folgt gewaschen:

1x fünf Minuten mit TBS, 3x zehn Minuten mit TWB, 1x fünf Minuten mit TBS.

Die Membran wurde schließlich in eine Plastikfolie gelegt, für drei Minuten mit 2 ml ECL-Substrat inkubiert und danach ausgestrichen.

Die Messung wurde im Image-Reader (Fuji-Film LAS 1000, Fujifilm Photo Film Europe GmbH, Düsseldorf, Deutschland) durchgeführt.

## 5.20. ELISPOT:

### Materialien:

- Anti-IFN $\gamma$  mAb 1-D1K Antikörper (MabTech AB, Hamburg, Deutschland)
- ELISPOT-Puffer
- 96-well Nitrocellulose Platte (Millipore GmbH, Schwalbach, Deutschland)
- PBS
- T-Zell-Medium
- RPMI mit Pen-Strep ohne Humanserum
- Peptide (AG Stevanović, Abteilung für Immunologie, Tübingen, Deutschland)
- $\beta_2$ -Mikroglobulin (Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)
- K562-A2 (Cedrick M. Britten, Mainz, Germany)
- PBS-Tween20 0,05% (Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland)
- Anti-IFN $\gamma$  7-B6-1 biotin (MabTech AB, Hamburg, Deutschland)
- PBS/BSA 0,5%: BSA (Sigma Aldrich GmbH, München, Deutschland)
- Elite Kit: Vectastain Reagenz (Vectastain-Elite, Wiesbaden, Deutschland)
- DIGI-III
- BCIP (Roche Diagnostics GmbH, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland)
- NBT (Roche Diagnostics GmbH, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland)

### Durchführung:

3,5  $\mu\text{g/ml}$  Anti-IFN $\gamma$  mAb 1-D1K Antikörper wurden in ELISPOT Puffer gelöst. Jeweils 100  $\mu\text{l}$  wurden in die benötigten Wells einer 96-well Nitrocellulose Platte gegeben. Die Platten wurden für 22 Stunden bei +4°C inkubiert.

Die gecoateten Platten wurden 3 mal fünf Minuten und einmal zehn Minuten mit 200  $\mu\text{l}$  PBS pro Well gewaschen. Danach wurde in jedes Well 150  $\mu\text{l}$  T-Zell-Medium mit 10% Humanserum zum Blocken gegeben. Die Platten wurden für 75 Minuten bei +37°C inkubiert.

In die Wells wurden die Reagenzien wie folgt zugegeben:

- a) 50  $\mu$ l T-Zell-Medium mit 10% Humanserum
- b) 50  $\mu$ l RPMI mit Pen-Strep ohne Humanserum mit dem jeweiligen Peptid oder Peptidmix mit der finalen Konzentration 5  $\mu$ g/ml. Zusätzlich wurde mit dieser Fraktion  $\beta_2$ -Mikroglobulin in der finalen Konzentration 2,5  $\mu$ g/ml zugegeben.
- c) 50  $\mu$ l RPMI mit Pen-Strep ohne Humanserum mit  $0,1 \times 10^6$  Zellen K562-A2.
- d) 50  $\mu$ l RPMI mit Pen-Strep ohne Humanserum mit humanen PBMCs. Die Anzahl der Zellen lag zwischen  $0,5 \times 10^6$  und  $0,125 \times 10^6$ . Nach Möglichkeit wurden die einzelnen Proben titriert, das heißt von einer Probe wurden  $0,5 \times 10^6$ ,  $0,25 \times 10^6$  und  $0,125 \times 10^6$  Zellen pro Well gemessen.

Alle Proben wurden in Doppelbestimmungen gemessen. Mögliche Luftblasen an der Oberfläche wurden mit einer Kanüle (Sterican, B. Braun Medical AG, Emmenbrücke, Schweiz) entfernt. Die Platten wurden anschließend bei +37°C für 40 Stunden unter besonderer Berücksichtigung, dass sie ruhig stehen, inkubiert.

Die Platten wurden mit PBS-Tween20 0,05% wie folgt gewaschen: Zwei mal zwei Minuten, ein Mal fünf Minuten, drei Mal zwei Minuten.

Der Antikörper Anti-IFN $\gamma$  7-B6-1 biotin wurde mit der Konzentration 1,5  $\mu$ g/ml in PBS/BSA 0,5% verdünnt. Zu jedem Well wurden 100  $\mu$ l dieser Antikörperlösung zugegeben. Etwaige Luftblasen wurden mit einer Kanüle entfernt. Die Platten wurden für zwei Stunden bei +37°C ohne Erschütterungen inkubiert.

Eine halbe Stunde vor Ende der Inkubation wurde ein Tropfen von der Lösung A des Elite Kits (Vectastain Reagenz) in 10 ml PBS/Tween20 0,05% gegeben. Fünfzehn Minuten vor Ende der Inkubation wurde ein Tropfen der Lösung B zugesetzt.

Die Platte wurde wieder wie oben beschrieben gewaschen. Danach wurden jeweils 100  $\mu$ l der A+B Lösung in jedes Well pipettiert und die Platte für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurden die Wells drei Mal mit PBS/Tween20 0,05% und drei Mal nur mit PBS gewaschen.

Direkt vor der Benutzung wurde die Substrat-Lösung aus 10 ml DIGI-III, 16,5 µl X-Phosphat (BCIP) und 16,5 µl NBT vorbereitet. Von ihr wurden jeweils 100 µl in die Wells gegeben. Der ELISPOT wurde für 7 bis 15 Minuten entwickelt. Die Reaktion wurde mit Leitungswasser gestoppt, wenn die Spots ausreichend sichtbar waren.

Die Platte wurde anschließend bei Raumtemperatur getrocknet und bis zur Messung im ELISPOT-Reader (Immunospotreader Series 3, Cellular Technology Ltd., Cleveland, Ohio, USA) ebenfalls bei Zimmertemperatur gelagert.

## 6. Ergebnisse und Diskussion

### 6.1. Vakzinierung mit Peptid-beladenen dendritischen Zellen bei fortgeschrittenem Nierenzellcarcinom<sup>4</sup>

#### 6.1.1. Studienpopulation und Zielsetzung:

Die Patientenpopulation für diese Studie waren Patienten mit fortgeschrittenem Nierenzellcarcinom, die zum Zeitpunkt der chirurgischen Resektion bereits Fernmetastasen aufwiesen. Die Patienten waren zum Zeitpunkt der Studienaufnahme in Bezug auf konventionelle Behandlungsmethoden (Strahlentherapie, chirurgische Resektion) austherapiert.

Primäres Ziel der Studie ist die Überprüfung, ob eine Immunisierung mit dendritischen Zellen, die mit synthetisch hergestellten HLA-gebundenen Peptiden *in vitro* beladen wurden, durchführbar und für den Patienten verträglich ist. Im Gegensatz zu einer früheren Studie, die mit wenigen Peptiden durchgeführt wurde, soll hier untersucht werden, ob eine solche Immunisierung mit dendritischen Zellen, die mit einer größeren Anzahl von Peptiden beladen wurden, grundsätzlich möglich ist. Außerdem waren in diesem Fall die Vakzinen individuell anhand von der Untersuchung von patientenspezifischen HLA-Liganden und Genexpressionsanalysen zusammengestellt. Ein weiteres Ziel dieser Studie war es also zu untersuchen, ob eine individuelle Vakzinierung Vorteile für den Patienten bringt.

Sekundäres Ziel ist die Untersuchung immunologischer Phänomene und klinisch-therapeutischer Effekte, die durch die Vakzinierung mit peptid-beladenen dendritischen Zellen induziert werden können.

Bei der Studie handelt es sich um eine monozentrisch durchgeführte, prospektive, randomisierte Phase I/II-Studie, bei der eine tumorantigenspezifische T-Zell-Induktion *in vivo* stimuliert werden soll. In die Studie sollten 14 Patienten aufgenommen werden. Wenn bei diesen Patienten ein klinischer Erfolg (Remission oder „No Change“ Situationen) beobachtet

---

<sup>4</sup> Projekt Nr. 234/2001: „Individuelle antigenspezifische Immuntherapie von Patienten mit fortgeschrittenen malignen Erkrankungen mit peptid-beladenen autologen dendritischen Zellen“, vorgelegt bei der Ethikkommission an der Medizinischen Fakultät und am Universitätsklinikum der Eberhard Karls-Universität Tübingen

würden, sollten 11 weitere Patienten in die Studie aufgenommen werden. Im Rahmen dieser Dissertation wurde die Induktion einer Immunantwort bei neun Patienten durch die Vakzinierung untersucht.

In die Studie aufgenommen wurden Patienten zwischen 18 und 75 Jahren mit fortgeschrittenem metastasierten Nierenzellcarcinom nach Durchführung von allen konventionellen Behandlungsmethoden, bei denen die letzte konventionelle Therapie mindestens 4 Wochen zurück lag. Weitere Einschlusskriterien waren ein positiver DTH-Test (*delayed type hypersensitivity*), um Reaktionen gegen applizierte dendritische Zellen sicherzustellen, ein messbarer Tumor, eine laborchemisch unauffällige Leber- und Nierenfunktion, sowie ein Karnofskyindex von mehr als 70%<sup>5</sup>.

Ausschlusskriterien waren ZNS-Metastasierung, pathologische kardiopulmonale Befunde (NYHA  $\geq$  3), das Vorliegen einer Zweittumorerkrankung, Einnahme von Immunsuppressiva, zerebrale Krampfleiden, Schwangerschaft, sowie ein Karnofskyindex von kleiner als 70%. Ebenfalls ausgeschlossen waren minderjährige und einwilligungsunfähige Patienten.

Autologe, aus adhaerenten mononukleären Zellen durch Inkubation mit GM-CSF, IL-4 und TNF- $\alpha$  generierte, mit Peptiden beladene dendritische Zellen wurden den Patienten subkutan zunächst vier Mal im Abstand von zwei Wochen (jeweils idealerweise etwa  $5 \times 10^6$  pro Injektion, meist aber deutlich weniger; siehe dazu die Daten der einzelnen Patienten) verabreicht. Die Vakzinierungen wurden fortgesetzt, sofern keine gravierenden Nebenwirkungen

---

<sup>5</sup> Der Karnofskyindex beschreibt die neurologischen und kognitiven Fähigkeiten eines Patienten. Er wird eingesetzt zur Abschätzung des körperlichen Zustandes, der Fähigkeiten und der Prognose eines Patienten nach einer therapeutischen Maßnahme, beziehungsweise für die Abschätzung der Studien- oder Therapietauglichkeit eines Patienten. Die Stufen definieren sich wie folgt:

100%	Vollkommenes Wohlbefinden
90%	Geringe Symptome – Patient kann normales Leben führen
80%	Normale Aktivität mit geringen Einschränkungen
70%	Keine normale Aktivität mehr möglich, eigenständiges Leben möglich
60%	Bedarf gelegentlicher Unterstützung
50%	Behinderung
40%	Patient benötigt ambulante pflegerische und ärztliche Hilfe
30%	Schwere Beeinträchtigung, Hospitalisierung
20%	Schwere Erkrankung, aktive Hilfe wird benötigt
10%	Moribund
0%	Exitus letalis

[Yates et al. 1980]

auftraten und die Tumorerkrankung der Patienten unter Therapie im CT-Staging stabil war. Bei Nebenwirkungen oder Progression wurden keine weiteren dendritischen Zellen gegeben.

Die Beladung der dendritischen Zellen mit Peptiden geschah für die Patienten RCC68, RCC70 und RCC75 in einem Pool. Ab dem Patienten RCC98 wurden die dendritischen Zellen geteilt und mit zwei Peptidpools inkubiert. Diese Peptidpools wurden nach der Affinität der Peptide zum MHC-I-Molekül zusammengestellt. Dies hatte den Sinn, dass weniger affine Peptide nicht durch stärker affine kompetitiv von der Bindung an das MHC-Molekül verdrängt wurden. So konnte die Wahrscheinlichkeit erhöht werden, dass wirklich die gesamte Vakzine auf dendritische Zellen geladen wurde.

Für jeden Patienten wurden individuell Analysen der MHC-Liganden im Vergleich zwischen Tumor- und Normalgewebe durchgeführt. Idealerweise sollte sich die Vakzine aus individuell zusammengestellten MHC-Liganden zusammensetzen, die spezifisch auf dem Tumor des Patienten gefunden worden waren. Manchmal war eine solche Analyse nicht möglich, weil kein beziehungsweise nicht genug Tumorgewebe vorhanden oder es für eine Analyse nicht geeignet war. In einem solchen Fall sollten bekannte tumorspezifische T-Zell-Epitope, von denen bekannt war, dass sie auf Nierenzellcarcinomen tumorspezifisch vorkommen oder überexprimiert sind, zum Einsatz kommen.

Zusätzlich wurden für jeden Patienten individuell Expressionsanalysen durchgeführt, um überexprimierte Gene herauszufinden, an Hand derer für eine Vakzinierung geeignete T-Zell-Epitope identifiziert werden konnten. Dazu wurden Prädiktionen über die SYFPEITHI-Datenbank angefertigt, indem das Programm in bekannten Sequenzen von Proteinen für die HLA-Restriktion des Patienten geeignete Fragmente sucht, die aufgrund ihrer Aminosäuresequenz auf den MHC-Molekülen präsentiert werden könnten.

Für alle diese Analysen wurden dem Labor Operationspräparate von Tumor- und Normalgewebe und venöse Blutproben zur Verfügung gestellt. Alle Analysen (siehe Abb. 33) wurden durch die Abteilung von Prof. Dr. Stefan

Stevanović durchgeführt [Weinschenk et al. 2002; Krüger et al. 2005] und sind nicht Bestandteil dieser Arbeit.

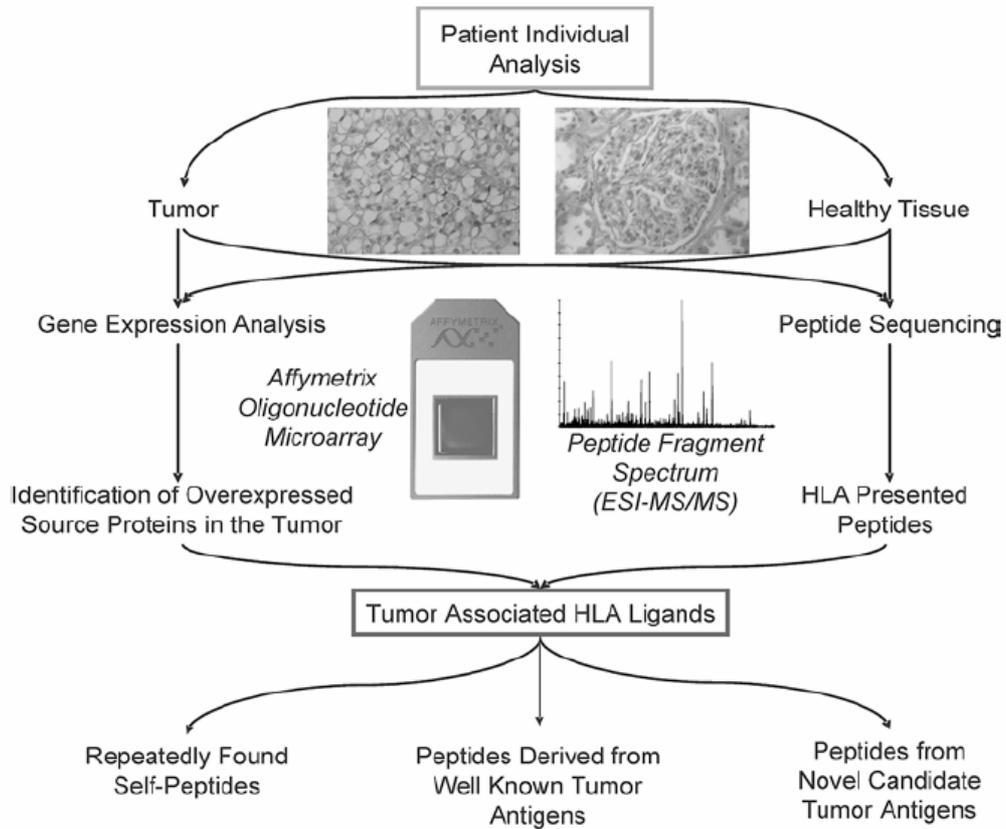


Abb. 33: Schema der Analysen für die Auswahl von Vakzinen bei Patienten mit Nierenzellcarcinom.

aus: Krüger et al. 2004

## 6.1.2. Ergebnisse:

### 6.1.2.1. Übersicht über Studie und Patienten

PBMCs von Patienten wurden durch das Labor von PD Dr. Peter Brossart in der Medizinischen Universitätsklinik isoliert und eingefroren. Diese Proben wurden der Abteilung für Immunologie zur Untersuchung überlassen.

Die Proben wurden zunächst in *ex vivo* Versuchen mit Real-Time RT-PCR untersucht. Das heißt die Proben wurden am Abend aufgetaut, über Nacht bei +37°C inkubiert und am nächsten Morgen für drei Stunden mit Peptid inkubiert, bevor die RNA isoliert wurde. Bei positiven Ergebnissen wurden diese nach Möglichkeit mit intrazellulärem IFN $\gamma$ -Staining, Tetramer-Staining oder ELISPOT reproduziert.

Getestet wurden neun Patienten, die zwischen vier und dreizehn Impfungen erhalten hatten.

Patienten #	Diagnose	Anzahl Impfungen	HLA-Typ	Anzahl Peptide	Klinik
RCC68	Klarzelliges RCC	4	A*0201	9	Progredient nach 4 Vakzinierungen
			DR	1	
RCC70	Klarzelliges RCC	4	A*0201	8	progredient nach 4 Vakzinierungen
			DR	1	
RCC75	Klarzelliges RCC	4	A*0301	3	progredient nach 4 Vakzinierungen
			B*0702	1	
			DR	1	
RCC98	Polymorphzelliges RCC, teils klarzellig, teil sarkomatoid	8	A*03	4	Stabil bis zur 8. Immunisierung. Dann massiver Progress.
			B*07	3	
			B*18	1	
			DR	1	
RCC112	Klarzelliges RCC	13	A*01	5	Stabil bis zur 13. Immunisierung. Dann Progress.
			B*08	3	
			DR	1	

RCC115	Klarzelliges RCC	4	A*0201	7	progredient nach 4 Vakzinierungen
			A*03	4	
			DR	1	
RCC116	Klarzelliges RCC	4	A*0201	6	progredient nach 4 Vakzinierungen
			B*27	2	
			DR	1	
RCC135	Klarzelliges RCC	4	A*0201	4	progredient nach 4 Vakzinierungen
			B*51	2	
			DR	1	
RCC149	Klarzelliges RCC	4	A*0201	10	progredient nach 4 Vakzinierungen
			A*33	2	
			B*14	1	
			DR	1	

Tab. 14: Übersicht der getesteten Patienten (für eine Auflistung der einzelnen Peptide siehe 6.1.2.1. Übersicht der verwendeten Peptide).

Die Aktivität von PBMCs der Patienten wurden gegen synthetisch hergestellte Peptide gemessen. Diese Peptide entsprachen denen, die im Impfcocktail den Patienten gegeben wurden.

Die Messwerte wurden auf die Negativkontrolle (gleich 1 gesetzt) normiert und damit in relativen Kopienzahlen der Negativkontrolle angegeben (Stimulation der Zellen mit einem für diese Patientenpopulation irrelevanten HIV-Epitop, das der jeweiligen HLA-Restriktion angepasst war, siehe dazu Kapitel 6.1.2.3. „Negativ- und Positivkontrollen“). Bei einer relativen Kopienzahl von mehr als zwei, das heißt einer um 100% gegenüber der Negativkontrolle vermehrten T-Zell-Aktivität, wurde das Ergebnis als positiv gewertet.

## 6.1.2.2. Übersicht der verwendeten Peptide

HLA	Peptid	Sequenz	Quelle	Funktion	Position	Referenz Ligand	Referenz Epitop	Tumor Assoziation
A*01	RGS-3	SLDKLLGNINY	Regulator of G-Protein signalling 5	Downregulation von heterotrimeren G-Proteinen durch Erhöhung der GTPase-Aktivität der $\alpha$ -Untereinheit [Dulin et al. 1999]. Dadurch Überführen der G-Proteine in ihre inaktive GDP-gebundene Form. Downregulation der G-Protein-vermittelten Ausschüttung von Inositol Phosphaten und Inhibition von MAP Kinasen [Druey et al. 1996]. RGS-5 wird auf Perizyten exprimiert [Berger et al. 2005].	64-73 90-100 109-117			bekannt (RCC) bekannt (RCC) bekannt (RCC)
A*01	Met-2	KSEMNVNIMKY	Met protoonkogen		32-41			bekannt
A*01	Met-3	MLDGILSKY	Hepatocyte Growth Factor Receptor		32-41			bekannt
A*02	ADFP-1	SVASTITGV	adipose differentiation-related protein	Charakteristika dieser Gruppe [Park et al. 1987]. Wird in Muttermilch sezerniert als Lipidkapseln in der Milch [Heid et al. 1996] und den Membranen von aktivierten Monozyten [Chen et al. 2001].	129-137	Weinschenk et al. 2002		unbekannt
A*02	Apol-1	FLGENISNFL	Apolipoprotein L		242-251	Flad et al. 1998		bekannt
A*02	Apol-2	ALADGVQKV	Apolipoprotein L	Risikofaktor für die Koronare Herzerkrankung (KHK) [Talmud et al. 2004]. Bestandteil von HDL. Enge Verwandtschaft zu einem Rattenprotein, das als Antwort eines Leberschadens hochreguliert wird [van der Vliet et al. 2001].	176-184	Weinschenk et al. 2002		bekannt
A*02	Cyclin-D1	LLGATCMFV	Cyclin D1		101-109		Sadownikova et al. 1998	bekannt (B-CLL,
A*02	Cyclin-D2	RLTRFLSRV	Cyclin D1	Cyclin D1 bildet einen Komplex mit CDK4 und CDK6 und fungiert als regulatorische Untereinheit [Hirai et al. 1995]. Dieser Komplex wird für den Übergang von der G1- in die S-Phase im Zellzyklus benötigt. Zusätzlich interagiert Cyclin D1 mit dem Tumorsuppressoren Rb [Dowdy et al. 1993]. Die Expression von Cyclin D1 wird durch Rb positiv beeinflusst. Mutationen, Amplifikation und Überexpression des Cyclin D1-Gens werden in vielen Tumoren beobachtet [Bergsagel et al. 2005].	228-236		Sadownikova et al. 1998	Lymphom, NSD)

A*02	CYP-1	FLDPRPLTV	Cytochrom P40 IBI Cytochrom P40 IBI	Die Gruppe der Cytochrome P450 sind Monooxygenasen, die viele Reaktionen des Arzneistoffwechsels und der Cholesterolf-, Steroid- und Lipidbiosynthese katalysieren. Regulation des Calciumhaushalts über Hydroxylierung von Vitamin D3 [Chen et al. 1993].	190-198 190-198	Maecker et al. 2003	Maecker et al. 2003	bekannt (Osophagus)
A*02	G250-1	HLSTAFARV	G250 (Carbon Anhydrase IX Vorläufer / Carbonat Dehydratase IX)	Reversible Hydratation von Carbondioxid. Mögliche Beteiligung an der Kontrolle von Zellproliferation und Transformation.	217-225	Visser et al. 1999		bekannt (RCC)
		HLSTAFARV	G250 (Carbon Anhydrase IX Vorläufer / Carbonat Dehydratase IX)	Neuer biologischer Tumormarker für Neoplasien der Cervix uteri [Pastorek et al. 1994].	254-262	Visser et al. 1999		bekannt (RCC)
A*02	GUCY1A3-1	SVFAGVGV	Guanylatzyklase 1 alpha 3	Katalysierung der Umrwandlung von GMP zum Second messenger cGMP. Hauptrezeptor für Nitrate [Zabel et al. 1998].	581-589	Weinschenk et al. 2002		unbekannt
A*02	KIAA0367-1	ALFDGDPHL	KIAA0367	unbekannt	1-9	Weinschenk et al. 2002		unbekannt
A*02	KPNA2	GLYFFLYSV	Importin alpha 2 subunit	unbekannt	377-385	Hunt et al. 1992		unbekannt
A*02	Met-1	YDPPVITSI	Met protoonkogen	siehe oben	654-662	Weinschenk et al. 2002	Schag et al. 2004	bekannt
A*02	MUC-1	STAPPVHNV	Mucin 1 (VNTR)	Membranbundes, glycosyliertes	950-958		Brossart et al. 1999	bekannt
A*02	MUC-2	LLLLTTLTV	Mucin 1 (VNTR)	Phosphoprotein auf der Oberfläche vieler Epithelzellen. Protektive Funktion wegen Bindung an Pathogene und Funktionen in der Signaltransduktion der Zellen. Überexpression, intrazelluläre Lokalisation und Veränderungen in der Glykosylierung sind mit Carcinomen assoziiert [Gendler et al. 1988]. Mucin-1 Expression kann durch dendritische Zellen auf T-Zellen induziert werden [Yasir et al. 2005].	12-20		Brossart et al. 1999	
A*02	RGS-2	LAALPHSCL	Regulator of G-Protein signalling 5	siehe oben	5-13	Krüger et al. 2004		bekannt (RCC)
A*02	PRAME	SLLQHLGL	PRAME gene product	Repressor der Signalgebung über Retinolsäurerezeptoren [Epping et al. 2005].	425-433		Kessler et al. 2001	bekannt (RCC)
A*02	Survivin	ELTLGEFLKL	Survivin	Verhinderung der Apoptose, die durch IL-3 vermittelt wird. Survivin wird in soliden Tumoren und Lymphomen gefunden [Ambrosini et al. 1997].	95-104		Schmitz et al. 2000	bekannt (alle bekannten soliden Tumoren, NHL)
A*03	ADFP-2	SLLTSSKGQLQK	adipose differentiation-related protein	siehe oben	369-380	Krüger et al. 2004		unbekannt
A*03	ADFP-3	TSALPIIQK	adipose differentiation-related protein	siehe oben	63-71	Krüger et al. 2004		unbekannt
A*03	FMO-1	ILNSWNISK	Flavin containing Monooxygenase	Oxidativer Metabolismus von xenobiotischen Substanzen wie Arzneimitteln und Pestizide.	-			unbekannt





### 6.1.2.3. Negativ- und Positivkontrollen:

Die Negativkontrolle war für alle Patienten ein Peptid aus HIV, jeweils dem HLA-Typ des Patienten, beziehungsweise der Vakzine angepasst. Es war gesichert, dass die Patienten nicht an einer HIV-Infektion litten (gesichert durch präoperative Screening-Untersuchungen). Daher würden die Patienten auch keine Antwort gegen ein HIV-Epitop zeigen. So wurde dieses Epitop als Negativkontrolle eingesetzt. In einigen wenigen Versuchen kam zusätzlich ein Selbst-Peptid als Negativkontrolle zum Einsatz.

Als Positivkontrolle wurde eine Mischung verschiedener viraler Peptide aus CMV, EBV und Influenza eingesetzt. Mit einer oder mehrerer dieser Infektionen kommt jeder Mensch im Laufe seines Lebens in Kontakt. Daher wurde eine Mischung dieser viralen Peptide als Positivkontrolle verwendet, weil davon ausgegangen werden konnte, dass die Patienten T-Zellen gegen eines oder mehrere dieser Epitope haben und entsprechend auf eine Stimulation mit Peptid reagieren.

Die einzelnen Peptide der Kontrollen sind in Abschnitt 6.1.2.1. (Übersicht der verwendeten Peptide) verzeichnet. Da grundsätzlich Peptidpools in der Positivkontrolle und gelegentlich auch bei Negativkontrollen eingesetzt wurden, die bei allen Patienten identisch waren, sind sie im Ergebnisteil nicht einzelnen definiert.

Die Pools der Negativkontrollen waren wie folgt:

Pool A3	HIV und IF5a
Pool B7	HIV und DP

Die Pools der Positivkontrollen waren wie folgt:

Pool A1	CMVpp50, CMVpp65 und Influenza NP
Pool A2	CMV, Influenza-Matrix, EBNA6-EBV, LMP2-EBV und IE63-EBV
Pool A3	NP Matrix (Influenza) und EBNA-3
Pool B7	CMVpp63, CMVpp65 und EBNA-3



Geschlecht:	♂
Alter:	71 Jahre
Diagnose:	Klarzelliges Nierenzellcarcinom pT3a pN0 pMX G3
Metastasierung:	pulmonal
Anzahl der Vakzinierungen:	4
Anzahl DCs:	1. Vakzinierung: $8,0 \times 10^5$ 2. Vakzinierung: $8,8 \times 10^5$ 3. Vakzinierung: $1,9 \times 10^6$ 4. Vakzinierung: $2,1 \times 10^6$
Klinik:	Progredienter Verlauf nach 4 Immunisierungen

Von diesem Patienten war eine autologe Tumorzelllinie verfügbar, mit der man die Proben testen konnte. Dazu wurden die PBMCs zusätzlich zur Stimulation mit Peptid mit der Zelllinie inkubiert. RCC68 wurde in zwei verschiedenen Ansätzen getestet, zum einen mit einer Stimulation mit Peptid, zum anderen mit einer Woche Prästimulation.

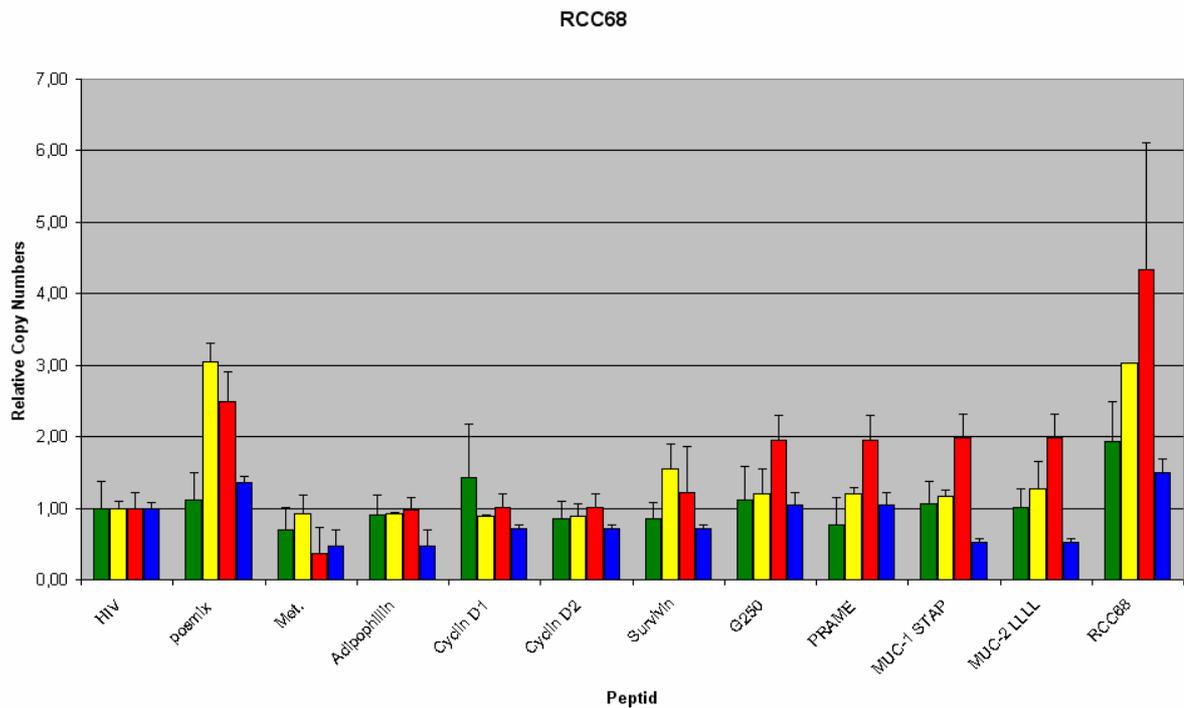


Abb. 34: Gegenüberstellung der relativen Kopienzahlen in RT-PCR bezogen auf HIV bei Test *ex vivo*. Vor Therapie (grün), nach 1. Therapie (gelb), nach 2. Therapie (rot), nach 3. Therapie (blau).

Trotz einer schwachen Antwort gegen die Positivkontrolle ist eine verstärkte Reaktivität gegen die Tumorzellreihe RCC68 bis nach der 2. Therapie zu beobachten. Die Antwort verschwindet aber wieder in der Probe nach 3. Therapie.

Ein Anstieg der Aktivität der Zellen bei Stimulation mit einem der Impfpeptide konnte in diesem Versuch nicht gezeigt werden.

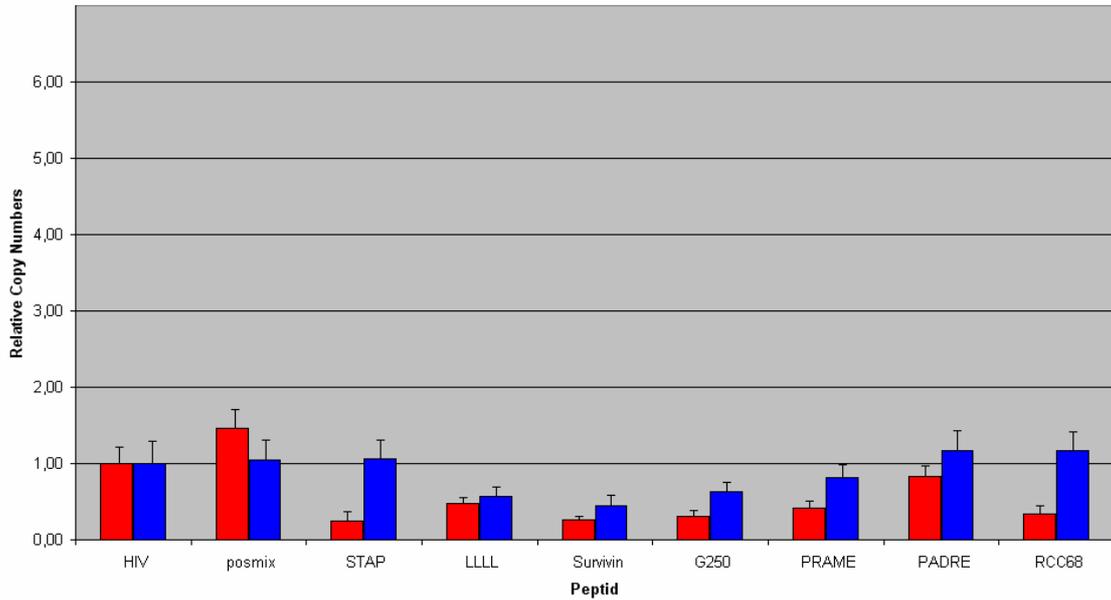
HLA	Vakzine	Sequenz	vor Th.	nach 1. Th.	nach 2. Th.	nach 3. Th.
A*02	Met.	YVDPVITSI	0,69	0,93	0,36	0,47
A*02	Adipophilin	SVASTITGV	0,90		0,98	
A*02	G250	HLSTAFARV	1,11	1,21	1,96	1,05
A*02	PRAME	SLLQHLIGL	0,76			
A*02	Cyclin-D1	LLGATCMFV	1,43	0,90	1,02	0,72
A*02	Cyclin-D2	RLTRFLSRV	0,86			
A*02	Survivin	ELTLGEFLKL	0,85			
A*02	MUC-1 STAP	STAPPVHNV	1,07	1,16	1,99	0,53
A*02	MUC-1 LLLL	LLLLTVLTV	1,00	1,28		
DR	PADRE	aKXVAAWTLKAAa	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
	RCC68	Zellreihe	1,93	3,03	4,33	0,74
A*02	Positivkontrolle Pool A2		1,11	3,04	2,50	1,35
A*02	Negativkontrolle HIV		1,00	1,00	1,00	1,00

Tab. 15: Werte der gemessenen relativen Kopienzahlen (RT-PCR) bezogen auf HIV (= 1,00 gesetzt als Referenz) im Ex-vivo-Test. Die negativen Messwerte sind rot markiert, die positiven grün.

Mit diesem Patienten wurde auch ein Stimulationstest durchgeführt. Die PBMCs wurden eine Woche mit Peptid und Interleukinen prästimuliert. Die oben gezeigte Reaktivität gegen die Zelllinie RCC68 nach 3. Vakzinierung konnte in diesem Versuch nicht reproduziert werden. Da im ersten Versuch die Positivkontrolle ein negatives Ergebnis hatte, wurden bei der Prästimulation PMA und Ionomycin, die T-Zellen unspezifisch stimulieren, als Positivkontrolle eingesetzt.

(a)

RCC68



(b)

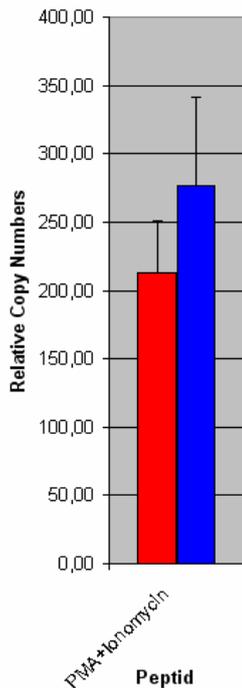


Abb. 35: Gegenüberstellung der relativen Kopienzahlen in RT-PCR bezogen auf HIV nach einer Woche Prästimulation. Die Proben vor Therapie und nach 1. Therapie wurden nicht getestet. Nach 2. Therapie (rot), nach 3. Therapie (blau). Da die relativen Kopienzahlen bei Stimulation mit den Impfpeptiden deutlich geringer waren als nach Stimulation mit PMA und Ionomycin, sind die beiden Diagramme unterschiedlich skaliert. Oben (a) die Stimulation mit Peptiden, links (b) die Positivkontrolle. Rote Säulen bezeichnen die Probe nach 2. Therapie, blaue Säulen die nach 3. Therapie

Die schlechte Antwort gegen die virale Positivkontrolle ist in diesem Versuch reproduzierbar. Die Positivkontrolle mit PMA und Ionomycin zeigt ein stark

positives Ergebnis, das heißt, die Zellen des Patienten konnten prinzipiell stark unspezifisch aktiviert werden.

Auch nach einer Woche Prästimulation zeigt sich keine erhöhte T-Zell-Aktivität gegen eines der Impfpeptide.

Dieser Versuch zeigte somit ein insgesamt negatives Ergebnis, das dadurch, dass die Positivkontrolle negativ war, keine deutliche Aussagekraft hat.

Als Erklärung für die Negativität der Positivkontrolle ist anzuführen, dass der Patient möglicherweise CMV-negativ war und somit der potenteste Stimulus (das CMV-Epitop) nicht zur Positivierung beitragen konnte. Andererseits könnte auch eine Immunsuppression des Patienten vorgelegen haben.

HLA	Vakzine	Sequenz	nach 2. Th.	nach 3. Th.
A*02	Met.	YVDPVITSI	n.t.	n.t.
A*02	Adipophilin	SVASTITGV	n.t.	n.t.
A*02	G250	HLSTAFARV	<b>0,31</b>	<b>0,63</b>
A*02	PRAME	SLLQHLIGL	<b>0,42</b>	<b>0,81</b>
A*02	Cyclin-D1	LLGATCMFV	n.t.	n.t.
A*02	Cyclin-D2	RLTRFLSRV	n.t.	n.t.
A*02	Survivin	ELTLGEFLKL	<b>0,25</b>	<b>0,45</b>
A*02	MUC-1 STAP	STAPPVHNV	<b>0,25</b>	<b>1,06</b>
A*02	MUC-1 LLLL	LLLLTVLTV	<b>0,47</b>	<b>0,56</b>
DR	PADRE	aKXVAAWTLKAAa	<b>0,83</b>	<b>1,18</b>
	RCC68	Zellreihe	<b>0,34</b>	<b>1,16</b>
A*02	Positivkontrolle Pool A2		<b>1,45</b>	<b>1,05</b>
A*02	Negativkontrolle HIV		<b>1,00</b>	<b>1,00</b>

Tab. 16: Zahlenwerte der in RT-PCR gemessenen relativen Kopienzahlen bezogen auf HIV im Test mit einer Woche Prästimulation. Die negativen Messwerte sind rot markiert, die positiven grün.

Der Patient RCC68 wurde mit bekannten Tumorspezifischen T-Zell-Epitopen und zwei HLA-Liganden, die in der Abteilung für Immunologie auf Tumoren anderer Patienten gefunden wurden, vakziniert. Er zeigte in der RT-PCR *ex vivo* ein schwach positives Ergebnis gegen die autologe Tumorzelllinie nach 2. Vakzinierung, die in der Probe nach 3. Vakzinierung nicht mehr detektierbar war. Diese Aktivität konnte im Versuch mit einer Woche Prästimulation nicht reproduziert werden. Gegen keines der Impfpeptide konnte eine

Aktivitätsvermehrung gemessen werden. Damit zeigte die Vakzinierung keinen messbaren Effekt.

Die virale Positivkontrolle war allenfalls sehr schwach positiv. Dies war in allen Versuchen reproduzierbar. Dies könnte an einer möglichen Immunsuppression des Patienten liegen oder daran, dass der Patient CMV-negativ war. Dies würde bedeuten, dass der stärkste Stimulus im Peptidpool (das CMV-Epitop) keine Wirkung bei diesem Patienten hätte.



Geschlecht: ♂  
 Alter: 72 Jahre  
 Diagnose: Klarzelliges Nierenzellcarcinom  
 pT3 pN2 MX G2  
 Metastasierung: pulmonal, hepatisch, lymphogen  
 Anzahl der Vakzinierungen: 4  
 Anzahl DCs: 1. Vakzinierung:  $1,6 \times 10^6$   
 2. Vakzinierung:  $2,6 \times 10^6$   
 3. Vakzinierung:  $2,1 \times 10^6$   
 4. Vakzinierung:  $6 \times 10^6$   
 Klinik: Progress der Tumormanifestationen nach 4  
 Vakzinierungen

Von diesem Patienten, der vier Mal vakziniert wurde, wurden die Proben vor Vakzinierung, nach 1., nach 2. und nach 3. Vakzinierung sowohl *ex vivo* als auch eine Woche prästimuliert mit RT-PCR gemessen.

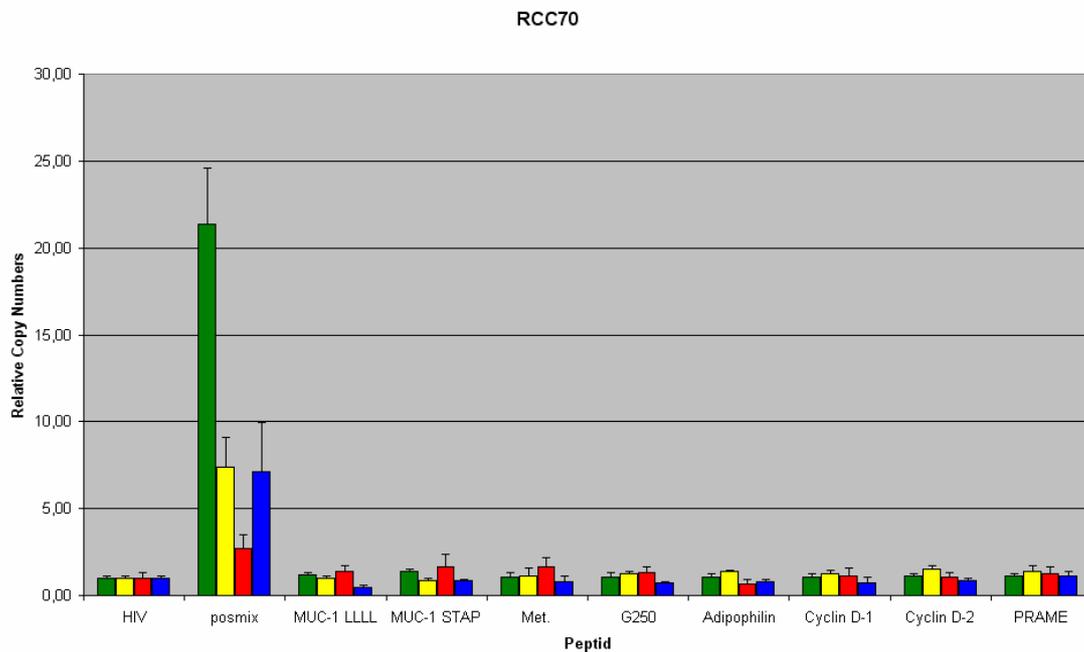


Abb. 36: RT-PCR *ex vivo* RCC70. Vor Therapie (grün), nach 1. Vakzinierung (gelb), nach 2. Vakzinierung (rot), nach 3. Vakzinierung (blau).

HLA	Vakzine	Sequenz	vor Th.	nach 1. Th.	nach 2. Th.	nach 3. Th.
A*02	Met.	YVDPVITSI	1,07	1,12	1,62	0,81
A*02	Adipophilin	SVASTITGV		1,36	0,67	0,82
A*02	G250	HLSTAFARV	1,14	1,24	1,32	0,73
A*02	PRAME	SLLQHLIGL		1,39	1,24	1,09
A*02	Cyclin-D1	LLGATCMFV	1,02	1,22	1,13	0,76
A*02	Cyclin-D2	RLTRFLSRV		1,51	1,06	0,83
A*02	MUC-1 STAP	STAPPVHNV	1,36	0,87	1,66	0,85
A*02	MUC-1 LLLL	LLLLTVLTV	1,20	0,99	1,35	0,47
DR	PADRE	aKXVAAWTLKAAa	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
A*02	Positivkontrolle Pool A2		21,33	7,36	2,69	7,11
A*02	Negativkontrolle HIV		1,00	1,00	1,00	1,00

Tab. 17: Relative Kopienzahlen (RT-PCR) des Patienten RCC70 im *ex vivo* Versuch. Die Messwerte sind auf HIV normiert. Die negativen Messwerte sind rot gedruckt, die positiven grün.

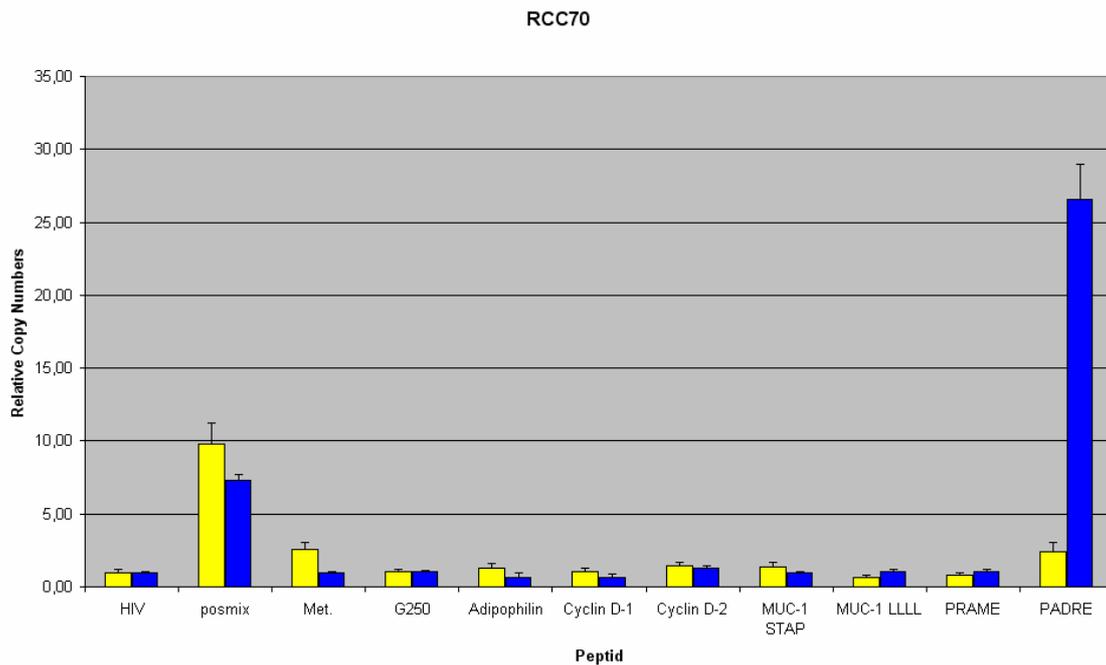


Abb. 37: RT-PCR nach einer Woche Prästimulation normiert auf HIV. Untersucht wurden die Proben nach 1. Vakzinierung (gelb) und nach 3. Vakzinierung (blau).

HLA	Vakzine	Sequenz	nach 1. Th.	nach 3. Th.
A*02	Met.	YVDPVITSI	2,58	0,95
A*02	Adipophilin	SVASTITGV	1,32	0,65
A*02	G250	HLSTAFARV	1,01	1,04
A*02	PRAME	SLLQHLIGL	2,38	1,08
A*02	Cyclin-D1	LLGATCMFV	1,08	1,25
A*02	Cyclin-D2	RLTRFLSRV	1,45	0,97
A*02	MUC-1 STAP	STAPPVHNV	1,40	0,97
A*02	MUC-1 LLLL	LLLLTVLTV	0,66	1,04
DR	PADRE	aKXVAAWTLKAAa	2,38	26,54
A*02	Positivkontrolle Pool A2		9,78	7,31
A*02	Negativkontrolle HIV		1,00	1,00

Tab. 18: Messwerte in relativen Kopienzahlen (RT-PCR) von RCC70 nach einer Woche Prästimulation.

Gegen die MHC-Klasse-I restringierten Impfpptide war in beiden Versuchen kein Aktivitätsanstieg von T-Zellen zu beobachten. Auf die virale Positivkontrolle reagierte der Patient adäquat. In der RT-PCR war allerdings zu beobachten, dass eine Aktivitätssteigerung gegen das Klasse-II Epitop PADRE zu beobachten war.

Die Ergebnisse wurden im Tetramer-Staining für MUC-1 STAP, MUC-1 LLLL und Adipophilin (PE markiert) erneut untersucht, um eventuell antigenspezifische T-Zellen detektieren zu können, die in dem oben gezeigten Versuch eine nicht detektierbare  $IFN\gamma$ -Produktion zeigten. Sie wurden ohne Prästimulation durchgeführt. Das Ergebnis reproduzierte oben gezeigte Ergebnisse. MUC- oder Adipophilin-Tetramer-positive Zellen waren nicht detektierbar (Daten nicht gezeigt).

Als Positivkontrolle bei diesem Tetramer-Staining wurden ein Influenza Matrix- und ein CMV-Tetramer, APC-markiert, eingesetzt.

Für die Positivkontrolle waren in geringer Anzahl Tetramer-positive Zellen nachweisbar. Diese erklären die erhöhte  $IFN\gamma$ -Aktivität in der RT-PCR.

Der Patient RCC70 wurde mit bekannten Tumorspezifischen T-Zell-Epitopen und MHC-Liganden vakziniert, die allerdings nicht direkt auf dem Tumor des

Patienten nachgewiesen werden konnten. Vielmehr war durch Genchip-Analysen festgestellt worden, dass die Gene für diese Proteine überexprimiert waren, aus denen dann die Peptide zum Einsatz kamen.

Der Patient zeigte weder *ex vivo* noch nach einer Woche Prästimulation eine Aktivitätsvermehrung gegen eines der MHC-I-restringierten Peptide. Lediglich gegen das Klasse-II-Epitop PADRE konnte eine erhöhte IFN $\gamma$ -Produktion nach 3. Therapie gemessen werden. Somit zeigte auch bei diesem Patienten die Immunisierung mit MHC-I-restringierten Peptiden keinen messbaren Erfolg.

Die viralen Positivkontrollen zeigten insgesamt eine Aktivierung spezifischer T-Zellen. Dies bedeutet, dass der Versuchsansatz prinzipiell funktioniert hatte.



Geschlecht: ♂  
 Alter: 37 Jahre  
 Diagnose: Papilläres Nierenzellcarcinom  
 pT4 NX M1(Hepar) G2-3  
 Metastasierung: Pulmonal, hepatisch, ossär  
 Anzahl der Vakzinierungen: 4  
 Anzahl DCs: 1. Vakzinierung:  $4,8 \times 10^6$   
 2. Vakzinierung:  $5,1 \times 10^6$   
 3. Vakzinierung:  $2,6 \times 10^6$   
 4. Vakzinierung:  $1,5 \times 10^6$   
 Klinik: Progress der Tumormanifestationen nach 4  
 Vakzinierungen

Auch dies ist ein Patient, der vier Mal vakziniert wurde. Die RT-PCR zeigte keine Aktivitätssteigerung spezifischer T-Zellen im Vergleich vor Vakzinierung und nach 3. Therapie.

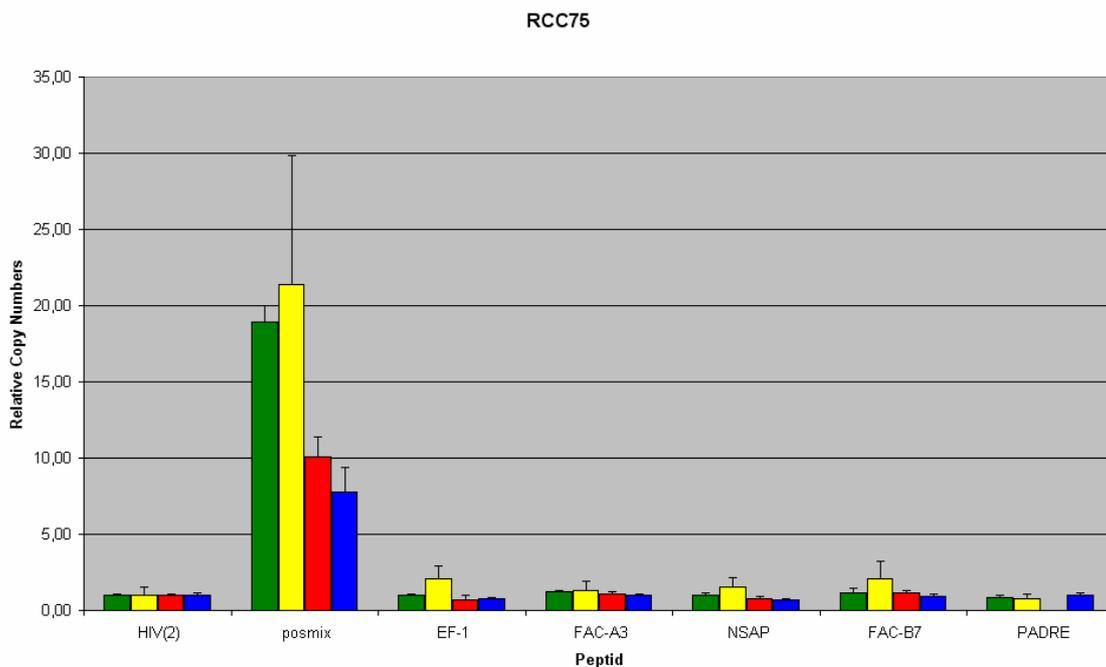


Abb. 38: RT-PCR (Messwerte ausgedrückt in relativen Kopienzahlen der Amplifikation von HIV). Vor Therapie (grün), nach 1. Vakzinierung (gelb), nach 2. Vakzinierung (rot) und nach 3. Vakzinierung (blau).

Aufgrund der klar negativen Versuchsergebnisse wurde bei diesem Patienten auf weitere Tests verzichtet.

HLA	Vakzine	Sequenz	vor Th.	nach 1. Th.	nach 2. Th.	nach 3. Th.
A*0301	EF1e	TLADILLYY	0,98	2,05	0,72	0,75
A*0301	FACL4	KLFDHAVSKF	1,27	1,34	1,09	0,97
A*0301	NSAP1	GLTDVILYH	1,01	1,53	0,80	0,69
B*0702	FACL4	VPNQKRLTLL	1,13	2,11	1,16	0,93
DR	PADRE	aKXVAAWTLKAAa	0,81	0,76	n.t.	1,01
	Positivkontrolle Pool A3 Pool B7		18,96	21,41	10,06	7,75
	Negativkontrolle Pool A3 Pool B7		1,00	1,00	n.t.	1,00

Tab. 19: Messwerte (in relativen Kopienzahlen normiert auf HIV) von RCC75. Positive Messergebnisse sind grün, negative rot gedruckt.

Der Patient RCC75 wurde mit MHC-Liganden vakziniert, die auf dem autologen Tumor dieses Patienten gefunden wurden. Er erhielt vier Vakzinierungen und zeigte in der RT-PCR *ex vivo* keine ansteigende oder erhöhte antigenspezifische T-Zell-Aktivität gegen eines der Vakzinierungspeptide. Aufgrund der geringen Anzahl an Vakzinierungen wurde auch nicht mit der Detektion einer induzierten Immunantwort gerechnet.

Die Stimulation mit der viralen Positivkontrolle zeigte jeweils eine gegenüber der Negativkontrolle erhöhte IFN $\gamma$ -Produktion.



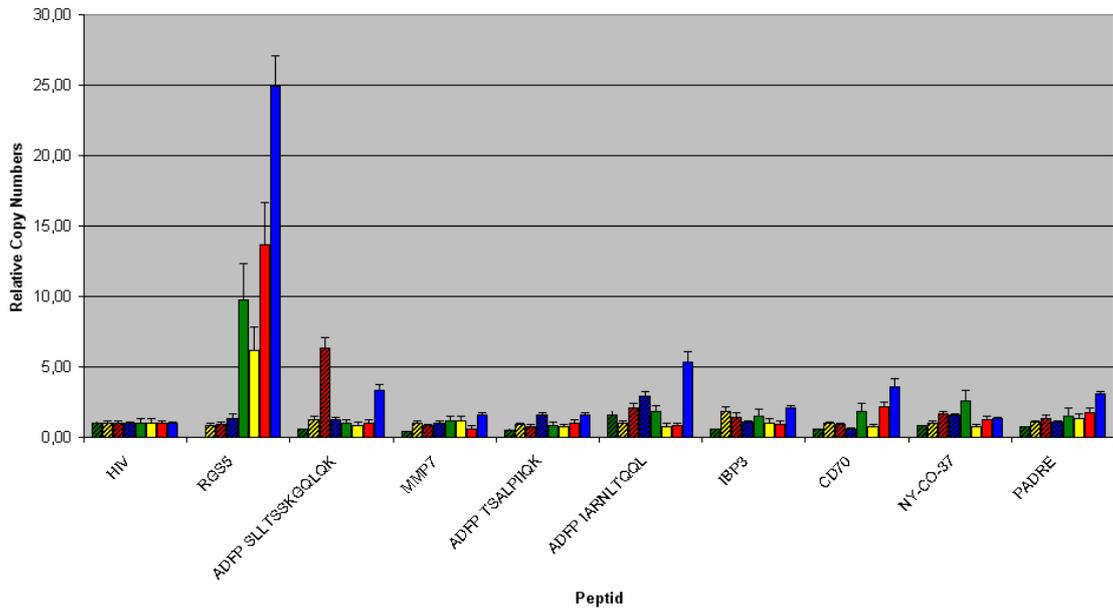
Geschlecht:	♂
Alter:	56 Jahre
Diagnose:	Spindelzelliges, pleomorphes Nierenzellcarcinom mit sarkomatoider, teils klarzelliger Komponente
Metastasierung:	pulmonal, pleural, ossär
Anzahl der Vakzinierungen:	8
Anzahl DCs:	1. Vakzinierung: $4 \times 10^5$ 2. Vakzinierung: $4 \times 10^5$ 3. Vakzinierung: $3,4 \times 10^5$ 4. Vakzinierung: $5,5 \times 10^5$ 5. Vakzinierung: $1,3 \times 10^5$ 6. Vakzinierung: keine Daten verfügbar 7. Vakzinierung: $1,3 \times 10^6$
Klinik: Vakzinierungen	Stabile Tumorerkrankung nach 4  Massiver Progress (besonders der Lungenherde) nach 8 Vakzinierungen

Dieser Patient erhielt erstmalig dendritische Zellen, die in zwei Pools mit Peptiden inkubiert worden waren. Drei der HLA-A\*03, zwei der HLA-B\*07 und das HLA-B\*18 restringierte Peptid, die im Impfcocktail appliziert wurden, waren im Tumor dieses Patienten als HLA-Liganden identifiziert worden.

Zusätzlich wurde dieser Patient, da keine Tumorprogression zu beobachten war, mehr als vier Mal vakziniert. Nach der 8. Vakzinierung konnten dem Patienten aufgrund von Tumorprogression im CT keine weiteren Impfungen appliziert werden.

(a)

RCC98



(b)

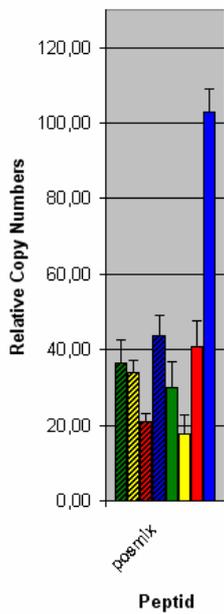


Abb. 39: Gegenüberstellung der relativen Kopienzahlen (RT-PCR) bezogen auf HIV vor Therapie (grün schraffiert), nach 1. Therapie (gelb schraffiert), nach 2. Therapie (rot schraffiert), nach 3. Therapie (blau schraffiert), nach 4. Therapie (grün), nach 5. Therapie (gelb), nach 6. Therapie (rot) und nach 7. Therapie (blau). Da die relativen Kopienzahlen nach Stimulation mit der viralen Positivkontrolle deutlich höher waren, als bei Stimulation mit den Impfpeptiden (a), ist sie hier gesondert abgebildet (b).

Der Patient zeigte einen deutlichen Anstieg der T-Zell-Aktivität bei Stimulation mit RGS-5 (HLA-A\*03 restringiert). Bei einigen weiteren Peptiden (ADFP

IARNLTQQL, CD70) ist ebenfalls eine Tendenz zu erhöhter Aktivität erkennbar, obwohl die relativen Kopienzahlen nicht so deutlich erhöht sind wie bei RGS-5.

HLA	Vakzine	Sequenz	vor Th.	nach 1. Th.	nach 2. Th.	nach 3. Th.
A*0301	RGS-5	GLASFKSFLK	0,00	0,84	0,89	1,30
A*0301	ADFP	SLLTSSKGQLQK	0,60	1,28	6,30	1,27
A*0301	MMP7	SLFPNSPKWTSK	0,41	1,02	0,80	1,02
A*0301	ADFP	TSALPIIQK	0,48	0,88	0,77	1,59
B*07	ADFP	IARNLTQQL	1,62	1,01	2,11	2,91
B*07	IBP3	RPTLWAAAL	0,56	1,87	1,42	1,07
B*07	CD70	GPALGRSFL	0,59	0,96	0,90	0,56
B*18	NY-CO-37	DEIVRINGY	0,82	0,99	1,65	1,56
DR	PADRE	aKXVAAWTLKAAa	0,76	1,04	1,36	1,10
	Positivkontrolle Pool A3 Pool B7		36,63	33,82	20,83	43,56
A*0301 B*07	Negativkontrolle HIV HIV		1,00	1,00	1,00	1,00

HLA	Vakzine	Sequenz	nach 4. Th.	nach 5. Th.	nach 6. Th.	nach 7. Th.
A*0301	RGS-5	GLASFKSFLK	9,71	6,15	13,64	24,93
A*0301	ADFP	SLLTSSKGQLQK	0,98	0,85	0,97	3,32
A*0301	MMP7	SLFPNSPKWTSK	1,19	1,19	0,60	1,55
A*0301	ADFP	TSALPIIQK	0,83	0,72	0,98	1,57
B*07	ADFP	IARNLTQQL	1,82	0,75	0,86	5,33
B*07	IBP3	RPTLWAAAL	1,52	0,99	0,94	2,09
B*07	CD70	GPALGRSFL	1,82	0,72	2,17	3,62
B*18	NY-CO-37	DEIVRINGY	2,59	0,73	1,26	1,34
DR	PADRE	aKXVAAWTLKAAa	1,53	1,31	1,74	3,05
	Positivkontrolle Pool A3 Pool B7		29,96	17,75	40,79	102,00
A*0301 B*07	Negativkontrolle HIV HIV		1,00	1,00	1,00	1,00

Tab. 20: Werte der quantitativen RT-PCR in relativen Kopienzahlen bezogen auf HIV. Positive Messergebnisse sind grün gedruckt, negative rot.

Ein im Labor von PD Dr. Peter Brossart durchgeführter ELISPOT zur Reproduktion der Ergebnisse konnte den Aktivitätsanstieg nach 5. und 7.

Therapie im Vergleich zu früheren Zeitpunkten für RGS-5 bestätigen (hier nicht gezeigt).

Tetramer-positive Zellen gegen RGS-5 konnten nur sehr spärlich nachgewiesen werden. In der Probe nach 6. Vakzinierung konnten mit 0,009 % der CD8<sup>+</sup> Zellen ein fast doppelt so hoher Anteil an Tetramer-positiven Zellen gemessen werden wie nach 3. Vakzinierung (0,005 %).

Im Tetramer-Staining der Positivkontrolle war der Anteil der Tetramer-positiven Zellen an der Gesamtzahl der CD8<sup>+</sup> Zellen in allen Proben konstant. Ihr Anteil war aber auch relativ gering.

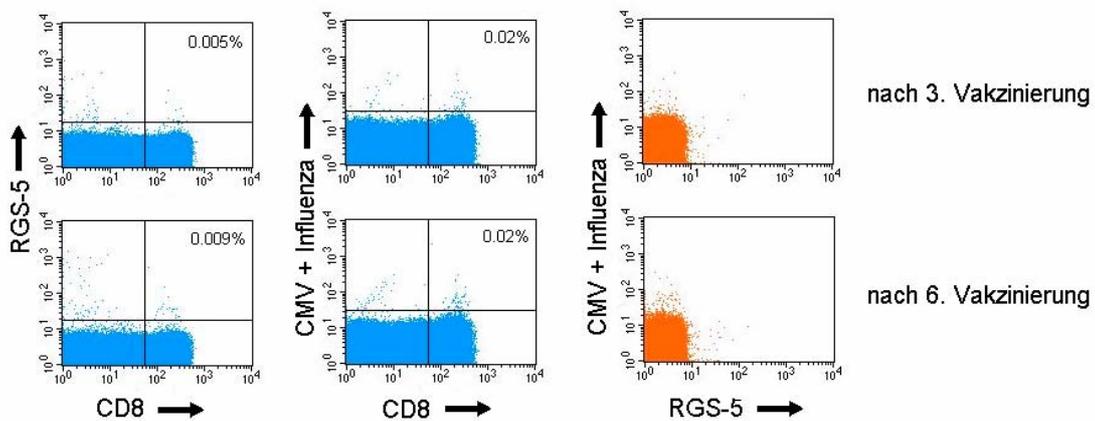


Abb. 40: Tetramer-Staining nach einer Woche *in vitro* Prästimulation von RCC98 der Proben nach 3. und nach 6. Vakzinierung. Die Prozentzahlen geben den Anteil der IFN $\gamma$  positiven Zellen an der Gesamtzahl der CD8<sup>+</sup> Zellen an.

Da außer T-Zell-Klonen keine sichere Positivkontrolle für Tetramere verfügbar war, konnte keine sichere Aussage getroffen werden, ob die hergestellten Tetramere wirklich spezifisch gebunden wurden. Daher wurde in späteren Versuchen, die mit Proben anderer Patienten durchgeführt wurden, nicht rein mit Tetrameren gefärbt, sondern diese Methode mit einem intrazellulären IFN $\gamma$ -Staining kombiniert. Dies hatte den Vorteil, dass der eingesetzte Antikörper gegen IFN $\gamma$  keine TCR-Spezifitäten detektiert, sondern an ein Zytokin bindet.

Der Patient RCC98 erhielt erstmals mehr als vier Immunisierungen mit MHC-Liganden, die auf dem autologen Tumor des Patienten gefunden wurden, und

einer Sequenz-Prädiktion, die aufgrund von Genexpressionsanalysen getätigt wurde. Ein erstes deutlich positives Messergebnis ist in der Probe nach 4. Vakzinierung gegen RGS-5 zu beobachten. Diese spezifische T-Zell-Aktivität wird bis nach der 7. Impfung weiter gesteigert. Die Reaktivitäten gegen RGS-5 konnten im ELISPOT durch das Labor von PD Dr. Peter Brossart und grenzwertig im Tetramer-Staining reproduziert werden. Allerdings ist die Frequenz antigenspezifischer T-Zellen im Tetramer-Staining mit 0,009 % der CD8<sup>+</sup> Zellen sehr gering. Da aber sowohl der Hintergrund als auch die Positivkontrolle in beiden Proben konstant sind, kann man die Zunahme von spezifischen Zellen von 0,005 % auf 0,009 % durchaus als positiv bewerten. Bei einer Aktivitätszunahme um den Faktor 40, die in RT-PCR gemessen wurde, wäre aber mit einer höheren Frequenz zu rechnen gewesen. Dies könnte daran liegen, dass Tetramere nicht immer sicher an die T-Zellen binden und somit dem Nachweis entgehen (siehe dazu die Diskussion).

Die viralen Positivkontrollen zeigten jeweils deutliche Antworten. Die relative Kopienzahl der Probe nach 7. Therapie zeigte mit 102 eine deutlich höhere Aktivierung als die vorhergehenden Proben. Dies könnte dazu führen, dass insgesamt die Probe etwas höhere relative Kopienzahlen zeigt. Ob in dieser Probe eine Reaktivität gegen RGS-5 gemessen wurde, steht dadurch nicht in Frage.

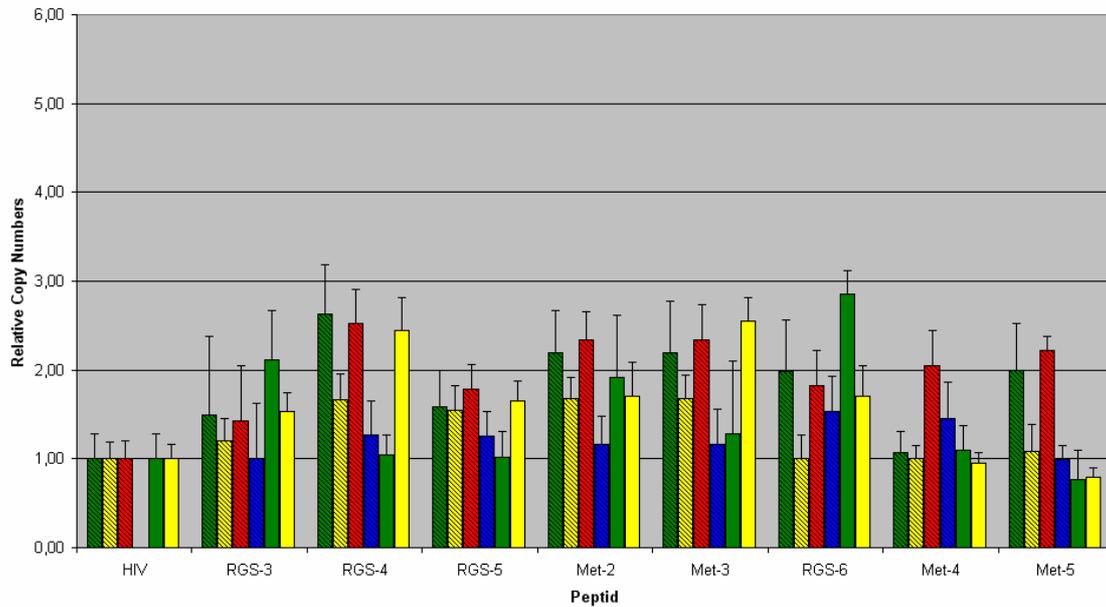


Geschlecht:	♀
Alter:	44 Jahre
Diagnose:	Klarzelliges Nierenzellcarcinom pT1 pN0 pM1 G2
Metastasierung:	Thoraxwand, Nebenniere
Anzahl der Vakzinierungen:	13
Anzahl DCs:	1. Vakzinierung: $1,8 \times 10^6$ 2. Vakzinierung: $6,4 \times 10^5$ 3. Vakzinierung: $1,7 \times 10^6$ 4. Vakzinierung: keine Daten verfügbar 5. Vakzinierung: $2,1 \times 10^6$ 6. Vakzinierung: keine Daten verfügbar 7. Vakzinierung: $2,0 \times 10^6$ 8. Vakzinierung: $1,7 \times 10^6$ 9. Vakzinierung: $15,8 \times 10^7$ 10. Vakzinierung: $2,25 \times 10^6$ 11. Vakzinierung: $2,2 \times 10^6$ 12. Vakzinierung: $9,0 \times 10^5$ 13. Vakzinierung: $33,0 \times 10^6$
Klinik:	Stabiler Verlauf bis zur Kontrolle nach 13. Vakzinierung, da dann Progress der bestehenden Tumormanifestationen sowie neue Filiae.

Diese Patientin wurde 13 Mal mit in SYFPEITHI prädiktierten Peptiden vakziniert. Die Genexpressionsanalysen hatten eine Überexpression zweier Gene ergeben. Für diese Gene wurden dann entsprechende Peptide aus dem *Met Protoonkogen* und dem *Regulator of G-Protein signalling (RGS-5)* vorausgesagt.

(a)

RCC112



(b)

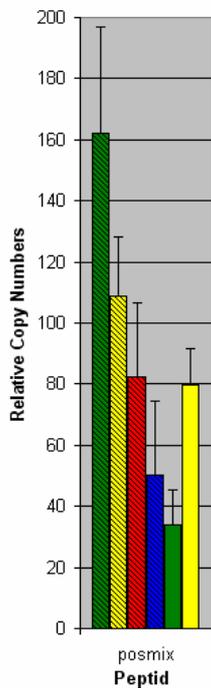


Abb. 41: Real-Time PCR des Patienten RCC112. Werte angegeben in relativen Kopienzahlen bezogen auf HIV. Proben vor Vakzinierung (grün schraffiert), nach 3. Vakzinierung (gelb schraffiert), nach 6. Vakzinierung (rot schraffiert), nach 7. Vakzinierung (blau schraffiert), nach 10. Vakzinierung (grün) und nach 13. Vakzinierung (gelb). Da die relativen Kopienzahlen der Proben, die mit der viralen Positivkontrolle stimuliert worden waren, die der mit Impfpeptid inkubierten Proben deutlich überschreiten, werden sie hier getrennt abgebildet. Die relativen Kopienzahlen der Proben mit Impfpeptid finden sich in Abbildung (a), die relativen Kopienzahlen der Positivkontrollen finden sich in Abbildung (b).

Getestet wurden die Proben vor Therapie und nach 3., 6., 7. 10. und 13. Therapie. Im gesamten Verlauf zeigten sich bei der Patientin gelegentlich grenzwertig positive Messergebnisse, die aber keine Tendenz der Steigerung

aufwiesen. Die Messwerte lagen nie über einem Faktor von 3 der relativen Kopienzahlen bezogen auf die Negativkontrolle HIV. Eine wirklich signifikante Antwort konnte nicht beobachtet werden.

HLA	Vakzine	Sequenz	vor Th.	nach 3. Th.	nach 6. Th.
A*01	RGS-3	SLDKLLQNNY	1,49	1,20	1,43
A*01	RGS-4	NLEFWIACEDY	2,63	1,66	2,53
A*01	RGS-5	MAEKAKQIY	1,59	1,55	1,78
A*01	Met-2	KSEMNVNMKY	2,20	1,68	2,34
A*01	Met-3	MLDGILSKY			
B*08	RGS-6	EIKIKLGIL	1,98	1,01	1,82
B*08	Met-4	AVKLIKIDL	1,07	1,01	2,05
B*08	Met-5	WLKKRKQI	1,99	1,09	2,22
DR	PADRE	aKXVAAWTLKAAa	n.t.	n.t.	n.t.
B*08	Positivkontrolle Pool A1 EBV		162,02	108,76	82,42
A*01	Negativkontrolle HIVgag17		1,00	1,00	1,00
HLA	Vakzine	Sequenz	nach 7. Th.	nach 10. Th.	nach 13. Th.
A*01	RGS-3	SLDKLLQNNY	1,00	2,12	1,53
A*01	RGS-4	NLEFWIACEDY	1,27	1,05	2,44
A*01	RGS-5	MAEKAKQIY	1,25	1,02	1,65
A*01	Met-2	KSEMNVNMKY	1,16	1,92	1,71
A*01	Met-3	MLDGILSKY			
B*08	RGS-6	EIKIKLGIL	1,53	2,86	1,71
B*08	Met-4	AVKLIKIDL	1,46	1,10	0,95
B*08	Met-5	WLKKRKQI	0,99	0,76	0,79
DR	PADRE	aKXVAAWTLKAAa	n.t.	1,64	1,87
B*08	Positivkontrolle Pool A1 EBV		50,21	33,94	79,62
A*01	Negativkontrolle HIVgag17		n.t.	1,00	1,00

Tab. 21: Messwerte für RCC112 in relativen Kopienzahlen (Referenz HIV).

Diese Patientin RCC112 erreichte ebenfalls wie RCC98 eine höhere Anzahl an Vakzinierungen. Bei dieser Patientin konnte keine spezifische Antwort gegen eines der eingesetzten Peptide gemessen werden, sondern in der Probe nach 13. Vakzinierung lediglich eine leichte Erhöhung aller Messwerte.

Beim der Patientin RCC112 war nicht genug Tumorgewebe vorhanden, um eine Analyse von MHC-Liganden durchzuführen. Daher wurde sie im Gegensatz zu RCC98 weder mit MHC-Liganden, die auf dem Tumor des Patienten gefunden wurden, noch mit bekannten T-Zell-Epitopen, die Anhand von Genexpressionsanalysen ausgewählt wurden, immunisiert, sondern erhielt einen Impfcocktail aus Prädiktionen, die ebenfalls aufgrund von Genexpressionsanalysen selektiert worden waren. Hierbei ist es weder klar, ob der Tumor wirklich diese Bruchstücke von Stoffwechselprodukten der überexprimierten Gene auf MHC-I-Molekülen zeigt, noch ob – wenn dies der Fall sein sollte – diese Peptide wirklich dazu befähigt sind, T-Zellen zu aktivieren, das heißt, ob es sich um Epitope handelt (siehe dazu die Diskussion).

Die viralen Positivkontrollen zeigten immer ein deutlich positives Ergebnis.

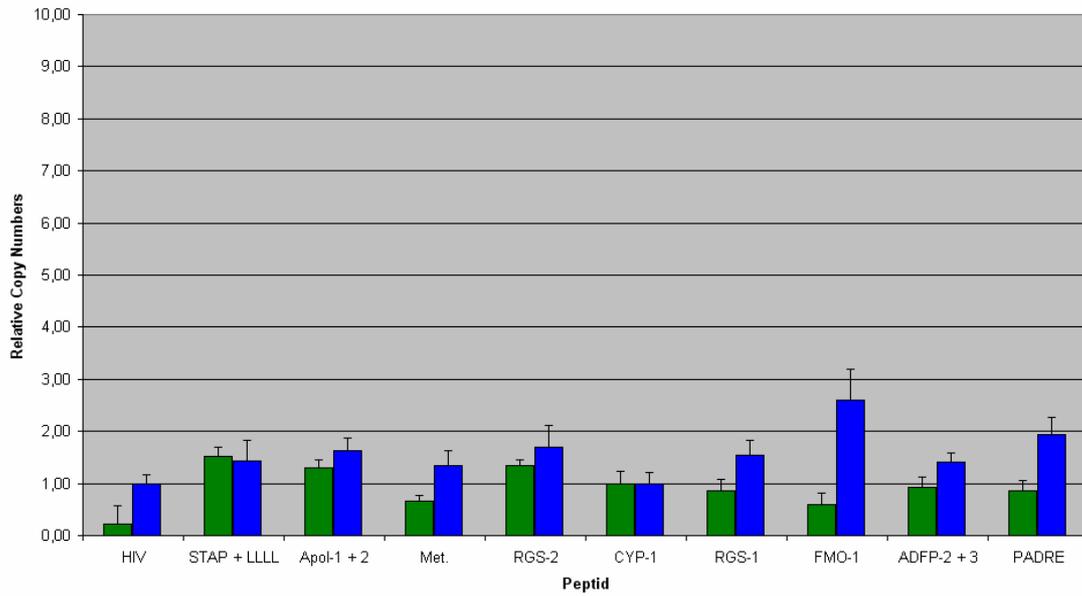


Geschlecht:	♂
Alter:	56 Jahre
Diagnose:	Klarzelliges Nierenzellcarcinom pT3 pN0 MX G2
Metastasierung:	pleural, infradiaphragmal, retro- und intraperitoneal, Omentum- und Peritonealcarcinose
Anzahl der Vakzinierungen:	4
Anzahl DCs:	keine Daten verfügbar
Klinik:	Progress nach 4 Vakzinierungen

Dieser Patient wurde wegen starker Progression der Tumorerkrankung nach vier Vakzinierungen aus der Studie genommen. Die Untersuchungen mit RT-PCR ergaben keine Aktivitätsvermehrung antigenspezifischer T-Zellen durch die Impfungen. Die Proben nach 1. und nach 2. Therapie wurden nicht untersucht. Da die Messwerte nach 3. Therapie weitgehend negativ waren, ist davon auszugehen, dass keine Aktivitätsvermehrung in den nicht untersuchten Proben zu beobachten wäre. Die Aktivität gegen FMO-1 nach 3. Therapie konnte nicht verifiziert werden, weil keine nachfolgende Probe zur Verfügung stand.

(a)

RCC115



(b)

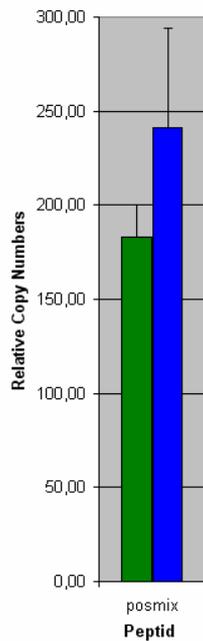


Abb. 42: RT-PCR RCC115 in relativen Kopienzahlen für die Impfpeptide (a). Da bei den viralen Positivkontrollen jeweils deutlich höhere relative Kopienzahlen messbar waren, werden sie hier anders skaliert abgebildet (b). Die Probe vor Therapie ist grün, die nach 3. Therapie blau gedruckt.

HLA	Vakzine	Sequenz	vor Th.	nach 3. Th.
A*02	MUC-1 STAP	STAPPVHNV	1,51	1,44
A*02	MUC-1 LLLL	LLLLTVLTV		
A*02	Apo1-1	FLGENISNFL	1,30	1,63
A*02	Apo1-2	ALADGVQKV		
A*02	Met.	YVDPVITSI	0,66	1,35
A*02	RGS-2	LAALPHSCL	1,34	1,69
A*02	CYP-1	FLDPRPLTV	1,00	1,00
A*03	RGS-1	GLASFKSFLK	0,87	1,54
A*03	FMO-1	ILNSWNISK	0,59	2,61
A*03	ADFP-2	SLLTSSKQQLQK	0,93	1,40
A*03	ADFP-3	TSALPIIQK		
DR	PADRE	aKXVAAWTLKAAa	0,85	1,94
	Positivkontrolle Pool A2		183,00	241,00
	Negativkontrolle HIV		0,21	1,00

Tab. 22: Messwerte bezogen auf HIV RCC115.

Im Impfcocktail enthalten waren sowohl MHC-Liganden, die auf dem autologen Tumor dieses Patienten detektiert worden waren, als auch bekannte T-Zell-Epitope, MHC-Liganden, die auf Tumoren anderer Patienten gefunden wurden, und ein Peptid, das aufgrund von Genexpressionsanalysen bei diesem Patienten in SYFPEITHI vorhergesagt wurde. Gegen das Peptid FMO-1 konnte eine sehr schwach positive Antwort detektiert werden, die allerdings in Ermangelung einer nachfolgenden Probe nicht mehr bestätigt werden konnte. Dieses Peptid war vorausgesagt worden, was eine mögliche Antwort gegen dieses Peptid interessant machen dürfte.

Die Stimulation mit der viralen Positivkontrolle bewirkte eine sehr starke IFN $\gamma$ -Produktion.

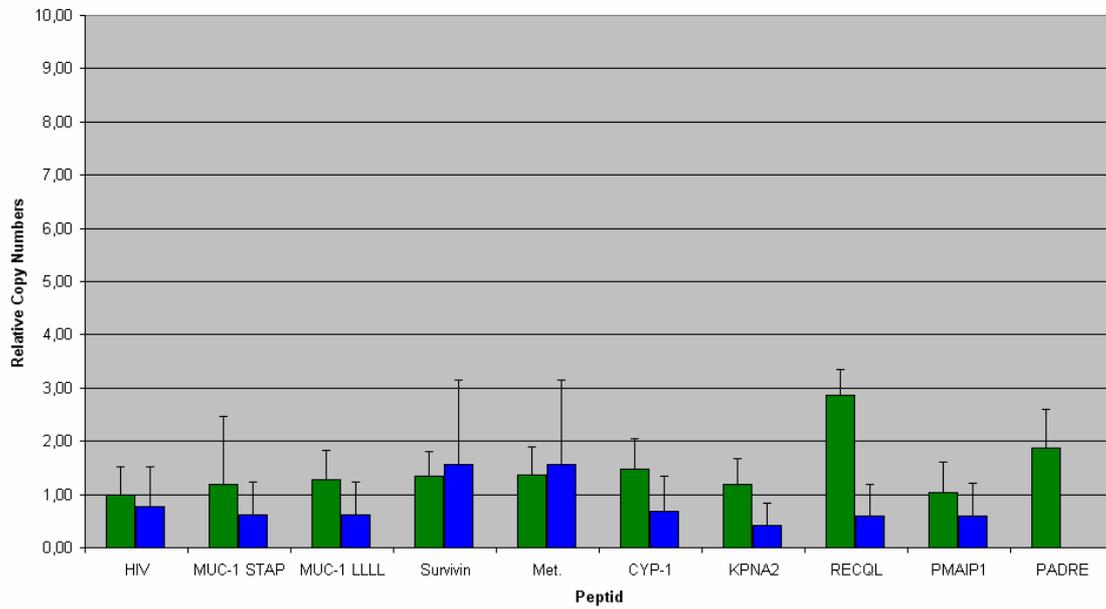


Geschlecht: ♂  
Alter: 60 Jahre  
Diagnose: Klarzelliges Nierenzellcarcinom  
pT3b pN2 MX0 G2  
Metastasierung: lymphogen  
Anzahl der Vakzinierungen: 4  
Anzahl DCs:  
1. Vakzinierung:  $3,3 \times 10^6$   
2. Vakzinierung: keine Daten verfügbar  
3. Vakzinierung:  $2,0 \times 10^6$   
4. Vakzinierung:  $5,5 \times 10^6$   
Klinik: Progress nach 4 Vakzinierungen

Dieser Patient mit vier Vakzinierungen zeigte nach 3. Impfung ein klar negatives Ergebnis gegen alle Impfpeptide, obwohl in der Probe vor Therapie eine schwache Reaktivität gegen RECQL detektiert werden konnte.

(a)

RCC116



(b)

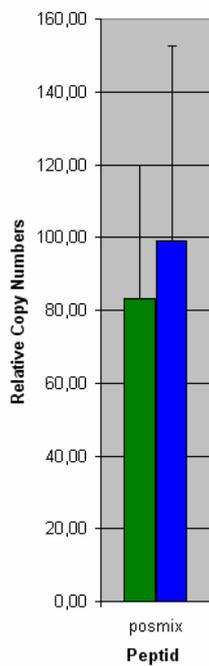


Abb. 43: Übersicht über die Messwerte der RT-PCR (in relativen Kopienzahlen normiert auf HIV) RCC116. Die relativen Kopienzahlen der Proben, die mit der viralen Positivkontrolle stimuliert wurden, waren deutlich höher als die der Peptide (a). Daher sind sie hier getrennt abgebildet (b). Die Probe vor Therapie ist grün, die nach 3. Vakzinierung blau gedruckt.

HLA	Vakzine	Sequenz	vor Th.	nach 3. Th.
A*02	MUC-1 STAP	STAPPVHNV	1,19	1,09
A*02	MUC-1 LLLL	LLLLTVLTV	1,27	
A*02	Survivin	ELTLGEFLKL	1,34	0,87
A*02	Met.	YVDPVITSI	1,36	
A*02	CYP-1	FLDPRPLTV	1,48	1,86
A*02	KPNA2	GLVPFLVSV	1,18	0,73
B*27	RECQL	NRPNLYYEV	2,86	1,06
B*27	PMAIP1	RRFGDKLNF	1,04	1,07
DR	PADRE	aKXVAAWTLKAAa	1,87	n.t.
	Positivkontrolle Pool A2		83,00	99,00
	Negativkontrolle HIV		1,00	1,00

Tab. 23: Messwerte in relativen Kopienzahlen RCC115.

Auch bei diesem Patienten war die Anzahl der Immunisierungen mit einer Mischung aus einem autologen MHC-Liganden, bekannten T-Zell-Epitopen, Liganden anderer Tumoren und einer Prädiktion sehr gering. Daher wurde auch hier nicht mit der Detektion einer induzierten Immunantwort gerechnet. Die relativen Kopienzahlen zeigen auch ein eindeutig negatives Ergebnis nach 3. Therapie. Vor Therapie konnte eine schwache Aktivität gegen RECQL beobachtet werden, die in der Probe nach 3. Vakzinierung nicht mehr messbar war. Die Immunisierung konnte also offensichtlich diese bereits bestehende Aktivität nicht verstärken.

Bei Stimulation mit der viralen Positivkontrolle zeigte sich eine starke IFN $\gamma$ -Produktion. Die relativen Kopienzahlen in beiden Proben waren nahezu konstant.

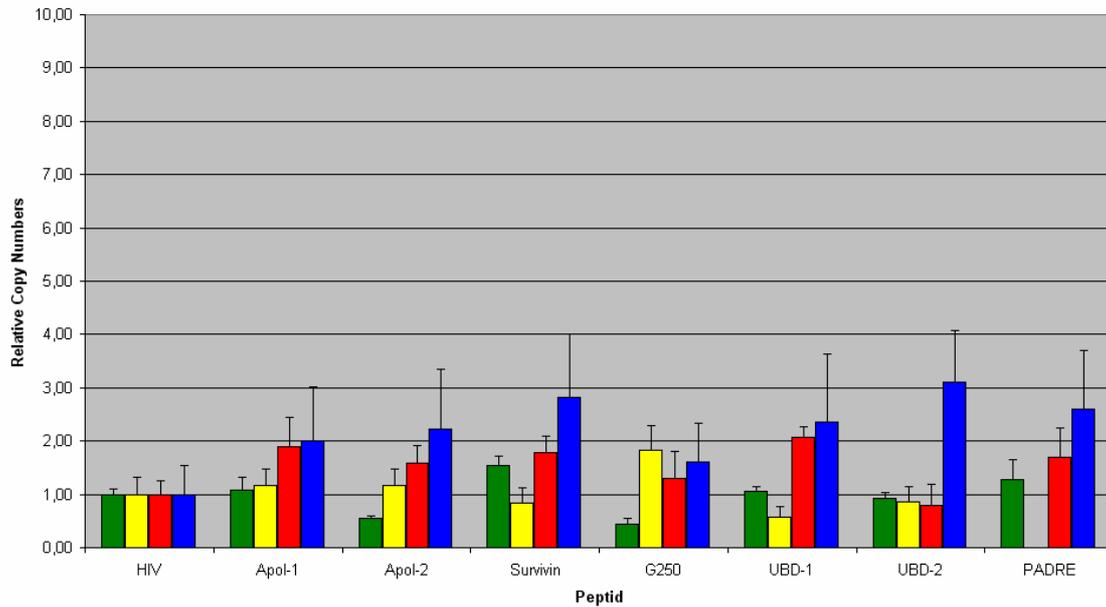


Geschlecht:	♂
Alter:	63 Jahre
Diagnose:	Klarzelliges Nierenzellcarcinom pT1b pN0 pMX G2-3
Metastasierung:	pulmonal
Anzahl der Vakzinierungen:	4
Anzahl DCs:	1. Vakzinierung: 2,2 x 10 <sup>6</sup> 2. Vakzinierung: 8,0 x 10 <sup>5</sup> 3. Vakzinierung: 2,6 x 10 <sup>6</sup> 4. Vakzinierung: 1,0 x 10 <sup>6</sup>
Klinik:	Progress der Lungenfiliae nach 4. Vakzinierung

Dieser Patient zeigte nach seiner 4. Vakzinierung eine globale Elevation der zytotoxischen T-Zell-Aktivität gegen alle Vakzinierungspeptide. Allerdings ist der Wert der Positivkontrolle auch deutlich höher als bei den Proben davor. Eine Aktivierung besonders mit einem der Impfpeptide wurde nicht nachgewiesen. Der Patient war nach 5. Vakzinierung stark progredient. Daher konnte er nicht weiter vakziniert werden.

(a)

RCC135



(b)

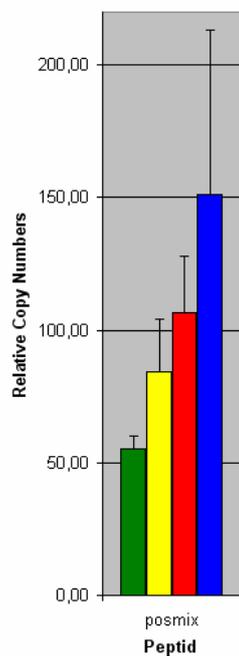


Abb. 44: Übersicht über die relativen Kopienzahlen bezogen auf HIV des Patienten RCC135. Die Säulen der Probe nach 1. Vakzinierung sind grün, nach 2. Vakzinierung gelb, nach 3. Vakzinierung rot und nach 4. Vakzinierung blau gedruckt. Da die relativen Kopienzahlen der Proben, die mit der viralen Positivkontrolle stimuliert waren (b), deutlich höher waren, als die der Proben, die mit einem der Impfpeptide stimuliert wurden (a), sind sie hier der besseren Übersichtlichkeit halber gesondert abgebildet.

HLA	Vakzine	Sequenz	nach 1. Th.	nach 2. Th.	nach 3. Th.	nach 4. Th.
A*02	Apol-1	FLGENISNFL	1,09	1,16	1,89	2,01
A*02	Apol-2	ALADGVQKV	0,54		1,58	2,23
A*02	Survivin	ELTLGEFLKL	1,54	0,84	1,78	2,82
A*02	G250	HLSTAFARV	0,45	1,83	1,29	1,61
B*51	UBD-1	NPYDSVKKI	1,05	0,58	2,08	2,35
B*51	UBD-2	DANPYDSVKKI	0,92	0,87	0,80	3,11
DR	PADRE	aKXVAAWTLKAAa	1,28	n.t.	1,69	2,61
A*02	Positivkontrolle		55,14	84,45	106,52	151,17
	Pool A2					
A*02	Negativkontrolle		1,00	1,00	1,00	1,00
	HIV					

Tab. 24: Messwerte in relativen Kopienzahlen (normiert auf HIV) RCC135.

Dieser Patient erhielt vier Vakzinierungen mit T-Zell-Epitopen, einem autologen MHC-Liganden und Liganden, die auf Tumoren anderer Patienten identifiziert wurden. Allerdings war bei diesem Patienten eine Blutprobe nach 4. Therapie verfügbar, weil es ihm sehr schlecht ging, als er die 5. Immunisierung erhalten sollte, dass er nicht vakziniert werden konnte. Beobachtet wurden in der Probe nach 4. Immunisierung zwar positive Ergebnisse. Eine erhöhte IFN $\gamma$ -Produktion war aber nicht nach Stimulation mit einem speziellen Impfpeptid zu beobachten, sondern in allen Proben. Auch war die relative Kopienzahl der Positivkontrolle deutlich höher als zu früheren Zeitpunkten. Es handelt sich also bei der letzten Probe um eine globale Aktivitätsvermehrung. Die Ergebnisse sind daher nicht als spezifisch positiv gegen die Peptide zu werten.

Die viralen Positivkontrollen brachten jeweils ein deutlich positives Ergebnis.



Geschlecht: ♂  
 Alter: 47 Jahre  
 Diagnose: Klarzelliges Nierenzellcarcinom  
 pT3b pNX pM1 G2  
 Metastasierung: pulmonal, ossär  
 Anzahl der Vakzinierungen: 4  
 Anzahl DCs: 1. Vakzinierung:  $3,8 \times 10^5$   
 2. Vakzinierung:  $8,2 \times 10^5$   
 3. Vakzinierung:  $3,0 \times 10^5$   
 4. Vakzinierung:  $7,0 \times 10^5$   
 Klinik: Progress nach 4 Vakzinierungen

Dieser Patient, der vier Vakzinierungen erhalten hat, zeigte keine Antwort auf irgendeines der Peptide, einschließlich der Positivkontrolle. Er musste ebenfalls wegen Tumorprogression aus der Studie genommen werden.

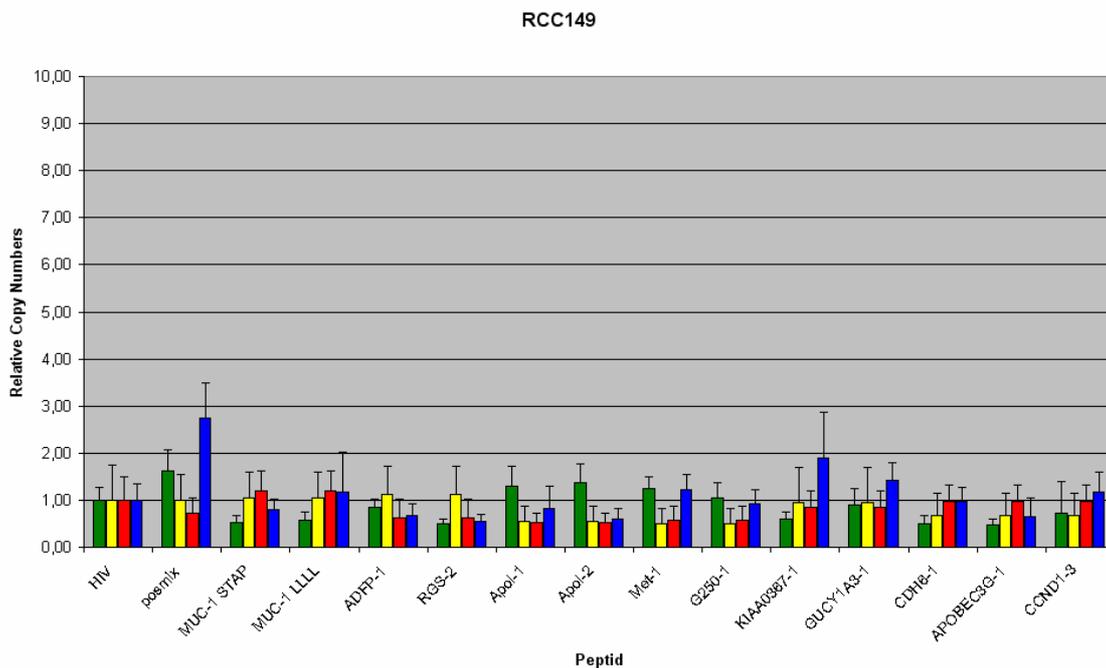


Abb. 45: RT-PCR des Patienten RCC149. Die Messwerte sind in relativen Kopienzahlen auf HIV normiert aufgetragen. Vor Therapie (grün), nach 1. Vakzinierung (gelb), nach 2. Vakzinierung (rot) und nach 3. Vakzinierung (blau).

HLA	Vakzine	Sequenz	vor Th.	nach 1. Th.	nach 2. Th.	nach 3. Th.
A*02	MUC-1 STAP	STAPPVHNV	0,53	1,04	1,19	0,80
A*02	MUC-1 LLLL	LLLLTVLTV	0,58			1,16
A*02	ADFP-1	SVASTITGV	0,84	1,11	0,63	0,67
A*02	RGS-2	LAALPHSCL	0,49			0,54
A*02	Apol-1	FLGENISNFL	1,29	0,56	0,52	0,82
A*02	Apol-2	ALADGVQKV	1,36			0,60
A*02	Met-1	YVDPVITSI	1,24	0,51	0,58	1,22
A*02	G250-1	HLSTAFARV	1,04			0,93
A*02	KIAA0367-1	ALFDGDPHL	0,59	0,96	0,85	1,90
A*02	GUCY1A3-1	SVFAGVVG	0,89			1,43
A*33	CDH6-1	DVRDFINQR	0,51	0,68	0,97	0,98
A*33	APOBEC3G-1	DTWVLLNQR	0,48			0,64
B*14	CCND1-3	DRVLRAML	0,73			1,16
DR	PADRE	aKXVAAWTLKAAa	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
A*02	Positivkontrolle		1,63	0,99	0,72	2,74
	Pool A2					
A*02	Negativkontrolle		1,00	1,00	1,00	1,00
	HIV					

Tab. 25: Messwerte in relativen Kopienzahlen RCC149. Negative Messwerte sind rot, positive grün gedruckt.

Der Patient RCC149 wurde mit Liganden, die auf Tumoren anderer Patienten identifiziert wurden, bekannten tumorspezifischen T-Zell-Epitopen und Prädiktionen immunisiert. Auch er erhielt nur vier Vakzinierungen. Eine antigenspezifische Antwort von T-Zellen wurde hier daher nicht erwartet. Der Patient zeigte auch keinerlei erhöhte  $IFN\gamma$ -Produktion im Vergleich zur Negativkontrolle nach Stimulation mit den Impfpeptiden.

Auch die Positivkontrolle zeigte – außer in der Probe nach 3. Impfung – kein positives Ergebnis. Dies könnte hier wiederum daran gelegen haben, dass der Patient CMV negativ war und daher nicht auf den potentesten Stimulus in der Positivkontrolle reagieren konnte, oder dass das Immunsystem des Patienten in irgendeiner Weise supprimiert war. Dies kann aufgrund der Ausschlusskriterien der Studie nicht auf die Einnahme immunsuppressiver Medikamente zurückgeführt werden.

### 6.1.2.13. Übersicht über die Ergebnisse:

Patient	# Impfungen	RT-PCR ex vivo	Positivkontrolle	RT-PCR prästimuliert	Positivkontrolle	Tetramer	ELISPOT
RCC68	4	negativ	negativ	negativ	negativ	n.t.	n.t.
RCC70	4	negativ	positiv	PADRE (26,54)	positiv	negativ	n.t.
RCC75	4	negativ	positiv	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
RCC98	8	RGS-5 (24,93) nach 7. Vakzinierung	positiv	n.t.	n.t.	negativ	positiv
		ADFP SLLTSSKGQLQK (3,32) nach 7. Vakzinierung					
		ADFP IARNLTQQL (5,33) nach 7. Vakzinierung					
		IBP-3 (2,09) nach 7. Vakzinierung					
		CD70 (3,62) nach 7. Vakzinierung					
		NY-CO-37 (3,05) nach 7. Vakzinierung					
RCC112	13	negativ	positiv	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
RCC115	4	negativ	positiv	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
RCC116	4	negativ	positiv	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
RCC135	4	Globale Elevation	positiv	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
RCC149	4	negativ	negativ	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.

Tab. 26: Übersicht über die Messergebnisse der RCC-Vakzinierungs-Studie. In Klammern stehen die maximalen relativen Kopienzahlen bezogen auf HIV. „n.t.“ bedeutet „Nicht getestet“.

### 6.1.3. Diskussion:

Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Messung einer Immunantwort nach Immunisierung mit Peptid-beladenen autologen dendritischen Zellen des jeweiligen Patienten. Dabei wurden autologe dendritische Zellen *in vitro* mit synthetisierten Peptiden beladen und dem Patient subkutan reinjiziert. Diese Methodik wird grundsätzlich schon seit mehreren Jahren angewendet [Paglia et al. 1996; Gilboa et al. 1998; Brossart 2002; Wiernecky et al. 2005]. Im Vergleich zu all diesen Studien wurden aber in vorliegender Untersuchung erstmals dendritische Zellen eingesetzt, die mit einer größeren Anzahl unterschiedlicher, individuell selektierter Peptide beladen wurden.

Die Selektion der Vakzinierungspeptide bediente sich dreier unterschiedlicher Quellen: Erstens HLA-Liganden, die direkt im Tumorgewebe der einzelnen Patienten gefunden wurden, beziehungsweise auch andere Peptide, die in Nierenzellcarcinomen überexprimiert sind. Zweitens bereits beschriebene T-Zell-Epitope, deren Gene in Genchipanalysen als überexprimiert detektiert wurden oder von denen bekannt ist, dass sie in Nierenzellcarcinomen in den meisten Fällen überexprimiert sind. Und drittens vorausgesagte HLA-Liganden, die anhand von Genexpressionsanalysen im Tumorgewebe der Patienten prädiktiert wurden, wenn überexprimierte Gene im Vergleich von autologem

Normal- zu autologem Tumorgewebe der jeweiligen Patienten gefunden wurden.

Im Verlauf der Studie wurde der Modus für die Beladung der dendritischen Zellen geändert. Für die Patienten RCC68, RCC70 und RCC75 wurde ein Peptidpool mit allen Impfpeptiden gebildet, bei den anderen Patienten wurden hingegen die autologen dendritischen Zellen mit zwei Peptidpools inkubiert, die abhängig von der Affinität der jeweiligen Peptide zum MHC-Molekül gebildet wurden, damit Peptide, die eine geringere Bindungsstärke haben, nicht von stärker affinen an der Bindungsstelle kompetitiv verdrängt wurden.

Die meisten Patienten zeigten keine antigenspezifische T-Zell-Aktivierung durch die Vakzinierung, das heißt, es war keine erhöhte Aktivität gegen eines der Impfpeptide detektierbar. Ein Patient (RCC98) zeigte eine deutliche Steigerung der Reaktivität, allerdings erst nach der vierten Impfung.

Die Blutproben, die hier als Probe nach einer Impfung untersucht wurden, waren immer am Tag der nächsten Impfung vor Applikation der dendritischen Zellen abgenommen worden. Dies bedeutet, dass von den Patienten, die nach vier Vakzinierungen aus der Studie genommen wurden, keine Probe nach vierter Therapie mehr abgenommen wurde. Dies war für sechs der neun untersuchten Patienten der Fall.

Zum Zeitpunkt nach 3. Therapie könnte anhand der vorliegenden Versuchsergebnisse noch keine Aktivitätsvermehrung zu erwarten sein, weil kein einziger der Patienten vorher schon eine antigenspezifische Reaktivität zeigte. Andere Studien zeigen ebenfalls, dass erst mehrere Vakzinierungen eine Antwort zu erzeugen. So beobachten einige Studien Antworten erst nach der 4. Immunisierung [Chang et al. 2005; Palucka et al. 2005].

Daher konnte man bei vorliegender Studie damit rechnen, dass durch drei Vakzinierungen noch keine messbare Immunantwort induziert werden konnte, weil die Anzahl der Immunisierungen zu gering war. Es konnte ja maximal die Probe nach dritter Vakzinierung gemessen werden. Negative Messergebnisse bedeuten hier aber nicht gleich, dass die Vakzinierung grundsätzlich keinen Erfolg zeigt, sondern lediglich, dass eine so kurze Immunisierung noch nicht den gewünschten Effekt hat, beziehungsweise eine antigenspezifische Aktivität

von T-Zellen zu diesem Zeitpunkt mit den angewandten Methoden noch nicht nachweisbar ist.

Interessant sind somit die Patienten RCC98 und RCC112, die mit mehr als vier Applikationen von dendritischen Zellen immunisiert wurden. Ihre jeweiligen Messergebnisse unterscheiden sich aber deutlich voneinander.

RCC98 zeigte eine starke, zunehmende Antwort zwischen der 4. und 7. Vakzinierung gegen HLA-Liganden, die individuell auf den Tumorzellen des Patienten gefunden wurden. Sie wurden als potentiell immunogen identifiziert und konnten in diesem Fall eine messbare Immunantwort auslösen. Diese HLA-Liganden leiteten sich ab von den Proteinen *Regulator of G-Protein Signalling* (RGS-5: GLASFKSFLK), *Adipophilin* (ADFP: SLLTSSKGQLQK und IARNLTQQL), *Insulin like Growth Factor Binding Protein* (IBP-3: RPTLWAAAL), CD70 (GPALGRSFL) und *Usher Syndrome 1c* (NY-CO-37: DEIVRINGY). Das Peptid aus IBP-3 ist ein bekanntes tumorassoziertes Antigen beim Nierenzellcarcinom, das aus NY-CO-37 beim Colorectalen Carcinom. Für die anderen Peptide ist die Tumorassoziation nicht gesichert. NY-CO-37 war beim Patienten RCC98 aber auch auf dessen Nierenzellcarcinom überexprimiert.

Über RGS-5 ist bisher nur bekannt, dass es als HLA-Ligand auf Tumorzellen vorkommen kann [Krüger et al. 2004]. Ob es sich bei diesem Peptid wirklich um ein T-Zell-Epitop handelt oder ob es tumorassoziert ist, konnte bisher nicht gezeigt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass RGS-5 GLASFKSFLK nicht nur ein HLA-Ligand ist, der auf dem Nierenzellcarcinom zweier Patienten (RCC98, RCC115) gefunden wurde, sondern dass es sich dabei wirklich um ein T-Zell-Epitop handelt. Die PBMCs zweier Patienten (RCC98, RFA048) reagierten gegen dieses Peptid. Beide zeigten eine relativ starke IFN $\gamma$ -Produktion nach Stimulation mit diesem Peptid. Dies zeigt, dass es T-Zellen gibt, die diesen Liganden erkennen können. Das spricht dafür, dass es sich bei RGS-5 GLASFKSFLK um ein T-Zell-Epitop handelt. In dieser Arbeit wird dieses Peptid erstmalig als Epitop beschrieben.

Interessant an RGS-5 ist die Frage, ob das Mutterprotein RGS tumorassoziert ist. Im Gegensatz zu vielen anderen tumorspezifischen Antigenen wird dieses nicht von der Tumorzelle selbst, sondern von Perizyten gebildet [Druey et al.

1996; Dulin et al. 1999]. Es dient dabei als Marker für die physiologische und pathologische Angiogenese [Berger et al. 2005]. RGS-5 könnte somit ein tumorassoziertes Antigen sein, das viele Tumoren exprimieren, weil es in den Zellen des Gefäßsystems vorkommt. Man würde also in Impfstudien, die sich Epitopen aus diesem Protein bedienen, die Angiogenese eines Tumors angreifen.

Interessant ist beim Patienten RCC98 zusätzlich, dass er mit sehr wenigen dendritischen Zellen vakziniert wurde und dennoch eine Immunantwort messbar war. Im Gegensatz dazu bekam RCC112 eine teilweise sehr große Anzahl von DCs (bis  $15,8 \times 10^7$ ), und es wurde keine Immunantwort gemessen. Demnach spielt die Anzahl von dendritischen Zellen offenbar eine untergeordnete Rolle im Vergleich zur Auswahl der Peptide. Auf der anderen Seite kann es auch sein, dass hier zu viele DCs gegeben wurden.

RCC112 wurde mit Prädiktionen immunisiert, das heißt, der Patient erhielt Peptide, die anhand von Genexpressionsmustern und dem HLA-Typ des Patienten als geeignet befunden wurden. Diese Genexpressionsanalyse wurde für eine Prädiktion von Peptiden genutzt. Diese Prädiktion ist möglich, weil man gewisse Muster kennt, die gebundene Peptide auf MHC-Molekülen für die Bindung haben müssen [Falk and Rotzschke 1993]. Anhand von Proteinsequenzen können über geeignete Computerprogramme potentielle MHC-Liganden vorausgesagt werden [Rammensee et al. 1999; Donnes and Elofsson 2002; Larsen et al. 2005]. Die Peptide, mit denen RCC112 immunisiert wurde, waren also weder bekannte T-Zell-Epitope, noch im dem autologen Tumorgewebe identifizierte HLA-Liganden, die auf dem Tumor des Patienten identifiziert wurden.

Nur der Patient RCC98 zeigte eine messbare Immunantwort. Bei den anderen Patienten war keine detektierbar. Dies kann verschiedene Gründe haben. Wie oben schon erwähnt, ist möglicherweise die Zahl der Immunisierungen bei den meisten Patienten zu gering. Vielleicht ist auch die applizierte Menge von dendritischen Zellen zu gering. Es könnte auch die Expression der Vakzinierungspeptide nicht suffizient genug gewesen sein. Dieses sollte mit der Bildung von Peptidpools, die nach der Affinität der einzelnen Peptide geordnet

waren, bei der Beladung von DCs behoben werden. Dies scheint bei RCC98 eine positive Wirkung gehabt zu haben. Allerdings kann keine sichere Aussage über den Effekt dieser Maßnahme getroffen werden, weil die Patienten, deren DCs mit allen Peptiden inkubiert worden waren (RCC68, RCC70, RCC75), keine Immunantwort zeigten. Sie wurden auch nur kurz vakziniert. Es ist daher nicht klar, ob sich wirklich Unterschiede zwischen beiden Maßnahmen zeigen würden.

Möglicherweise konnte auch kein T-Zell-Priming durch die Vakzinierung stattfinden, weil geeignete Adjuvantien fehlten. Allerdings zeigte RCC98 trotz fehlender Adjuvantien eine Antwort, die vor Vakzinierung nicht sichtbar war. In anderen Studien kommt als Adjuvanz IL-2 zum Einsatz [Bronte et al. 1995]. Da dies in dieser Studie ebenfalls nicht zum Einsatz kam, könnte auch eine fehlende Memory-Bildung nach Vakzinierung ein Faktor sein, warum die Immunisierung keinen Effekt zeigt. Dadurch würde eine induzierte Immunantwort nur sehr kurz stattfinden und keine längerfristige, beziehungsweise deutlich effektive Wirkung zeigen.

Keiner der Patienten zeigte unter Therapie eine dauerhafte Stabilisierung der Tumorerkrankung. Bei den Patienten, bei denen durch die Vakzinierung keine Immunantwort induziert wurde (beziehungsweise keine Immunantwort messbar war), ist dies nicht weiter überraschend. In diesem Fall ist eine Korrelation zwischen keiner Immunantwort und fehlender Regression oder Stabilisierung zu beobachten. Auf der anderen Seite hatte auch die Induktion einer Immunantwort bei RCC98 keinen deutlichen klinischen Effekt. Möglicherweise war die Immunantwort nicht stark genug, um den Tumor dauerhaft zu kontrollieren. Immerhin zeigt sich eine zeitweilige Stabilisierung.

Andere Studien beschreiben eine Korrelation zwischen T-Zell-Aktivität und klinischem Status [Chang et al. 2005; van Baren et al. 2005].

Die Gründe für die weitere Progression der Tumorerkrankung trotz Immunantwort sind wahrscheinlich vielfältig. Eine detaillierte Aufstellung der Tumor-Escape-Mechanismen findet sich in Kapitel 1.3. „Das Immunsystem bei Tumorerkrankungen“.

Der Grund, warum bei Patient RCC98 eine Antwort antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen im peripheren Blut nachweisbar ist, aber keine Tumorregression oder zumindest Stabilisierung erreicht werden konnte, ist wahrscheinlich kein einzelner der in Kapitel 1.3. genannten, sondern ein komplexes Zusammenspiel vieler dieser Faktoren.

Weitergehende Forschung sollte geeignete Adjuvantien finden, die eine Infiltration von immunkompetenten Zellen in den Tumor ermöglichen und eine stärkere Stimulation gegen die Impfpeptide bewirken. Dazu wären zum Beispiel TNFSF-14 [Yu et al. 2004] oder Glycoprotein p33 [Spiotto and Schreiber 2005] eine Option. Außerdem könnte eine größere Anzahl von MHC-II-restringierten Epitopen im Impfcocktail zum Einsatz kommen, um eine globale Stimulation von T-Zellen zu erreichen.

## **6.2. Untersuchung der Immunantwort gegen tumorassoziierte Antigene bei Krebspatienten, die mit perkutaner Radiofrequenzablation behandelt wurden<sup>6</sup>**

### **6.2.1. Studienpopulation und Zielsetzung:**

Patienten im Alter von 18 bis 79 Jahren werden in die Studie eingeschlossen, die an primären und sekundären Tumoren der Leber, Niere und Lunge erkrankt sind (sowohl Metastasen als auch Primärtumoren), die einer perkutanen Radiofrequenzablation zugänglich sind. Die Einwilligungsfähigkeit der Patienten musste gegeben sein.

Der maximale Querdurchmesser der Neoplasien musste  $\leq 5$  cm betragen. Die maximale Anzahl von Tumormanifestationen in der Leber war 5, in der Niere 3. Ausserdem musste die Diagnose eindeutig histologisch gesichert sein.

Ausschlusskriterien waren das Vorliegen einer nicht-kontrollierbaren Gerinnungsstörung, Patienten mit Tumoren, die einer Behandlung mit RF-Ablation nicht zugänglich waren, Minderjährigkeit oder fehlende Zustimmungsfähigkeit der Patienten und Kriterien, die eine Untersuchung im MRT unmöglich machen (zum Beispiel Herzschrittmacher, künstliche Herzklappen, Metallclips, Unverträglichkeiten von MRT-Kontrastmittel (Gadolinium-Unverträglichkeit), Klaustrophobie, etc.).

Während der Behandlung wurden die Patienten mit 50-150 mg Dolantin und 2-5 mg Dormicum analgosediert. Bei Bedarf wurden weitere Analgetika gegeben. Eine Allgemeinanästhesie war unter Umständen ebenfalls möglich.

Von den Patienten wurde am selben Tag vor der Behandlung, einen Tag (ca. 24 Stunden) nach RF-Ablation, einen Monat später und im weiteren Verlauf alle drei Monate bei routinemäßigen Kontrolluntersuchungen jeweils eine Probe für die Isolierung von Lymphozyten und eine Serumprobe abgenommen.

Für die Studienteilnahme war jeweils eine zusätzliche Blutabnahme von 36 ml erforderlich, die zu Untersuchungszwecken an die Abteilung für Immunologie anonymisiert weitergegeben wurde. Da für die Therapie und die Kontrolle zur

---

<sup>6</sup> Projekt-Nr. 297/2002, 242/2003, 284/2003 und 169/2005V, vorgelegt bei der Ethikkommission an der Medizinischen Fakultät und am Universitätsklinikum der Eberhard Karls-Universität Tübingen

Sicherheit eine Verweilkanüle gelegt wird, war für die Patienten für die Studie eine zusätzliche Abnahme nicht erforderlich.

Auf Thrombozyten der Patienten wurde eine HLA-Typisierung auf HLA-A2 und HLA-A3 durchgeführt. Für manche Patienten, die in der Abteilung für Immunologie auf HLA-A2 negativ getestet wurden, wurde die HLA-Bestimmung durch die Abteilung für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Tübingen mittels PCR durchgeführt. Dabei wurde auch eine Klasse-II-Typisierung durchgeführt.

### **6.2.2. Übersicht über die Studie:**

Seit Februar 2002 wurden Blutproben von den Patienten für diese Studie akquiriert. Damit ergibt sich ein Follow Up der Patienten von bis zu 42 Monaten.

Bis August 2005 wurden in die Studie 91 Patienten aufgenommen.

Die Patienten litten an folgenden Tumoren:

Colorectales Carcinom (CRC)	n = 39
	RFA003, RFA004, RFA005, RFA007, RFA009, RFA010, RFA011, RFA014, RFA015, RFA019, RFA020, RFA021, RFA023, RFA024, RFA026, RFA027, RFA033, RFA034, RFA035, RFA037, RFA045, RFA046, RFA047, RFA050, RFA051, RFA053, RFA057, RFA064, RFA068, RFA070, RFA073, RFA076, RFA079, RFA080, RFA082, RFA083, RFA086, RFA087, RFA092
Hepatozelluläres Carcinom (HCC)	n = 18
	RFA012, RFA022, RFA031, RFA040, RFA041, RFA044, RFA052, RFA054, RFA055, RFA060, RFA066, RFA067, RFA071, RFA074, RFA081, RFA090, RFA091, RFA093

Nierenzellcarcinom (RCC)	n = 14	RFA002, RFA016, RFA025, RFA028, RFA030, RFA032, RFA036, RFA039, RFA048, RFA056, RFA059, RFA062, RFA063, RFA065
Mammacarcinom (BRC)	n = 5	RFA001, RFA006, RFA029, RFA049, RFA058
Melanom	n = 5	RFA038, RFA069, RFA075, RFA085, RFA089
Sarkome	n = 3	RFA061, RFA077, RFA088
Bronchialcarcinom	n = 2	RFA013, RFA084
Neuroendokrine Carcinome	n = 2	RFA042, RFA078
Pankreascarcinom	n = 1	RFA018
Nebennierencarcinom	n = 1	RFA043
Gallenblasencarcinom	n = 1	RFA072

Die Patienten wurden an drei verschiedenen Organen behandelt: Leber, Lunge und Niere.

Leber	n = 70	(davon Primärtumoren n = 18, Metastasen n = 52)
Niere	n = 13	(davon Primärtumoren n = 13, Metastasen n = 0)
Lunge	n = 8	(davon Primärtumoren n = 3, Metastasen n = 5)

Für die Untersuchung antigenspezifischer T-Zellen wurden zuerst nur HLA-A2+ Spender ausgewählt, später auch HLA-A3+ Spender, die an einem Nierenzellcarcinom litten.

Für die Bestimmung von Hitzeschockproteinen und Harnsäure im Serum wurden Patienten ausgewählt, bei denen Proben vom Tag der RF-Ablation und 24 Stunden nach Behandlung verfügbar waren.

Zu den Ergebnissen der HLA-Typisierung der Patienten und die Zahlen der verschiedenen HLA-Typen der Patienten siehe Kapitel 6.2.4.1. „HLA-Typisierung“.

Eine Übersicht der untersuchten Patienten findet sich am Anfang des jeweiligen Ergebnisteils.

### **6.2.3. Kontrollgruppen:**

Als Kontrollgruppen für die Bestimmung inflammatorischer Parameter im Serum nach Radiofrequenzablation wurden drei Kontrollgruppen untersucht:

1. Patienten, deren Gallenblase laparoskopisch entfernt wurde (Kontrollgruppe CO). Die laparoskopischen Cholezystektomien fanden unter Allgemeinanästhesie statt. Hier handelte es sich wie bei der RF-Ablation um einen minimal invasiven Eingriff. Die Vergleichbarkeit dieser beiden Gruppen war allerdings eingeschränkt.
2. Patienten, deren Leber biopsiert wurde (Kontrollgruppe LB). Es handelte sich hierbei nicht nur um Tumorpatienten, sondern auch um Patienten, die mit Verdacht auf Infektionen (HBV, HCV), Leberzirrhosen, Fettlebern oder anderen Gründen biopsiert wurden. Diese zweite Kontrollgruppe war mit den RFA-Patienten direkt vergleichbar, weil der einzige Unterschied zwischen den beiden Prozeduren der Einsatz von Radiofrequenzenergie war. Hier war auch die Anästhesieform gleich. Sowohl die Radiofrequenzablation als auch die Leberbiopsien wurden im Allgemeinen unter lokaler Betäubung durchgeführt.
3. Eine Gruppe mit gesunden freiwilligen Spendern aus dem Labor, die keine Behandlung in irgendeiner Form erhalten hatten (Kontrollgruppe

HD). Für diese Kontrollgruppe wurde den Spendern an fünf konsekutiven Tagen Blut abgenommen.

Von den Patienten der Gruppen 1 und 2 wurden Serumproben am Tag vor dem Eingriff und am nächsten Tag angenommen. Dies war vergleichbar mit dem Abnahmeschema bei den mit Radiofrequenzablation behandelten Patienten.

## 6.2.4. Ergebnisse:

### 6.2.4.1. HLA-Typisierung:

Für jeden neuen Patienten wurde eine HLA-Typisierung auf Thrombozyten für HLA-A2 und HLA-A3 durchgeführt. In der nächsten Blutprobe wurden die Ergebnisse durch eine weitere Färbung bestätigt.

Als Beispiel werden hier zwei Spender gezeigt. Zum einen ein gesunder Laborspender, der HLA-A2 und HLA-A3 positiv ist, zum anderen ein Patient der RFA-Studie, der HLA-A2 und HLA-A3 negativ ist.

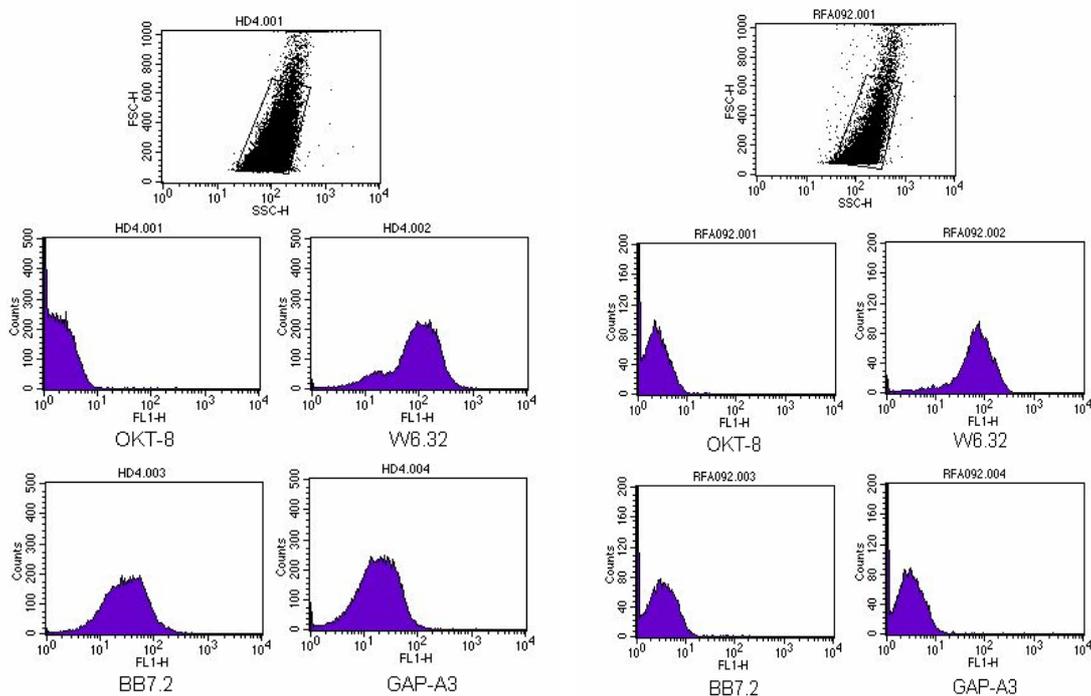


Abb. 46a: HLA-Färbung mit Antikörpern und GAM-FITC (Kanal FL1) eines gesunden Spenders (HD4) aus dem Labor. Der Spender ist HLA-A2<sup>+</sup> und HLA-A3<sup>+</sup>.

Abb. 46b: HLA-Färbung mit Antikörper und GAM-FITC (Kanal FL1) des Patienten RFA092. Der Patient ist HLA-A2<sup>-</sup> und HLA-A3<sup>-</sup>.

Im Rahmen dieser Studie wurden bei 91 Patienten HLA-Typisierungen auf Thrombozyten vorgenommen. Untersucht wurde auf HLA-A2- und HLA-A3-Expression.

Die Ergebnisse der Typisierungen waren wie folgt:

HLA-A2+A3-            n = 29  
RFA001, RFA009, RFA012, RFA013, RFA015, RFA016,  
RFA022, RFA024, RFA026, RFA031, RFA042, RFA043,

RFA046, RFA047, RFA055, RFA056, RFA061, RFA064,  
RFA067, RFA068, RFA073, RFA074, RFA076, RFA078,  
RFA084, RFA085, RFA089, RFA091, RFA093

HLA-A2+A3+

n = 7

RFA004, RFA027, RFA029, RFA054, RFA063, RFA066,  
RFA080

HLA-A2-A3+

n = 22

RFA002, RFA005, RFA010, RFA014, RFA023, RFA025,  
RFA034, RFA037, RFA038, RFA044, RFA048, RFA050,  
RFA053, RFA058, RFA059, RFA069, RFA070, RFA075,  
RFA081, RFA086, RFA088, RFA090

HLA-A2-A3-

n = 33

RFA003, RFA006, RFA007, RFA011, RFA018, RFA019,  
RFA020, RFA021, RFA028, RFA030, RFA032, RFA033,  
RFA035, RFA036, RFA039, RFA040, RFA041, RFA045,  
RFA049, RFA051, RFA052, RFA057, RFA060, RFA062,  
RFA065, RFA071, RFA072, RFA077, RFA079, RFA082,  
RFA083, RFA087, RFA092

## **6.2.4.2. Untersuchung antigenspezifischer T-Zellen:**

### **6.2.4.2.1. Zielsetzung:**

Im Tiermodell wurde gezeigt, dass durch Radiofrequenzablation tumorspezifische T-Zellen aktiviert werden [Wissniowski et al. 2003]. Bei anderen Thermoverfahren wie der Cryoablation sind ebenfalls spezifische Immunantworten beschrieben worden [Sabel et al. 2005]. Ziel unserer Studie war es herauszufinden, ob in Patienten, die mit Radiofrequenzablation als Thermoverfahren behandelt wurden, ebenfalls eine spezifische Immunantwort gegen den Tumor stimuliert werden kann.

Eine individuelle Analyse der Tumoren war nicht möglich, weil kein Tumorgewebe zur Verfügung stand. Daher musste auf T-Zell-Epitope zur Untersuchung zurückgegriffen werden, die in den verschiedenen Tumoren zumeist überexprimiert sind oder tumorspezifisch vorkommen (eine detaillierte Auflistung der eingesetzten Peptide und die Expressionsdaten in verschiedenen Tumoren finden sich in Kapitel 6.2.4.2.3.).

Bei vielen Patienten wurden einige Peptide zur Stimulation gepoolt. Die Pools wurden hier nach ihren Mutterproteinen zusammengestellt.

#### 6.2.4.2.2. Übersicht über die Patienten:

<b>Patient</b>	<b>HLA</b>	<b>Primärtumor</b>	<b>Metastasen</b>	<b>Behandeltes Organ</b>
RFA001	HLA-A2	Mammacarcinom	Leber	Leber
RFA009	HLA-A2	Colorectales Carcinom	Leber	Leber
RFA012	HLA-A2	Hepatozelluläres Carcinom	---	Leber
RFA015	HLA-A2	Colorectales Carcinom	Leber	Leber
RFA016	HLA-A2	Nierenzellcarcinom	---	Niere
RFA022	HLA-A2	Hepatozelluläres Carcinom	---	Leber
RFA024	HLA-A2	Colorectales Carcinom	Leber	Leber
RFA025	HLA-A3	Nierenzellcarcinom	---	Niere
RFA026	HLA-A2	Colorectales Carcinom	Leber	Leber
RFA027	HLA-A2	Colorectales Carcinom	Leber	Leber
RFA031	HLA-A2	Hepatozelluläres Carcinom	---	Leber
RFA046	HLA-A2	Colorectales Carcinom	Leber	Leber
RFA047	HLA-A2	Colorectales Carcinom	Leber	Leber
RFA048	HLA-A3	Nierenzellcarcinom	---	Niere
RFA054	HLA-A2	Hepatozelluläres Carcinom	---	Leber

Tab. 27: Übersicht über die im Rahmen der Untersuchung antigenspezifischer T-Zellen untersuchten Patienten.

### 6.2.4.2.3. Übersicht der verwendeten Peptide

Colorectales Carcinom:								
Peptid	Quelle	Funktion	Position	Res.	Sequenz	Referenz Ligand	Referenz Epitop	Tumor Assoziation
MUC-1 STAP	Mucin-1 (VNTR)	Membranboundenes, glycosyliertes	950-958	A2	STAPPVHNV		Brossart et al. 1999	bekannt
MUC-1 LLLL	Mucin-1 (VNTR)	Phosphoprotein auf der Oberfläche	12-20	A2	LLLLTLTV		Brossart et al. 1999	bekannt
		vieler Epithelzellen. Protektive Funktion wegen Bindung an Pathogene und Funktionen in der Signaltransduktion der Zellen. Überexpression, intrazelluläre Lokalisation und Veränderungen in der Glykosylierung sind mit Carcinomen assoziiert [Gendler et al. 1988]. Mucin-1 Expression kann durch dendritische Zellen auf T-Zellen induziert werden [Yasir et al. 2005].						
Survivin	Survivin	Verhinderung der Apoptose, die durch IL-3 vermittelt wird. Survivin wird in soliden Tumoren und Lymphomen gefunden [Ambrosini et al. 1997].	94-103	A2	ELTLGEFLKL		Schmitz et al. 2000	bekannt
CEA-CAP	Carcinoembryonales Antigen	Mögliche Funktionen: Zelladhäsion, Signaltransduktion oder Regulation der	571-579	A2	YLSGANLNL		Tsang et al. 1995	bekannt
CEA-MS	Carcinoembryonales Antigen	Signaltransduktion in Assoziation mit anderen Vertretern dieser Gruppe [Hammarstrom 1999].	694-702	A2	GVLVGVALI	Schittle et al. 2000		
Her2/neu	Her2/neu	Humaner Tyrosinkinase-Rezeptor	633-641	A2	IISAVVGIL		Peiper et al. 1997	bekannt
Her2/neu	Her2/neu	Humaner Tyrosinkinase-Rezeptor	348-356	A2	KIFGSLAFL		Fisk et al. 1995	bekannt
Telomerase	Telomerase	Verlängerung des Telomers auf	540-548	A2	ILAKFLHWL		Vonderheide et al. 1999	bekannt
Telomerase	Telomerase	den Chromosomen	548-556	A2	LMSYVYVEL			bekannt

<b>Nierenzellcarcinom:</b>									
Peptid	Quelle	Funktion	Position	Res.	Sequenz	Referenz Ligand	Referenz Epitop		
Survivin	Survivin	Verhinderung der Apoptose, die durch IL-3 vermittelt wird. Survivin wird in soliden Tumoren und Lymphomen gefunden [Ambrosini et al. 1997].	94-103	A2	ELTLGEFLKL		Schmitz et al. 2000		bekannt
Met.	Met protoonkogen	Tyrosin-Kinase-Familie von Rezeptoren für Wachstumsfaktoren (Met protoonkogen zeigt Charakteristika dieser Gruppe) [Park et al. 1987].	654-662	A2	YVDPVITSI	Weinschenk et al. 2002			bekannt
G250	G250	Reversible Hydratation von Carbondioxid. Mögliche Beteiligung an der Kontrolle von Zellproliferation und Transformation.	254-262	A2	HLSTAFARV		Visser et al. 1999		bekannt
Adipophilin	adipose differentiation-related protein	Neuer biologischer Tumormarker für Neoplasien der Cervix uteri [Pastorek et al. 1994].							
		Wird in Muttermilch sezerniert als Bestandteil der Membranen der Lipidkapseln in der Milch [Heid et al. 1996].	129-137	A2	SVASTITGV	Weinschenk et al. 2002			unbekannt
CCND1	Cyclin D1	Regulator von CDK-Kinasen und damit Koordination jeder Mitose.	228-236	A2	RLTRFLSRV		Sadownikova et al. 1998		bekannt
CCND1	Cyclin D1	Cyclin D1 bildet einen Komplex mit CDK4 und CDK6 und fungiert als regulatorische Untereinheit [Hirai et al. 1995]. Dieser Komplex wird für den Übergang von der G1- in die S-Phase im Zellzyklus benötigt. Zusätzlich interagiert Cyclin D1 mit dem Tumorsuppressorgen Rb [Dowdy et al. 1993]. Die Expression von Cyclin D1 wird durch Rb positiv beeinflusst. Mutationen, Amplifikation und Überexpression des Cyclin D1-Gens werden in vielen Tumoren beobachtet [Bergsagel et al. 2005].	101-109	A2	LLGATCMFV		Sadownikova et al. 1998		bekannt

MUC-1 STAP	Mucin-1 (VNTR)	Membrangebundenes, glycosyliertes Phosphoprotein auf der Oberfläche vieler Epithelzellen. Protektive Funktion wegen Bindung an Pathogene und Funktionen in der Signaltransduktion der Zellen. Überexpression, intrazelluläre Lokalisation und Veränderungen in der Glykosylierung sind mit Carcinomen assoziiert [Gendler et al. 1988]. Mucin-1 Expression kann durch dendritische Zellen auf T-Zellen induziert werden [Vaasir et al. 2005].	950-958 12-20	A2 A2	STAPPVHNV LLLLTVLV	Brossart et al. 1999 Brossart et al. 1999	bekannt
PRAME	PRAME gene product	unbekannt	425-433	A2	SLLQLHLGL	Kessler et al. 2001	bekannt
ADFP-2	adipose differentiation-related protein	Wird in Muttermilch sezerniert als Bestandteil der Membranen der Lipidkapseln in der Milch [Heid et al. 1996].	369-380	A3	SLLTSSKGLQIK	Krüger et al. 2004	unbekannt
ADFP-3	adipose differentiation-related protein		63-71	A3	TSALPIIQIK	Krüger et al. 2004	unbekannt
MMP7	Matrix Metalloprotease	unbekannt	79-90	A3	SLFPNSPKWTSK	Krüger et al. 2004	unbekannt
RGS-5	Regulator of G-Protein signalling	Downregulation von heterotrimeren G-Proteinen durch Erhöhung der GTPase-Aktivität der $\alpha$ -Untereinheit [Dulin et al. 1999]. Dadurch Überführen der G-Proteine in ihre inaktive GDP-gebundene Form. Downregulation der G-Protein-vermittelten Ausschüttung von Inositol Phosphaten und Inhibition von MAP Kinasen [Druey et al. 1996].	74-83	A3	GLASFKSFVK	Krüger et al. 2004	unbekannt

<b>Mammacarcinom:</b>									
Peptid	Quelle	Funktion	Position	Res.	Sequenz	Referenz Ligand	Referenz Epitop		
NY-ESO-1	Cancer Testis Antigen NY-ESO-1	unbekannt	157-167	A2	LMWITQCFL		Jäger et al. 1998		bekannt
MAGE-1	Melanoma associated gene product	unbekannt	278-286	A2	KLEYYVIV		Pascolo et al. 2001		bekannt
MUC-1 STAP	Mucin-1 (VNTR)	Membran gebundenes, glycosyliertes Phosphoprotein auf der Oberfläche vieler Epithelzellen. Protektive Funktion wegen Bindung an Pathogene und Funktionen in der Signaltransduktion der Zellen. Überexpression, intrazelluläre Lokalisation und Veränderungen in der Glykosylierung sind mit Carcinomen assoziiert [Gendler et al. 1988]. Mucin-1 Expression kann durch dendritische Zellen auf T-Zellen induziert werden [Vasir et al. 2005].	950-958	A2	STAPPVHNV		Brossart et al. 1999		bekannt
MUC-1 LLLL	Mucin-1 (VNTR)		12-20	A2	LLLLTVLV		Brossart et al. 1999		bekannt
CEA-CAP	Carcinoembryonales Antigen	Mögliche Funktionen: Zelladhäsion, Signaltransduktion oder Regulation der Signaltransduktion in Assoziation mit anderen Vertretern dieser Gruppe [Hammarstrom 1999].	571-579	A2	YLSGANLNL		Tsang et al. 1995		bekannt
CEA-MS	Carcinoembryonales Antigen		694-702	A2	GVLVGVALL	Schirle et al. 2000			bekannt
Her2/neu	Her2/neu	Humaner Tyrosinkinase-Rezeptor	633-641	A2	IISAVVIGIL		Peiper et al. 1997		bekannt
Her2/neu	Her2/neu	Humaner Tyrosinkinase-Rezeptor	348-356	A2	KIFGSLAFL		Fisk et al. 1995		bekannt
Survivin	Survivin	Verhinderung der Apoptose, die durch IL-3 vermittelt wird. Survivin wird in soliden Tumoren und Lymphomen gefunden [Ambrosini et al. 1997].	94-103	A2	ELTLGEFLKL		Schmitz et al. 2000		bekannt
KIAA002	KIAA002	Minor Histocompatibility Antigen. Wird durch Hepatitis B Virus X-Antigen transaktiviert [Warren et al. 2002].	110-118	A2	ALLELAEEEL				unbekannt
KIAA002	KIAA002		296-304	A2	KVADMALHY				unbekannt
KIAA002	KIAA002		509-518	A2	KLATNAAYTV				unbekannt
KIAA002	KIAA002		500-508	A2	TYLGKYWAI				unbekannt

Hepatozelluläres Carcinom:									
Peptid	Quelle	Funktion	Position	Res.	Sequenz	Referenz Ligand	Referenz Epitop		
MUC-1 STAP	Mucin-1 (VNTR)	Membrangebundenes, glycosyliertes Phosphoprotein auf der Oberfläche vieler Epithelzellen. Protektive Funktion wegen Bindung an Pathogene und Funktionen in der Signaltransduktion der Zellen. Überexpression, intrazelluläre Lokalisation und Veränderungen in der Glykosylierung sind mit Carcinomen assoziiert [Gendler et al. 1988]. Mucin-1 Expression kann durch dendritische Zellen auf T-Zellen induziert werden [Vasir et al. 2005].	950-968 12-20	A2 A2	STAPPVHNV LLLLTVLTV		Brossart et al. 1999 Brossart et al. 1999	bekannt bekannt	
MAGE-1	MAGE-A1	unbekannt	278-286	A2	KLLEYVIKV		Pascolo et al. 2001	bekannt	
Survivin	Survivin	Verhinderung der Apoptose, die durch IL-3 vermittelt wird. Survivin wird in soliden Tumoren und Lymphomen gefunden [Ambrosini et al. 1997].	94-103	A2	ELTLGEFLKL		Schmitz et al. 2000	bekannt	
Keratin-18	KRT (Cytokeratin-18)	Strukturprotein. Einer der häufigsten Vertreter der Intermediärfilamente. Expression auf einschichtigem Epithel. Marker für Lebererkrankungen [Schutte et al. 2004].	365-373	A2	ALLNIKVKL	Weinschenk et al. 2002		unbekannt	
Met.	Met protoonkogen	Tyrosin-Kinase-Familie von Rezeptoren für Wachstumsfaktoren (Met protoonkogen zeigt Charakteristika dieser Gruppe) [Park et al. 1987].	654-662	A2	YVDPVITSI	Weinschenk et al. 2002		bekannt	
CEA-CAP	Carcinoembryonales Antigen	Mögliche Funktionen: Zelladhäsion, Signaltransduktion oder Regulation der Signaltransduktion in Assoziation mit anderen Vertretern dieser Gruppe [Hammarstrom 1999].	571-579 694-702	A2 A2	YLSGANLNL GLVGYVALI		Tsang et al. 1995	bekannt bekannt	
Telomerase	Telomerase	Verlängerung des Telomers auf den Chromosomen	540-548 548-556	A2 A2	ILAKFLHWL LMSVYVVEL		Vonderheide et al. 1999	bekannt bekannt	
HCV PolG	HCV-1 NS1	Hepatitis C Virus	1406-1415	A2	KLVALGINAV		Cerny et al. 1995	bekannt	
HCV NS1	HCV-1 NS1	Hepatitis C Virus	18-28	A2	SLLAPGAKQNV		Shirai et al. 1995	bekannt	
HCV Core	HCV-1 MP	Hepatitis C Virus	132-140	A2	DLMGYIPLV		Shirai et al. 1994	bekannt	
AFP 137	Alpha Fetoprotein	Mitglied der Albumin-Protein Familie,	137-145	A2	PLFGVPEPV			bekannt	
AFP 158	Alpha Fetoprotein	Serumprotein für den Transport von	158-166	A2	FMNKFIYEI			bekannt	
AFP 325	Alpha Fetoprotein	Bilirubin, Fettsäuren, Steroiden,	325-334	A2	GLSPNLNRFL			bekannt	
AFP 542	Alpha Fetoprotein	Schwermetallen, Hormonen und Medikamenten [Mizejewski 2001]. Tumormarker.	542-550	A2	GVALQTMKQ		Butterfield et al. 1999	bekannt	



#### **6.2.4.2.4. Positiv- und Negativkontrollen:**

Als Negativkontrolle wurde ein Epitop aus der reversen Transkriptase von HIV verwendet. Es wurde angenommen, dass die Patienten in der Studie HIV-seronegativ waren. Daher wurde keine Antwort gegen diese HIV-Epitop erwartet. Da es sich bei diesem Peptid ebenfalls um ein virales Epitop handelt, konnte es im Vergleich zur Positivkontrolle, für die eine Mischung verschiedener viraler Epitope verwendet wurde, eingesetzt werden. Die Peptidpools der Kontrollen entsprachen denen, die im anderen Teil dieser Arbeit, der Vakzinierung mit peptidbeladenen dendritischen Zellen, zur Anwendung kamen. Als Positivkontrolle wurde eine Mischung viraler Epitope aus EBV, CMV und Influenza Matrix verwendet. Da die meisten Menschen in ihrem Leben mit einem oder mehreren dieser Viren in Kontakt kommen, war davon auszugehen, dass sie eine Antwort gegen mindestens eines der Epitope in dieser Mischung zeigen würden.

Als positives Ergebnis wurde gewertet, wenn die Aktivität einer Probe um 100% höher war als die der Negativkontrolle. Das heißt, eine relative Kopienzahl von größer als 2 wurde als positiv gewertet.

In den Ergebnissen werden Namen für die Peptid-Pools der Positivkontrollen verwendet:

Pool A2	CMV, Influenza-Matrix, EBNA6-EBV, LMP2-EBV und IE63-EBV
Pool A3	NP Matrix (Influenza) und EBNA-3

#### **6.2.4.2.5. Anmerkung zur Beschriftung:**

Wenn ein Patient mehr als einmal mit Radiofrequenzablation behandelt wurde, werden die Angaben der Zeitpunkte nach RF-Ablation nicht ausgeschrieben, sondern folgende Abkürzungen verwendet:

W für „Wochen nach RF-Ablation“

M für „Monate nach RF-Ablation“

d0 für Tag 0, das heißt der Tag der RF-Ablation vor Behandlung

d1 für Tag 1, das heißt 24 Stunden nach RF-Ablation

Ist eine Probe also einen Monat nach 2. RF-Ablation und 17 Monate nach 1. RF-Ablation abgenommen, ist die Beschriftung wie folgt: 17M/1M. Wenn ein Patient nur einmal mit RF-Ablation behandelt wurde, wird „Monate“ ausgeschrieben.

#### 6.2.4.2.6. RFA001:

Geschlecht: ♀  
Alter: 56 Jahre  
(bei Eintritt in die Studie)  
Primärtumor: Mammacarcinom, pT3 N1bIV M0  
Metastasierung: hepatisch  
Behandeltes Organ: Leber  
Anzahl RFAs: 2 (Intervall 9 Monate)  
Getestete Proben: vor 2. RF-Ablation (9M/d0)  
nach RF-Ablation: 9M/2W, 16M/7M, 18M/9M,  
21M/12M, 34M/25M, 38M/29M  
Tests: Quantitative IFN $\gamma$ -RT-PCR mit selektierten Peptiden  
nach einer Woche Prästimulation in Multiplex-PCR  
und getrenntem Setup  
Prästimationsassay mit vorhergesagten Peptiden  
nach Ergebnissen der SADA-Analyse  
Chemotherapie: 5 Jahre vor RF-Ablation: 3 Zyklen  
Taxotere/Adriamycin  
4 Jahre vor RF-Ablation: Hochdosis-Chemotherapie  
nach dem VIC-Protokoll mit Transplantation  
autologer peripherer Blustammzellen  
ab 3 Monate nach RF-Ablation: Capecitabin (Xeloda)  
5 Monate bis 9 Monate nach RF-Ablation: 4 Zyklen  
Capecitabin (Xeloda) in reduzierter Dosis  
16 Monate bis 20 Monate nach RF-Ablation: 5 Zyklen  
Mitoxantron  
22 Monate bis 32 Monate nach RF-Ablation: 15  
Zyklen Paclitaxel/Gemcitabine  
Besonderheiten: Antikörperproduktion nach RF-Ablation  
Andere Tests innerhalb dieser Studie: SADA-Analyse (durch Dr. D. Jäger,  
Zürich)

Follow-up nach erster RF-Ablation: 33 Monate (Exitus letalis 42 Monate nach 1. RF-Ablation)

PBMCs dieser Patientin wurden eine Woche mit Peptiden und Interleukinen prästimuliert. Nach RNA-Extraktion wurde zuerst in Multiplex-PCR gemessen. Die relativen Kopienzahlen bezogen auf HIV sprachen für keine Aktivierung antigenspezifischer T-Zellen.

HLA	Peptid	Sequenz	vor RFA	2W	7M
A*0201	NY-ESO-1	LMWITQCFL	0,44	0,66	0,75
A*0201	MAGE-1	KLLEYVIKV	0,43	0,44	0,63
A*0201	MUC-1 STAP	STAPPVHNV	0,50	0,48	2,20
A*0201	MUC-1 LLLL	LLLLTVLTV			1,13
A*0201	CEA-CAP	YLSGANLNL	0,53	1,29	1,01
A*0201	CEA-MS	GVLVGVALI			0,62
A*0201	Her2/neu	IISAVVGIL	0,83	1,09	0,77
A*0201	Her2/neu	KIFGSLAFL			0,64
A*0201	Survivin	ELTLGEFLKL	n.t.	n.t.	2,11
A*0201	Positivkontrolle Pool A2		0,90	0,73	0,83
A*0201	Negativkontrolle HIV		1,00	1,00	1,00

HLA	Peptid	Sequenz	9M	12M
A*0201	NY-ESO-1	LMWITQCFL	0,81	0,78
A*0201	MAGE-1	KLLEYVIKV	0,80	1,04
A*0201	MUC-1 STAP	STAPPVHNV	0,56	1,48
A*0201	MUC-1 LLLL	LLLLTVLTV		
A*0201	CEA-CAP	YLSGANLNL	0,53	1,01
A*0201	CEA-MS	GVLVGVALI		
A*0201	Her2/neu	IISAVVGIL	0,58	0,65
A*0201	Her2/neu	KIFGSLAFL		
A*0201	Survivin	ELTLGEFLKL	n.t.	n.t.
A*0201	Positivkontrolle Pool A2		2,47	4,59
A*0201	Negativkontrolle HIV		1,00	1,00

Tab. 28: Messwerte RFA001 in relativen Kopienzahlen normiert auf HIV. Negative Messwerte sind rot, positive grün gedruckt.

Aufgrund der Probleme mit dem Messverfahren in Multiplex-PCR wurden die cDNA-Proben erneut getrennt für CD8 und IFN $\gamma$  gemessen. Im Gegensatz zur

Multiplex-PCR konnten hier positive Messergebnisse für die Positivkontrolle gemessen werden. Die relativen Kopienzahlen für die Proben, die mit Peptiden stimuliert worden waren, waren aber auch in diesem Fall nicht höher als die bei Stimulation mit der Negativkontrolle. In den mit Peptiden stimulierten Proben wurde also auch hier keine spezifische T-Zell-Aktivität detektiert.

Von dieser Patientin wurden Serumproben im Labor von Dr. Dirk Jäger in Zürich mittels SADA-Analyse auf Antikörper untersucht. Dabei wurde eine

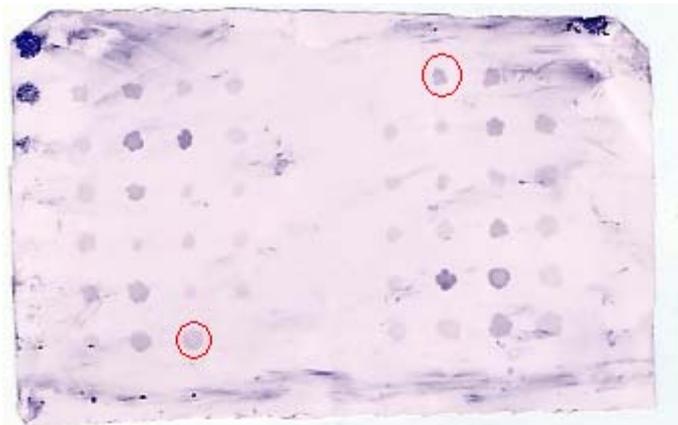


Abb. 47: SADA-Analyse der Serumproben von RFA001. Die Membranen sind spiegelbildlich um den Mittelpunkt angeordnet. Die rot umkreisten Punkte markieren NY-REN [Scanlan et al. 1999]. Im linken Teil die Probe 7 Monate, rechts die Probe 14 Monate nach RF-Ablation. Die Intensität der Dots steht für die Antikörper-Aktivität. Eine ebenfalls untersuchte Probe vor RF-Ablation zeigte ein gleichwertiges Ergebnis wie die Probe nach 7 Monaten (Abbildung nicht gezeigt).

© Dr. Dirk Jäger, Zürich

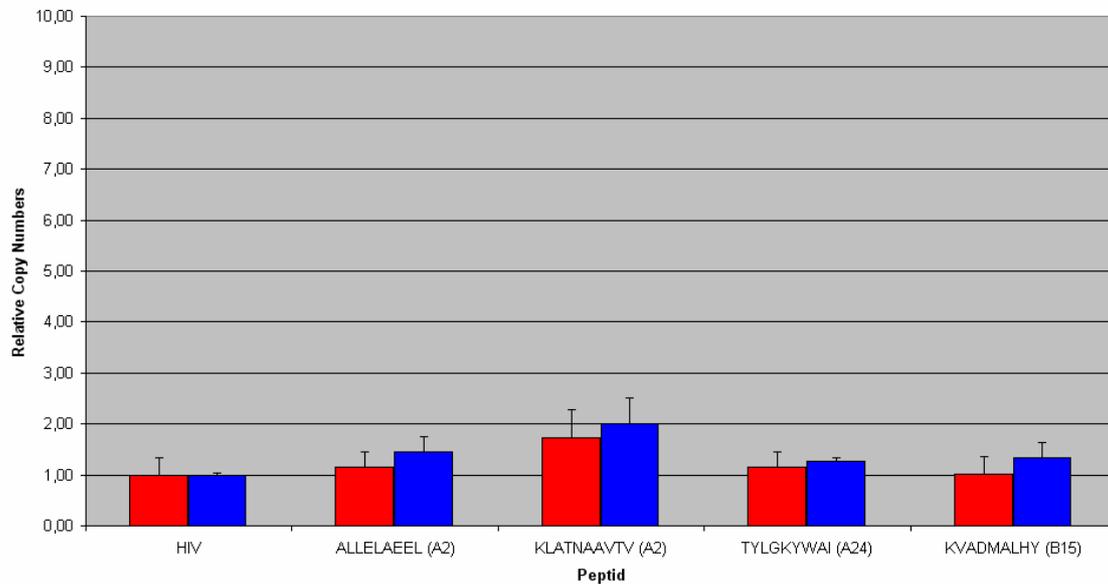
grenzwertig erhöhte Reaktivität nach Radiofrequenzablation gegen KIAA002 (NY-REN-15) detektiert.

Über SYFPEITHI wurden für dieses Protein potentielle T-Zell-Epitope für den HLA-Typ der Patientin (HLA-A2, HLA-A24 und HLA-B15) vorhergesagt, die dann in einem RT-PCR-Test untersucht wurden. Mit den vorausgesagten Peptiden wurden zwei PBMC-Proben

getestet. Bei diesen beiden Proben war zuvor untersucht worden, ob sie eine Reaktivität gegen die Positivkontrolle zeigten. Dies war nötig, weil die Patientin sich im Intervall unter Chemotherapie befand. Es sollte sichergestellt werden, dass überhaupt eine Reaktivität zu sehen sei.

(a)

RFA001  
Prädiktionen



(b)

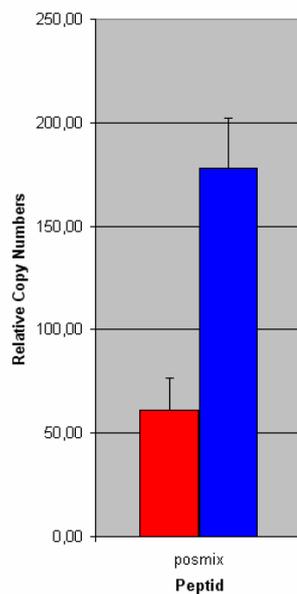


Abb. 48: RT-PCR der Prästimulation mit vorhergesagten KIAA002-Peptiden in relativen Kopienzahlen normiert auf HIV der Proben 12 Monate (rot) und 29 Monate (blau) nach Radiofrequenzablation. Da die Proben, die mit der viralen Positivkontrolle (b) stimuliert waren, eine deutlich höhere  $IFN\gamma$ -Produktion zeigten als die Proben, die mit Peptiden (a) stimuliert wurden, werden sie hier anders skaliert getrennt abgebildet.

Die Proben zeigten eine starke Antwort auf die virale Positivkontrolle, aber keine erhöhte Aktivität gegen die vorhergesagten Peptide.

HLA	Peptid	Sequenz	12M	29M
A*02	KIAA002	ALLELAEEL	1,14	1,46
A*02	KIAA002	KLATNAAVTV	1,72	2,00
A*24	KIAA002	TYLGKYWAI	1,16	1,27
B*15	KIAA002	KVADMALHY	1,01	1,33
A*0201	Positivkontrolle Pool A2		60,97	177,91
A*0201	Negativkontrolle HIV		1,00	1,00

Tab. 29: Messwerte in relativen Kopienzahlen bezogen auf die Negativkontrolle stimuliert mit HIV (= 1 gesetzt) des Versuchs mit vorhergesagten Peptiden der Patientin RFA001. Positive Messergebnisse sind grün, negative rot gedruckt.

Da die Patientin chemotherapiert wurde und zu keinem Zeitpunkt eine Reaktivität gegen eines der eingesetzten Peptide zeigte, wurden keine weiteren Versuche durchgeführt.

Die Patientin RFA001 litt an einem primären Mammacarcinom, dessen Leberfiliae zwei Mal mit RF-Ablation behandelt wurden. Zwischen erster und zweiter RF-Ablation standen keine Proben zur Verfügung.

Bei der Patientin zeigten sich in quantitativer RT-PCR zu keinem Zeitpunkt Unterschiede in der Reaktivität antigenspezifischer T-Zellen. Allerdings konnte auswärtig ein erhöhter Serumspiegel von Antikörpern gegen KIAA0002 (NY-REN-15) in SADA-Analyse detektiert werden. Peptide aus NY-REN-15, die für den HLA-Typ der Patientin (HLA-A2, HLA-A24, HLA-B15) vorhergesagt wurden, konnten ebenfalls keine verstärkte IFN $\gamma$ -Produktion bewirken.

Die Proben, die mit der viralen Positivkontrolle stimuliert worden waren, zeigten in Multiplex-PCR ebenfalls keine positiven Messergebnisse. In getrennter Auftragung konnte dann aber eine IFN $\gamma$ -Produktion gemessen werden. Dies hängt mit den Problemen der Multiplex-PCR zusammen. Der Versuch mit vorhergesagten Peptiden wurde in Singleplex-PCR durchgeführt. Dabei waren die Messergebnisse der Proben der Positivkontrolle jeweils deutlich positiv.

Da die Patienten lange und sehr intensiv (auch mit High Dose Schemata, siehe dazu den Anhang) mit Chemotherapie behandelt wurde, kann dies erklären, dass sie keine Antwort gegen die Peptide und die Positivkontrolle zeigte. Sie

könnte allerdings auch durch andere Faktoren immunsupprimiert gewesen sein (zum Beispiel durch Einnahme immunsuppressiver Medikamente).

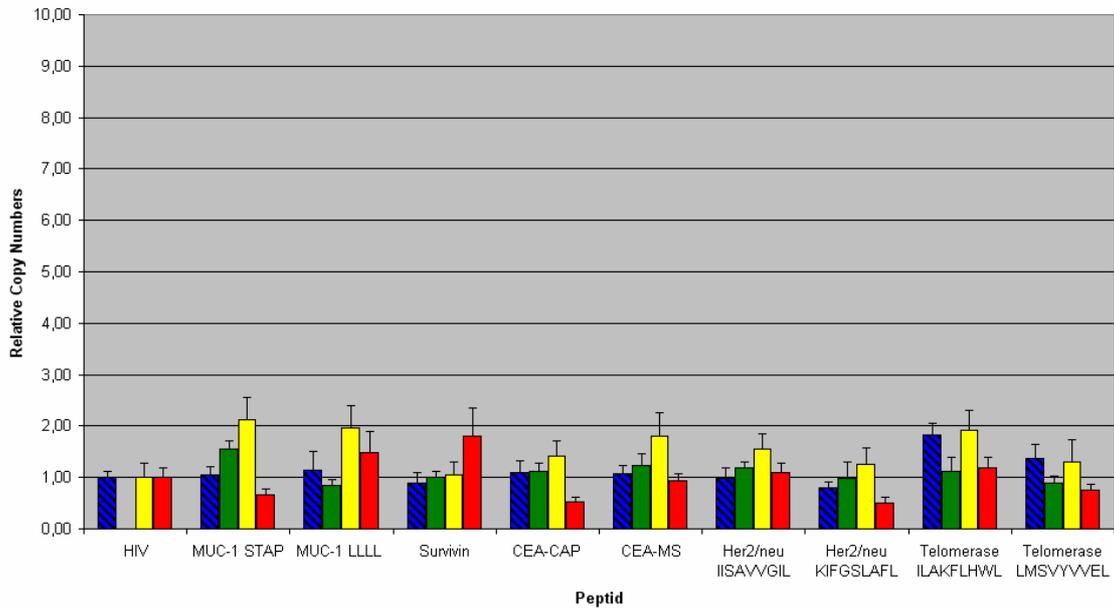
#### 6.2.4.2.7. RFA009:

Geschlecht: ♂  
Alter: 69 Jahre  
(bei Eintritt in die Studie)  
Primärtumor: Sigmacarcinom, pT3 N0 M0 G2  
Metastasierung: hepatisch  
Behandeltes Organ: Leber  
Anzahl RFAs: 4 (Intervall 5 Monate, 11 Monate, 2 Monate)  
Getestete Proben: vor RF-Ablation  
nach RF-Ablation: 2M, 14M/9M, 17M/12M/1M,  
25M/20M/9M/7M  
Tests: Quantitative IFN $\gamma$ -RT-PCR mit selektierten Peptiden  
nach einer Woche Prästimulation  
Chemotherapie: 25M/20M/9M/7M Einleitung einer palliativen low-  
dose Chemotherapie mit 5-FU  
Besonderheiten: Immunsuppression, Cortison, dialysepflichtige  
Niereninsuffizienz, Diabetes mellitus  
Andere Tests innerhalb dieser Studie: keine  
Follow-up nach erster RF-Ablation: 34 Monate

Von diesem Patienten waren die ersten Proben cryoasserviert, die Probe 25M/20M/9M/7M wurde frisch getestet.

(a)

RFA009



(b)

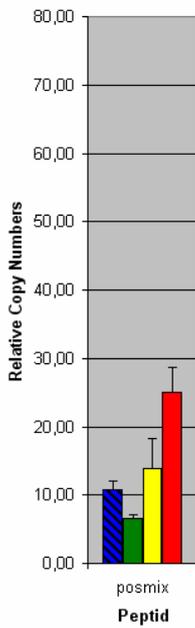
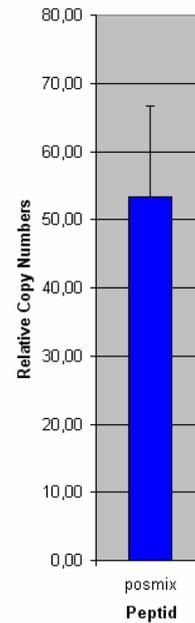
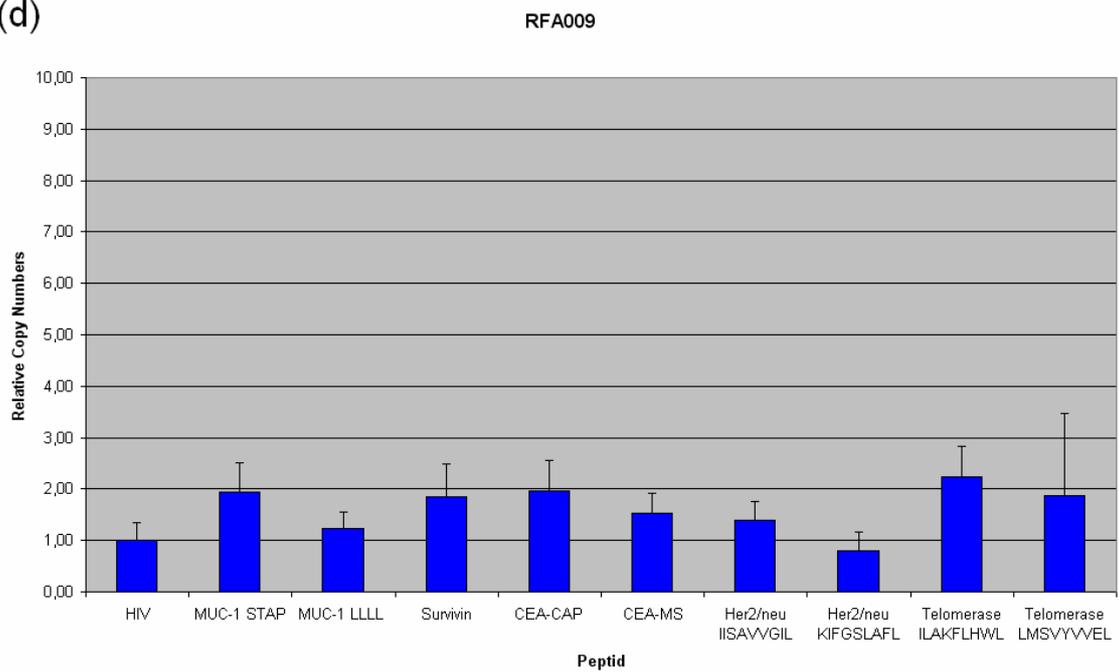


Abb. 49: RT-PCR aufgetragen in relativen Kopienzahlen bezogen auf HIV. Probe vor RF-Ablation (blau schraffiert), Probe 2M (grün), Probe 14M/9M (gelb), Probe 17M/12M/1M (rot), 25M/20M/9M/7M (blau). Da die Stimulationen mit der viralen Positivkontrolle (b+c) deutliche höhere relative Kopienzahlen ergaben als die mit Tumorantigenpeptiden (a+d), werden sie hier in anderer Skalierung separat abgebildet. Die Schaubilder a und b zeigen die aufgetauten Proben, die Bilder c und d die frisch getestete Probe.

(c)



(d)



Gegen keines der Epitope war eine Reaktivität antigenspezifischer T-Zellen zu beobachten. Weitere Versuche wurden daher mit Zellen dieses Patienten nicht durchgeführt.

HLA	Peptid	Sequenz	vor RFA	2M	14M/9M
A*0201	MUC-1 STAP	STAPPVHNV	1,06	1,54	2,13
A*0201	MUC-1 LLLL	LLLLTVLTV	1,14	0,86	1,97
A*0201	Survivin	ELTLGEFLKL	0,90	1,00	1,05
A*0201	CEA-CAP	YLSGANLNL	1,09	1,13	1,42
A*0201	CEA-MS	GVLVGVALI	1,07	1,24	1,80
A*0201	Her2/neu	IISAVVGIL	0,99	1,18	1,54
A*0201	Her2/neu	KIFGSLAFL	0,80	0,99	1,25
A*0201	Telomerase	ILAKFLHWL	1,83	1,11	1,93
A*0201	Telomerase	LMSVYVVEL	1,37	0,90	1,30
A*0201	Positivkontrolle Pool A2		10,70	6,61	13,93
A*0201	Negativkontrolle HIV		1,00	1,00	1,00

HLA	Peptid	Sequenz	17M/12M/1M	25M/20M/9M/7M
A*0201	MUC-1 STAP	STAPPVHNV	0,67	1,94
A*0201	MUC-1 LLLL	LLLLTVLTV	1,49	1,24
A*0201	Survivin	ELTLGEFLKL	1,81	1,85
A*0201	CEA-CAP	YLSGANLNL	0,54	1,97
A*0201	CEA-MS	GVLVGVALI	0,93	1,53
A*0201	Her2/neu	IISAVVGIL	1,11	1,40
A*0201	Her2/neu	KIFGSLAFL	0,49	0,79
A*0201	Telomerase	ILAKFLHWL	1,19	2,24
A*0201	Telomerase	LMSVYVVEL	0,75	1,87
A*0201	Positivkontrolle Pool A2		25,02	53,26
A*0201	Negativkontrolle HIV		1,00	1,00

Tab. 30: Werte der RT-PCR RFA009 angegeben in relativen Kopienzahlen normiert auf HIV. Positive Messergebnisse sind grün, negative rot gedruckt.

Der Patient RFA009 wurde vier Mal an Lebermetastasen eines primären Sigmoidcarcinoms mit RF-Ablation behandelt. Über einen untersuchten Zeitraum von 25 Monaten zeigte er zu keinem Zeitpunkt eine deutliche Reaktivität antigenspezifischer T-Zellen gegen eines der T-Zell-Epitope aus verschiedenen Tumorantigenen.

Die Positivkontrollen zeigten eine deutlich vermehrte IFN $\gamma$ -Produktion im Vergleich zur Negativkontrolle HIV.

Gründe für eine fehlende Reaktivität sind in der Immunsuppression des Patienten zu suchen. Es ist auch möglich, dass hier die Reaktivität gegen die falschen Tumorantigenpeptide untersucht wurde.

#### 6.2.4.2.8. RFA012:

Geschlecht: ♂  
Alter: 73 Jahre  
(bei Eintritt in die Studie)  
Primärtumor: Hepatozelluläres Carcinom  
Metastasierung: keine  
Behandeltes Organ: Leber  
Anzahl RFAs: 1  
Getestete Proben: vor RF-Ablation  
nach RF-Ablation: 9 Monate, 15 Monate, 19  
Monate, 23 Monate  
Tests: Quantitative IFN $\gamma$ -RT-PCR mit selektierten Peptiden  
nach einer Woche Prästimulation  
Tetramer- und IFN $\gamma$ -Staining  
IFN $\gamma$ -ELISPOT  
Chemotherapie: keine  
Besonderheiten: stark progressive Tumorerkrankung im gesamten  
Verlauf  
Andere Tests innerhalb dieser Studie: keine  
Follow-up nach erster RF-Ablation: 28 Monate

HLA	Peptid	Sequenz	vor RFA	9M	15M
A*0201	MUC-1 STAP	STAPPVHNV	3,51	1,49	1,31
A*0201	MUC-1 LLLL	LLLLTVLTV	1,07	1,61	1,37
A*0201	MAGE-1	KLLEYVIKV	1,21	1,69	1,60
A*0201	Survivin	ELTLGEFLKL	1,66	1,99	1,84
A*0201	Keratin-18	ALLNIKVKL	1,38	2,11	4,17
A*0201	Met.	YVDPVITSI			
A*0201	CEA-CAP	YLSGANLNL	0,61	1,34	2,79
A*0201	CEA-MS	GVLVGVALI			
A*0201	Telomerase	ILAKFLHWL	0,74	5,26	5,06
A*0201	Telomerase	LMSVYVVEL			
A*0201	HCV PolG	KLVALGINAV	1,69	2,03	2,69
A*0201	HCV NS1	SLLAPGAKQNV			
A*0201	HCV Core	DLMGYIPLV			
A*0201	AFP 137	PLFQVPEPV	6,17	2,60	3,59
A*0201	AFP 158	FMNKFIYEI			
A*0201	AFP 325	GLSPNLNRFL			
A*0201	AFP 542	GVALQTMKQ			
A*02	Positivkontrolle Pool A2		13,04	22,09	26,08
A*02	Negativkontrolle HIV		1,00	1,00	1,00

HLA	Peptid	Sequenz	19M	23M
A*0201	MUC-1 STAP	STAPPVHNV	93,70	190,02
A*0201	MUC-1 LLLL	LLLLTVLTV	1,95	0,54
A*0201	MAGE-1	KLLEYVIKV	n.t.	1,13
A*0201	Survivin	ELTLGEFLKL	1,03	0,25
A*0201	Keratin-18	ALLNIKVKL	3,00	0,21
A*0201	Met.	YVDPVITSI	3,53	0,61
A*0201	CEA-CAP	YLSGANLNL	3,35	0,43
A*0201	CEA-MS	GVLVGVALI	2,42	0,76
A*0201	Telomerase	ILAKFLHWL	2,93	1,04
A*0201	Telomerase	LMSVYVVEL	2,34	0,77
A*0201	HCV PolG	KLVALGINAV	n.t.	0,45
A*0201	HCV NS1	SLLAPGAKQNV		
A*0201	HCV Core	DLMGYIPLV		
A*0201	AFP 137	PLFQVPEPV	3,34	0,40
A*0201	AFP 158	FMNKFIYEI	0,88	
A*0201	AFP 325	GLSPNLNRFL	0,98	
A*0201	AFP 542	GVALQTMKQ	4,13	
A*02	Positivkontrolle Pool A2		166,00	28,15
A*02	Negativkontrolle HIV		1,00	1,00

Tab. 31: Messwerte der RT-PCR in relativen Kopienzahlen normiert auf die Negativkontrolle.

Zellen dieses Patienten wurden mit RT-PCR und kombiniertem Tetramer- und  $\text{IFN}_\gamma$ -Staining untersucht. Die Tetramer-Färbung mit einem MUC-1 STAP HLA-A2 Tetramer zeigte keine spezifische Bindung (Daten nicht gezeigt).

### RFA012

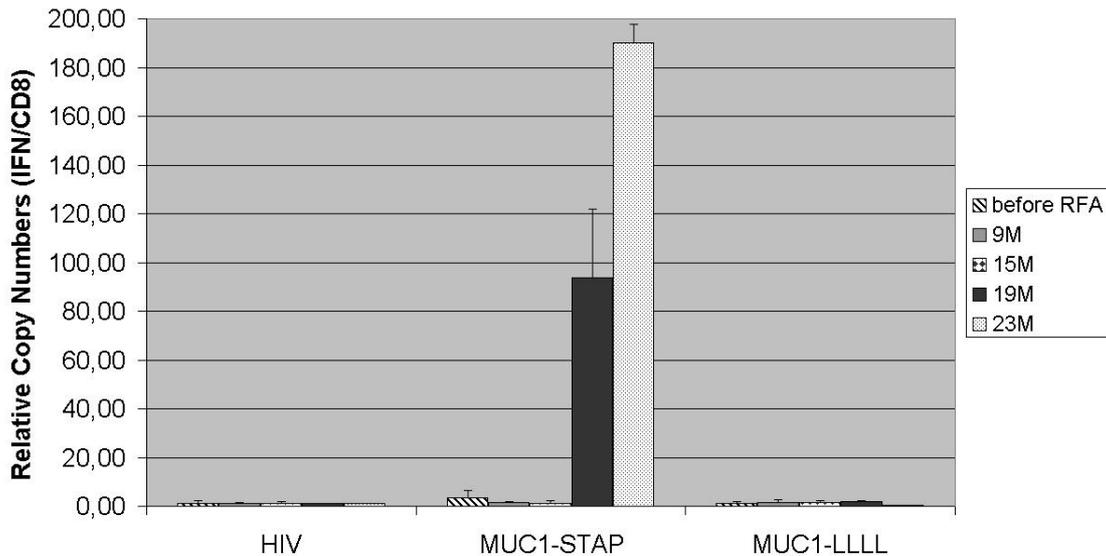


Abb. 50: Ergebnisse der RT-PCR in relativen Kopienzahlen für HIV, MUC-1 STAP und MUC-1 LLLL (andere Peptide nicht gezeigt).

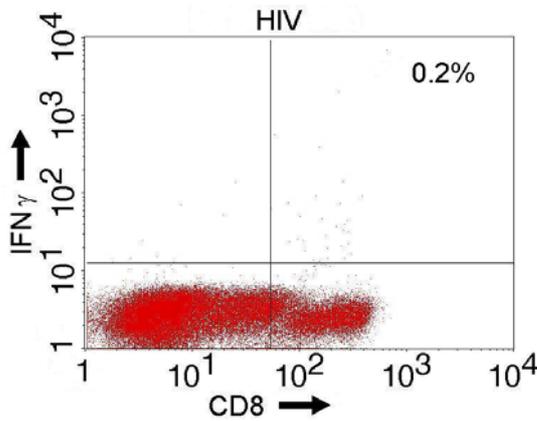


Abb. 51a: Intrazelluläres  $\text{IFN}_\gamma$ -Staining der Probe 23 Monate nach RF-Ablation. Die Probe wurde stimuliert mit irrelevantem Peptid (HIV als Negativkontrolle). Die Prozentzahlen geben den Anteil der  $\text{IFN}_\gamma$  positiven Zellen an der Gesamtzahl der  $\text{CD8}^+$  Zellen an.

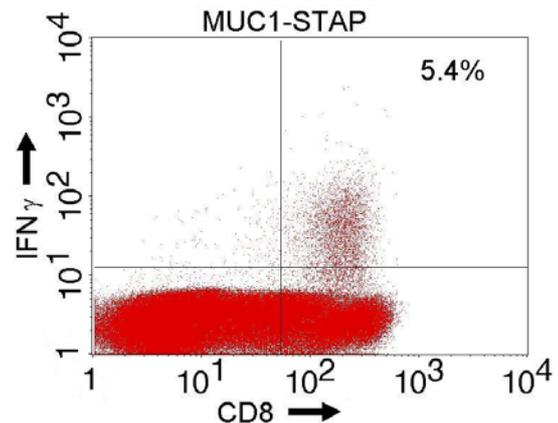


Abb. 51b: Intrazelluläres  $\text{IFN}_\gamma$ -Staining nach Stimulation mit relevantem Peptid (MUC-1 STAP) der Probe 23 Monate nach RF-Ablation. Die Prozentzahlen geben den Anteil der  $\text{IFN}_\gamma$  positiven Zellen an der Gesamtzahl der  $\text{CD8}^+$  Zellen an.

Die Probe 19 Monate zeigte erstmalig eine starke Reaktivität gegen das MUC-1 Epitop STAPPVHNV. Vor RF-Ablation war eine geringe Aktivität gegen dieses Peptid bereits zu detektieren (relative Kopienzahl 3,51). In der Probe 23 Monate nach RF-Ablation war diese Aktivität noch stärker zu messen.

In der Probe nach 23 Monaten konnte die Aktivierung auch im intrazellulären IFN $\gamma$ -Staining bestätigt werden.

Ein durchgeführter IFN $\gamma$ -ELISPOT ergab ein grenzwertig positives Ergebnis.

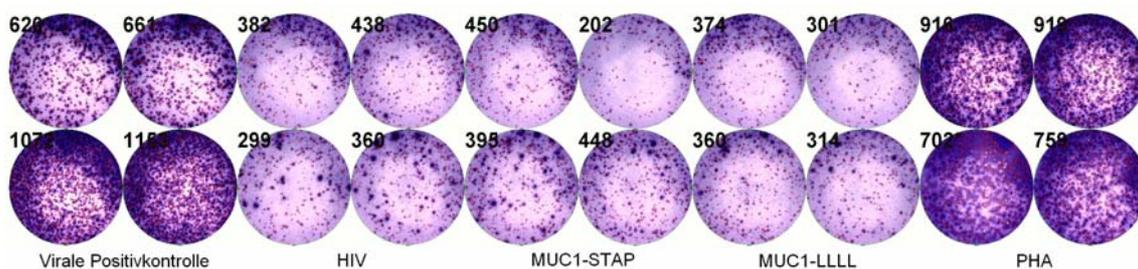


Abb. 52: IFN $\gamma$ -ELISPOT der Proben vor RF-Ablation (oben) und 23 Monate nach RF-Ablation (unten).

Vom Aspekt her scheint es eine Vermehrung von Spots für MUC-1 STAP im Vergleich zwischen der Probe vor Radiofrequenzablation und der Probe 23 Monate später zu geben. Die Spots in dieser zweiten Probe sind größer. Die absoluten Zahlenwerte sprechen allerdings dafür, dass die Reaktivität der zweiten Proben gegen MUC-1 STAP höher ist als die der ersten.

Der Patient RFA012 wurde an einem primären Hepatozellulären Carcinom mit RF-Ablation behandelt. Er zeigte eine stark ansteigende IFN $\gamma$ -Produktion bei Stimulation mit dem Epitop MUC-1 STAP bis 29 Monate nach RF-Ablation. Auch gegen andere Epitope konnten Reaktivitäten detektiert werden, zum Beispiel gegen den Pool der beiden Telomerase-Peptide nach 9, 15 und 25 Monaten.

Die Reaktivität konnte sowohl im intrazellulären IFN $\gamma$ -Staining als auch im ELISPOT reproduziert werden. Konsekutive Proben konnten nicht untersucht

werden, weil von dem Patienten keine Proben mehr abgenommen worden waren.

Trotz dieser Immunantwort war die Tumorerkrankung progredient.

Die Positivkontrollen zeigten jeweils eine starke IFN $\gamma$ -Produktion im Vergleich zur Negativkontrolle. In der Probe 19 Monate nach RF-Ablation war die relative Kopienzahl mit 166 deutlich höher als in den anderen Proben (um 20). In dieser Probe war auch insgesamt eine höhere Reaktivität aller Ansätze zu beobachten, was auch mit der erhöhten Aktivität der Positivkontrolle korreliert.

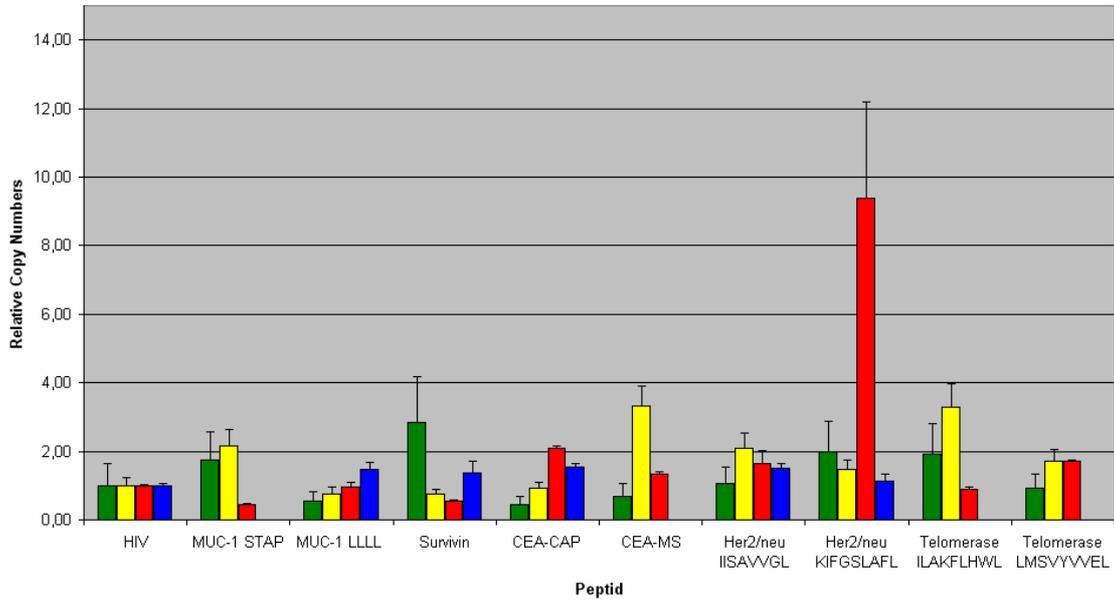
#### 6.2.4.2.9. RFA015:

Geschlecht:	♂
Alter:	61 Jahre
(bei Eintritt in die Studie)	
Primärtumor:	Rectumcarcinom, pT3 pN1 M1 (Hepar) G3
Metastasierung:	Leber
Behandeltes Organ:	Leber
Anzahl RFAs:	1
Getestete Proben:	vor RF-Ablation nach RF-Ablation: 1 Monat, 3 Monate, 17 Monate
Tests:	Quantitative IFN $\gamma$ -RT-PCR mit selektierten Peptiden nach einer Woche Prästimulation in Multiplex-PCR und getrenntem Setup Tetramer-Staining mit vier Wochen Prästimulation
Chemotherapie:	7 Monate bis 4 Monate vor RF-Ablation: 8 Zyklen FOLFOX 1 Monat vor RF-Ablation: Oxaliplatin 5 Monate nach RF-Ablation bis 17 Monate nach RF-Ablation: 7 Zyklen à 6 Dosen FOLFIRI
Besonderheiten:	keine
Andere Tests innerhalb dieser Studie:	keine
Follow-up nach erster RF-Ablation:	29 Monate

Dieser Patient wurde mit Epitopen untersucht, die in Darmtumoren überexprimiert sind. Er zeigte eine Reaktivität gegen das Her2/neu Epitop KIFGSLAFL 3 Monate nach Therapie in Tests mit RT-PCR. Der Patient wurde zu späteren Zeitpunkten auswärtig weiterbetreut. Daher war eine weitere Beobachtung zwischen 3 Monaten und 17 Monaten nach Therapie nicht möglich. Siebzehn Monate nach Therapie wurde der Patient chemotherapiert und zeigte keine Antwort mehr gegen eines der untersuchten Epitope.

(a)

RFA015



(b)

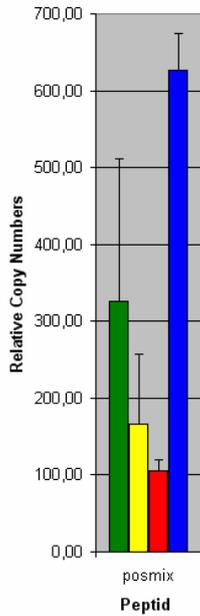


Abb. 53: Ergebnisse der RT-PCR RFA015 aufgetragen in relativen Kopienzahlen normiert auf die Negativkontrolle HIV. Probe vor RF-Ablation (grün, Multiplex-PCR), 1 Monat nach RF-Ablation (gelb, Multiplex-PCR), 3 Monate nach RF-Ablation (rot, Multiplex-PCR) und 17 Monate nach RF-Ablation (blau, Singleplex-PCR). Beim Test der Probe nach 17 Monaten wurden nicht alle Peptide untersucht. Da die relativen Kopienzahlen für IFN $\gamma$  bei den Proben, die mit der viralen Positivkontrolle stimuliert waren, deutlich höher waren als bei denen, die mit den Tumorantigenpeptiden (a) stimuliert waren, sind sie hier anders skaliert separat abgebildet (b).

**Multiplex-PCR**

HLA	Peptid	Sequenz	vor RFA	1M	3M
A*0201	MUC-1 STAP	STAPPVHNV	1,76	2,17	0,43
A*0201	MUC-1 LLLL	LLLLTVLTV	0,55	0,76	0,97
A*0201	Survivin	ELTLGEFLKL	2,86	0,74	0,54
A*0201	CEA-CAP	YLSGANLNL	0,45	0,93	2,09
A*0201	CEA-MS	GVLVGVALI	0,69	3,31	1,34
A*0201	Her2/neu	IISAVVGIL	1,05	2,10	1,65
A*0201	Her2/neu	KIFGSLAFL	1,99	1,47	9,38
A*0201	Telomerase	ILAKFLHWL	1,93	3,28	0,90
A*0201	Telomerase	LMSVYVVEL	0,92	1,71	1,71
A*0201	Positivkontrolle Pool A2		326,29	166,57	105,42
A*0201	Negativkontrolle HIV		1,00	1,00	1,00

**Singleplex-PCR**

HLA	Peptid	Sequenz	17M
A*0201	MUC-1 STAP	STAPPVHNV	n.t.
A*0201	MUC-1 LLLL	LLLLTVLTV	1,47
A*0201	Survivin	ELTLGEFLKL	1,37
A*0201	CEA-CAP	YLSGANLNL	1,55
A*0201	CEA-MS	GVLVGVALI	n.t.
A*0201	Her2/neu	IISAVVGIL	1,51
A*0201	Her2/neu	KIFGSLAFL	1,13
A*0201	Telomerase	ILAKFLHWL	n.t.
A*0201	Telomerase	LMSVYVVEL	n.t.
A*0201	Positivkontrolle Pool A2		625,99
A*0201	Negativkontrolle HIV		1,00

Tab. 32: Messwerte der RT-PCR des Patienten RFA015 in relativen Kopienzahlen normiert auf HIV als Negativkontrolle.

Mehrere Tetramer-Färbungen konnten die RT-PCR-Ergebnisse nicht reproduzieren.

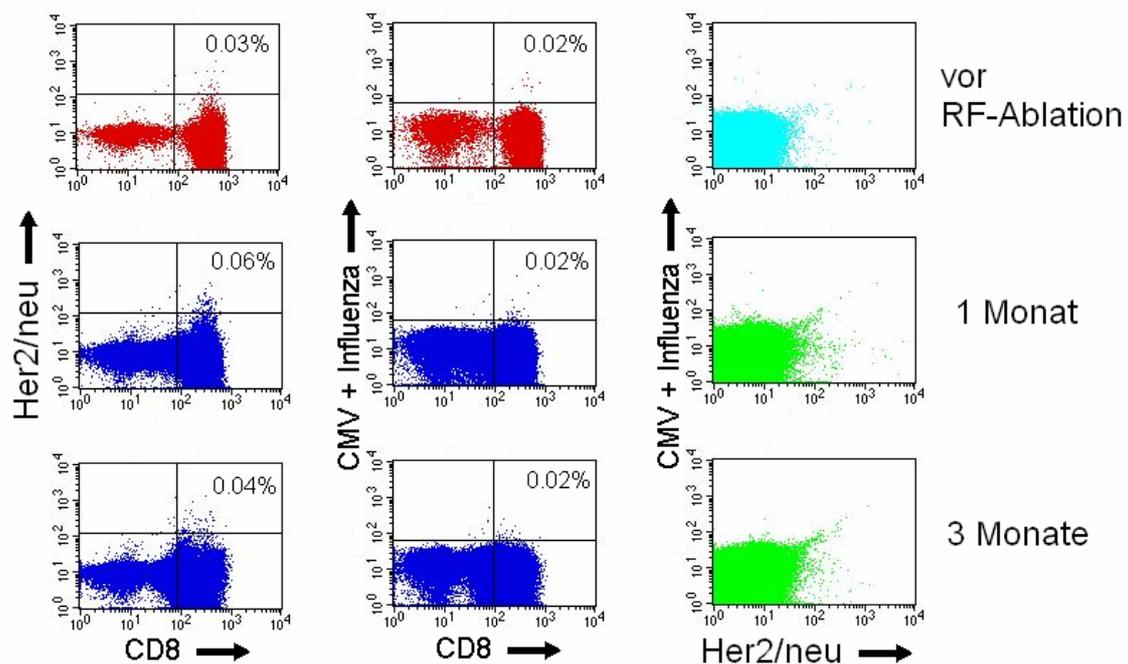


Abb. 54: Tetramer-Färbung von RFA015 der Probe 3 Monate nach RF-Ablation (Test vom 17.06.2004). Die Prozentzahlen geben den Anteil der Tetramer-positiven Zellen an der Gesamtzahl der CD8<sup>+</sup> Zellen an.

Der Patient RFA015 wurde an hepatischen Metastasen eines Rectumcarcinoms mit RF-Ablation behandelt. Drei Monate nach Therapie ließ sich eine erhöhte IFN $\gamma$ -Produktion nach Stimulation mit dem Her2/neu Epitop KIFGSLAFL detektieren. Da der Patient nach Abnahme dieser Probe vorerst nicht zur Kontrolle ins Universitätsklinikum Tübingen zurückkehrte, sondern erst über ein Jahr später über seinen Hausarzt wieder eine Blutprobe erhalten werden konnte, wurde die nächste Probe erst 17 Monate nach Therapie wieder untersucht. Zu diesem Zeitpunkt befand sich der Patient unter Chemotherapie. Eine Reaktivität gegen das Her2/neu Epitop konnte nicht mehr gemessen werden.

Da keine Zellen mehr zur Verfügung standen, konnte an der positiv getesteten Probe kein intrazelluläres IFN $\gamma$ -Staining mehr durchgeführt werden. Mehrere Tetramerfärbungen zeigten keine tetramer-positiven, das heißt antigenspezifischen T-Zellen, beziehungsweise nur eine sehr geringe, sich nicht verändernde Frequenz. Dies kann daran liegen, dass die Tetramere nicht an den T-Zell-Rezeptor gebunden werden. Eine wirkliche Positivkontrolle für das Tetramer (außer Klone) gibt es nicht, weil kein Patient oder Spender zur

Verfügung stand, der gesichert T-Zellen gegen das Her2/neu Epitop KIFGSLAFL aufwies. Ein intrazelluläres IFN $\gamma$ -Staining hätte den Vorteil, dass es nicht davon abhängig ist, ob das Tetramer spezifisch vom T-Zell-Rezeptor gebunden wird. Vielmehr wird hierbei ein Zytokin (IFN $\gamma$ ) markiert. Dabei kann man bei Stimulation mit einer viralen Positivkontrolle diese durchaus als Positivkontrolle für den IFN $\gamma$ -Antikörper verwenden.

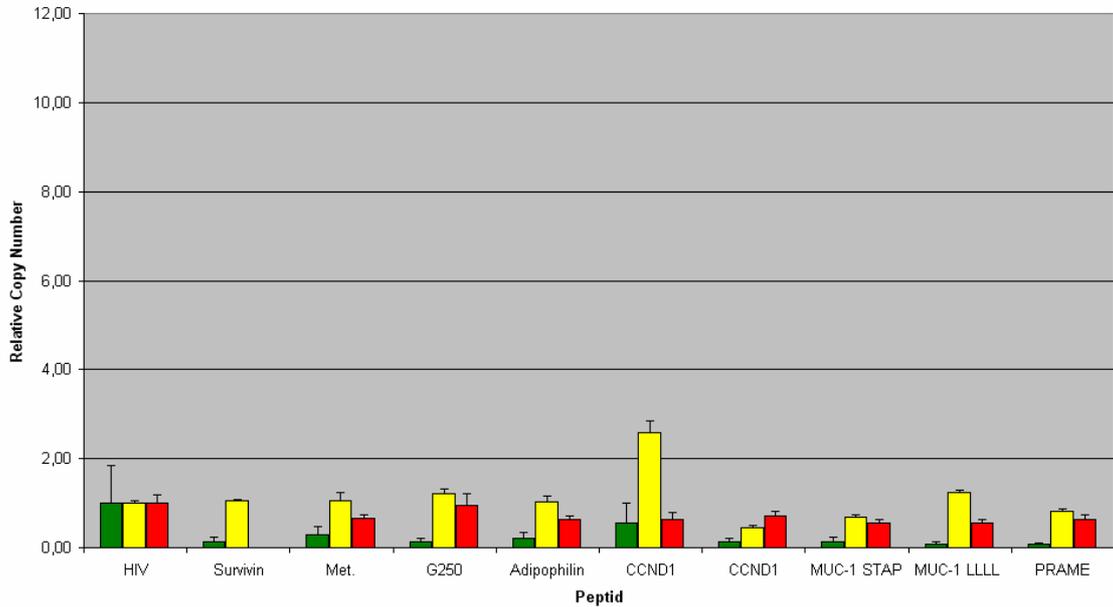
Die Positivkontrolle in der RT-PCR zeigte in allen Proben sehr stark positive Ergebnisse. In der Tetramerfärbung war allerdings nur in der Probe vor RF-Ablation eine deutliche Population tetramer-positiver Zellen nachweisbar.

#### 6.2.4.2.10. RFA016:

Geschlecht: ♀  
Alter: 72 Jahre  
(bei Eintritt in die Studie)  
Primärtumor: Nierenzellcarcinom, pT1 pN0 M0 G2  
Metastasierung: keine  
Behandeltes Organ: Niere  
Anzahl RFAs: 2 (Intervall 11 Monate)  
Getestete Proben: vor RF-Ablation  
nach RF-Ablation: 4M, 10M, 28M/17M  
Tests: Quantitative IFN $\gamma$ -RT-PCR mit selektierten Peptiden  
nach einer Woche Prästimulation in Multiplex-PCR,  
Messung dieser Probe in getrenntem Setup  
Restimulation der Proben und Messung mit RT-PCR  
Messung späterer Proben mit quantitativer IFN $\gamma$ -RT-PCR in getrennter Auftragung  
Tetramer-Staining nach einer Woche Prästimulation  
Kombiniertes Tetramer- und IFN $\gamma$ -Staining nach  
einer Woche Prästimulation  
IFN $\gamma$ -ELISPOT  
Chemotherapie: keine  
Besonderheiten: Lokalrezidiv, das ebenfalls 11 Monate nach 1. RF-  
Ablation mit Radiofrequenzablation behandelt wurde.  
Das Nierenzellcarcinom ist die dritte  
Tumorerkrankung des Patienten (Z.n. Hirntumor,  
Dickdarmtumor).  
Andere Tests innerhalb dieser Studie: keine  
Follow-up nach erster RF-Ablation: 29 Monate

(a)

RFA016



(b)

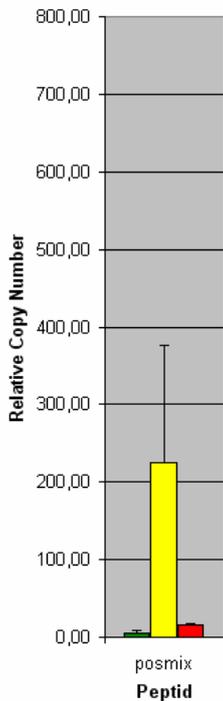
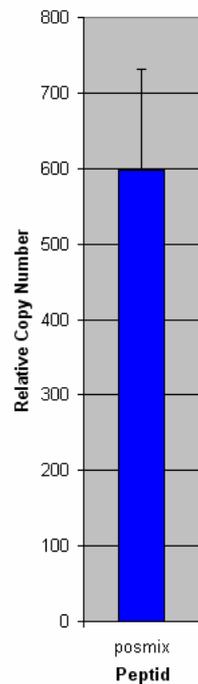
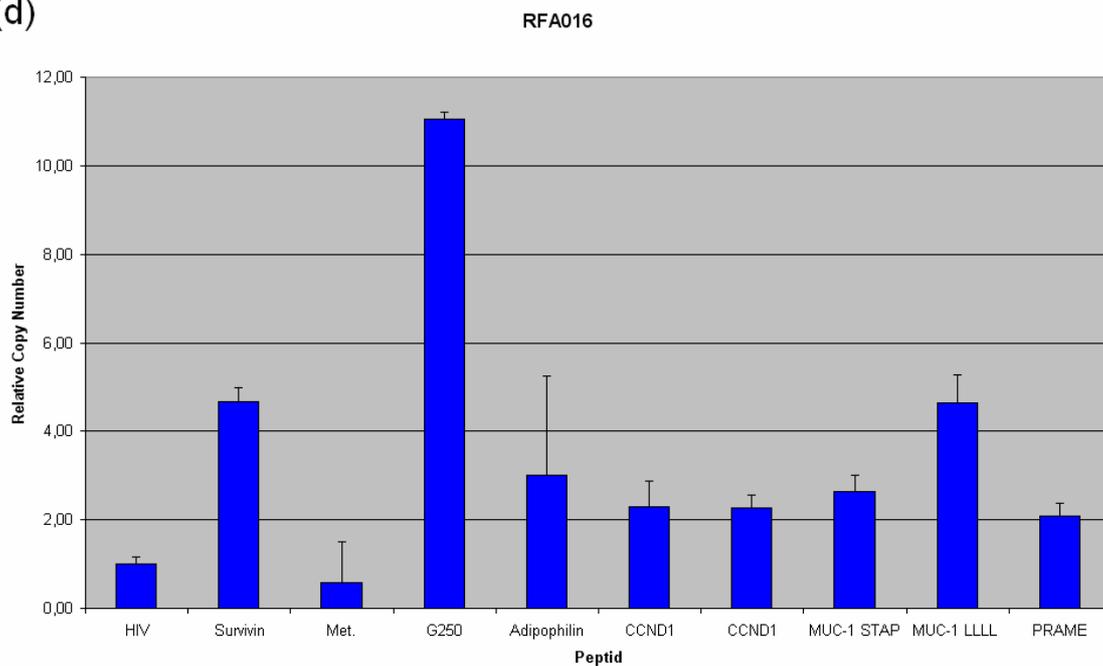


Abb. 55: Messergebnisse der Patientin RFA016 angegeben in relativen Kopienzahlen bezogen auf die Negativkontrolle HIV (willkürlich = 1 gesetzt). Da die relativen Kopienzahlen der Positivkontrollen (b+c) deutlich höher waren, als die der Proben, die mit den Tumorepitopen (a+d) stimuliert worden waren, sind sie hier in anderer Skalierung gesondert abgebildet. Die Säulen sind wie folgt gefärbt: vor RF-Ablation (grün), 4 Monate nach RF-Ablation (gelb), 10 Monate nach RF-Ablation (rot) und die Probe 28M/17M (blau). Die Probe 28M/17M wurde frisch getestet und ist daher hier gesondert abgebildet, die anderen Proben waren eingefroren und wurden für den Versuch aufgetaut.

(c)



(d)



Proben dieser Patientin wurde sowohl mit RT-PCR in Multiplex, als auch in getrennter Auftragung untersucht. Positive Ergebnisse konnten in Multiplex-PCR nach zehn Monaten beobachtet werden gegen Adipophilin, PRAME und die beiden MUC-1 Epitope. Diese erhöhten Amplifikationsraten waren in getrenntem Setup nur noch gering erhöht, die in der nachfolgenden Probe 28 Monate nach 1. Radiofrequenzablation nicht mehr detektierbar waren.

Eine Reproduktion der Ergebnisse war im ELISPOT und der Tetramer-Färbung allerdings nicht möglich.

HLA	Peptid	Sequenz	vor RFA Multiplex	4M Multiplex
A*0201	Survivin	STAPPVHNV	0,14	1,05
A*0201	Met.	LLLLTVLTV	0,29	1,07
A*0201	G250	KLLEYVIKV	0,14	1,21
A*0201	Adipophilin	ELTLGEFLKL	0,22	1,03
A*0201	CCND1	ALLNIKVKL	0,57	2,59
A*0201	CCND1	YVDPVITSI	0,14	0,44
A*0201	MUC-1 STAP	YLSGANLNL	0,14	0,69
A*0201	MUC-1 LLLL	GVLVGVALI	0,08	1,23
A*0201	PRAME	ILAKFLHWL	0,07	0,81
A*0201	Positivkontrolle Pool A2		5,01	224,41
A*0201	Negativkontrolle HIV		1,00	1,00

HLA	Peptid	Sequenz	10M Singleplex	28M/17M Singleplex
A*0201	Survivin	STAPPVHNV	n.t.	4,66
A*0201	Met.	LLLLTVLTV	0,66	0,57
A*0201	G250	KLLEYVIKV	0,94	11,04
A*0201	Adipophilin	ELTLGEFLKL	0,63	3,00
A*0201	CCND1	ALLNIKVKL	0,63	2,30
A*0201	CCND1	YVDPVITSI	0,71	2,28
A*0201	MUC-1 STAP	YLSGANLNL	0,55	2,64
A*0201	MUC-1 LLLL	GVLVGVALI	0,56	4,63
A*0201	PRAME	ILAKFLHWL	0,64	2,08
A*0201	Positivkontrolle Pool A2		21,71	598,41
A*0201	Negativkontrolle HIV		1,00	1,00

Tab. 33: Messwerte in relativen Kopienzahlen der Patientin RFA016. Positive Messergebnisse sind grün, negative rot gedruckt.

Diese Patientin zeigte eine schwache Antwort bei Stimulation mit dem Cyclin D1 Epitop ALLNIKVKL vier Monate nach RF-Ablation. In der Probe 28M/17M war dann insgesamt eine Aktivitätssteigerung gegen (fast) alle Peptide zu beobachten, besonders aber gegen G250 KLLEYVIKV, Survivin und MUC-1 LLLL. Diese relativen Kopienzahlen sprechen für eine spezifische Antwort, weil sie deutlich höher ausfallen als die anderen Werte der Probe.

Reproduktionsversuche mit den früheren Proben bis 10 Monate nach Radiofrequenzablation waren nicht erfolgreich. Weder im Tetramer-Staining, noch im ELISPOT konnten antigenspezifische Zellen oder ihre Aktivität nachgewiesen werden. Mit der neuesten Probe wurden noch keine Versuche zur Reproduktion der Ergebnisse durchgeführt.

Die Stimulation mit der viralen Positivkontrolle wies starke Schwankungen um bis zu Faktor 100 in den relativen Kopienzahlen auf. Sie zeigte aber immer deutlich positive Messergebnisse.

#### 6.2.4.2.11. RFA022:

Geschlecht:	♀
Alter:	72 Jahre
(bei Eintritt in die Studie)	
Primärtumor:	Hepatozelluläres Carcinom, pT2 pN0 pM0
Metastasierung:	keine
Behandeltes Organ:	Leber
Anzahl RFAs:	2 (Intervall 20 Monate)
Getestete Proben:	vor RF-Ablation nach RF-Ablation: 4M, 13M, 25M/5M
Tests:	Quantitative IFN $\gamma$ -RT-PCR mit selektierten Peptiden nach einer Woche Prästimulation
Chemotherapie:	keine
Besonderheiten:	Tumormarkererhöhung AFP
Andere Tests innerhalb dieser Studie:	HSP70-ELISA
Follow-up nach erster RF-Ablation:	28 Monate

Getestet wurden aufgetaute Proben (vor RF-Ablation, 4 Monate, 13 Monate) und eine frische Probe (25M/5M). Die Patientin zeigte in allen Proben eine Antwort gegen die virale Positivkontrolle und keine Antwort gegen eines der getesteten Peptide im gesamten Intervall.

Es wurden keine weiteren Untersuchungen durchgeführt.

HLA	Peptid	Sequenz	vor RFA	4M
A*0201	MUC-1 STAP	STAPPVHNV	1,02	1,07
A*0201	MUC-1 LLLL	LLLLTVLTV	1,78	0,99
A*0201	MAGE-1	KLLEYVIKV	0,88	0,52
A*0201	Survivin	ELTLGEFLKL	1,04	0,99
A*0201	Keratin-18	ALLNIKVKL	1,00	1,56
A*0201	Met.	YVDPVITSI	1,01	
A*0201	CEA-CAP	YLSGANLNL	2,04	0,87
A*0201	CEA-MS	GVLVGVALI	1,12	
A*0201	Telomerase	ILAKFLHWL	0,83	1,80
A*0201	Telomerase	LMSVYVVEL	0,71	
A*0201	HCV PoIG	KLVALGINAV	1,46	0,90
A*0201	HCV NS1	SLLAPGAKQNV		
A*0201	HCV Core	DLMGYIPLV		
A*0201	AFP 137	PLFQVPEPV	1,56	0,83
A*0201	AFP 158	FMNKFIYEI		
A*0201	AFP 325	GLSPNLNRFL		
A*0201	AFP 542	GVALQTMKQ		
A*0201	Positivkontrolle Pool A2		96,67	46,21
A*0201	Negativkontrolle HIV		1,00	1,00
HLA	Peptid	Sequenz	13M	25M/5M
A*0201	MUC-1 STAP	STAPPVHNV	0,65	0,99
A*0201	MUC-1 LLLL	LLLLTVLTV	0,62	0,56
A*0201	MAGE-1	KLLEYVIKV	0,86	0,79
A*0201	Survivin	ELTLGEFLKL	1,50	1,19
A*0201	Keratin-18	ALLNIKVKL	0,66	0,51
A*0201	Met.	YVDPVITSI	1,17	
A*0201	CEA-CAP	YLSGANLNL	0,57	0,72
A*0201	CEA-MS	GVLVGVALI	0,76	
A*0201	Telomerase	ILAKFLHWL	1,15	0,87
A*0201	Telomerase	LMSVYVVEL	1,18	
A*0201	HCV PoIG	KLVALGINAV	1,82	0,77
A*0201	HCV NS1	SLLAPGAKQNV		
A*0201	HCV Core	DLMGYIPLV		
A*0201	AFP 137	PLFQVPEPV	0,76	1,08
A*0201	AFP 158	FMNKFIYEI		
A*0201	AFP 325	GLSPNLNRFL		
A*0201	AFP 542	GVALQTMKQ		
A*0201	Positivkontrolle Pool A2		171,85	190,68
A*0201	Negativkontrolle HIV		1,00	1,00

Tab. 34: Messwerte der RT-PCR RFA022 in relativen Kopienzahlen bezogen auf die Negativkontrolle HIV. Gemessen wurde in Singleplex-PCR. Negative Messergebnisse sind rot, positive grün gedruckt.

Die Patientin RFA022 wurde zwei Mal im Abstand von 20 Monaten mit RF-Ablation an einem primären Hepatozellulären Carcinom behandelt.

Nach Stimulation von PBMCs mit T-Zell-Epitopen aus Tumorantigenen zeigte sich keine erhöhte IFN $\gamma$ -Produktion, das heißt keine verstärkte Aktivität antigenspezifischer T-Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle HIV. Veränderungen über den Zeitraum der Beobachtung liessen sich nicht beobachten. Die Positivkontrollen ergaben jeweils ein stark positives Ergebnis.

#### 6.2.4.2.12. RFA024:

Geschlecht:	♂
Alter:	38 Jahre
(bei Eintritt in die Studie)	
Primärtumor:	Rectumcarcinom, pT2 N1 M0 G2
Metastasierung:	Leber
Behandeltes Organ:	Leber
Anzahl RFAs:	3 (Intervall 5 Monate, 9 Monate)
Getestete Proben:	vor RF-Ablation nach RF-Ablation: 1M, 4M, 6M/1M, 12M/7M, 14M/9M/d0, 15M/10M/1M, 21M/16M/7M
Tests:	Quantitative IFN $\gamma$ -RT-PCR mit selektierten Peptiden nach einer Woche Prästimulation Tetramer-Staining Kombiniertes Tetramer- und IFN $\gamma$ -Staining IFN $\gamma$ -ELISPOT
Chemotherapie:	21 Monate bis 20 Monate vor 1. RF-Ablation: neoadjuvante Radiochemotherapie (Schlag- Protokoll) 17 Monate bis 15 Monate vor 1. RF-Ablation: 5- FU/Folinsäure 9 Monate vor 1. RF-Ablation: FOLFOX 1 Monat nach 2. RF-Ablation bis 3 Monate nach 2. RF-Ablation: 4 Zyklen FOLFOX
Besonderheiten:	keine
Andere Tests innerhalb dieser Studie:	HSP70-ELISA
Follow-up nach erster RF-Ablation:	25 Monate

Dieser Patient mit einem Rectumcarcinom wurde bisher fast zwei Jahre nach seiner ersten Radiofrequenzablation nachbeobachtet. Im Zeitraum wurden acht Proben über drei Ablationen untersucht. Die Proben bis 6 Monate nach 1. RF-

Ablation wurden in Multiplex-PCR getestet. Die späteren Proben in getrenntem Setup.

Der Patient zeigte in der Probe 6M/1M erstmalig ein schwach positives Ergebnis gegen Survivin und die beiden CEA-Epitope. Im weiteren Verlauf zeigte sich eine Reaktivität gegen MUC-1 STAP, die erstmalig in der Probe 12M/7M sichtbar war und ihr Maximum in der Probe 15M/10M/1M hatte. In der konsekutiven Probe war die Reaktivität nicht mehr detektierbar.

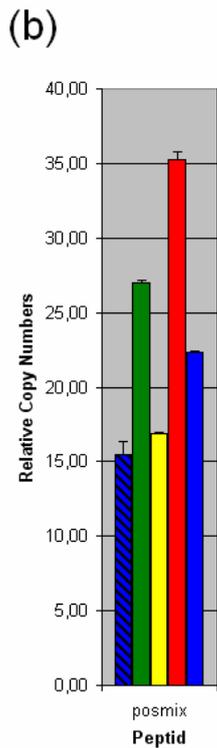
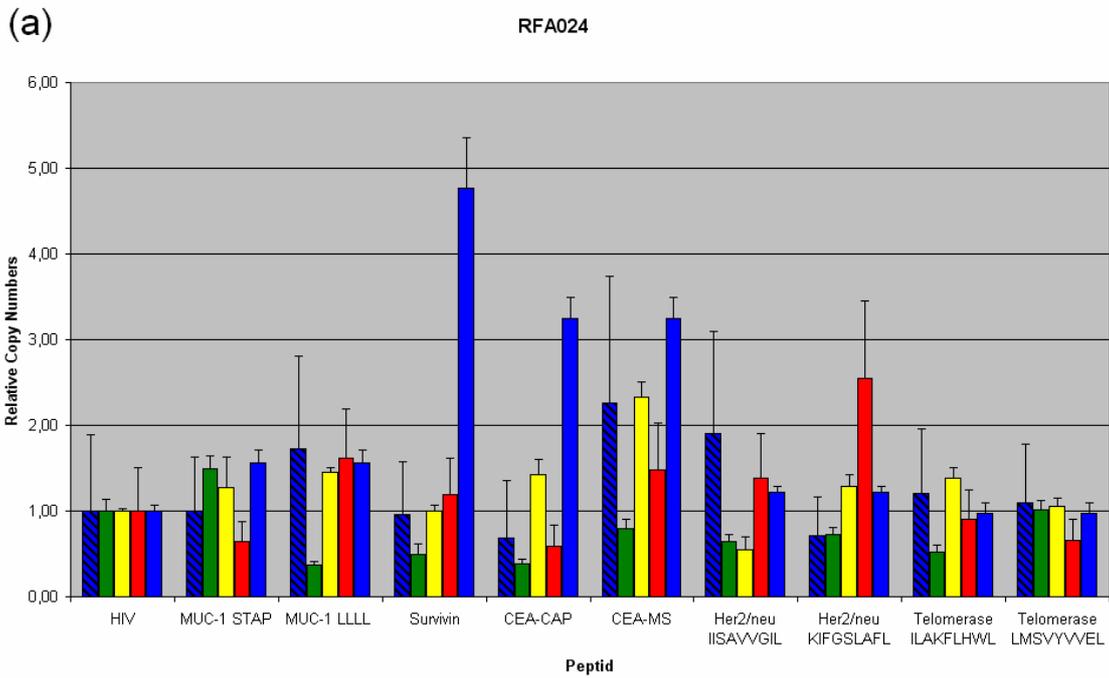
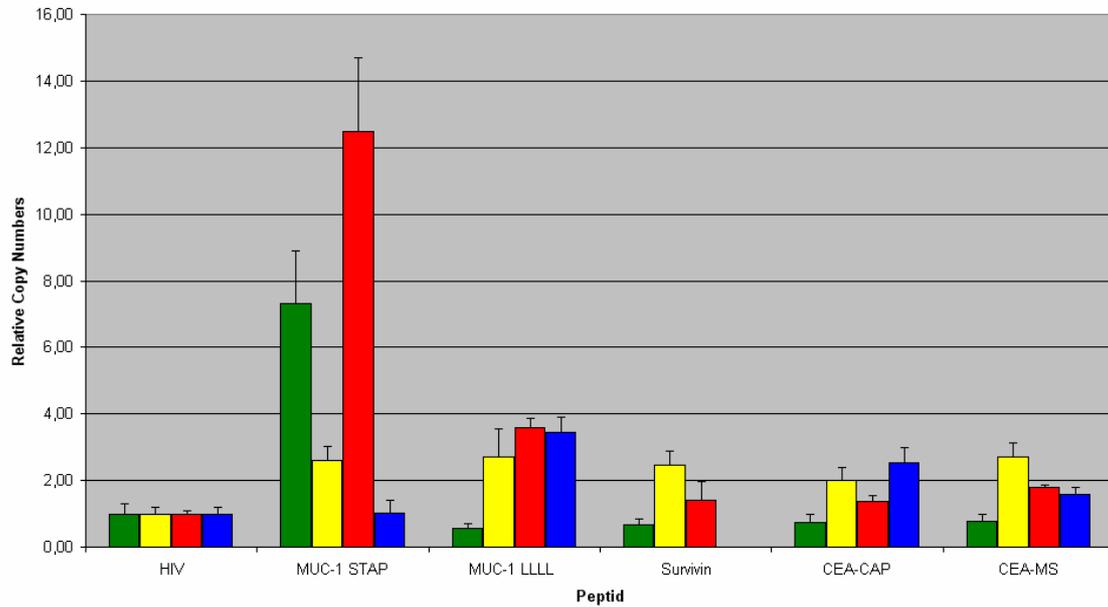


Abb. 56: RFA024 gemessen mit RT-PCR in Multiplex Detektion. Die Werte sind in relativen Kopienzahlen von HIV angegeben. Vor RF-Ablation (blau schraffiert), 1M (grün), 4M (gelb), 6M/1M (rot), 12M/7M (blau). Die relativen Kopienzahlen der Stimulationen mit den Zielpeptiden sind in Abbildung a, die der Positivkontrollen in anderer Skalierung in Abbildung b separat abgebildet.

(a)

RFA024



(b)

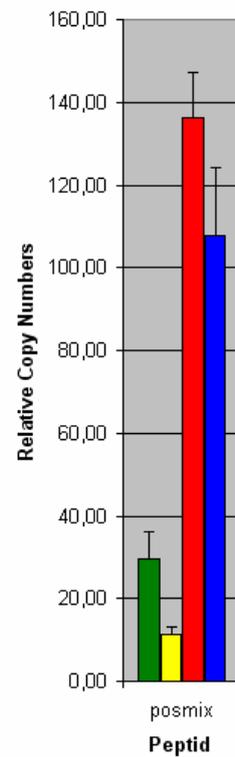


Abb. 57: RFA024 gemessen in Singleplex-PCR. Die Werte sind in relativen Kopienzahlen bezogen auf die Negativkontrolle HIV (=1 gesetzt) bezogen. Da die relativen Kopienzahlen der Proben, die mit der viralen Positivkontrolle (b) stimuliert worden waren, deutlich höher waren als die der Stimulationen mit den Epitopen (a), sind sie hier gesondert in anderer Skalierung abgebildet.

**Multiplex-PCR**

HLA	Peptid	Sequenz	vor RFA	4M	6M/1M
A*0201	MUC-1 STAP	STAPPVHNV	1,00	1,27	1,56
A*0201	MUC-1 LLLL	LLLLTVLTV	1,72	1,45	
A*0201	Survivin	ELTLGEFLKL	0,96	1,00	4,77
A*0201	CEA-CAP	YLSGANLNL	0,68	1,43	3,24
A*0201	CEA-MS	GVLVGVALI	2,26	2,33	
A*0201	Her2/neu	IISAVVGIL	1,90	0,55	1,22
A*0201	Her2/neu	KIFGSLAFL	0,71	1,29	
A*0201	Telomerase	ILAKFLHWL	1,20	1,39	0,97
A*0201	Telomerase	LMSVYVVEL	1,09	1,05	
A*0201	Positivkontrolle Pool A2		15,45	16,91	22,32
A*0201	Negativkontrolle HIV		1,00	1,00	1,00

**Singleplex-PCR**

HLA	Peptid	Sequenz	12M/7M	14M/9M/d0	15M/10M/1M
A*0201	MUC-1 STAP	STAPPVHNV	7,31	2,59	12,47
A*0201	MUC-1 LLLL	LLLLTVLTV	0,55	2,72	3,57
A*0201	Survivin	ELTLGEFLKL	0,67	2,45	1,41
A*0201	CEA-CAP	YLSGANLNL	0,74	2,02	1,37
A*0201	CEA-MS	GVLVGVALI	0,79	2,71	1,78
A*0201	Her2/neu	IISAVVGIL	n.t.	n.t.	2,58
A*0201	Her2/neu	KIFGSLAFL	n.t.	n.t.	3,51
A*0201	Telomerase	ILAKFLHWL	n.t.	n.t.	2,14
A*0201	Telomerase	LMSVYVVEL	n.t.	n.t.	2,86
A*0201	Positivkontrolle Pool A2		29,55	11,47	136,24
A*0201	Negativkontrolle HIV		1,00	1,00	1,00

HLA	Peptid	Sequenz	21M/16M/7M
A*0201	MUC-1 STAP	STAPPVHNV	1,03
A*0201	MUC-1 LLLL	LLLLTVLTV	3,43
A*0201	Survivin	ELTLGEFLKL	n.t.
A*0201	CEA-CAP	YLSGANLNL	2,52
A*0201	CEA-MS	GVLVGVALI	1,59
A*0201	Her2/neu	IISAVVGIL	n.t.
A*0201	Her2/neu	KIFGSLAFL	n.t.
A*0201	Telomerase	ILAKFLHWL	n.t.
A*0201	Telomerase	LMSVYVVEL	n.t.
A*0201	Positivkontrolle Pool A2		107,63
A*0201	Negativkontrolle HIV		1,00

Tab. 35: Messwerte in relativen Kopienzahlen normiert auf HIV als Negativkontrolle von RFA024. Der Patient erhielt drei Radiofrequenzablationen.

Sowohl im Tetramer-Staining als auch im ELISPOT konnten die in RT-PCR gemessenen Ergebnisse nicht reproduziert werden (Daten nicht gezeigt).

Beim Patienten RFA024 wurden drei Mal im Abstand von fünf, beziehungsweise neun Monaten Lebermetastasen eines Rectumcarcinoms hitzeokoaguliert. Bei Stimulation von PBMCs dieses Patienten zeigte sich eine deutlich erhöhte IFN $\gamma$ -Produktion gegen MUC-1 STAP ab 12 Monaten nach erster RF-Ablation. In der Probe nach 21 Monaten war die Reaktivität allerdings nicht mehr detektierbar.

Im Verlauf zeigten sich noch andere transiente Aktivitäten gegen einzelne Peptide (CEA-CAP, MUC-1 LLLL, die beiden Her2/neu Epitope und eines der Telomerase Epitope). Diese Antworten waren aber nur in einzelnen Proben zu messen.

Weder im Tetramer-Staining, im intrazellulären IFN $\gamma$ -Staining, noch im ELISPOT konnte die IFN $\gamma$ -Produktion reproduziert, beziehungsweise antigenspezifische T-Zellen gegen eines der Peptide nachgewiesen werden. Dies könnte damit zusammenhängen, dass die RT-PCR eine sensitivere Methode ist als ELISPOT, IFN $\gamma$ -Staining und Tetramer-Färbung. Da aber in

mehreren konsekutiven Proben eine IFN $\gamma$ -Produktion nach Stimulation mit MUC-1 STAP messbar war, ist es sehr wahrscheinlich, dass dieses Messergebnis kein Artefakt ist.

Die Positivkontrollen zeigten stets positive Messwerte, die in den letzten beiden untersuchten Proben deutlich höher waren als in den Proben zuvor. Dass die erhöhte Aktivität der Probe 15M/10M/1M nach Stimulation mit MUC-1 STAP eine Folge einer erhöhten Gesamtaktivität dieser Probe ist, ist ebenfalls unwahrscheinlich, da in der Probe 12M/7M bei relativ niedriger Positivkontrolle bereits eine deutliche Aktivität zu messen ist und in der Probe 21M/16M/7M bei sehr starker Positivkontrolle keine erhöhte Reaktivität gegen MUC-1 STAP messbar ist.

#### 6.2.4.2.13. RFA025:

Geschlecht:	♀
Alter:	80 Jahre
(bei Eintritt in die Studie)	
Primärtumor:	Nierenzellcarcinom, pT1 Nx M0
Metastasierung:	keine
Behandeltes Organ:	Niere
Anzahl RFAs:	1
Getestete Proben:	vor RF-Ablation nach RF-Ablation: 7 Monate, 16 Monate
Tests:	Quantitative IFN $\gamma$ -RT-PCR mit selektierten Peptiden nach einer Woche Prästimulation
Chemotherapie:	keine
Besonderheiten:	Z.n. Mammacarcinom und Z.n. benignem mesenchymalen Glutealtumor Kontralaterale Tumornephrektomie 14 Jahre vor RF- Ablation
Andere Tests innerhalb dieser Studie:	HSP70-ELISA gp96 Western Blot
Follow-up nach erster RF-Ablation:	16 Monate

Von dieser Patientin wurden drei PBMC-Proben untersucht. Sie wurden mit Peptiden stimuliert, die als HLA-A3-restringierte Liganden auf den Tumoren der Patienten RCC98 und RCC115 (siehe Kapitel 6.1.3.5. und 6.1.3.7.) gefunden worden waren.

Die drei Zeitpunkte waren über den gesamten Beobachtungszeitraum verteilt zwischen RF-Ablation und Ende des Follow-Up.

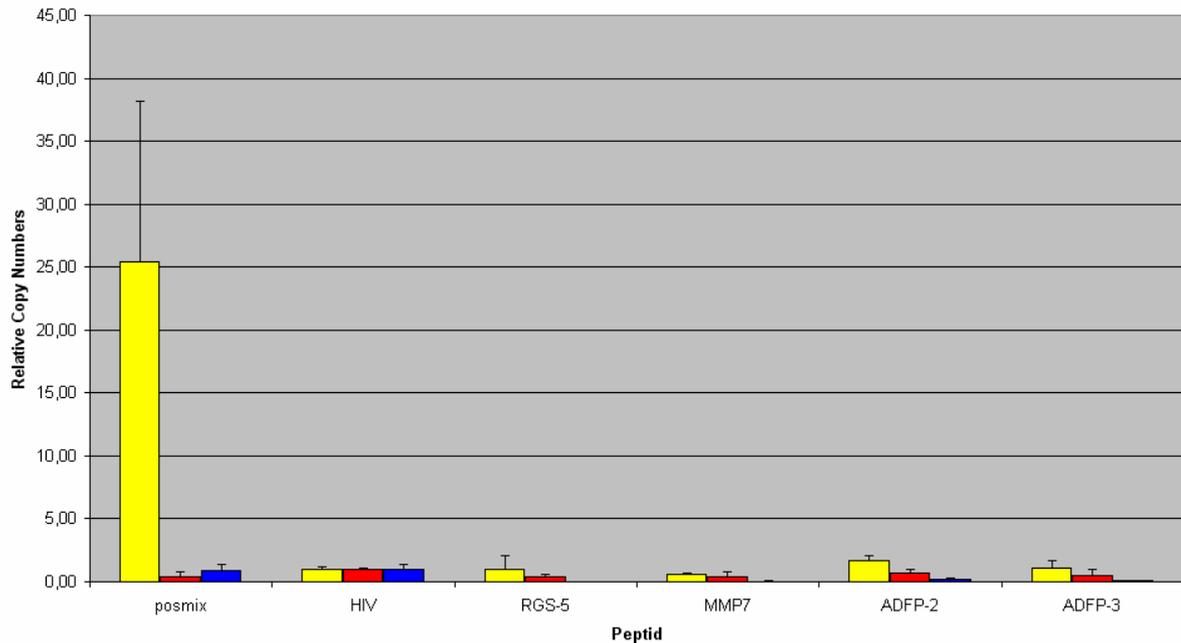


Abb. 58: Messwerte in relativen Kopienzahlen bezogen auf HIV (willkürlich = 1 gesetzt). Die Säulen sind wie folgt gefärbt: vor Therapie (gelb), 7 Monate nach RF-Ablation (rot) und 16 Monate nach RF-Ablation (blau).

HLA	Peptid	Sequenz	vor RFA	7M	16M
A*03	RGS-5	GLASFKSFLK	1,02	0,44	0,03
A*03	MMP7	SLFPNSPKWTSK	0,58	0,41	0,05
A*03	ADFP-2	SLLTSSKGQLQK	1,64	0,67	0,22
A*03	ADFP-3	TSALPIIQK	1,07	0,52	0,07
A*03	Positivkontrolle: Pool A3		25,46	0,36	0,85
A*03	Negativkontrolle: HIV		1,00	1,00	1,00

Tab. 36: Messwerte in relativen Kopienzahlen bezogen auf HIV der Proben der Patientin RFA025. Positive Messergebnisse sind grün, negative rot gedruckt.

Zellen der Patientin RFA025, die an einem Nierenzellcarcinom litt, wurden mit Peptiden untersucht, die auf den autologen Tumorzellen der beiden Impfpatienten RCC98 und RCC115 als HLA-Liganden gefunden wurden. Über diese Peptide war primär nicht bekannt, ob es sich dabei auch um T-Zell-Epitope handelte. Die Messwerte der Patienten RCC98 und RFA048 sprechen allerdings dafür (siehe Kapitel 6.1.2.7. und 6.2.4.2.19.).

Zellen der Patientin zeigten keine erhöhte IFN $\gamma$ -Produktion nach Stimulation mit diesen Peptiden. Auch die Stimulation mit der viralen Positivkontrolle zeigte nur in der ersten Probe vor RFA ein positives Ergebnis.

Interessant an dieser Patientin ist ihr frühes Tumorstadium. Durch die Radiofrequenzablation wurde der Tumor komplett zerstört. In den Folgeuntersuchungen wurden kein vitales Resttumorgewebe und kein Lokalrezidiv gefunden. Möglicherweise konnte keine weitere Stimulation des Immunsystems stattfinden, weil kein Tumor mehr vorhanden war, dessen Oberflächenstrukturen eine spezifische Immunantwort auslösen könnten.

#### 6.2.4.2.14. RFA026:

Geschlecht: ♀  
Alter: 61 Jahre  
(bei Eintritt in die Studie)  
Primärtumor: Sigmacarcinom, pT3 pN0 pM1 (Hepar) G2  
Metastasierung: Leber  
Behandeltes Organ: Leber  
Anzahl RFAs: 4 (Intervall 1 Monat, 6 Monate, 6 Monate)  
Getestete Proben: vor RF-Ablation  
nach RF-Ablation: 1M, 6M, 8M, 11M/10M/4M,  
13M/12M/6M/d0,  
14M/13M/7M/1M,  
17M/16M/10M/4M,  
20M/19M/13M/7M  
Tests: Quantitative IFN $\gamma$ -RT-PCR mit selektierten Peptiden  
nach einer Woche Prästimulation  
Tetramer-Staining mit einer Woche Prästimulation  
Kombiniertes Tetramer- und IFN $\gamma$ -Staining mit einer  
Woche Prästimulation  
IFN $\gamma$ -ELISPOT nach einer Woche Prästimulation  
Chemotherapie: 3 Monate vor 1. RF-Ablation bis 2 Monate nach 1.  
und 1 Monat nach 2. RF-Ablation: 8 Zyklen FOLFOX  
Besonderheiten: keine  
Andere Tests innerhalb dieser Studie: HSP70-ELISA  
Follow-up nach erster RF-Ablation: 23 Monate

Diese Patientin litt an einem Sigmacarcinom und wurde vier Mal an Lebermetastasen mit Radiofrequenzablation behandelt. Getestet wurden neun PBMC Proben mit quantitativer RT-PCR (getrenntes Setup), kombiniertem Tetramer- und IFN $\gamma$ -Staining und ELISPOT.

HLA	Peptid	Sequenz	vor RFA	1M	6M
A*0201	MUC-1 STAP	STAPPVHNV			
A*0201	MUC-1 LLLL	LLLLTVLTV	2,26	2,57	4,89
A*0201	Survivin	ELTLGEFLKL	0,86	mit Her2/neu	mit Her2/neu
A*0201	CEA-CAP	YLSGANLNL			
A*0201	CEA-MS	GVLVGVALI	0,96	1,11	1,80
A*0201	Her2/neu	IISAVVGIL			
A*0201	Her2/neu	KIFGSLAFL	0,97	1,11	1,97
A*0201	Telomerase	ILAKFLHWL			
A*0201	Telomerase	LMSVYVVEL	1,51	1,51	4,39
A*0201	Positivkontrolle Pool A2		7,01	14,12	11,08
A*0201	Negativkontrolle HIV		1,00	1,00	1,00

HLA	Peptid	Sequenz	8M	11M/10M/4M	13M/12M/6M/d0
A*0201	MUC-1 STAP	STAPPVHNV			
A*0201	MUC-1 LLLL	LLLLTVLTV	0,66	1,75	3,01
A*0201	Survivin	ELTLGEFLKL	mit Her2/neu	0,33	1,28
A*0201	CEA-CAP	YLSGANLNL			
A*0201	CEA-MS	GVLVGVALI	0,48	n.t.	n.t.
A*0201	Her2/neu	IISAVVGIL			
A*0201	Her2/neu	KIFGSLAFL	0,49	n.t.	n.t.
A*0201	Telomerase	ILAKFLHWL			
A*0201	Telomerase	LMSVYVVEL	0,29	0,62	0,55
A*0201	Positivkontrolle Pool A2		3,07	144,01	131,14
A*0201	Negativkontrolle HIV		1,00	1,00	1,00

HLA	Peptid	Sequenz	14M/13M/7M/1M	17M/16M/10M/4M	20M/19M/13M/7M
A*0201	MUC-1 STAP	STAPPVHNV	118,60	0,71	1,20
A*0201	MUC-1 LLLL	LLLLTVLTV	4,42	0,68	1,39
A*0201	Survivin	ELTLGEFLKL	1,54	0,63	0,80
A*0201	CEA-CAP	YLSGANLNL	1,74	1,21	0,47
A*0201	CEA-MS	GVLVGVALI	1,23	0,84	2,67
A*0201	Her2/neu	IISAVVGIL	n.t.	n.t.	1,59
A*0201	Her2/neu	KIFGSLAFL	n.t.	n.t.	0,64
A*0201	Telomerase	ILAKFLHWL	1,17	1,11	0,91
A*0201	Telomerase	LMSVYVVEL	1,13		1,09
A*0201	Positivkontrolle Pool A2		222,86	8,17	1640,59
A*0201	Negativkontrolle HIV		1,00	1,00	1,00

Tab. 37: Messwerte der RT-PCR RFA026 angegeben in relativen Kopienzahlen normiert auf die Negativkontrolle HIV. Positive Messergebnisse sind grün, negative rot gedruckt.

Die Patientin zeigte zunächst keine Reaktivität gegen die eingesetzten Epitope. Einen Monat nach 4. Radiofrequenzablation zeigte sich dann eine sehr starke Antwort gegen das MUC-1 Epitop STAPPVHNV. Diese Reaktivität war im intrazellulären IFN $\gamma$ -Staining reproduzierbar. Im IFN $\gamma$ -ELISPOT konnte diese Reaktivität gegen MUC-1 STAP nicht detektiert werden.

## RFA026

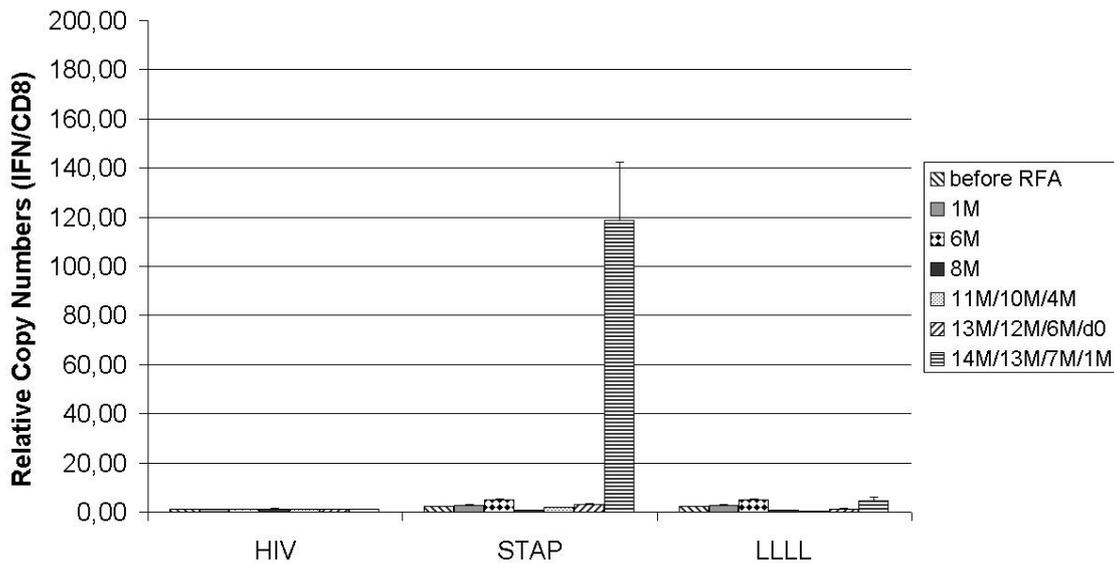


Abb. 59: Aufgetragen sind relative Kopienzahlen bezogen auf die Negativkontrolle HIV. Die Daten für die übrigen untersuchten T-Zell-Epitope sind nicht gezeigt, weil die gesamten Ergebnisse eindeutig negativ waren.

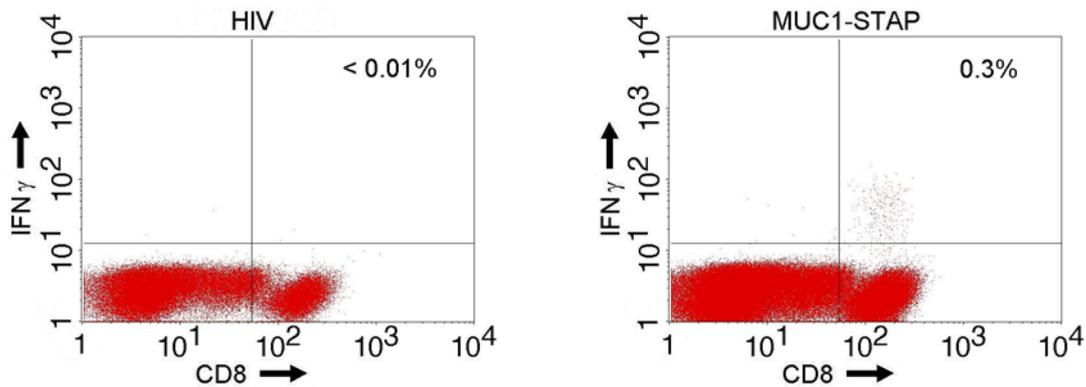


Abb. 60a: Intrazelluläres  $\text{IFN}\gamma$ -Staining der Probe 14M/13M/7M/1M nach Stimulation mit irrelevantem Peptid (HIV). Die angegebenen Prozentwerte sind der Anteil der Zellen an der Gesamtzahl der  $\text{CD8}^+$  Zellen, die eine  $\text{IFN}\gamma$ -Produktion zeigten.

Abb. 60b: Intrazelluläres  $\text{IFN}\gamma$ -Staining der Probe 14M/13M/7M/1M nach Stimulation mit relevantem Peptid (MUC-1 STAP). Die angegebenen Prozentwerte sind der Anteil der Zellen an der Gesamtzahl der  $\text{CD8}^+$  Zellen, die eine  $\text{IFN}\gamma$ -Produktion zeigten.

In den beiden letzten untersuchten Proben war diese Antwort allerdings nicht mehr detektierbar.

Die positiven Messergebnisse der Proben 6M und 14M/13M/7M/1M konnten im ELISPOT nicht reproduziert werden.

Die Patientin RFA026 wurde vier Mal an Lebermetastasen eines Sigmacarcinoms behandelt. Sie ist der zweite Patient, der sowohl in quantitativer IFN $\gamma$ -RT-PCR als auch im intrazellulären IFN $\gamma$ -Staining eine deutliche Reaktivität bei Stimulation ihrer PBMCs mit MUC-1 STAP zeigte. Die Antwort war stark messbar in der Probe, die einen Monat nach vierter RF-Ablation abgenommen wurde. Vorher waren immer wieder schwächere Reaktivitäten gegen dieses Peptid gemessen worden. Es scheint, dass die vierte Ablation eine Art Booster-Effekt für diese Immunantwort hatte. Drei Monate nach der Probe, die die starke Antwort gezeigt hatte, war keine erhöhte IFN $\gamma$ -Produktion mehr messbar.

Die Zellen sprachen grundsätzlich auf die virale Positivkontrolle an. Sie fiel von den relativen Kopienzahlen her allerdings deutlich unterschiedlich aus. Die Stärke der Positivkontrollen korrelierte aber nicht mit den Antworten gegen MUC-1 STAP.

#### 6.2.4.2.15. RFA027:

Geschlecht:	♂
Alter:	61 Jahre
(bei Eintritt in die Studie)	
Primärtumor:	Colonicarcinom, pT3 pN1 M1 (Hepar) G2
Metastasierung:	Leber
Behandeltes Organ:	Leber
Anzahl RFAs:	1
Getestete Proben:	vor RF-Ablation nach RF-Ablation: 1 Monat, 4 Monate
Tests:	Quantitative IFN $\gamma$ -RT-PCR mit selektierten Peptiden nach einer Woche Prästimulation in Multiplex-PCR
Chemotherapie:	6 Monate vor bis zur RF-Ablation: 3 Zyklen FOLFOX Abbruch wegen Thrombopenie
Besonderheiten:	keine
Andere Tests innerhalb dieser Studie:	HSP70-ELISA
Follow-up nach erster RF-Ablation:	4 Monate (Exitus letalis 9 Monate nach RF-Ablation)

Von diesem Patienten wurden drei PBMC-Proben in Multiplex RT-PCR untersucht.

HLA	Peptid	Sequenz	vor RFA	1M	4M
A*0201	MUC-1 STAP	STAPPVHNV	2,62	0,45	3,40
A*0201	MUC-1 LLLL	LLLLTVLTV			
A*0201	Survivin	ELTLGEFLKL	1,68	1,07	1,71
A*0201	CEA-CAP	YLSGANLNL	1,56	0,57	1,44
A*0201	CEA-MS	GVLVGVALI			
A*0201	Her2/neu	IISAVVGIL	2,11	1,13	0,86
A*0201	Her2/neu	KIFGSLAFL			
A*0201	Telomerase	ILAKFLHWL	2,17	0,32	0,45
A*0201	Telomerase	LMSVYVVEL			
A*0201	Positivkontrolle Pool A2		27,00	1,31	1,78
A*0201	Negativkontrolle HIV		1,00	1,00	1,00

Tab. 38: Messwerte RFA027 gemessen in Multiplex-PCR. Angegeben sind relative Kopienzahlen normiert auf die Negativkontrolle HIV (gesetzt = 1). Negative Messergebnisse sind rot, positive grün angegeben.

Die hepatischen Metastasen des Patienten RFA027 mit Colocarzinom wurden einmal mit RF-Ablation behandelt.

Der Patient zeigte in allen Proben nur äußerst geringe antigenspezifische T-Zell-Reaktivität gegen eines der eingesetzten Peptide, aber in den Proben nach Radiofrequenzablation keine Antwort gegen die virale Positivkontrolle. Die relativen Kopienzahlen waren im Vergleich in der Probe vor Therapie und in der Probe nach Therapie nicht unterschiedlich; es war also keine Aktivitätsvermehrung durch die Therapie detektierbar.

Da von dem Patienten keine späteren Proben abgenommen wurden und der Patient 9 Monate nach Radiofrequenzablation verstarb, konnten auch keine weiteren Untersuchungen vorgenommen werden.

#### 6.2.4.2.16. RFA031:

Geschlecht: ♂  
Alter: 56 Jahre  
(bei Eintritt in die Studie)  
Primärtumor: Hepatozelluläres Carcinom, pTX pN0 M0 G1  
Metastasierung: keine  
Behandeltes Organ: Leber  
Anzahl RFAs: 1  
Getestete Proben: vor RF-Ablation  
nach RF-Ablation: 4 Monate, 7 Monate  
Tests: Quantitative IFN $\gamma$ -RT-PCR mit selektierten Peptiden  
nach einer Woche Prästimulation  
Chemotherapie: keine  
Besonderheiten: AFP im Normbereich  
Andere Tests innerhalb dieser Studie: HSP70-ELISA  
Follow-up nach erster RF-Ablation: 20 Monate

Dieser Patient litt an einem Hepatozellulären Carcinom. Es bestand ein chronischer C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>-OH-Abusus. Untersucht wurden drei Proben von PBMCs.

HLA	Peptid	Sequenz	vor RFA	4M	7M
A*0201	MUC-1 STAP	STAPPVHNV	1,11	0,80	1,13
A*0201	MUC-1 LLLL	LLLLTVLTV	1,17		
A*0201	MAGE-1	KLLEYVIKV	1,11	mit CEA	1,29
A*0201	Survivin	ELTLGEFLKL	1,84	1,03	2,11
A*0201	Keratin-18	ALLNIKVKL	0,77		
A*0201	Met.	YVDPVITSI	1,38		
A*0201	CEA-CAP	YLSGANLNL	1,07	2,08	2,29
A*0201	CEA-MS	GVLVGVALI			
A*0201	Telomerase	ILAKFLHWL	0,93	1,43	1,41
A*0201	Telomerase	LMSVYVVEL	0,86		
A*0201	HCV PolIG	KLVALGINAV	2,03	0,85	1,44
A*0201	HCV NS1	SLLAPGAKQNV			
A*0201	HCV Core	DLMGYIPLV			
A*0201	AFP 137	PLFQVPEPV	1,28	1,15	1,40
A*0201	AFP 158	FMNKFIYEI			
A*0201	AFP 325	GLSPNLNRFL			
A*0201	AFP 542	GVALQTMKQ			
A*0201	Positivkontrolle Pool A2		39,81	20,46	195,36
A*0201	Negativkontrolle HIV		1,00	1,00	1,00

Tab. 39: Messwerte in relativen Kopienzahlen bezogen auf HIV als Negativkontrolle (= 1 gesetzt) des Patienten RFA031.

Das Hepatozelluläre Carcinom des Patienten wurde einmal mit RF-Ablation behandelt. Untersucht wurden PBMCs zu drei Zeitpunkten vor RF-Ablation, sowie vier und sieben Monate nach Therapie.

In allen drei Proben konnte keine spezifische Aktivierung antigenspezifischer T-Zellen nachgewiesen werden. Einige relative Kopienzahlen lagen knapp über zwei. Diese leicht erhöhte Amplifikation war aber in der jeweils folgenden Probe nicht mehr nachweisbar oder war nicht erhöht gegenüber der Probe vor Therapie und ist somit nicht als wirklich positiv zu werten. Eine Aktivitätszunahme war nach RF-Ablation nicht zu beobachten.

Die Zellen, die mit der Mischung viraler Epitope als Positivkontrolle stimuliert worden waren, zeigten jeweils eine deutliche IFN $\gamma$ -Produktion.

Aufgrund fehlender Reaktivität wurde auf weitere Versuche mit Zellen dieses Patienten verzichtet.

#### 6.2.4.2.17. RFA046:

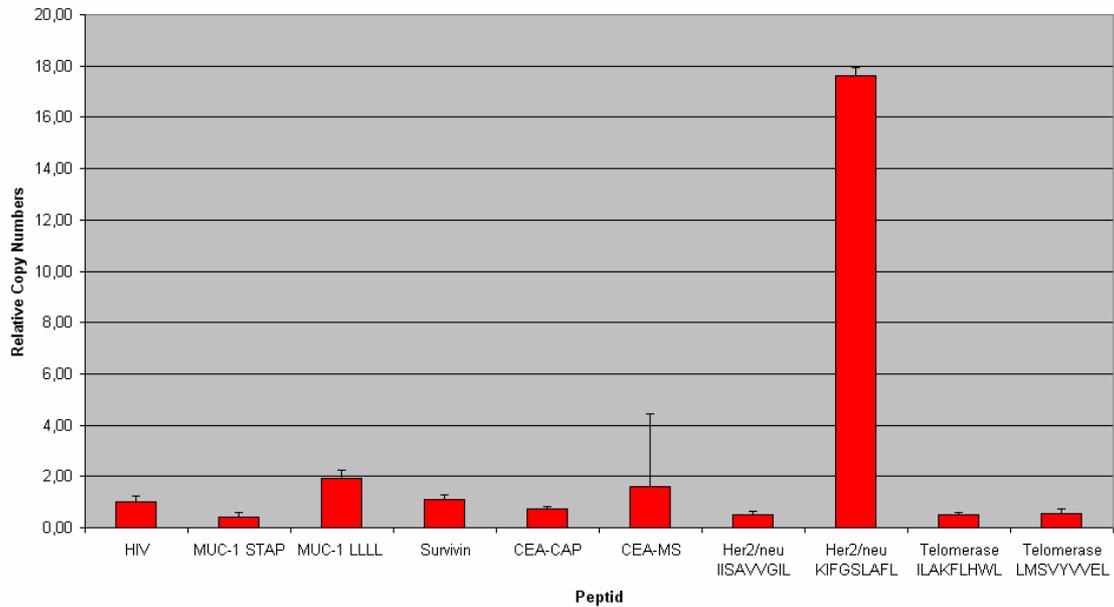
Geschlecht:	♂
Alter:	67 Jahre
(bei Eintritt in die Studie)	
Primärtumor:	Coloncancer
Metastasierung:	Leber
Behandeltes Organ:	Leber
Anzahl RFAs:	1
Getestete Proben:	vor RF-Ablation nicht getestet nach RF-Ablation: 12 Monate
Tests:	Quantitative IFN $\gamma$ -RT-PCR mit selektierten Peptiden nach einer Woche Prästimulation
Chemotherapie:	Chemotherapie zum Zeitpunkt der RF-Ablation
Besonderheiten:	keine
Andere Tests innerhalb dieser Studie:	HSP70-ELISA
Follow-up nach erster RF-Ablation:	14 Monate

Dieser Patient litt an einem colorectalen Carcinom. Es wurden Lebermetastasen mit Radiofrequenzablation behandelt.

Die Probe ein Jahr nach Therapie wurde frisch getestet. Daher wurden bislang keine früheren Proben untersucht.

(a)

RFA046



(b)

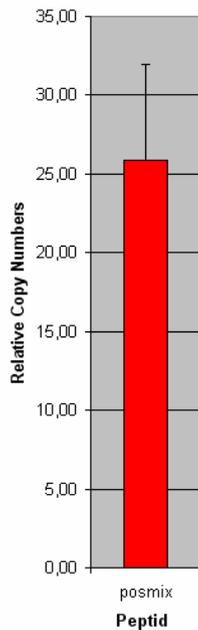


Abb. 61: RT-PCR von Patient RFA046. Auf der y-Achse sind relative Kopienzahlen aufgetragen, die auf die Negativkontrolle HIV normiert wurden (HIV willkürlich = 1,00 gesetzt). Die gezeigte Probe ist die 12 Monate nach Radiofrequenzablation. Zur besseren Übersichtlichkeit ist die Positivkontrolle (b), bei der eine höhere relative Kopienzahl gemessen wurde, in anderer Skalierung separat abgebildet. Die relativen Kopienzahlen der Stimulationen mit den Zielpeptiden sind in Abbildung a abgebildet.

HLA	Peptid	Sequenz	12M
A*0201	MUC-1 STAP	STAPPVHNV	<b>0,43</b>
A*0201	MUC-1 LLLL	LLLLTVLTV	<b>1,94</b>
A*0201	Survivin	ELTLGEFLKL	<b>1,09</b>
A*0201	CEA-CAP	YLSGANLNL	<b>0,71</b>
A*0201	CEA-MS	GVLVGVALI	<b>1,61</b>
A*0201	Her2/neu	IISAVVGIL	<b>0,51</b>
A*0201	Her2/neu	KIFGSLAFL	<b>17,63</b>
A*0201	Telomerase	ILAKFLHWL	<b>0,52</b>
A*0201	Telomerase	LMSVYVVEL	<b>0,56</b>
A*0201	Positivkontrolle Pool A2		<b>25,90</b>
A*0201	Negativkontrolle HIV		<b>1,00</b>

Tab. 40: Messwerte der RT-PCR von RFA046 angegeben in relativen Kopienzahlen. Die Werte sind normiert auf die Negativkontrolle HIV (gesetzt als 1,00). Positive Messergebnisse sind grün, negative rot gedruckt.

Versuche zur Reproduktion und Bestätigung der Ergebnisse werden noch durchgeführt.

Der Patient zeigte eine deutliche Reaktivität gegen die virale Positivkontrolle und eine deutliche Antwort gegen das Her2/neu Epitop KIFGSLAFL, gegen das auch schon bei RFA015 und RFA047 eine antigenspezifische CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort detektierbar war.

Mit einer relativen Kopienzahl von 17,63 in Singleplex RT-PCR war diese Antwort die bislang stärkste gegen dieses Epitop, die in allen Versuchen gemessen wurde.

Die Stimulation mit der Mischung aus viralen T-Zell-Epitopen als Positivkontrolle bewirkte eine IFN $\gamma$ -Produktion antigenspezifischer T-Zellen. Der gemessene Wert der Positivkontrolle war mit einer relativen Kopienzahl von 25,9 höher als die Messwerte der übrigen Proben und ebenfalls höher als die Messwerte der als positiv getesteten Probe, die mit dem Her2/neu Epitop KIFGSLAFL stimuliert worden war.

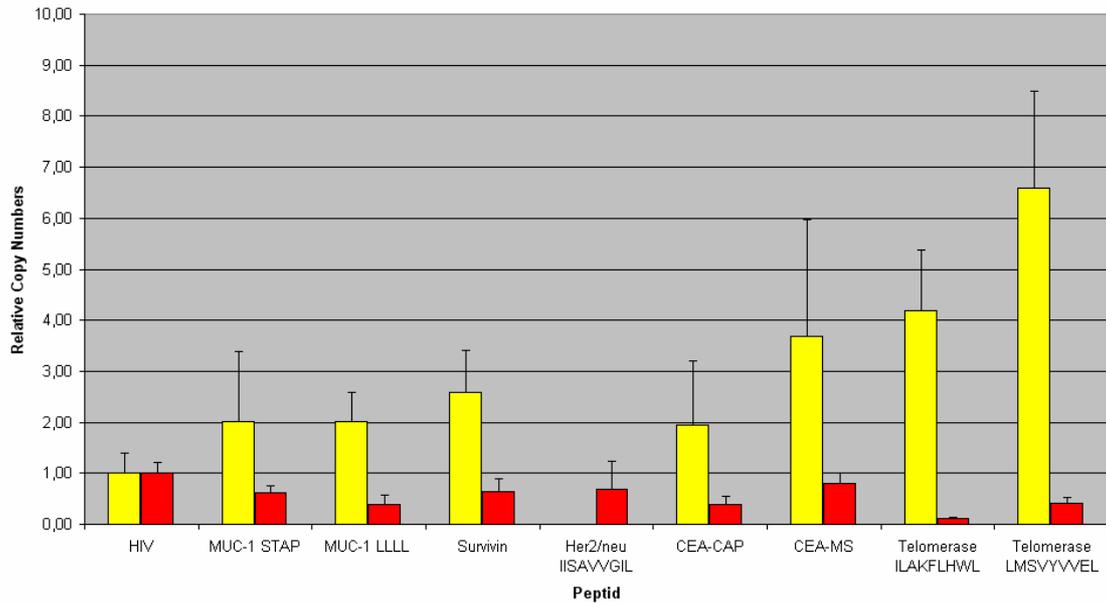
#### 6.2.4.2.18. RFA047:

Geschlecht:	♂
Alter:	64 Jahre
(bei Eintritt in die Studie)	
Primärtumor:	Rectumcarcinom, pT3 pN2 (7/14) M0 G2
Metastasierung:	Leber
Behandeltes Organ:	Leber
Anzahl RFAs:	2 (Intervall 3 Monate)
Getestete Proben:	vor RF-Ablation nach RF-Ablation: 4M/1M, 10M/7M
Tests:	Quantitative IFN $\gamma$ -RT-PCR mit selektierten Peptiden nach einer Woche Prästimulation Kombiniertes Tetramer- und IFN $\gamma$ -Staining IFN $\gamma$ -ELISPOT
Chemotherapie:	10 Monate bis 9 Monate vor RF-Ablation: adjuvante Radiochemotherapie (FOLFOX) Chemotherapie zum Zeitpunkt der RF-Ablation (FOLFOX)
Besonderheiten:	keine
Andere Tests innerhalb dieser Studie:	HSP70-ELISA
Follow-up nach erster RF-Ablation:	13 Monate

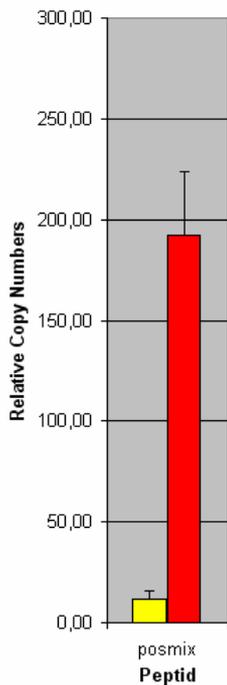
Von Patient RFA047 wurden drei PBMC-Proben mit RT-PCR untersucht. Die Proben vor RF-Ablation und 4M/1M waren cryoasserviert, die dritte Probe wurde frisch getestet.

(a)

RFA047



(b)



(c)

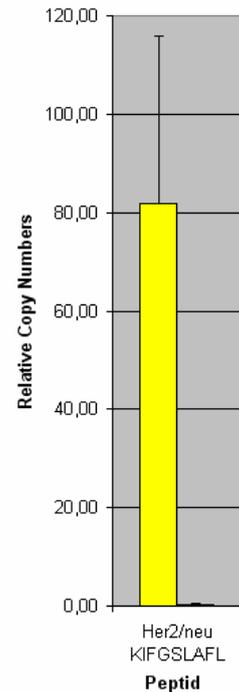
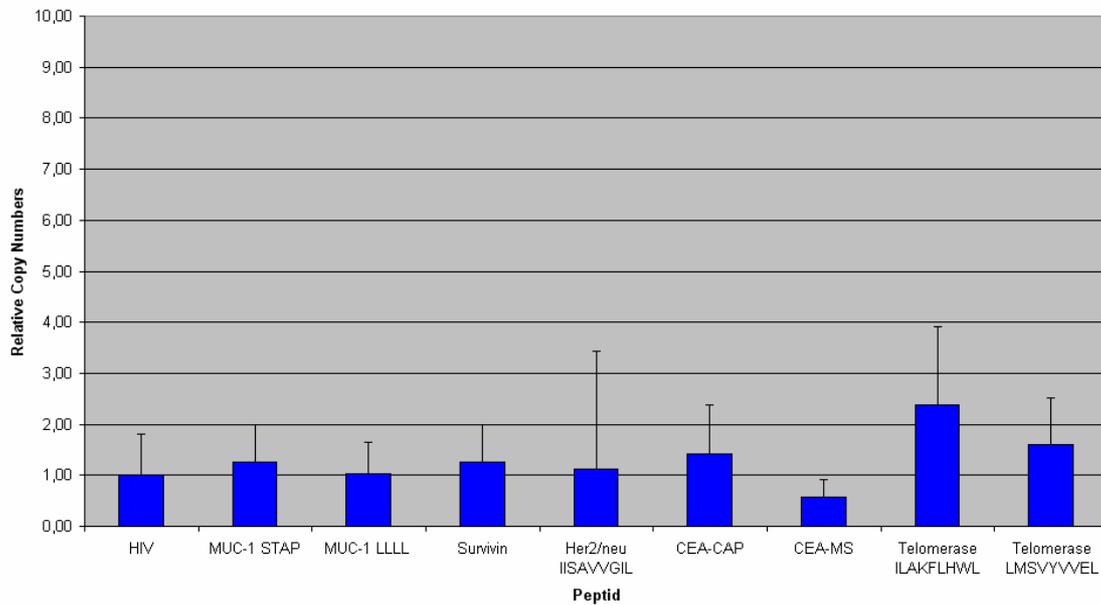


Abb. 62: Diagramm der relativen Kopienzahlen bezogen auf die Negativkontrolle HIV (willkürlich = 1 gesetzt) des Patienten RFA047. Da die relativen Kopienzahlen der Positivkontrollen und der Her2/neu Epitops KIFGSLAFL die der anderen Proben deutlich übersteigen, sind diese beiden hier separat in anderer Skalierung abgebildet. Die Positivkontrollen finden sich in Abbildung (b), das Her2/neu Epitop KIFGSLAFL in Abbildung (c). Die übrigen eingesetzten Peptide finden sich in Diagramm (a). Die Farben der Säulen sind wie folgt: Vor RF-Ablation (gelb) und 4M/1M (rot).

(a)

RFA047



(b)

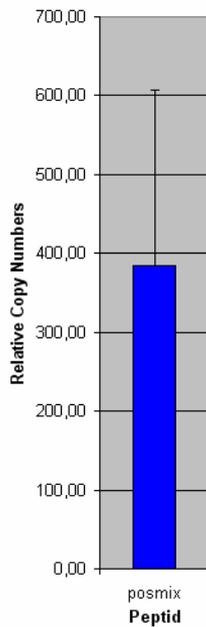
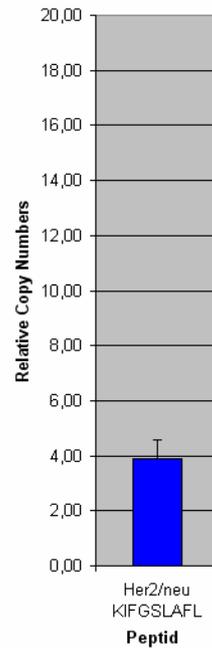


Abb. 63: Diagramm der relativen Kopienzahlen bezogen auf die Negativkontrolle HIV. Darstellung in blauen Säulen der Probe 10M/7M. Die einzelnen Peptide finden sich in Abbildung a, die Positivkontrollen sind der besseren Übersicht halber in anderer Skalierung gesondert abgebildet (Abbildung b). Der Vergleichbarkeit wegen mit der Abbildung der Proben vor RF-Ablation und 4M/1M ist das Her2/neu Epitop KIFGSLAFL ebenfalls gesondert abgebildet (Abbildung c).

(c)



HLA	Peptid	Sequenz	vor RFA	4M/1M	10M/7M
A*0201	MUC-1 STAP	STAPPVHNV	2,01	0,62	1,26
A*0201	MUC-1 LLLL	LLLLTVLTV	2,01	0,39	1,04
A*0201	Survivin	ELTLGEFLKL	2,58	0,65	1,25
A*0201	Her2/neu	KIFGSLAFL	81,86	0,28	3,88
A*0201	Her2/neu	IISAVVGIL	n.t.	0,69	1,13
A*0201	CEA-CAP	YLSGANLNL	1,95	0,39	1,43
A*0201	CEA-MS	GVLVGVALI	3,69	0,80	0,56
A*0201	Telomerase	ILAKFLHWL	4,18	0,10	2,38
A*0201	Telomerase	LMSVYVVEL	6,59	0,42	1,60
A*0201	Positivkontrolle Pool A2		11,35	192,00	384,01
A*0201	Negativkontrolle HIV		1,00	1,00	1,00

Tab. 41: Messwerte in relativen Kopienzahlen bezogen auf die Negativkontrolle HIV des Patienten RFA047. Positive Messergebnisse sind grün, negative rot gedruckt.

Der Patient zeigte vor RF-Ablation eine starke Antwort nach Stimulation mit dem Her2/neu Epitop KIFGSLAFL.

Dieser Patient ist der einzige, der bereits vor RF-Ablation eine Reaktivität gegen eines der Peptide zeigte (in diesem Fall gegen das Her2/neu-Epitop KIFGSLAFL). Eine schwache Reaktivität gegen dieses Peptid zeigte sich auch wieder in der Probe 10M/7M. Das Verschwinden von einmal detektierten Immunantworten ist ein bekanntes Phänomen. Siehe dazu die Diskussion.

#### 6.2.4.2.19. RFA048:

Geschlecht:	♂
Alter:	62 Jahre
(bei Eintritt in die Studie)	
Primärtumor:	Nierenzellcarcinom
Metastasierung:	keine
Behandeltes Organ:	Niere
Anzahl RFAs:	1
Getestete Proben:	vor RF-Ablation
	nach RF-Ablation: 10 Monate
Tests:	Quantitative IFN $\gamma$ -RT-PCR mit selektierten Peptiden
	nach einer Woche Prästimulation
Chemotherapie:	keine
Besonderheiten:	keine
Andere Tests innerhalb dieser Studie:	keine
Follow-up nach erster RF-Ablation:	13 Monate

Zellen dieses Patienten wurden mit HLA-A3 restringierten Liganden getestet, die individuell auf dem Tumor des Patienten RCC98 gefunden worden waren. Eines dieser Peptide (RGS-5) hatte in diesem Patienten eine starke, ansteigende spezifische T-Zell-Antwort induziert.

RFA048

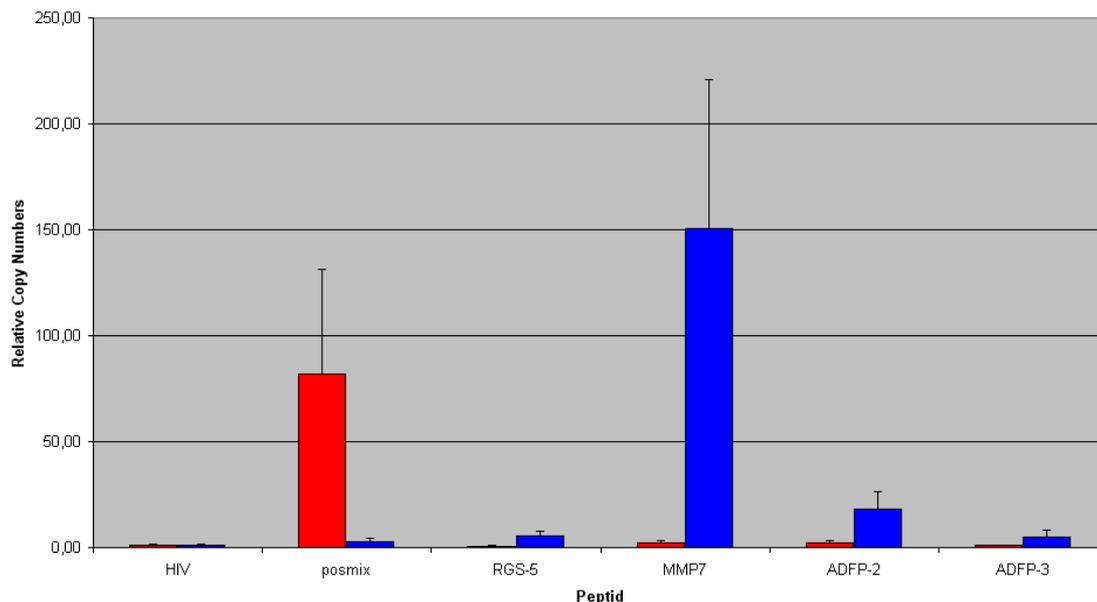


Abb. 64: RT-PCR des Patienten RFA048. Aufgetragen auf der y-Achse sind relative Kopienzahlen bezogen auf die Negativkontrolle HIV. Untersucht wurde die Reaktivität antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die mit Peptiden stimuliert wurden, die auf dem Nierenzellcarcinom des Impfpatienten RCC98 als HLA-A3-restringierte Liganden identifiziert wurden (siehe Kapitel 6.1.2.7.).

Rote Säulen bezeichnen die Probe vor Radiofrequenzablation, blaue Säulen die Probe zehn Monate nach Therapie.

HLA	Peptid	Sequenz	vor RFA	10M
A*03	RGS-5	GLASFKSFLK	0,74	5,35
A*03	MMP7	SLFPNSPKWTSK	2,13	150,64
A*03	ADFP-2	SLLTSSKGQLQK	2,06	18,13
A*03	ADFP-3	TSALPIIQK	0,83	4,68
A*03	Positivkontrolle: Pool A2		82,14	2,70
A*03	Negativkontrolle: HIV		1,00	1,00

Tab. 42: Messwerte des Patienten RFA048 in relativen Kopienzahlen bezogen auf die Negativkontrolle HIV. Positive Messergebnisse sind grün, negative rot gedruckt.

Versuche zur Reproduktion der Ergebnisse werden noch durchgeführt.

Das primäre Nierenzellcarcinom wurde einmal mit RF-Ablation behandelt. Der Patient wurde danach 13 Monate nachverfolgt. Resttumor konnte bisher nicht nachgewiesen werden, auch kam es zu keinem Rezidiv.

Die eingesetzten Peptide waren auf einem spindelzelligen, pleomorphen Nierenzellcarcinom mit sarkomatoider, teils klarzelliger Komponente des Impfpatienten RCC98 als HLA-A3-restringierte Liganden gefunden worden. Im Patienten RCC98 war eine zunehmende Aktivierung antigenspezifischer T-Zellen gegen RGS-5 messbar gewesen (siehe Kapitel 6.1.2.7.).

Der hier untersuchte Patient RFA048 zeigte vor Radiofrequenzablation jeweils eine geringe Antwort gegen MMP-7 und ADFP SLLTSSKGQLQK und eine deutliche Antwort gegen die virale Positivkontrolle. Zehn Monate nach Therapie war die Antwort gegen die Positivkontrolle deutlich schwächer ausgeprägt. Hier konnten aber deutliche Reaktivitäten antigenspezifischer T-Zellen gegen alle eingesetzten Peptide detektiert werden, am deutlichsten aber gegen MMP7.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass es sich bei den eingesetzten HLA-Liganden nicht nur um Liganden, sondern um T-Zell-Epitope handelt. In zwei Patienten (RCC98, RFA048) konnte jetzt eine verstärkte IFN $\gamma$ -Produktion nach Stimulation mit diesen Peptiden gemessen werden.

#### 6.2.4.2.20. RFA054:

Geschlecht:	♂
Alter:	66 Jahre
(bei Eintritt in die Studie)	
Primärtumor:	Hepatozelluläres Carcinom, pT1 pNX MX
Metastasierung:	unbekannt (MX)
Behandeltes Organ:	Leber
Anzahl RFAs:	1
Getestete Proben:	vor RF-Ablation nicht getestet nach RF-Ablation: 1 Monat, 4 Monate, 8 Monate
Tests:	Quantitative IFN $\gamma$ -RT-PCR mit selektierten Peptiden nach einer Woche Prästimulation
Chemotherapie:	keine
Besonderheiten:	Z.n. Lebertransplantation nach nutritiv-toxischer Leberzirrhose und Hepatozellulärem Carcinom Rezidiv-HCC in der Transplantatleber Immunsuppression AFP-Anstieg
Andere Tests innerhalb dieser Studie:	keine
Follow-up nach erster RF-Ablation:	11 Monate

Dieser Patient mit Hepatozellulärem Carcinom ist HCV-negativ. Er zeigte aber trotzdem eine transiente leichte Antwort gegen Peptide aus HCV und AFP, die aber in der folgenden Probe nicht mehr nachweisbar waren.

Es wurden keine weiteren Versuche durchgeführt.

HLA	Peptid	Sequenz	1M	4M	8M
A*0201	MUC-1 STAP	STAPPVHNV	0,66	1,27	1,05
A*0201	MUC-1 LLLL	LLLLTVLTV	0,85		1,14
A*0201	MAGE-1	KLLEYVIKV	1,69	1,33	1,01
A*0201	Survivin	ELTLGEFLKL	0,17		1,93
A*0201	Keratin-18	ALLNIKVKL	0,74		1,36
A*0201	Met.	YVDPVITSI			
A*0201	CEA-CAP	YLSGANLNL	0,83	1,89	1,32
A*0201	CEA-MS	GVLVGVALI			
A*0201	Telomerase	ILAKFLHWL	0,47		0,97
A*0201	Telomerase	LMSVYVVEL			
A*0201	HCV PolG	KLVALGINAV			
A*0201	HCV NS1	SLLAPGAKQNV	0,98	3,20	1,19
A*0201	HCV Core	DLMGYIPLV			
A*0201	AFP 137	PLFQVPEPV			
A*0201	AFP 158	FMNKFIEI	0,56	2,61	1,37
A*0201	AFP 325	GLSPNLNRFL			
A*0201	AFP 542	GVALQTMKQ			
A*0201	Positivkontrolle Pool A2		37,40	41,07	144,51
A*0201	Negativkontrolle HIV		1,00	1,00	1,00

Tab. 43: Messwerte in relativen Kopienzahlen normiert auf die Negativkontrolle HIV des Patienten RFA054.

Der Patient RFA054 wurde einmal mit RF-Ablation an einem primären Hepatozellulären Carcinom behandelt. Der Patient hatte aufgrund einer äthyltoxischen Leberzirrose und damit verbundenem HCC neun Jahre vor RF-Ablation eine neue Leber bekommen. Im Spenderorgan hatte sich ein neues Hepatozelluläres Carcinom gebildet, das nun mit RF-Ablation behandelt wurde. Im Verlauf zeigte der Patient einen Anstieg von AFP als Tumormarker. Dies könnte die schwache Antwort antigenspezifischer T-Zellen nach Stimulation mit dem AFP-Peptid-Pool erklären.

Der Patient ist HCV negativ. Dennoch zeigt er eine schwache Reaktivität gegen Peptide aus diesem Virus.

Außer diesen beiden schwachen Antworten ergaben die Stimulationen mit anderen Peptiden keine positiven Messergebnisse. Dies kann mit der Immunsuppression des Patienten zusammenhängen, der nach Lebertransplantation Tacrolimus (Prograf®), das die Produktion

immunstimulatorischer Zytokine hemmt, Mycophenolatmofetil (CellCept®), das T- und B-Zell-Proliferation inhibiert, und Prednisolon (Decortin H) einnehmen musste.

Nach Stimulation mit der Mischung viraler Epitope als Positivkontrolle ließ sich jeweils eine deutlich IFN $\gamma$ -Produktion der PBMCs messen.

### 6.2.4.2.21. Übersicht über die Ergebnisse:

Untersucht wurden die PBMCs von 15 Patienten. Dreizehn Patienten waren HLA-A2<sup>+</sup>, zwei HLA-A3<sup>+</sup>. Zur Stimulation wurden jeweils tumorassoziierte T-Zell-Epitope oder HLA-Liganden verwendet.

Von den 15 Patienten zeigten 8 Patienten im Vergleich zur Negativkontrolle erhöhte Aktivitäten gegen eines oder mehrere der untersuchten Peptide. Bei zwei Patienten (RFA012, RFA026) konnten diese Reaktivitäten mit einer zweiten Methode (intrazelluläre IFN $\gamma$ -Färbung) reproduziert werden. Einer dieser beiden Patienten (RFA012) zeigte zusätzlich noch ein schwach positives Ergebnis im ELISPOT.

Die frühesten positiven Messwerte wurden nach drei Monaten, die spätesten nach neunzehn Monaten detektiert.

Zum Einfluss von Chemotherapie auf das Immunsystem und mögliche Zusammenhänge zwischen RF-Ablation, Chemotherapie und Aktivierung des Immunsystem, sowie zu Möglichkeiten des weiteren Procedere in dieser Studie siehe Kapitel 6.2.4.

Patient	HLA	Carcinom	Proben	Ergebnis
RFA001	A2	BRC	9M/d0; 9M/2W; 16M/7M; 18M/9M; 21M/12M; 34M/25M; 38M/29M	RT-PCR: <b>negativ</b>
			12M/3M; 38M/29M	RT-PCR mit prädiktierten Peptiden nach SADA-Analyse: <b>negativ</b>
			16M/7M; 23M/14M	SADA-Analyse: <b>schwach positiv</b> für NY-REN nach 14 Monaten im Vergleich zu 7 Monaten nach RF-Ablation.
RFA009	A2	CRC	d0; 2M; 14M/9M; 17M/12M/1M; 25M/20M/9M/7M	RT-PCR: <b>negativ</b>
RFA012	A2	HCC	d0; 9 M; 15 M; 19 M; 23 M	RT-PCR: <b>positiv</b> für MUC1-STAP (relative Kopienzahl bis: 190 in zwei konsekutiven Proben 19M und 23M)
			23M	IFN $\gamma$ -Färbung: <b>positiv</b> (5,4%)
			23M	IFN $\gamma$ -ELISPOT: <b>schwach positiv</b>

RFA015	A2	CRC	d0; 1M; 3M; 17M	RT-PCR: <b>positiv</b> für Her2/neu KIFGSLAFL (relative Kopienzahl bis 9 in Probe 3M). Probe 17M wieder <b>negativ</b> .
			d0; 3M	Tetramer-Staining: <b>negativ</b>
RFA016	A2	RCC	d0; 4M; 10M; 28M/17M	RT-PCR: <b>positiv</b> für Survivin (4,66 in Probe 28M/17M), G250 (11,04 in Probe 28M/17M) und MUC1-LLLL (4,63 in Probe 28M/17M).
			d0; 4M; 10M	Tetramer-Staining: <b>negativ</b>
			d0; 4M; 10M	IFN $\gamma$ -Färbung: <b>negativ</b>
			d0; 4M; 10M	IFN $\gamma$ -ELISPOT: <b>negativ</b>
RFA022	A2	HCC	d0; 4M; 13M; 25M/5M	RT-PCR: <b>negativ</b>
RFA024	A2	CRC	d0; 1M; 4M; 6M/1M; 12M/7M; 14M/9M/d0; 15M/10M/1M; 21M/16M/7M	RT-PCR: <b>positiv</b> für MUC1-STAP (12,47 in Probe 15M/10M/1M), MUC1-LLLL (3,57 in Probe 15M/10M/1M), Survivin (4,77 in Probe 6M/1M), Her2/neu KIFGSLAFL (3,51 in Probe 15M/10M/1M).
			d0; 6M/1M; 12M/7M	Tetramer-Staining: <b>negativ</b>
			d0; 15M/10M/1M	IFN $\gamma$ -ELISPOT: <b>negativ</b>
RFA025	A3	RCC	d0; 7M; 16M	RT-PCR: <b>negativ</b>
RFA026	A2	CRC	d0; 1M; 6M; 8M; 11M/10M/4M; 13M/12M/6M/d0; 14M/13M/7M/1M; 17M/16M/10M/4M; 20M/19M/13M/7M	RT-PCR: <b>positiv</b> für MUC1-STAP (relative Kopienzahl bis: 118,6 in zwei konsekutiven Proben 13M/12M/6M/d0; 14M/13M/7M/1M)
			14M/13M/7M/1M	IFN $\gamma$ -Färbung: <b>positiv</b> (0,3%)
			14M/13M/7M/1M	ELISPOT: <b>negativ</b>
RFA027	A2	CRC	d0; 1M; 4M	RT-PCR: <b>negativ</b>

RFA031	A2	HCC	d0; 4M; 7M	RT-PCR: <b>negativ</b>
RFA046	A2	CRC	12M	RT-PCR: <b>positiv</b> für Her2/neu KIFGSLAFL (relative Kopienzahl bis: 17,63).
RFA047	A2	CRC	10M/7M	RT-PCR: <b>positiv</b> für HER2/neu KIFGSLAFL (relative Kopienzahl bis: 3,88).
			10M/7M	Tetramer-Staining: <b>negativ</b>
			10M/7M	IFN $\gamma$ -Färbung: <b>negativ</b>
			10M/7M	IFN $\gamma$ -ELISPOT: <b>negativ</b>
RFA048	A3	RCC	d0; 10M	RT-PCR: <b>positiv</b> für RGS-5 (5,35 in Probe 10M), MMP7 (150,64 in Probe 10M), ADFP SLLTSSKGQLQK (18,13 in Probe 10M) und ADFP TSALPIQK (4,68 in Probe 10M)
RFA054	A2	HCC	1M; 4M; 8M	RT-PCR: <b>negativ</b>

Tab. 44: Übersicht über die Ergebnisse der T-Zell-Versuche.

### 6.2.3.3. Harnsäure:

#### 6.2.3.3.1. Zielsetzung:

Harnsäure ist ein Alarmsignal für das Immunsystem. Daher sollte evaluiert werden, ob durch Radiofrequenzablation der Harnsäurespiegel im Serum der Patienten ansteigt.

#### 6.2.3.3.2. Ergebnisse:

In 218 Serumproben von 51 Patienten und 33 Proben von 10 Kontrollspendern wurde der Harnsäurespiegel im Serum gemessen. Es wurden jeweils Proben, die im Abstand von 24 Stunden abgenommen wurden, untersucht. Da durch Nekrose Harnsäure freigesetzt wird, sollte – sofern RF-Ablation eine systemische Ausschüttung von Harnsäure ins Serum bewirkt – ein erhöhter Harnsäurespiegel 24 Stunden nach RF-Ablation nachweisbar sein.

Die Proben wurden in Augenschein genommen. Anhand der Rotfärbung des Serums wurde beurteilt, ob sie hämolytisch waren. In der folgenden Tabelle ist eine hämolytische Probe mit einem „+“ gekennzeichnet. Von Interesse war dabei eine mögliche Korrelation zwischen dem Grad der Hämolyse und dem Harnsäurespiegel beziehungsweise den Veränderungen vor und nach RF-Ablation.

Die Messwerte waren wie folgt:

Patient	Name der Probe	Uric Acid [mg/dl]	Hämolytische Probe	Faktor d1/d0	Differenz mit Probe vorher
RFA003	RFA003 12M	8,30			
RFA005	RFA005 23M/18M/15M	10,40			
	RFA005 28M/24M/20M	8,30			-2,1
RFA009	RFA009 14M/9M	14,00	+		
	RFA009 16M/11M/d0	13,00			-1
	RFA009 17M/12M/1M	12,30			-0,7
	RFA009 18M/13M/2M/d0	13,20			0,9
	RFA009 18M/13M/2M/d1	13,00		0,98	-0,2
	RFA009 20M/15M/4M/2M	4,00			-9
	RFA009 25M/20M/9M/7M	8,80			4,4
RFA011	RFA011 9M	4,50	+		
	RFA011 12M	4,10	+		-0,4
	RFA011 15M/d0	4,50	+		0,4
	RFA011 15M/d1	5,30	+	1,17	0,8
	RFA011 16M/1M	3,80			-1,5
	RFA011 19M/4M	4,00			0,2
	RFA011 22M/7M	3,50	+		-0,5

RFA012	RFA012 11M	5,40			
	RFA012 14M	5,40			0
	RFA012 15M	5,60			0,2
	RFA012 18M	6,20			0,6
RFA016	RFA016 10M	7,60	+		
	RFA016 11M/d0	7,40			-0,2
	RFA016 11M/d1	8,70		1,17	1,3
	RFA016 16M/5M	5,40	+		-3,3
RFA019	RFA019 14M/d0	8,00			
	RFA019 14M/d1	7,60			-0,4
	RFA019 16M/2M	8,20			0,6
RFA021	RFA021 12M/d0	6,10			
	RFA021 12M/d1	6,80		1,11	0,7
	RFA021 13M/1M	6,00			-0,8
	RFA021 16M/4M	6,90			0,9
RFA022	RFA022 d0	5,40			
	RFA022 d1	4,90		0,91	-0,5
	RFA022 7M	5,50			0,6
	RFA022 10M	5,10	+		-0,4
	RFA022 13M	5,90			0,8
RFA023	RFA023 d0	7,00			
	RFA023 d1	5,90		0,84	-1,1
	RFA023 2M/d0	7,10			1,2
	RFA023 2M/d1	7,10			0
	RFA023 3M/d0	6,40	+		-0,7
	RFA023 3M/d1	6,20		0,97	-0,2
	RFA023 6M/3M	7,00			0,8
RFA024	RFA024 d0	7,10			
	RFA024 4M	8,40			1,3
	RFA024 5M/d0	8,00			-0,4
	RFA024 5M/d1	7,00		0,86	-1
	RFA024 6M/1M	7,60			0,6
	RFA024 9M/4M	8,60			1
	RFA024 12M/7M	9,00			0,4
	RFA024 14M/9M/d0	8,30			-0,7
	RFA024 14M/9M/d1	6,90		0,83	-1,4
	RFA024 15M/10M/1M	7,30			0,4
RFA025	RFA025 d0	9,30			
	RFA025 d1	9,10		0,98	-0,2
	RFA025 5M	7,20	+		-1,9
	RFA025 16M	7,10			-0,1
RFA026	RFA026 d0	3,40			
	RFA026 d1	3,30		0,97	-0,1
	RFA026 1M/d-1	4,60	+		1,3
	RFA026 1M/d1	4,10		0,89	0,1
	RFA026 6M/5M	4,70			0,6
	RFA026 7M/6M/d0	4,70			0
	RFA026 7M/6M/d1	3,70		0,79	-1
	RFA026 8M/7M/1M	4,20			0,5
	RFA026 11M/10M/4M/d0	5,60			1,4
	RFA026 11M/10M/4M/d1	4,00		0,7	-1,6
RFA027	RFA027 d0	6,20			

	RFA027 d1	5,90		0,95	-0,3
	RFA027 1M	6,80			0,9
	RFA027 5M	5,50			-1,3
RFA028	RFA028 d0	6,60			
	RFA028 d1	7,90		1,19	1,3
	RFA028 1M	7,50			-0,4
	RFA028 4M	8,20			0,7
	RFA028 7M	7,60			-0,6
	RFA028 10M	8,40			0,8
RFA029	RFA029 d0	6,00			
	RFA029 d1	3,80		0,63	-2,2
	RFA029 1M	5,20	+		1,4
	RFA029 4M	5,30			0,1
RFA030	RFA030 d0	4,70			
	RFA030 d1	4,30		0,91	-0,4
	RFA030 1M	5,20			0,9
	RFA030 4M	4,40			-0,8
	RFA030 7M	4,70	+		0,3
	RFA030 10M	4,20			-0,5
RFA031	RFA031 d0	8,10	+		
	RFA031 d1	7,40	+	0,91	-0,7
	RFA031 1M	5,70	+		-1,7
	RFA031 7M	7,50			1,8
	RFA031 10M	6,20			-1,3
RFA032	RFA032 ???	5,20			
	RFA032 ???	5,10			-0,1
RFA033	RFA033 d0	5,20			
	RFA033 d1	4,70		0,90	-0,5
	RFA033 2M	4,80			0,1
	RFA033 2M/d0	5,10	+		0,3
	RFA033 5M/3M	5,20			0,1
	RFA033 9M/7M	5,00			-0,2
RFA034	RFA034 d0	5,80			
	RFA034 d1	5,90		1,01	0,1
	RFA034 1M	6,30			0,4
	RFA034 2M/d0	5,80			-0,5
	RFA034 2M/d1	6,00		1,03	0,2
	RFA034 3M/1M	5,80			-0,2
	RFA034 6M/4M	6,00			0,2
	RFA034 7M/5M/d0	5,70			-0,3
	RFA034 7M/5M/d1	6,70		1,18	1
	RFA034 9M/7M/1M	6,40			-0,3
RFA035	RFA035 d0	6,80			
	RFA035 d1	7,30		1,07	0,5
	RFA035 1M	6,30			-1
	RFA035 4M	6,70			0,4
	RFA035 7M	7,00			0,3
RFA036	RFA036 d0	4,10			
	RFA036 d1	4,00		0,98	-0,1
	RFA036 1M	3,60			-0,4
RFA037	RFA037 d0	8,10			
	RFA037 d1	7,80		0,96	-0,3

	RFA037 1M	6,40		-1,4
	RFA037 3M	9,20		2,8
	RFA037 4M/d0	2,90		-6,3
	RFA037 4M/d1	3,90	1,34	1
	RFA037 6M/2M	8,30		4,4
	RFA037 7M/3M/d0	7,90		-0,4
	RFA037 7M/3M/d1	8,60	1,08	0,5
RFA038	RFA038 d0	8,20		
	RFA038 d1	9,00	1,09	0,8
	RFA038 1M	7,30		-1,7
	RFA038 2M/d0	7,10		-0,2
	RFA038 2M/d1	7,00	0,99	-0,1
	RFA038 3M/1M	7,80		0,8
	RFA038 6M/4M	8,40		0,6
RFA039	RFA039 d0	6,80		
	RFA039 d1	6,30	0,93	-0,5
RFA040	RFA040 d0	7,70		
	RFA040 d1	9,30	1,20	1,6
	RFA040 1M	7,40		-1,9
	RFA040 5M	8,00		0,6
RFA041	RFA041 d0	8,30		
	RFA041 d1	8,50	1,02	0,2
	RFA041 1M	8,90		0,4
	RFA041 4M	9,50	+	0,6
	RFA041 7M	9,90		0,4
RFA042	RFA042 d0	7,40		
	RFA042 d1	7,00	0,95	-0,4
	RFA042 1M	8,60		1,6
	RFA042 3M/d0	7,70		-0,9
	RFA042 3M/d1	6,00	0,78	-1,7
	RFA042 4M/1M	7,30		1,3
RFA043	RFA043 d0	4,70		
	RFA043 d1	4,50	0,96	-0,2
	RFA043 2W	3,10		-1,4
RFA044	RFA044 d0	7,90		
	RFA044 d1	4,20	0,53	-3,7
		4,00		
	RFA044 1M	7,20		3
		6,10		
	RFA044 4M	7,00		-0,2
RFA045	RFA045 d0	5,70		
	RFA045 d1	5,70	1,00	0
	RFA045 1M	5,80		0,1
	RFA045 4M	6,20		0,4
RFA046	RFA046 d0	6,60		
	RFA046 d1	6,10	0,92	-0,5
	RFA046 1M	6,30		0,2
	RFA046 3M	8,60		2,3
RFA047	RFA047 d0	9,80		
	RFA047 d1	8,60	+	0,88
	RFA047 1M	7,80	+	-0,8
	RFA047 3M/d0	7,70		-0,1

	RFA047 3M/d1	6,30		0,82	-1,4
	RFA047 4M/1M	7,30			1
RFA048	RFA048 d0	4,90			
	RFA048 d1	5,30		1,23	0,4
RFA049	RFA049 d-7	6,30			
	RFA049 d1	6,00		0,95	-0,3
	RFA049 1M	6,60			0,6
RFA050	RFA050 d0	6,60			
	RFA050 d1	6,70		1,02	0,1
	RFA050 d1	6,00			-0,7
RFA051	RFA051 d0	7,50	+		
	RFA051 d1	7,30		0,97	-0,2
	RFA051 1M	6,90			-0,4
RFA052	RFA052 d0	4,60			
	RFA052 d1	4,40		0,96	-0,2
	RFA052 1M/d0	5,40			1
	RFA052 1M/d1	4,90		0,91	-0,5
	RFA052 2M/1M	4,90			0
RFA053	RFA053 d-20	5,50			
	RFA053 d1	4,10		0,75	-0,4
	RFA053 1M	4,50			-1
RFA054	RFA054 d0	3,20			
	RFA054 d1	3,60		1,13	0,4
	RFA054 1M	3,80			0,2
RFA055	RFA055 d0	6,20	+		
	RFA055 d1	6,30		1,02	0,1
	RFA055 1M	5,30			-1
RFA056	RFA056 d0	7,30			
	RFA056 d1	7,60		1,04	0,3
	RFA056 1M	6,40			-1,2
RFA057	RFA057 d0	6,00			
RFA058	RFA058 d0	4,30			
	RFA058 d1	3,70		0,86	-0,6
RFA059	RFA059 d0	7,40			
	RFA059 d1	7,70		1,04	0,3
RFA060	RFA060 d0	5,30			
	RFA060 d1	5,60		1,06	0,3
RFA061	RFA061 d0	1,80			
RFA062	RFA062 d0	12,60	+		
	RFA062 d1	12,20		0,97	-0,4
RFA063	RFA063 d0	7,40			
	RFA063 d1	7,00		0,95	-0,4
RFA064	RFA064 d0	6,50			
	RFA064 d1	7,20		1,11	0,7
	RFA064 d3	4,70			-2,5

Tab. 45: Messwerte der Harnsäurebestimmung bei Patienten, die mit RF-Ablation behandelt wurden. Der Referenzbereich für den Harnsäurespiegel im Serum wird vom Zentrallabor des Universitätsklinikums Tübingen mit 2,4 – 5,7 mg/dl bei Männern und Frauen prämenopausal und 3,4 – 7,0 mg/dl bei Frauen postmenopausal angegeben.

In den Kontrollgruppen wurden bei vier gesunden Spendern (Kontrollgruppe HD) aus dem Labor und bei sechs Patienten, deren Gallenblasen laparoskopisch entfernt worden war (Kontrollgruppe CO), Serumproben untersucht.

Bei den Spendern, die sich im Labor freiwillig gemeldet hatten, wurde an fünf aufeinanderfolgenden Tagen einer Woche jeweils ein Serumröhrchen abgenommen, um tägliche Variationen des Harnsäurespiegels im Serum zu evaluieren. Damit konnte ausgeschlossen werden, dass mögliche Schwankungen im Harnsäurespiegel bei Patienten nicht RF-induziert, sondern nur physiologisch waren.

Die Patienten, deren Gallenblase laparoskopisch entfernt wurde, waren dahingehend vergleichbar, dass bei ihnen – ähnlich wie bei RF-Ablation – eine minimal invasive Technik zum Einsatz kam, das heißt, die Zugangswege sehr klein waren (im Gegensatz zu einer offenen Operation). Unterschiede bei dieser Gruppe lagen in der Allgemeinanästhesie der Patienten und dem Umstand, dass bei laparoskopischen Operationen zum einen mehr als ein Zugang für die unterschiedlichen Geräte und deutlich größere Zugänge benötigt werden. Auch kam bei den laparoskopischen Operationen keine, beziehungsweise kaum Radiofrequenzenergie (nur bei Koagulation kleiner Blutgefäße) zum Einsatz.

Die gemessenen Werte waren:

Patient	Name der Probe	Uric Acid [mg/dl]	Hämolytische Probe	Faktor d1/d0	Differenz mit Probe vorher
HD1	HD1 d1	4,70	+		
	HD1 d2	4,90		1,04	0,2
	HD1 d3	4,60		0,94	-0,3
	HD1 d4	4,60		1,00	0
	HD1 d5	4,90		1,07	0,3
HD2	HD2 d1	5,70			
	HD2 d2	5,90		1,04	0,2
	HD2 d3	5,60		0,95	-0,3
		5,50		0,93	
	HD2 d4	5,40		0,98	-0,2
HD3	HD2 d5	5,50		1,02	0,1
	HD3 d1	1,20			
	HD3 d2	4,90		4,08	3,7
	HD3 d3	4,90		1,00	0
		4,90		1,00	
HD4	HD3 d4	4,50		0,92	-0,4
	HD3 d5	4,80		1,07	0,3
	HD4 d1	6,50			
	HD4 d2	6,40		0,98	-0,1
	HD4 d3	6,40		1,00	0
CO1	HD4 d4	6,30	+	0,98	-0,1
	HD4 d5	6,70		1,06	0,4
	CO1 d0	6,10			
CO2	CO1 d1	4,30		0,70	-1,8
	CO2 d0	7,80			
CO3	CO2 d1	6,70		0,86	-1,1
	CO3 d0	8,80			
CO4	CO3 d1	7,60		0,86	-1,2
	CO4 d0	7,10			
CO5	CO4 d1	6,70		0,94	-0,4
	CO5 d0	6,00			
CO6	CO5 d1	6,00		1,00	0
	CO6 d0	6,20			
	CO6 d1	7,30		1,18	0,9

Tab. 46: Messergebnisse der Harnsäurebestimmung bei Spendern der Kontrollgruppen. Der Referenzbereich für den Harnsäurespiegel im Serum wird vom Zentrallabor des Universitätsklinikums Tübingen mit 2,4 – 5,7 mg/dl bei Männern und Frauen prämenopausal und 3,4 – 7,0 mg/dl bei Frauen postmenopausal angegeben.

Ein erhöhter Harnsäurespiegel war weder in den RFA-Patienten noch in den Kontrollgruppen detektierbar.

Die Ergebnisse wurden mit dem Grad der Hämolyse der Serumproben verglichen. Ein Zusammenhang war nicht zu beobachten.

Der Referenzbereich wird vom Zentrallabor des Universitätsklinikums Tübingen bei deren Messverfahren mit 2,4 – 5,7 mg/dl bei Männern und Frauen prämenopausal, sowie mit 3,4 – 7,0 mg/dl bei Frauen postmenopausal angegeben. Nicht alle gemessenen Werte lagen in diesem Bereich. Bei einigen Patienten lag der Harnsäurespiegel über dem Grenzwert. Die beiden Patienten RFA009 und RFA062, die beide deutlich zu hohe Harnsäurespiegel aufwiesen, waren beide dialysepflichtig.

#### **6.2.3.3.3. Statistische Auswertung der Harnsäurebestimmung:**

Zugrundegelegt für die statistische Auswertung wurden die Faktoren d1/d1, die den Anstieg, beziehungsweise Abfall der Harnsäurekonzentration im Serum im Vergleich vor und nach Radiofrequenzablation ausdrückt.

Der T-Test wird als homoskadastischer T-Test bezeichnet. Diese Berechnung nimmt an, dass die Mittelwerte zweier Datensätze gleich sind. Mit Hilfe dieses T-Testes wird untersucht, ob die Mittelwerte zweier Stichproben gleich sind oder sich unterscheiden. Da die beiden Gruppen in diesem Fall (Patienten 57 Werte und Kontrollgruppen 24 Werte) eindeutig abgegrenzt waren, wurde der T-Test eingesetzt.

Der Wert des T-Testes wurde nach folgender Formel berechnet:

$$t = \frac{\bar{x} - \bar{y} - \Delta_0}{\sqrt{\frac{S_1^2}{m} + \frac{S_2^2}{n}}}$$

Dabei ist

$\bar{x}$	das arithmetische Mittel der Gruppe A
$\bar{y}$	das arithmetische Mittel der Gruppe B
$m$	der Stichprobenumfang der Gruppe A
$n$	der Stichprobenumfang der Gruppe B
$S_1^2$	die Varianz (Schätzwert für die Grundgesamtheit) der Gruppe A
$S_2^2$	die Varianz (Schätzwert für die Grundgesamtheit) der Gruppe B
$\Delta_0$	eine Größe, deren Betrag der zu prüfenden Nullhypothese entspricht. Diese Größe wird meist = 0 gesetzt. Dadurch wird geprüft, ob die Differenz der beiden Mittelwerte > 0 ist.

Die Varianz ist die Summe der quadrierten Abweichungen der einzelnen Werte eines Datenbündels vom Mittelwert dividiert durch n, das heißt die Anzahl der Messwerte. Die Varianz ist also ein Maß dafür, wie weit die einzelnen Werte im Durchschnitt vom Mittelwert entfernt liegen. Die Varianz wird mit folgender Formel berechnet:

$$s^2 = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$$

Der T-Test ergab folgendes Ergebnis:

t = 1,54

c-Wert (aus Tabelle) bei 79 Freiheitsgraden: 1,67

Hier ist  $t \leq c$ . Damit wird die Nullhypothese angenommen. Das heißt, die beiden Stichproben sind gleich, es gibt keinen signifikanten Unterschied.

Standardabweichung: 0,366

Freiheitsgrade: 79

Je höher die Freiheitsgrade sind desto mehr nähert sich die Verteilung der Normalverteilung an. Bereits bei einem Wert von 20 sind die Abweichungen nur noch marginal. In diesem Fall sind die Werte annähernd normalverteilt.

Wahrscheinlichkeit für ein abweichendes Ergebnis bei Annahme der Nullhypothese, dass die Mittelwerte der Stichproben gleich sind: 0,13

Im Folgenden sind die angegebenen Werte Faktoren d1/d0

Gruppe A: RFA-Patienten

Arithmetischer Mittelwert der Messwerte: m = 0,971

Dieser Wert errechnet sich:

$$\frac{(n_1 + n_2 + \dots + n_x)}{x} = m$$

95% Konfidenzintervall: 0,8745 – 1,068

Standardabweichung: 0,145

95% der gemessenen Werte liegen damit in diesem Bereich.

Maximaler gemessener Wert: 1,34

Minimaler gemessener Wert: 0,53

Median: 0,97

Der Median ( $\tilde{x}$ ) ist der Wert, von dem sich 50% der Messwerte oberhalb und 50% der Messwerte unterhalb befinden. Er berechnet sich in einer geordneten Stichprobe ( $x_1, x_2, \dots, x_n$ ):

für ungerade Stichproben:  $\tilde{x} = x_{(n+1)/2}$

für gerade Stichproben:  $\tilde{x} = \frac{1}{2}(x_{n/2} + x_{n/2+1})$

Durchschnittlich absolute Abweichung vom Median: 0,105

Gruppe B: Kontrollgruppe

Arithmetischer Mittelwert der Messwerte: 1,11

95% Konfidenzintervall: 0,9596 – 1,257

Standardabweichung: 0,639

Maximaler gemessener Wert: 4,08

Minimaler gemessener Wert: 0,7

Median: 1,00

Durchschnittlich absolute Abweichung vom Median: 0,188

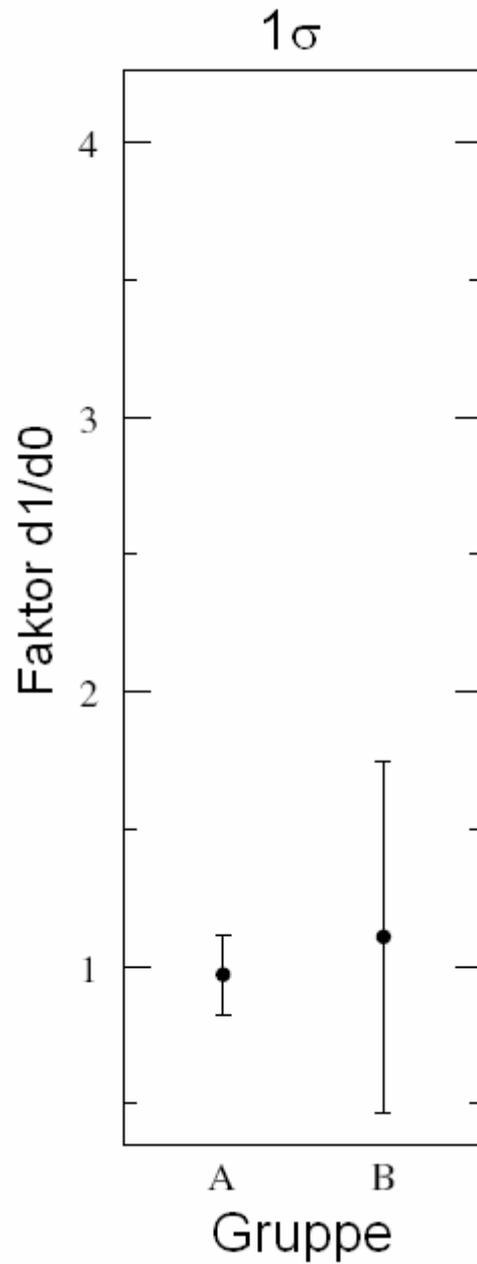
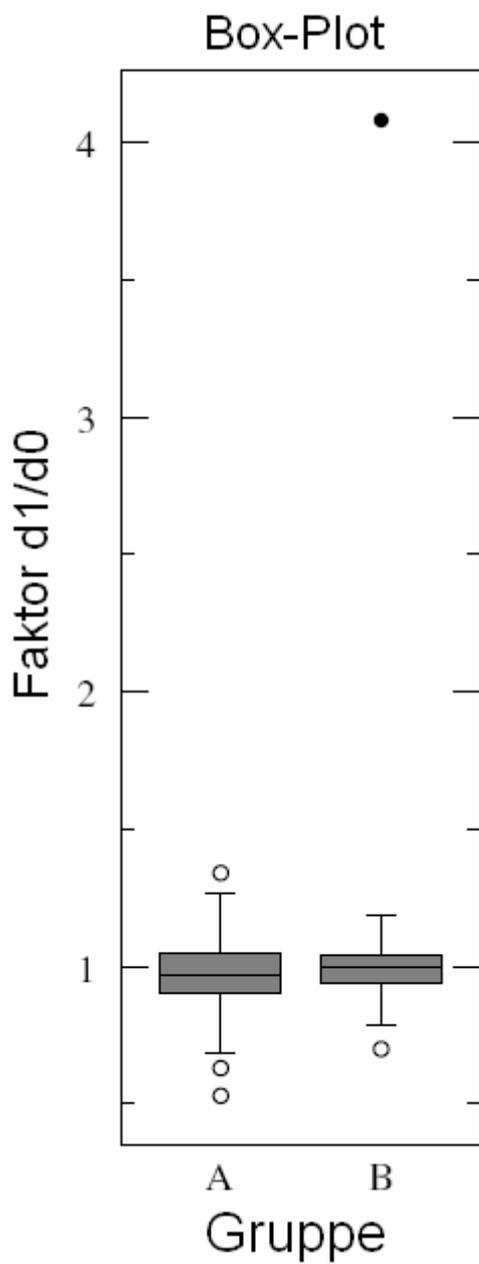


Abb. 65a: Box & Whisker Plot des t-Tests. Gruppe A sind die RFA-Patienten, Gruppe B die Kontrollgruppe. Zur Erklärung dieses Plots siehe Kapitel 3.10.

Abb. 65b: Plot des t-Tests mit Durchschnittswert und 1 $\sigma$ -Fehlerbalken. Gruppe A sind die RFA-Patienten, Gruppe B die Kontrollgruppe.

Für die Beurteilung dieser Ergebnisse siehe die Diskussion.

#### 6.2.3.4. Hitzeschockproteine:

##### 6.2.3.4.1. Zielsetzung:

Ziel dieses Teils der Studie war es herauszufinden, ob durch Radiofrequenzablation die Hitzeschockproteine gp96 und HSP70 systemisch freigesetzt werden und am Tag nach Radiofrequenzablation im Serum der Patienten, das aus peripher venösen Blutproben separiert wurde, in erhöhtem Maße nachweisbar ist.

##### 6.2.3.4.2. gp96:

Die Ausschüttung von gp96 wurde mittels Western Blot gemessen.

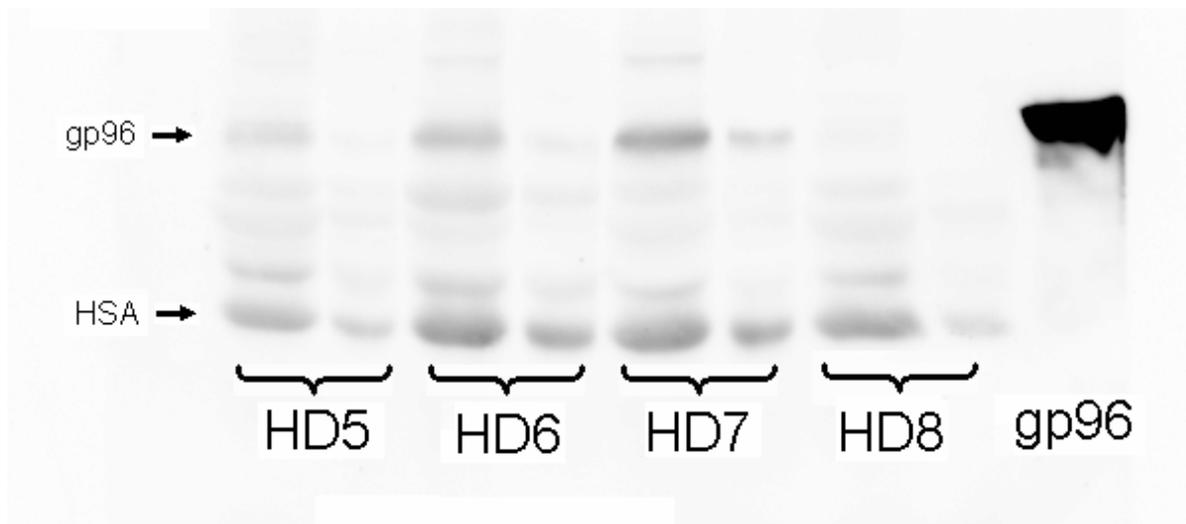


Abb. 66: gp96-Western-Blot von Proben gesunder Spender. In jeweils zwei nebeneinander liegenden Bahnen wurden die Proben des gleichen Spenders in einer 1:10 Verdünnung aufgetragen. In die Bahn ganz rechts wurde ein gp96-Standard in bekannter Konzentration gegeben.

Die zweiten deutlichen Banden (in der Abbildung mit „HSA“ bezeichnet) wurden in einem zweiten Versuch nach Coomassie-Färbung aus dem Gel ausgeschnitten und sequenziert. Bei diesen handelt es sich um humanes Serumalbumin (HSA), das der Primärantikörper offensichtlich unspezifisch bindet. Zur Kontrolle wurden ebenfalls die gp96-Bahnen sequenziert. Es handelte sich wirklich um das erwartete Protein. Die Sequenzierungen wurden von Jörn Dengjel aus der Abteilung für Immunologie, Universität Tübingen durchgeführt.

Untersucht wurden die Serum- und Plasmaproben von zwei Patienten (RFA019, RFA025).

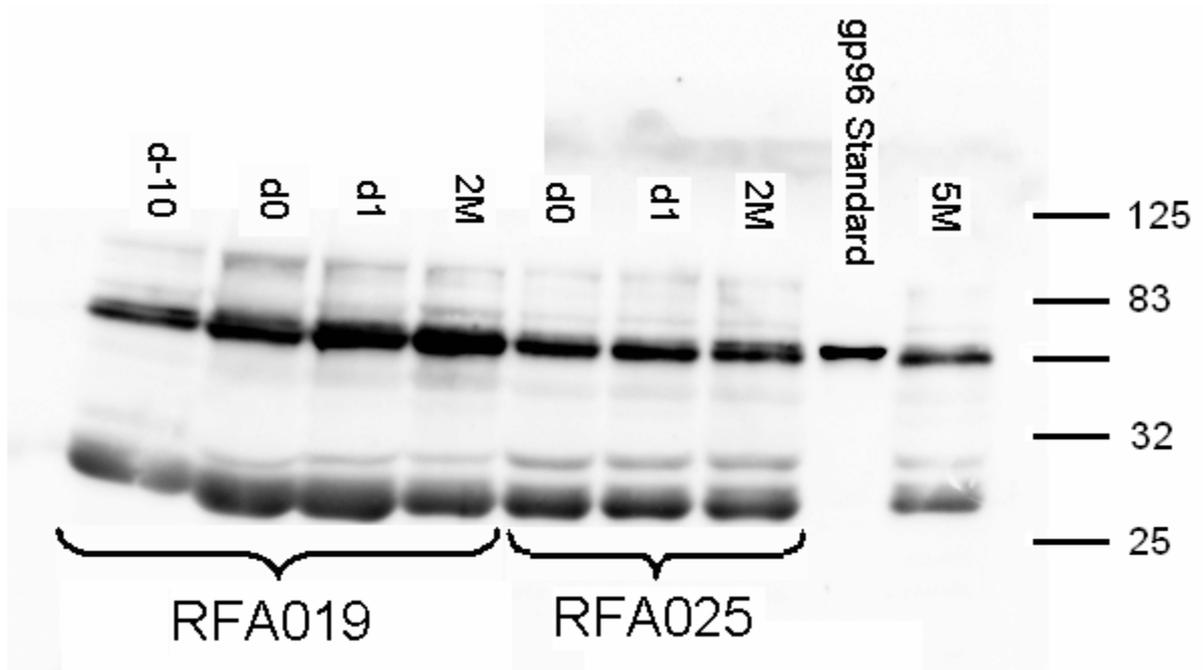


Abb. 67: gp96 Western Blot der Patienten RFA019 und RFA025. Die obere Bande ist gp96, die untere HSA. Der Proteinmarker konnte bei der Messung im Image Reader nicht sichtbar gemacht werden und ist daher nachträglich eingefügt worden.

Die Schwärzung wurde quantifiziert, indem Regionen über den Banden definiert wurden. Die Intensität der Schwärzung wurde über das Image Reader Programm berechnet.

<b>Probe</b>	<b>Region [Ereignisse]</b>	<b>Größe der Region [Pixel]</b>	<b>Hintergrund [Ereignisse]</b>	<b>Größe Hintergrund [Pixel]</b>	<b>korrigierte Intensität [Ereignisse]</b>	<b>Faktor Probe nachher / Probe vorher</b>
RFA019 -10d	2498000	847	121600	400	2240512	
RFA019 d0	2740000	636	121600	400	2546656	1,1
RFA019 d1	3348000	691	121600	400	3137936	1,2
RFA019 2M	3619000	671	121600	400	3415016	1,1
RFA025 d0	1918000	468	121600	400	1775728	
RFA025 d1	1976000	466	121600	400	1834336	1,0
RFA025 2M	1943000	559	121600	400	1773064	0,9
RFA025 5M	1317000	457	121600	400	1178072	0,7
Hintergrund	121600	400	121600	400	0	
Standard	2026000	319	121600	400	1929024	

Tab. 47: Messwerte der Intensität: Western Blot für RFA019 und RFA025.

Diese Berechnungen zeigten keinen Anstieg von gp96 im Serum der Patienten. Die Quantifizierung des Western Blots gestaltete sich allerdings schwierig (siehe dazu die Diskussion).

#### **6.2.3.4.3. HSP70:**

##### **6.2.3.4.3.1. Ergebnisse:**

Die Konzentration von Hitzeschockproteinen im Patientenserum wurde mittels HSP70-ELISA gemessen. Die Konzentration wurde aufgrund einer Standardkurve berechnet.

Getestet wurden 107 Proben von 24 Patienten mit 35 RF-Ablationen. Manche Proben wurden in verschiedenen Versuchen mehrfach getestet, um die Konstanz der Versuche zu überprüfen. Die Messwerte waren nur geringfügig unterschiedlich. In folgender Tabelle sind beide Messwerte angegeben. Die unterschiedlichen Versuche sind in der rechten Spalte mit Datum des jeweiligen Versuches angegeben.

Patient	Sample Name	HSP-70 [ng/ml]	Durchschnitt HSP-70 [ng/ml]	Standard Abweichung	Faktor d0/d1	Volumen Nekrose [cm³]	Volumen Tumor [cm³]	Volumen abladiertes Normalgewebe	Test			
RFA011	RFA011 9M	4,004	3,92	0,12					14.05.2004			
		3,834							14.05.2004			
	RFA011 12M	5,492	5,442	0,072					14.05.2004			
		5,392							14.05.2004			
	RFA011 15M/d0	3,97	3,462	0,718					14,99	9,62	5,37	14.05.2004
		2,954										14.05.2004
	RFA011 15M/d1	7,456	7,184	0,382					<b>2,07</b>	14.05.2004		
		6,914								14.05.2004		
	RFA011 16M/1M	3,462	3,462	0					25,30	14.05.2004		
		3,462								14.05.2004		
RFA023	RFA023 d0	0,718	0,598	0,17		95,40	24,60	70,80	15.04.2004			
		0,478							15.04.2004			
	RFA023 d1	1,924	1,784	0,196					<b>2,98</b>	15.04.2004		
		1,646								15.04.2004		
	RFA023 2M/d0	1,2	1,056	0,204					56,00	6,00	50,00	15.04.2004
		0,912										15.04.2004
	RFA023 2M/d1	2,942	2,93	0,02					<b>2,77</b>	15.04.2004		
		2,916								15.04.2004		
	RFA023 3M/1M/d0	1,488	1,446	0,058					15.04.2004			
		1,404							15.04.2004			
RFA023 3M/1M/d1	2,202	2,044	0,222	1,41	15.04.2004							
	1,886				15.04.2004							
RFA023	6M/4M/3M	0,83	0,81	0,026	15.04.2004							
		0,792			15.04.2004							
RFA023	RFA023 d0	2,25	2,446	0,278		95,40	24,60	70,80	09.12.2004			
		2,644							09.12.2004			
	RFA023 d1	8,54	8,072	0,66					<b>3,30</b>	09.12.2004		
		7,606								09.12.2004		
	RFA023 2M/d0	3,872	4,462	0,834					56,00	6,00	50,00	09.12.2004
		5,052										09.12.2004
	RFA023 2M/d1	10,112	10,014	0,138					<b>2,24</b>	09.12.2004		
		9,916								09.12.2004		
	RFA023 3M/d0	5,1	5,174	0,104					09.12.2004			
		5,248							09.12.2004			
RFA023 3M/d1	8,294	8,884	0,824	1,72	09.12.2004							
	9,474				09.12.2004							
RFA023 6M/3M	4,216	3,774	0,626	09.12.2004								
	3,332			09.12.2004								
RFA024	RFA024 4M	0,654	0,69	0,052	15.04.2004							
		0,728			15.04.2004							
	RFA024 5M/d0	1,21	1,052	0,222	15.04.2004							
		0,894			15.04.2004							
RFA024 5M/d1	1,422	1,45	0,04	1,38	15.04.2004							

		1,478				15.04.2004
	RFA024 6M/1M	0,486	0,394	0,132		15.04.2004
		0,302				15.04.2004
RFA026	RFA026 d0	0,366	0,268	0,138		15.04.2004
		0,172				15.04.2004
	RFA026 d1	0,7	0,546	0,216	<b>2,03</b>	15.04.2004
		0,394				15.04.2004
	RFA026 1M/d-1	1,376	1,274	0,144		15.04.2004
		1,172				15.04.2004
	RFA026 1M/d1	1,794	1,686	0,15	1,32	15.04.2004
		1,58				15.04.2004
	RFA026 6M/5M	0,728	0,668	0,086		15.04.2004
		0,608				15.04.2004
RFA027	RFA027 d0	2,954	3,174	0,312		14.05.2004
		3,394				14.05.2004
	RFA027 d1	1,872	2,042	0,24	0,64	14.05.2004
		2,21				14.05.2004
	RFA027 1M	2,414	2,228	0,264		14.05.2004
		2,042				14.05.2004
	RFA027 5M	2,834	2,624	0,312		14.05.2004
		2,414				14.05.2004
RFA030	RFA030 d0	4,834	4,88	0,064		16.04.2004
		4,924				16.04.2004
	RFA030 d1	11,26	11,126	0,192	<b>2,28</b>	16.04.2004
		10,99				16.04.2004
	RFA030 1M	2,852	2,792	0,084		16.04.2004
		2,732				16.04.2004
	RFA030 4M	1,862	1,998	0,192		16.04.2004
		2,132				16.04.2004
RFA031	RFA031 d0	12,402	12,296	0,148		16.04.2004
		12,192				16.04.2004
	RFA031 d1	12,102	11,846	0,36	0,96	16.04.2004
		11,59				16.04.2004
	RFA031 1M	7,718	7,808	0,128		16.04.2004
		7,898				16.04.2004
RFA033	RFA033 d0	7,176	6,742	0,616		16.04.2004
		6,306				16.04.2004
	RFA033 d1	16,244	15,014	1,742	<b>2,27</b>	16.04.2004
		13,782				16.04.2004
	RFA033 1M	2,822	2,808	0,022		16.04.2004
		2,792				16.04.2004
RFA034	RFA034 d0	3,814	3,918	0,148		16.04.2004
		4,024				16.04.2004
	RFA034 d1	5,134	5,15	0,022	1,31	16.04.2004
		5,164				16.04.2004
	RFA034 1M	3,094	3,094	0		16.04.2004
		3,094				16.04.2004
	RFA034 2M/d0	4,894	4,7	0,276		16.04.2004
		4,504				16.04.2004
	RFA034 2M/d1	3,904	4,084	0,254	0,87	16.04.2004
		4,264				16.04.2004
	RFA034 3M/1M	1,652	1,998	0,488		16.04.2004

		2,342						16.04.2004	
RFA035	RFA035 d0	2,988	3,528	0,764		48,30	10,80	37,50	09.12.2004
		4,068							09.12.2004
	RFA035 d1	2,89	2,692	0,278	0,76				09.12.2004
		2,496							09.12.2004
	RFA035 1M	2,89	2,79	0,138					09.12.2004
		2,692							09.12.2004
	RFA035 4M	1,808	1,66	0,208					09.12.2004
		1,514							09.12.2004
RFA036	RFA036 d0	2,3	1,882	0,59		26,32	18,60	7,72	09.12.2004
		1,464							09.12.2004
	RFA036 d1	3,036	2,324	1,008	1,23				09.12.2004
		1,612							09.12.2004
RFA037	RFA037 d0	2,718	3,142	0,598		55,24	26,60	28,64	14.05.2004
		3,564							14.05.2004
	RFA037 d1	5,56	5,612	0,072	1,79				14.05.2004
		5,662							14.05.2004
	RFA037 1M	2,752	3,276	0,742					14.05.2004
		3,8							14.05.2004
RFA038	RFA038 d0	4,068	4,216	0,208		22,93	5,72	17,21	09.12.2004
		4,364							09.12.2004
	RFA038 d1	7,016	6,426	0,824	1,52				09.12.2004
		5,383							09.12.2004
	RFA038 1M	2,3	2,202	0,138		48,41			09.12.2004
		2,102							09.12.2004
	RFA038 2M/d0	3,724	3,528	0,278		33,10	18,00	15,10	09.12.2004
		3,332							09.12.2004
	RFA038 2M/d1	10,75	10,284	0,66	2,91				09.12.2004
		9,818							09.12.2004
	RFA038 3M/1M	3,97	4,952	1,39					09.12.2004
		5,936							09.12.2004
	RFA038 6M/4M	4,462	4,412	0,07					09.12.2004
		4,364							09.12.2004
RFA039	RFA039 d0	0,334	0,358	0,034		12,45	2,55	9,90	09.12.2004
		0,348							09.12.2004
	RFA039 d1	1,514	0,9	0,868	2,51				09.12.2004
		0,284							09.12.2004
RFA040	RFA040 d0	4,608	4,314	0,416		28,53	10,19	18,34	09.12.2004
		4,02							09.12.2004
	RFA040 d1	11,636	11,66	0,034	2,70				09.12.2004
		11,684							09.12.2004
	RFA040 1M	3,282	3,306	0,034		20,48			09.12.2004
		3,332							09.12.2004
	RFA040 5M	5,396	5,124	0,382		12,58			09.12.2004
		4,854							09.12.2004
	RFA040 8M	3,626	3,406	0,312		10,31			09.12.2004
		3,184							09.12.2004
RFA041	RFA041 d0	14,486	13,134	1,91		13,52	8,49	5,03	09.12.2004
		11,782							09.12.2004
	RFA041 d1	12,274	11,832	0,626	0,90				09.12.2004
		11,39							09.12.2004
	RFA041 1M	7,852	7,63	0,312		15,66			09.12.2004

		7,41						09.12.2004	
	RFA041 4M	9,818	8,958	1,216		14,01		09.12.2004	
		8,098						09.12.2004	
RFA042	RFA042 d0	8,294	7,14	1,632		46,29	2,81	43,48	09.12.2004
		5,984							09.12.2004
	RFA042 d1	7,312	7,238	0,104	1,01				09.12.2004
		7,164							09.12.2004
	RFA042 1M	1,956	1,932	0,034		58,13			09.12.2004
		1,906							09.12.2004
	RFA042 3M/d0	4,952	5,444	0,694		24,47	4,35	20,12	09.12.2004
		5,936							09.12.2004
	RFA042 3M/d1	13,404	13,994	0,834	<b>2,57</b>				09.12.2004
		14,584							09.12.2004
	RFA042 4M/1M	4,166	4,004	0,174		18,77			09.12.2004
		3,92							09.12.2004
	RFA042 7M/4M	4,56	4,192	0,522		18,77			09.12.2004
		3,822							09.12.2004
RFA043	RFA043 d0	3,768	2,854	1,292		12,29	2,81	9,48	14.05.2004
		1,94							14.05.2004
	RFA043 d1	3,328	3,412	0,12	1,20				14.05.2004
		3,496							14.05.2004
	RFA043 2W	3,902	3,8	0,144		5,50			14.05.2004
		3,7							14.05.2004
RFA044	RFA044 d0	2,202	2,072	0,184		20,38	10,23	10,15	16.01.2005
		1,942							16.01.2005
	RFA044 d1	0,58	0,32	0,368	0,15				16.01.2005
		0,06							16.01.2005
	RFA044 1M	1,812	1,52	0,414		12,35			16.01.2005
		1,228							16.01.2005
	RFA044 4M	2,202	2,104	0,138		12,35			16.01.2005
		2,008							16.01.2005
RFA046	RFA046 d0	2,592	2,558	0,046		19,23	0,52	18,71	16.01.2005
		2,526							16.01.2005
	RFA046 d1	2,916	2,558	0,504	1,00				16.01.2005
		2,202							16.01.2005
	RFA046 1M	2,332	2,396	0,092		18,10			16.01.2005
		2,462							16.01.2005
	RFA046 3M	1,488	1,488	0		7,00			16.01.2005
		1,488							16.01.2005
RFA047	RFA047 d0	4,278	4,57	0,414		124,29	7,61	116,68	16.01.2005
		4,862							16.01.2005
	RFA047 d1	14,988	13,82	1,652	<b>3,02</b>				16.01.2005
		12,65							16.01.2005
	RFA047 1M	6,94	7,166	0,322					16.01.2005
		7,394							16.01.2005
	RFA047 3M/d0	8,562	9,016	0,642		24,96	zusätzlich		16.01.2005
		9,47							16.01.2005
	RFA047 3M/d1	5,446	6,096	0,918	0,68				16.01.2005
		6,744							16.01.2005
	RFA047 4M/1M	7,588	7,718	0,184		94,00			16.01.2005
		7,848							16.01.2005
RFA052	RFA052 d0	2,916	3,078	0,23		7,95	1,42	6,53	16.01.2005

		3,24						16.01.2005
	RFA052 d1	6,55	5,642	1,284	1,83			16.01.2005
		4,732						16.01.2005
	RFA052 1M/d0	2,396	2,428	0,046		45,52	7,36	38,16
		2,462						16.01.2005
	RFA052 1M/d1	6,616	4,798	2,57	1,98			16.01.2005
		2,98						16.01.2005
	RFA052 2M/1M	3,11	2,428	0,964		45,52		16.01.2005
		1,748						16.01.2005
RFA064	RFA064 d0	8,692	8,076	0,872		94,82	37,98	56,84
		7,458						16.01.2005
	RFA064 d1	18,038	17	1,468	<b>2,11</b>			16.01.2005
		15,96						16.01.2005
	RFA064 d3	6,68	7,914	1,744				16.01.2005
		9,146						16.01.2005

Tab. 48: Messwerte für HSP70 in Absolutwerten [ng/ml] der RFA-Patienten. Angegeben sind die Daten der Versuche, weil einige Patienten mehrfach auf die Konzentration von HSP70 im Serum getestet wurden, um die Vergleichbarkeit der Versuche zu gewährleisten. Die Quotienten d1/d0, die höher als 2 berechnet wurden, sind rot hervorgehoben.

Die angegebenen Volumenangaben wurden von Dr. Diethard Schmidt aus der Universitätsklinik für Radiologie anhand der Kontrolluntersuchungen in MRT und CT ausgemessen und berechnet.

Als wichtigste Kontrollgruppe wurden 20 Patienten auf die Expression von HSP70 im Serum im Tagesvergleich vor und einen Tag nach Leberbiopsie untersucht. Diese Kontrollgruppe (LB) unterscheidet sich von der Patienten-Population nur darin, dass hierbei keine Radiofrequenz zum Einsatz kam und somit keine Koagulationsnekrose durch Hitze induziert wurde. Die Größen der Biopsie-Nadeln und der Ablationssonden waren ebenfalls vergleichbar. Die Patienten erhielten auch hier nur eine Lokalanästhesie.

Patient	Sample Name	HSP-70 [ng/ml]	Durchschnitt HSP-70 [ng/ml]	Standard Abweichung	Faktor d1/d0	Test
LB1	LB1 d0	0,270	0,276	0,008	0,88	04.08.2005
		0,282				04.08.2005
LB1	LB1 d1	0,248	0,242	0,008		04.08.2005
		0,236				04.08.2005
LB2	LB2 d0	0,100	0,092	0,012	1,15	04.08.2005
		0,082				04.08.2005
LB2	LB2 d1	0,120	0,106	0,020		04.08.2005
		0,090				04.08.2005
LB3	LB3 d0	0,356	0,362	0,008	1,25	04.08.2005
		0,368				04.08.2005
LB3	LB3 d1	0,460	0,452	0,010		04.08.2005
		0,446				04.08.2005
LB4	LB4 d0	0,258	0,242	0,024	<b>2,03</b>	04.08.2005
		0,224				04.08.2005
LB4	LB4 d1	0,486	0,492	0,010		04.08.2005
		0,500				04.08.2005
LB5	LB5 d0	0,202	0,224	0,032	0,30	04.08.2005
		0,248				04.08.2005
LB5	LB5 d1	0,082	0,074	0,012		04.08.2005
		0,064				04.08.2005
LB6	LB6 d0	1,302	1,302	0,000	1,07	04.08.2005
		1,302				04.08.2005
LB6	LB6 d1	1,510	1,398	0,158		04.08.2005
		1,284				04.08.2005
LB7	LB7 d0	0,460	0,500	0,058	0,93	04.08.2005
		0,540				04.08.2005
LB7	LB7 d1	0,486	0,466	0,028		04.08.2005
		0,446				04.08.2005
LB9	LB9 d0	0,192	0,186	0,008	1,12	04.08.2005
		0,180				04.08.2005
LB9	LB9 d1	0,214	0,208	0,008		04.08.2005
		0,202				04.08.2005
LB10	LB10 d0	0,974	0,950	0,034	0,95	04.08.2005
		0,926				04.08.2005
LB10	LB10 d1	0,894	0,902	0,012		04.08.2005
		0,910				04.08.2005
LB11	LB11 d0	0,258	0,258	0,000	0,68	04.08.2005
		0,258				04.08.2005
LB11	LB11 d1	0,140	0,176	0,052		04.08.2005
		0,214				04.08.2005
LB12	LB12 d0	0,420	0,432	0,018	1,30	04.08.2005
		0,446				04.08.2005
LB12	LB12 d1	0,554	0,562	0,010		04.08.2005
		0,568				04.08.2005
LB13	LB13 d0	0,110	0,140	0,042	1,60	04.08.2005

		0,170				04.08.2005
	LB13 d1	0,224	0,224	0,000		04.08.2005
		0,224				04.08.2005
LB14	LB14 d0	0,214	0,208	0,008	0,65	04.08.2005
		0,202				04.08.2005
	LB14 d1	0,130	0,135	0,008		04.08.2005
		0,140				04.08.2005
LB16	LB16 d0	0,170	0,175	0,008	0,86	04.08.2005
		0,180				04.08.2005
	LB16 d1	0,140	0,150	0,014		04.08.2005
		0,160				04.08.2005
LB17	LB17 d0	1,054	1,078	0,034	1,07	04.08.2005
		1,102				04.08.2005
	LB17 d1	1,150	1,150	0,000		04.08.2005
		1,150				04.08.2005
LB19	LB19 d0	0,626	0,618	0,010	0,80	04.08.2005
		0,612				04.08.2005
	LB19 d1	0,528	0,494	0,048		04.08.2005
		0,460				04.08.2005
LB20	LB20 d0	1,168	1,268	0,144	1,14	04.08.2005
		1,370				04.08.2005
	LB20 d1	1,616	1,450	0,234		04.08.2005
		1,284				04.08.2005
LB21	LB21 d0	0,612	0,582	0,040		04.08.2005
		0,554				04.08.2005
	LB21 d1	1,670	1,652	0,026	<b>2,84</b>	04.08.2005
		1,634				04.08.2005
LB23	LB23 d0	0,500	0,492	0,010	0,83	04.08.2005
		0,486				04.08.2005
	LB23 d1	0,432	0,408	0,036		04.08.2005
		0,382				04.08.2005
LB24	LB24 d0	0,170	0,155	0,022	0,86	04.08.2005
		0,140				04.08.2005
	LB24 d1	0,140	0,134	0,008		04.08.2005
		0,130				04.08.2005

Tab. 49: HSP70-ELISA: Messwerte der Kontrollgruppe LB bestehend aus Patienten, die zu diagnostischen Zwecken eine Leberbiopsie erhalten hatten. Die Quotienten d1/d0, die höher als 2 berechnet wurden, sind rot hervorgehoben.

Die Vergleichbarkeit der Gruppe mit der Patienten-Population ist durch die Größe der eingesetzten Nadeln und die Bedingungen gegeben, Der Unterschied besteht darin, dass bei der LB-Gruppe keine Radiofrequenz zum Einsatz kam.

Außerdem wurden 9 Patienten der Kontrollgruppe der Patienten, die eine laparoskopische Cholezystektomie erhalten hatten (CO), und 5 gesunde Kontrollspender (HD) aus dem Labor auf Hitzeschockproteinexpression im Serum untersucht.

Patient		Sample Name	HSP-70 [ng/ml]	Durchschnitt HSP-70 [ng/ml]	Standard Abweichung	Faktor d1/d0	Test
CO1	CO1 d0		2,546	2,472	0,104		09.12.2004
			2,398				09.12.2004
CO1	CO1 d1		4,462	3,798	0,938	1,54	09.12.2004
			3,134				09.12.2004
CO1	CO1 d0		2,202	2,17	0,046		16.01.2005
			2,136				16.01.2005
CO1	CO1 d1		4,862	5,772	1,284	<b>2,66</b>	16.01.2005
			6,68				16.01.2005
CO2	CO2 d0		3,5	4,376	1,24		16.01.2005
			5,252				16.01.2005
CO2	CO2 d1		6,744	6,908	0,23	1,58	16.01.2005
			7,07				16.01.2005
CO3	CO3 d0		2,916	3,63	1,01		16.01.2005
			4,344				16.01.2005
CO3	CO3 d1		5,772	5,772	0	1,75	16.01.2005
			5,772				16.01.2005
CO4	CO4 d0		3,76	3,564	0,276		16.01.2005
			3,37				16.01.2005
CO4	CO4 d1		2,202	2,98	1,102	0,84	16.01.2005
			3,76				16.01.2005
CO5	CO5 d0		2,332	2,202	0,184		16.01.2005
			2,072				16.01.2005
CO5	CO5 d1		3,37	3,24	0,184	1,47	16.01.2005
			3,11				16.01.2005
CO6	CO6 d0		2,916	2,656	0,368		16.01.2005
			2,396				16.01.2005
CO6	CO6 d1		2,656	2,266	0,55	0,85	16.01.2005
			1,878				16.01.2005
CO7	CO7 d0		2,98	2,754	0,322		16.01.2005
			2,526				16.01.2005
CO7	CO7 d1		3,76	3,89	0,184	1,41	16.01.2005
			4,02				16.01.2005
CO8	CO8 d0		2,332	2,494	0,23		16.01.2005
			2,656				16.01.2005
CO8	CO8 d1		0,968	0,872	0,138	0,35	16.01.2005
			0,774				16.01.2005
CO9	CO9 d-1		1,552	1,974	0,596		16.01.2005
			2,396				16.01.2005
CO9	CO9 d1		2,02	3,856	0,23	1,95	16.01.2005
			3,694				16.01.2005
HD1	HD1 d1		1,974	2,076	0,144		14.05.2004
			2,176				14.05.2004
	HD1 d2		2,108	2,176	0,096	1,04	14.05.2004
			2,244				14.05.2004
HD1 d3		1,77	1,686	0,12	0,77	14.05.2004	
		1,602				14.05.2004	
HD1 d4		1,196	1,516	0,454	0,90	14.05.2004	

		1,838				14.05.2004
	HD1 d5	2,21	2,278	0,096	1,50	14.05.2004
		2,346				14.05.2004
HD2	HD2 d1	1,5	1,872	0,526		14.05.2004
		2,244				14.05.2004
	HD2 d2	4,004	4,072	0,096	<b>2,17</b>	14.05.2004
		4,14				14.05.2004
	HD2 d3	1,94	2,346	0,574	0,58	14.05.2004
		2,752				14.05.2004
	HD2 d4	1,67	1,788	0,168	0,76	14.05.2004
		1,906				14.05.2004
	HD2 d5	2,448	2,126	0,454	1,19	14.05.2004
		1,804				14.05.2004
HD3	HD3 d1	2,21	1,736	0,67		14.05.2004
		1,264				14.05.2004
	HD3 d2	4,274	4,36	0,12	<b>2,51</b>	14.05.2004
		4,444				14.05.2004
	HD3 d3	2,684	2,532	0,216	0,58	14.05.2004
		2,38				14.05.2004
	HD3 d4	3,158	3,022	0,192	1,19	14.05.2004
		2,888				14.05.2004
	HD3 d5	2,482	2,582	0,144	0,85	14.05.2004
		2,684				14.05.2004
HD4	HD4 d1	2,274	3,97	0,52		14.05.2004
		3,666				14.05.2004
	HD4 d2	2,042	1,262	0,454	0,32	14.05.2004
		1,684				14.05.2004
	HD4 d3	4,028	4,14	0,144	<b>3,29</b>	14.05.2004
		4,24				14.05.2004
	HD4 d4	4,242	4,174	0,24	1,01	14.05.2004
		4,004				14.05.2004
	HD4 d5	5,798	6,272	0,67	1,50	14.05.2004
		6,744				14.05.2004
HD5	HD5 d1	4,308	4,24	0,096		14.05.2004
		4,174				14.05.2004
	HD5 d2	1,906	1,72	0,264	0,41	14.05.2004
		1,534				14.05.2004
	HD5 d3	3,496	3,226	0,382	1,88	14.05.2004
		2,954				14.05.2004
	HD5 d4	2,076	2,076	0	0,64	14.05.2004
		void				14.05.2004
	HD5 d5	3,564	3,734	0,24	1,80	14.05.2004
		3,902				14.05.2004

Tab. 50: Messwerte für HSP70 in Absolutwerten [ng/ml] der Kontrollgruppen. Die Daten der Versuche sind angegeben, weil einige Patienten mehrfach getestet wurden, um die Vergleichbarkeit der einzelnen Versuche zu überprüfen. Die Quotienten d1/d0, die höher als 2 berechnet wurden, sind rot hervorgehoben.

Bei den RFA-Patienten konnte in etwa der Hälfte der Fälle ein Anstieg der Serumkonzentration von HSP70 um mehr als das Doppelte beobachtet werden. Bei den verschiedenen Kontrollgruppen sahen die Ergebnisse jeweils sehr unterschiedlich aus. Die Kontrollgruppe LB zeigte bei zwei Patienten einen Anstieg der HSP70-Expression. Die anderen Patienten zeigten einen sehr geringen Spiegel von HSP70 im Serum.

In der Kontrollgruppe CO zeigte ein Patient einen Anstieg der Serumkonzentration von HSP70 um mehr als das Doppelte.

In der Kontrollgruppe HD zeigte sich eine deutliche starke Variabilität der Serumspiegel.

Zur Erklärung dieser Ergebnisse siehe Kapitel 6.2.4. „Diskussion“.

#### **6.2.3.4.3.2. Statistische Auswertung der Hitzeschockprotein-Detektion:**

Durchgeführt wurde ein Student's T-Test zum Vergleich der einzelnen Gruppen. Verglichen wurden die Faktoren  $d1/d0$ , die angeben, in wie weit sich der Serumspiegel von HSP70 im Tagesvergleich verändert.

Die Patienten mit RF-Ablation wurden jeweils mit einer der Kontrollgruppen verglichen. Für die Frage, in wie weit diese Gruppen vergleichbar sind, siehe Kapitel 6.2.4. Diskussion

Für die Erklärung der einzelnen Parameter siehe Kapitel 6.2.3.3.3.

Die Werte der einzelnen Gruppen waren (die Zahlenwerte sind jeweils angegeben in Faktor  $d1/d0$ ):

**Gruppe A:** Patienten, die mit RF-Ablation behandelt wurden

**Gruppe B:** Patienten, die zu diagnostischen Zwecken leberbiopsiert wurden

**Gruppe C:** Patienten, deren Gallenblase laparoskopisch entfernt wurde

**Gruppe D:** Gesunde Spender

	Gruppe A	Gruppe B	Gruppe C	Gruppe D
<b>Arithmetisches Mittel</b>	1,75	1,12	1,44	1,24
<b>95% Konfidenz-Intervall</b>	1,499 bis 1,997	0,7904 bis 1,44	0,9436 bis 1,936	0,8884 bis 1,601
<b>Standardabweichung</b>	0,81	0,543	0,647	0,765
<b>Höchster Messwert</b>	3,1	2,84	2,66	3,29
<b>Niedrigster Messwert</b>	0,15	0,3	0,35	0,32
<b>Median</b>	1,75	1,01	1,5	1,02
<b>Standardabweichung vom Median</b>	0,685	0,341	0,456	0,563

Tab. 51: Übersicht der Werte der einzelnen Gruppen.

Der T-Test ergab folgende Ergebnisse:

**Vergleich RFA-Patienten mit Kontrollgruppe LB (Leberbiopsiepatienten)**

Mittel RFA-Patienten: 1,75

Mittel Kontrollgruppe LB: 1,12

$t = 3,1$

c-Wert (aus Tabelle) bei 95% Konfidenz: 1,68

Standardabweichung: 0,724

Freiheitsgrade: 52

Wahrscheinlichkeit dieses Ergebnisses bei Annahme der Nullhypothese: 0,0031

Für die Werte der einzelnen Gruppen siehe oben.

Da  $t$  hier deutlich größer ist als der c-Wert ist der Mittelwert der Faktoren  $d1/d0$  als Verhältnis der Serumkonzentration vor und nach RF-Ablation bei RFA-Patienten deutlich höher als bei Patienten, die eine Leberbiopsie erhalten haben.

**Vergleich RFA-Patienten mit Kontrollgruppe CO (Laparoskopische Cholezytektomie)**

Mittel RFA-Patienten: 1,75

Mittel Kontrollgruppe CO: 1,44

$t = 1,1$

c-Wert (aus Tabelle) bei 95% Konfidenz: 1,68

Standardabweichung: 0,778

Freiheitsgrade: 42

Wahrscheinlichkeit dieses Ergebnisses bei Annahme der Nullhypothese: 0,28

Für die Werte der einzelnen Gruppen siehe oben.

Damit ist diese Gruppe vom Mittelwert her gesehen nicht unterschiedlich von den RFA-Patienten.

**Vergleich RFA-Patienten mit Kontrollgruppe HD (Laborspender)**

Mittel RFA-Patienten: 1,75

Mittel Kontrollgruppe HD: 1,24

$t = 2,25$

c-Wert (aus Tabelle) bei 95% Konfidenz: 1,68

Standardabweichung: 0,794

Freiheitsgrade: 52

Wahrscheinlichkeit dieses Ergebnisses bei Annahme der Nullhypothese: 0,029

Damit ist auch hier der Mittelwert der RFA-Patienten deutlich höher als der der gesunden Spender.

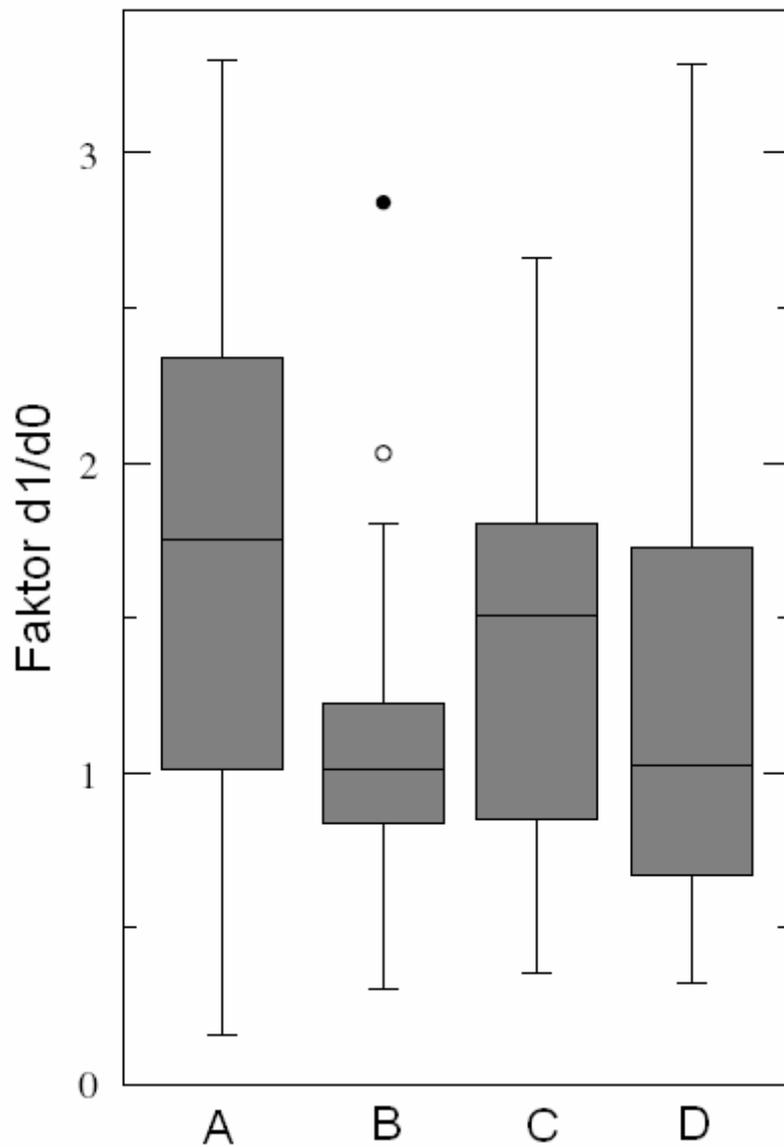


Abb. 68: Box & Whisker Plots der Faktoren  $d1/d0$  bei RFA-Patienten (Gruppe A), der Kontrollgruppe LB (B), der Kontrollgruppe CO (C) und der Kontrollgruppe HD (D). Für die Erklärung der Box & Whisker Plots siehe Kapitel 3.10.

#### **6.2.4. Diskussion**

Thermoablative Verfahren sind neue minimal invasive Methoden zur Behandlung maligner Neoplasien, die zunehmend einen Platz in der Standardtherapie bekommen. Zu ihnen zählt neben der Radiofrequenzablation auch die Cryotherapie, die sich der entgegengesetzten Temperatur bedient. Bei ihr werden Tumore eingefroren [McCarter and Fong 2000]. Neue Studien haben gezeigt, dass die Cryoablation einen immunstimulatorischen Effekt hat. Im Tiermodell wurde dabei beschrieben, dass es dabei sowohl zu einer Aktivierung von T-Zellen als auch zu einer erhöhten systemischen Aktivität von NK-Zellen kommt [Sabel et al. 2005].

Für die Radiofrequenzablation wurde Ähnliches gezeigt: Im Tiermodell wurde die Aktivierung tumorspezifischer T-Lymphozyten beschrieben. Zusätzlich zu dieser T-Zell Aktivierung wurde eine verstärkte Infiltration immunkompetenter Zellen in den Tumor nachgewiesen [Wissniowski et al. 2003]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Expression von Hitzschockproteinen auf der Membran der Zellen im ablatierten Gewebe und in einem Ringsaum um die Nekrose herum erhöht ist [Schueller et al. 2004; Yang et al. 2004; Schueller et al. 2004b; Rai et al. 2005; Schenk and Pereira unpublished data].

Vorliegende Studie beschäftigt sich damit, ob im Menschen gleichartige Ergebnisse auch zu beobachten sind. Es wird das T-Zell-Repertoire, die Antikörper-Expression im Serum und die systemische Ausschüttung immunstimulatorischer Parameter untersucht.

Da kein Tumor- und kein Normalgewebe der einzelnen Patienten verfügbar war, musste auf eine patientenindividuelle Analyse von Genexpression, Oberflächenstrukturen und MHC-Liganden verzichtet werden. Es musste also Epitope zurückgegriffen werden, die in der Literatur beschrieben sind. Zum Einsatz kamen Epitope, die in bestimmten Tumorarten (zum Beispiel im Colorectalen Carcinom) in den meisten Fällen, beziehungsweise immer überexprimiert sind oder gar tumorspezifisch vorkommen.

Diese Methodik war nicht für alle HLA-Restriktionen verfügbar, weil zu wenige tumorassoziierte Epitope für manche HLA-Allele bekannt waren. Somit war der zweite wichtige limitierende Faktor, dass die Patienten, die mit dieser Methode

untersucht werden konnten, HLA-A2<sup>+</sup> sein mussten. Aufgrund anderer Messergebnisse dieser Arbeit (siehe dazu Kapitel 6.1.2.7.) konnten auch zwei Patienten, die HLA-A3<sup>+</sup> waren, untersucht werden.

Ob diese Antigene wirklich auf den Tumorzellen der Patienten exprimiert waren, war nicht nachvollziehbar. Möglicherweise wäre nach individueller Analyse der Tumoren ein anderer Peptidcocktail für die *in vitro* Versuche zum Einsatz gekommen. Dazu soll eine neue Studie durchgeführt werden, die ab September 2005 beginnt (siehe unten).

Etwa die Hälfte der untersuchten Patienten zeigte eine zumindest transiente Immunantwort gegen mindestens eines der eingesetzten Epitope. Dies ist erstaunlich, wenn man sich vor Augen führt, dass nur einige wenige Epitope zur Untersuchung ausgewählt wurden. Man muss davon ausgehen, dass es eine sehr große Menge von tumorassoziierten T-Zell-Epitopen und HLA-Liganden gibt, die bis heute unbekannt sind [Hammer et al. 2005]. Auch gibt es sehr viele dieser Oberflächenstrukturen. Eine Untersuchung von PBMCs der Patienten mit all diesen Antigenen wäre (sofern man sie alle kennen würde) schlicht unmöglich. Wenn man nun mit einigen wenigen Peptiden die Zellen untersucht und damit bei der Hälfte der Patienten eine Antwort beobachten kann, heißt dies nicht, dass bei der anderen Hälfte keine Immunantwort zu beobachten ist, sondern lediglich, dass man sie durch die Auswahl der Peptide verpasst. Es kann nämlich sein, dass bei Patienten, die gegen die ausgewählten Peptide keine Antwort zeigen, dennoch eine Immunantwort gegen ihren Tumor induziert wurde. Ein negatives Ergebnis ist bei diesem Versuchsaufbau also nicht zwingend ein wirklich negatives Ergebnis in Bezug auf die Fragestellung, ob Radiofrequenzablation in der Lage ist, eine antigenspezifische T-Zell-Antwort zu generieren. Zusätzlich bedeutet ein positives Ergebnis nicht gleich, dass die Immunantwort nur gegen dieses eine (oder einige wenige) Epitop induziert wurde, sondern dass es prinzipiell auch noch eine Immunantwort gegen ein oder mehrere nicht untersuchte Epitope geben könnte.

Die Ergebnisse sind also prinzipiell sehr vielversprechend, weil man davon ausgehen kann, dass sehr viele Reaktivitäten mit der Methodik gar nicht messbar sind. Es kann sich durchaus um eine breite Aktivierung des

Immunsystems bei den meisten Patienten handeln. Wenn man mit maximal 14 Peptiden schon eine Ansprechrate von über 50% detektieren kann, müsste man mit deutlich mehr Peptiden viel mehr positive Ergebnisse detektieren können.

Die als negativ gemessenen Patienten würden sich also nochmals in zwei Gruppen teilen: Patienten, bei denen tatsächlich keine Immunantwort in Verbindung mit der RF-Ablation induziert wurde, und Patienten, bei denen eine Reaktivität durch Radiofrequenzablation generiert wurde, die aber mit dem angewendeten Protokoll nicht detektiert werden konnte.

Eine Lösung dieses Problems wäre die Untersuchung der PBMCs mit Transfektion autologer RNA aus den eigenen Tumorzellen in dendritische Zellen [Nencioni et al. 2003; Grunebach et al. 2005]. Dabei wird RNA, die aus autologem Tumorgewebe der Patienten gewonnen wird, in dendritische Zellen transfiziert. Die T-Zellen werden dann mit diesen DCs stimuliert. Diese Technik hat den Vorteil, dass man die T-Zellen auf alle potentiellen T-Zell-Epitope untersuchen könnte, und auch Patienten in die Studie eingeschlossen werden können, deren HLA-Typ entweder nicht bekannt oder für die in dieser Arbeit angewandte Technik ungünstig war, weil zu wenige T-Zell-Epitope für die jeweilige HLA-Restriktion bekannt waren. Außerdem könnten gleichzeitig MHC-Klasse-II-Epitope untersucht werden. Die extrahierte RNA kann *in vitro* amplifiziert werden, sodass eine Biopsie als Gewebeprobe ausreicht. Für den Patient würde dies zusätzlich einen Eingriff zur Materialgewinnung bedeuten. Dies könnte eine Biopsie sein oder eine chirurgische Resektion. Ein Problem dabei ist auch, dass dem Patienten sowohl eine Biopsie des Tumors als auch eine Biopsie mit Normalgewebe entnommen werden müsste, um die beiden Gewebe vergleichen zu können.

Um dies untersuchen zu können, wird ab September 2005 eine neue Studie in Zusammenarbeit mit der Universitätsklinik für Radiologie und der Universitätsklinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie durchgeführt. Dabei gibt es vier Gruppen von Patienten:

1. Patienten, die Herde primärer oder sekundärer Lebertumoren in verschiedenen Leberlappen haben. Bei ihnen werden ein oder mehrere

Herde mit RF-Ablation behandelt. Nach vier Wochen werden die anderen Herde chirurgisch reseziert.

2. Patienten, die resektable Herde in der Leber haben, erhalten vier Wochen präoperativ eine RF-Ablation. Die bereits behandelten Herde werden entfernt.
3. Resektale Leberherde werden nach dem Goldstandard chirurgisch reseziert. Eine RF-Ablation findet nicht statt.
4. Leberherde werden nur mit RF-Ablation behandelt.

Von den Gruppen 1-3 erhält die Abteilung für Immunologie Gewebeproben von Tumor- und Normalgewebe, um daran analog zur Vakzinierungsstudie bei fortgeschrittenem Nierenzellcarcinom Genexpressionsanalysen und Analysen der MHC-Liganden durchzuführen. So können individuelle Mischungen von Peptiden zusammengestellt werden, die auf den jeweiligen Tumor der einzelnen Patienten abgestimmt sind. Damit können die *in vitro* Stimulationen mit Peptiden optimiert werden.

Zusätzlich werden die Gruppen in Bezug auf ihre Immunantwort, die Infiltration von Lymphozyten und den klinischen Verlauf miteinander verglichen. Dadurch sollen Aussagen getroffen werden, in wie weit RF-Ablation eine systemische Immunantwort induzieren kann (zum Beispiel durch die Bestimmung der Infiltration von Lymphozyten in nicht mit RF-Ablation behandelte Herde). Hierbei könnten auch TILs gewonnen und charakterisiert werden, wobei das meiste Gewebe wahrscheinlich bereits fixiert ist.

Die Detektion transienter Immunantworten, die in konsekutiven Proben nicht mehr nachweisbar sind, ist ein Phänomen, das in anderen Impfstudien schon beobachtet wurde [Boon et al. 1994; Tuting et al. 1998]. Eine Erklärung dafür ist, dass die Anzahl von antigenspezifischen T-Zellen limitiert ist und wieder unter die Nachweisgrenze sinken kann [Rentzsch et al. 2003].

Die Zeitpunkte der ersten Detektion waren bei den positiv getesteten Patienten sehr unterschiedlich. Die ersten Antworten konnten drei Monate (RFA015), die spätesten neunzehn Monate (RFA012) nach RF-Ablation detektiert werden. Zur näheren Evaluierung dieses Phänomens werden weitere Patienten untersucht.

Ob diese Reaktivität durch Radiofrequenzablation allein induziert wurde oder nicht, ist nicht mit letzter Sicherheit zu sagen.

Prinzipiell ist eine Chemotherapie ebenfalls in der Lage, tumorspezifische Immunantworten zu induzieren [Correale et al. 2003].

Da der Patient RFA012 nicht mit Chemotherapie behandelt wurde, scheidet für ihn diese Möglichkeit der Immunstimulation aus. Allerdings ist bei ihm die Antwort gegen MUC-1 STAP erst sehr spät detektierbar (nach 19 Monaten). Möglicherweise war der Anteil von antigenspezifischen T-Zellen an der Gesamtzahl der CD8<sup>+</sup> T-Zellen so gering, dass sie vor dem ersten positiv getesteten Zeitpunkt unter der Nachweisgrenze lag.

Beim Patienten RFA015 war die Antwort gegen das Her2/neu Epitop KIFGSLAFL drei Monate nach Radiofrequenzablation und vier Monate nach der letzten Chemotherapie detektierbar. Die Erholungszeiten nach myeloablativer Therapie als Therapie für Mammacarcinome und Plasmozytome mit anschließender peripherer Stammzelltransplantation bewegen sich im Bereich weniger Wochen [De Rosa et al. 2004]. Nach Blutspende wird mit maximal drei Monaten Erholungszeit gerechnet. Somit sollte nach einer Zeitspanne von vier Monaten eine Immunrekonstitution stattgefunden haben. Wäre die gemessene Aktivität ein Chemotherapieeffekt müsste er wohl früher einsetzen, also demnach schon spätestens in der Probe einen Monat nach Radiofrequenzablation detektierbar gewesen sein.

Ein Problem der Versuche mit Zellen dieses Patienten ist, dass die Aktivität in Singleplex-PCR deutlich schwächer als in Multiplex-PCR zu detektieren war. Die Reproduktion des Ergebnisses war mit Tetramer-Färbung nicht möglich. Dies könnte damit zusammenhängen, dass die RT-PCR eine deutlich sensitivere Methode zur Detektion spezifischer T-Zellen ist als das Tetramer-Staining.

Für Tetramere, die Peptid-MHC-Komplexe repräsentieren, die sich aus T-Zell-Antigenen ableiten, gibt es zusätzlich keine verlässliche Positivkontrolle außer klonierten T-Zellen, die sich allerdings deutlich von Zellen von Patienten unterscheiden. Diese Klonierung ist auch sehr zeitaufwendig und kostenintensiv. Es ist daher sinnvoller, Patienten oder gesunde Spender zu

untersuchen. Zeigen sie eine spezifische Tetramer-Bindung, kann davon ausgegangen werden, dass das Tetramer wohl spezifisch bindet. Solche Spender sind natürlich unter Umständen schwer zu finden. Es ist somit schwierig zu sagen, ob ein Tetramer überhaupt an den T-Zell-Rezeptor bindet oder ob diese Bindung spezifisch ist. Somit könnte ein negatives Ergebnis in der Tetramer-Färbung auch bedeuten, dass keine spezifische Tetramer-Bindung möglich war. Eine intrazelluläre IFN $\gamma$ -Färbung war bei RFA015 nicht möglich, weil keine PMBC-Proben mehr vorhanden waren. Diese Technik hätte das Problem der fehlenden Positivkontrolle eliminiert. Dabei wird mit einem intrazellulären Antikörper ein produziertes Zytokin gemessen. Eine Analyse der Funktionalität der T-Zelle wird dabei nicht durchgeführt.

RFA016 zeigte zuerst transiente Antworten gegen einige wenige Peptide. Die Aktivitäten waren in den jeweils konsekutiven Proben nicht mehr detektierbar. Das Verschwinden von einmal gemessenen Antworten ist ein bekanntes Phänomen [Boon et al. 1994]. Die Zahl der antigenspezifischen T-Zellen ist limitiert und kann daher wieder unter die Nachweisgrenze sinken [Rentzsch et al. 2003]. Die letzte untersuchte Probe 28M/17M zeigte eine deutliche Aktivitätsvermehrung nach Stimulation mit (fast) allen Peptiden, sowie eine deutlich erhöhte IFN $\gamma$ -Produktion nach Stimulation mit G250 HLSTAFARV. Versuche, diese Ergebnisse in der letzten Probe zu reproduzieren, werden noch durchgeführt.

Die positiven Ergebnisse in den frühen Proben konnten im Tetramer-Staining nicht reproduziert werden, was wiederum mit der geringeren Sensitivität dieser Methode zusammenhängen könnte.

RFA024 wurde ab einen Monat bis drei Monate nach 2. Radiofrequenzablation chemotherapiert. In der Probe einen Monat nach 2. RF-Ablation ist eine Antwort gegen Survivin sichtbar. Dies ist, da in den letzten zehn Monaten davor keine Chemotherapie stattgefunden hatte, kein Effekt einer Chemotherapie. In der nächsten Probe (12M/7M) ist dann eine Antwort gegen MUC-1 STAP detektiert worden. Dies könnte nun unter Umständen ein Chemotherapieeffekt gewesen sein. Andererseits spricht die Tatsache, dass der Patient zeitnah chemotherapiert wurde, nicht zwingend gegen eine Induktion der T-Zell-Antwort

durch die Radiofrequenzablation. Die Antwort gegen MUC-1 STAP wird in der folgenden Probe (14M/9M/d0) wieder schwächer. Nach dritter Radiofrequenzablation (Probe 15M/10M/1M) ist dann eine starke Antwort gegen MUC-1 STAP detektierbar. Während dieser Zeit hat keine Chemotherapie stattgefunden. Eine Erklärung wäre, dass eine geringe Anzahl MUC-1 STAP-spezifischer T-Zellen vorhanden war, die durch RF-Ablation amplifiziert wurde. Somit wurde eine starke Antwort messbar.

RFA025 zeigte keine Antwort gegen die HLA-A3-restringierten Liganden, die auf den Tumorzellen der Patienten RCC98 und RCC115 identifiziert wurden. Interessanterweise konnte bei der Patientin RFA025 der Nierentumor mittels RF-Ablation vollständig zerstört werden.

RFA026 wurde zeitnah zur ersten Radiofrequenzablation chemotherapiert. Bereits vor RF-Ablation war eine geringe Aktivität gegen MUC-1 STAP detektierbar, die bis sechs Monate nach Therapie nachweisbar war, dann aber nicht mehr detektiert werden konnte. Die vierte Radiofrequenzablation scheint aber einen neuen Booster-Effekt gehabt zu haben. Einen Monat nach dieser Therapie wurde eine sehr starke Antwort gegen MUC-1 STAP detektiert. Dies spricht dafür, dass Radiofrequenzablation zumindest in der Lage ist, bereits bestehende, geringe Immunantworten zu verstärken. Sie hat somit einen deutlichen immunstimulatorischen Effekt.

Die PBMCs des Patienten RFA046 zeigten bei Stimulation mit dem Her2/neu Epitop KIFGSLAFL eine deutlich erhöhte IFN $\gamma$ -Produktion in der Probe 12 Monate nach RF-Ablation. Von diesem Patienten wurde bisher nur diese eine Probe untersucht. Weiterführende Untersuchungen müssen zeigen, ab wann diese Reaktivität messbar ist, und ob diese Ergebnisse im intrazellulären IFN $\gamma$ -Staining und IFN $\gamma$ -ELISPOT reproduzierbar sind.

Der Patient RFA047 zeigte zehn Monate nach 1. und sieben Monate nach 2. Radiofrequenzablation eine antigenspezifische Reaktivität gegen das Her2/neu-Epitop KIFGSLAFL. Gegen dieses Peptid hatten auch schon die Patienten RFA015 und RFA046 reagiert. Der Zeitpunkt der Messung sieben Monate nach Therapie liegt hier ebenfalls im Zeitrahmen der anderen gemessenen Aktivitäten und würde somit global betrachtet dafür sprechen, dass

Radiofrequenzablation eine spezifische Immunantwort gegen Tumorantigene in diesem Zeitrahmen induzieren kann.

Patient RFA048 war einer der beiden Patienten, deren Zellen mit Peptiden stimuliert wurden, die als Liganden auf dem Tumor eines der Impfpatienten (RCC98) aus dem anderen Zweig dieser Arbeit gefunden wurden [Krüger et al. 2004]. Diese Peptide sind bislang nicht als Epitope beschrieben worden. Es war daher nicht klar, ob ein anderer Patient außer RCC98 überhaupt eine Antwort gegen diese Peptide zeigen würde. In RCC98 waren Reaktivitäten gemessen worden. Besonders RGS-5 hatte dort eine deutliche Antwort induziert. Der Patient RFA048 zeigte nun auch deutliche antigenspezifische CD8<sup>+</sup> T-Zell-Aktivitäten gegen alle der eingesetzten Peptide.

Klärung für die Frage nach der Probabilität der Versuchsergebnisse müssen weitere Untersuchungen mit intrazellulärem IFN $\gamma$ -Staining und IFN $\gamma$ -ELISPOT bringen.

Beobachtet wurden somit Reaktivitäten gegen Her2/neu-, Survivin-, CEA und besonders MUC-1 Epitope, sowie die HLA-A\*03 restringierten Liganden RGS-5 GLASFKSFLK, MMP7 SLFPNSPKWTSK, ADFP SLLTSSKGQLQK und ADFP TSALPIIQK. Für MUC-1 ist beschrieben worden, dass gegen diese Epitope in Patienten mit Colocarzinomen native Antworten vorkommen [Dittmann et al. 2005]. Auch sind mit MUC-1 schon Impfstudien durchgeführt worden [Brossart et al. 1999; Wierecky et al. 2005]. MUC-1 Epitope sind demnach stark immunogen. Außerdem ist eine schwache Immunantwort gegen diese Epitope häufig präexistent. Dies könnte erklären, warum relativ häufig eine Reaktivität messbar ist. Radiofrequenzablation könnte hier die Immunantwort gegen bestimmte tumorspezifische Antigene verstärken.

Sicherlich kann man nicht mit letzter Sicherheit postulieren, dass die gemessenen antigenspezifischen T-Zell-Aktivitäten durch Radiofrequenzablation induziert oder verstärkt wurden. Die vorliegenden Ergebnisse sprechen allerdings dafür. Um wirklich detaillierte Aussagen über die Effekte der RF-Ablation treffen zu können, müssten schwerpunktmäßig Patienten untersucht werden, die nicht chemotherapiert wurden. Es bieten sich

dabei natürlich Patienten an, die an hepatozellulären Carcinomen oder Nierenzellcarcinomen leiden.

Radiofrequenzablation induziert eine Koagulationsnekrose des Tumors und des umliegenden gesunden Gewebes [Pereira et al. 2004]. Nekrose ist ein ausgesprochen starker Stimulus für das Immunsystem [Ryan and Geczy 1987]. Die Reaktion ist zunächst unspezifisch, das heißt, es kommt zu einer Infiltration immunkompetenter Zellen in den Bereich der Nekrose, um diese zu eliminieren. Dies ist ein Phänomen, das zum Beispiel auch nach Infarkten oder Embolien zu beobachten ist. Es kommt zu einer Entzündungsreaktion und zur Organisation des nekrotischen Gewebes, später eventuell zum Umbau in Bindegewebe. Ziel dieser Reaktion ist es, einen „Normalzustand“ wieder herzustellen und das zerstörte Gewebe zu entfernen.

Bei dieser Immunreaktion werden die abgetöteten Zellen phagozytiert. Die phagozytierenden Zellen können sich zu antigenpräsentierenden Zellen weiterdifferenzieren. Die APCs zeigen dann Bruchstücke aus den aufgenommenen Zellen auf MHC-Molekülen beider Klassen. Sind diese präsentierten Antigene nun gegenüber dem Normalgewebe verändert, kommt es, nachdem diese Kontakt zu ihrem spezifischen Antigen hatten, zur Aktivierung und Amplifikation antigenspezifischer T-Zellen, sofern bereits T-Zellen vorhanden sind, die dieses Antigen erkennen können. Zusätzlich kommt es zu einer Aktivierung von dendritischen Zellen und daraus resultierend zu einem Priming von T-Zellen, die dann den Tumor erkennen können. Dabei werden Alarmsignale (wie zum Beispiel HSP70) benötigt, damit es zu einer Aktivierung dendritischer Zellen kommt.

Hier stellt sich die Frage, warum das Immunsystem erst dieser induzierten Nekrose bedarf, um einen Tumor spezifisch zu erkennen. Legt man die Hypothese einer Stroma-Barriere [Menon et al. 2003] zugrunde, würde die Radiofrequenzablation diese Barriere mechanisch brechen und somit den immunkompetenten Zellen ermöglichen, den Tumor zu infiltrieren. Mögliche Adjuvantien, die diese Barriere überwinden würden [Yu et al. 2004], werden hier nicht benötigt, weil diese Schranke bereits gebrochen ist.

Radiofrequenzablation ist ein thermoablatives Verfahren. Es ist berichtet worden, dass auch die Cryoablation als weiteres thermoablatives Verfahren eine immunstimulatorische Wirkung haben soll [Sabel et al. 2005]. Die Temperatur dürfte diesbezüglich eigentlich keine Rolle spielen. Hitze oder Kälte haben den gleichen Effekt. Beide induzieren eine Koagulationsnekrose, die prinzipiell oben beschriebene Auswirkungen haben kann.

Für Radiofrequenzablation ist zusätzlich im Tiermodell nachgewiesen worden, dass sie dort in der Lage ist, tumorspezifische T-Zellen zu aktivieren [Wissniowski et al. 2003].

Vorliegende Arbeit beobachtet zum ersten Mal diese Effekte im Menschen.

Ein weiteres Indiz dafür, dass Radiofrequenzablation weitergehende Effekte hat, als nur die lokale Tumordestruktion, ist der Umstand, dass die Überlebenszeiten im Vergleich zur chirurgischen Resektion verlängert sind [Lencioni et al. 2005]. Ist ein Tumor erst reseziert, hat das Immunsystem keine Möglichkeit mehr, durch ihn aktiviert zu werden. Der Tumor wird durch RF-Ablation ebenfalls „entfernt“, wenn auch nur im Sinne einer Destruktion. Der Vorteil hierbei ist nur, dass der „entfernte“, also abgetötete Tumor in situ belassen wird und somit immunstimulatorisch wirksam werden kann. Dieser Umstand könnte erklären, warum die Überlebenswahrscheinlichkeit nach Radiofrequenzablation höher ist als nach chirurgischer Resektion. Sie könnte den weitergehenden Effekt dahingehend haben, dass sie das Immunsystem des Patienten lehrt, den Tumor zu erkennen und Teile des Tumors abzutöten.

Ob RF-Ablation eine Prognoseverbesserung bei den behandelten Patienten bewirkt, müssen spätere Beobachtungen klären. Dabei muss auch beachtet werden, ob Patienten, die eine T-Zell-Reaktivität gegen eines oder mehrere der eingesetzten Peptide zeigten, eine bessere Überlebensrate haben, als die Patienten, deren Zellen negativ getestet wurden.

In den Versuchen mit T-Zellen schien es einen deutlichen Unterschied zu geben zwischen Proben, die frisch getestet wurde und Proben, die cryo-asserviert waren und zur Untersuchung aufgetaut wurden. Aufgetaute Proben ergaben selten positive Ergebnisse. Der Verlust von Zellen betrug etwa 20% im Vergleich zu der eingefrorenen Anzahl von Zellen. Dies hängt zum einen mit

der Toxizität des eingesetzten DMSO im Einfriermedium zusammen, zum anderen sind PBMCs ausgesprochen empfindlich gegenüber dem Einfrierprozeß. So kann es auch zum Verlust antigenspezifischer Zellen kommen, die dann natürlich nicht mehr detektiert werden können.

Harnsäure wird aus nekrotischem Gewebe freigesetzt. Nekrose kann zu einem deutlich erhöhten Harnsäurespiegel führen. Neuere Studien haben gezeigt, dass Harnsäure ein bedeutendes Alarmsignal darstellt und eine starke immunmodulatorische Potenz besitzt [Shi et al. 2003]. Interessant war daher, ob durch Radiofrequenzablation, die ja eine doch teilweise erheblich große Nekrose induziert, eine Harnsäurefreisetzung ins Serum messbar war. Das Ergebnis war eindeutig. Die Quotienten Tag 1 durch Tag 0 betragen im Mittel für die Patientengruppe 0,97 und für die Kontrollgruppe 1,11. Radiofrequenzablation bewirkt also im untersuchten Zeitintervall von 24 Stunden keine systemische Freisetzung von Harnsäure. Insgesamt nahm die Harnsäurekonzentration im Mittel eher ab. Drei Tage nach RF-Ablation zeigten sich auch keine Unterschiede im Vergleich zu den Proben vor Therapie.

Sowohl bei gesunden Spendern, als auch bei Patienten, deren Gallenblase laparoskopisch entfernt wurde, als auch bei den Patienten, die mit RF-Ablation behandelt wurden, unterscheiden sich die Mittelwerte statistisch nicht voneinander. Somit verhält sich die Variationen des Harnsäurespiegels im Tagesvergleich in allen Gruppen analog.

Ein weiteres Alarmsignal für das Immunsystem ist HSP70, ein Chaperon, das streß- oder hitzeinduziert gebildet wird [Van Eden et al. 2005]. Andere Studien haben beschrieben, dass nach Radiofrequenzablation mehr HSP70 auf der Membran von Hepatozyten exprimiert wird. Dies wurde sowohl im Tiermodell als auch in Fallstudien am Menschen gezeigt [Schueller et al. 2004; Yang et al. 2004; Schueller et al. 2004b; Rai et al. 2005; Schenk and Pereira unpublished data].

Die Daten dieser Arbeit sprechen zusätzlich für einen Anstieg der Konzentration von HSP70 im Serum der Patienten 24 Stunden nach RF-Ablation.

Untersucht wurden 23 Patienten mit 31 RF-Ablationen. Dabei wurde in 39% der Fälle jeweils ein Tag nach 12 RF-Ablationen ein um mindestens den Faktor 2 erhöhter Serumspiegel von HSP70 gemessen.

Die Kontrollgruppe LB umfasst Patienten, bei denen zu diagnostischen Zwecken eine Leberbiopsie durchgeführt wurde. Diese Gruppe ist mit den Patienten, die mit RF-Ablation behandelt wurden, am besten vergleichbar. Beide Gruppen gleichen sich in der Art der Anästhesie und Analgosedierung, der Dicke der Punktionsnadeln (17 Gauge) und der Eindringtiefe ins Zielorgan. Unterschiede der Gruppen liegen in der Dauer der Anwendung (eine Leberbiopsie benötigt weniger Zeit) und dem Einsatz von RF-Energie. Bei einer Leberbiopsie wird kein Gewebe erhitzt.

Im Vergleich der Patienten mit RF-Ablation und Patienten mit Leberbiopsie zeigte sich ein deutlicher Unterschied der Mittelwerte im Faktor d1/d0. Der durchschnittliche Anstieg der Serumkonzentration von HSP70 war bei den Patienten, die mit RF-Ablation behandelt wurden, deutlich höher als bei Patienten, die eine Leberbiopsie erhielten. Dies legt nahe, dass Radiofrequenzablation zu einer systemischen Ausschüttung von HSP70 führt. Da Hitzeschockproteine potente Alarmsignale für das Immunsystem sind und antigenpräsentierende Zellen aktivieren können [Breloer et al. 2001], kann diese Ausschüttung nach RF-Ablation eine weitergehende Immunantwort bewirken.

Die Patienten, deren PBMCs auf antigenspezifische T-Zell-Antworten untersucht wurden, konnten nicht alle auch auf den Serumspiegel von HSP70 getestet werden, weil nicht genügend Serumproben zur Verfügung standen. Die Patienten RFA026, RFA027, RFA031, RFA046 und RFA047 wurden sowohl bezüglich der T-Zell-Antwort als auch der Expression von HSP70 untersucht. Ein Anstieg des Serumspiegels von HSP70 korrelierte bei den Patienten RFA026, RFA027 und RFA031 mit der T-Zell-Antwort (das heißt, Anstieg größer 2 korreliert mit detektierbarer T-Zell-Antwort, ein Faktor kleiner 2 korreliert mit dem Ausbleiben einer messbaren Antwort). RFA046 zeigte eine T-Zell-Reaktivität, aber keinen Anstieg des Serumspiegels von HSP70 (Faktor d1/d0 = 1,00), der Patient RFA047 zeigte keine Verstärkung einer

vorbestehenden T-Zell-Antwort bei einem Anstieg der Serumkonzentration von HSP70 um das 3,02-fache. Daher sind Aussagen über eine Korrelation schwierig.

Weitere Untersuchungen sollten nun zeigen, ob die Ausschüttung von Hitzeschockproteinen mit einer möglichen T-Zell-Antwort oder gar mit einer Produktion von spezifischen Antikörpern korreliert. Dazu müssten allerdings die Versuche für die T-Zell-Aktivität wie oben beschrieben mit dendritischen Zellen, die mit RNA aus autologem Tumorgewebe transfiziert wurden, durchgeführt werden, um sicher zu gehen, dass die PBMCs mit allen potentiellen Epitopen untersucht werden.

Die Kontrollgruppe CO, deren Gallenblase laparoskopisch entfernt wurde, unterscheidet sich sehr grundlegend von den Patienten, die mit RF-Ablation behandelt wurden, durch verschiedene Faktoren. Erstens befinden sich die Patienten in Allgemeinanästhesie. Es ist beschrieben worden, dass es unter Operationsbedingungen zu einer verstärkten Expression von HSP70 kommt [Udelsman et al. 1991]. Auch kann der Einsatz des Magenschutzpräparats *Geranylgeranylacetone* (GGA) eine Induktion von Hitzeschockproteinen bewirken [Masuda et al. 2003]. Daher muss man mit dieser Kontrollgruppe vorsichtig sein, weil sie nicht eindeutig vergleichbar mit der Gruppe der Patienten, die mit RF-Ablation behandelt wurden.

So findet sich in der statistischen Auswertung auch kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen der Patienten, die mit RF-Ablation behandelt wurden, und denen, deren Gallenblase laparoskopisch entfernt wurde. Die Vergleichbarkeit dieser beiden Gruppen muß allerdings mit Vorsicht betrachtet werden, weil es in der Laparoskopie-Gruppe zu viele Störfaktoren gibt, die eine HSP70-Expression bewirken können. Diese Gruppe sollte in der Bewertung, ob RF-Ablation zu einer systemischen Ausschüttung von HSP70 führt, - auch unter dem Hintergrund, dass zwei andere Kontrollgruppen zur Verfügung stehen - außer Acht gelassen werden.

Die Kontrollgruppe mit der geringsten Vergleichbarkeit ist die Gruppe HD. Die Spender aus dem Labor bekamen keine Behandlung, waren keinem Streß, der durch eine Operation, eine Biopsie oder eine RF-Ablation ausgelöst wird,

ausgesetzt. Sie nahmen keine Medikamente ein, erhielten keine Analgosedierung und waren nicht hospitalisiert. Ein weiterer großer Unterschied ist der, dass keine Bettruhe eingehalten werden musste. Körperliche Anstrengung kann zu einer Freisetzung von Hitzeschockproteinen führen [Fehrenbach et al. 2001]. Diese Gruppe war also schlecht mit der Gruppe der RFA-Patienten vergleichbar. Die Messwerte können hier also eher dazu dienen zu beschreiben, in wie weit sich der Serumspiegel von HSP70 über die Tage verändert. Hier könnte eine weitere Studie durchgeführt werden, um zu evaluieren, welche Faktoren die Hitzeschockproteinexpression beeinflussen und welche Variationen in der Konzentration möglich sind.

Interessanterweise unterscheiden sich die Mittelwerte der Faktoren d1/d0 zwischen den RFA-Patienten und den gesunden Spendern deutlich voneinander. Dies bedeutet, dass selbst körperliche Belastung und etwaiger Streß im Mittel nicht zu einer so starken systemischen Ausschüttung von HSP70 führen wie eine RF-Ablation.

## 7. Schlussfolgerung

Die Stimulation einer Immunreaktion mit peptidbeladenen dendritischen Zellen *in vivo* ist grundsätzlich möglich. Dies haben frühere Studien bereits gezeigt. Auch die Beladung mit einer größeren Anzahl von Peptiden kann eine antigenspezifische T-Zell-Antwort stimulieren. Für die Immunisierung werden allerdings wohl eine größere Anzahl subkutaner Injektionen dendritischer Zellen benötigt.

Es scheint günstiger zu sein, verschiedene Peptidpools zu bilden, die nach der Affinität der einzelnen Peptide zum MHC-Molekül zusammengestellt sind, um zu verhindern, dass weniger affine Peptide durch Konkurrenz von der MHC-Bindung verdrängt werden und somit am gewünschten Effekt der Vakzinierung keinen Anteil haben. Durch die Vermischung ähnlich affiner Peptide können alle Peptide auf MHC gebunden werden.

Der Einsatz von prädiktierten Peptiden für eine Vakzinierung scheint prinzipiell nicht ideal, weil nicht sicher ist, ob die eingesetzten Peptide überhaupt eine Immunantwort induzieren können. Eine Vakzinierung mit diesen potentiellen Liganden hatte in den hier untersuchten Patienten nicht den gewünschten Effekt einer Immunstimulation.

Wenn durch die Vakzinierung eine Immunantwort stimuliert wurde, bedeutet dies nicht, dass der Tumor zurückgeht. Es bedeutet auch nicht, dass eine verstärkte Infiltration immunkompetenter Zellen in den Tumor stattfindet. Dies hängt mit verschiedenen Escape-Mechanismen der Tumoren zusammen, die bewirken, dass der Tumor dem Immunsystem entgeht. Die Induktion einer Immunantwort korreliert also nicht mit Tumorregression oder Infiltration von Immunzellen in den Tumor.

Die Vakzinierungstherapie bedarf damit wohl potenter Adjuvantien und weiterer T-Zell-Epitope, um eine wirkliche Immunität gegen den Tumor zu schaffen. Langfristiges Ziel ist die Erstellung bestimmter Cocktails von Peptiden und Adjuvantien, die nicht mehr nur patientenspezifisch, sondern global für alle Patienten, die an einem bestimmten Tumor leiden, eingesetzt werden können und dort eine Immunantwort stimulieren können.

Radiofrequenzablation ist ein aufstrebendes Verfahren zur lokalen Therapie primärer und sekundärer Tumoren der Leber, Lunge, Niere und anderen Organen. Sie führt zu einer Koagulationsnekrose des Gewebes. Diese Nekrose ist ein potenter Stimulus für das Immunsystem, um den entstandenen Schaden zu beseitigen.

Neben dem lokalen Effekt einer Tumoreradikation könnte diese Therapie weitergehende Effekte haben. Nach Radiofrequenzablation war in etwa 50% der untersuchten Patienten eine antigenspezifische T-Zell-Antwort gegen bestimmte T-Zell-Epitope und ein Anstieg von über 100% in der Konzentration von HSP70 im Serum von etwa 40% der Patienten detektierbar, was auch immunstimulatorische Effekte hat. Ein erhöhter Serumspiegel an Harnsäure als Nekrosemarker war nicht zu messen.

Eine Erhöhung von Hitzeschockproteinen im Serum korrelierte nicht mit der Größe des Tumors, der Größe des abladierten Normalgewebes und auch nicht mit dem Volumen der induzierten Nekrose. Eine große Nekrose war somit nicht gleichbedeutend mit einem Anstieg der HSP70-Konzentration im Serum.

Radiofrequenzablation kann das Immunsystem stimulieren, beziehungsweise eine bestehende geringe Immunantwort verstärken. Ob diese Effekte rein durch Radiofrequenzablation induziert worden sind, lässt sich nicht mit letzter Sicherheit sagen.

Längerfristig sollte auch hier der Einsatz geeigneter Adjuvantien erwogen werden, die in der Lage sind, mehr immunkompetente Zellen in den behandelten Bereich zu locken, beziehungsweise die Infiltration in andere Herde zu verstärken. Interessant wäre zusätzlich der Einsatz patientenspezifischer Peptide oder die Untersuchung über die Transfektion autologer RNA. So könnte ein breites Antigenpektrum untersucht und genaue Daten darüber gesammelt werden, in wie weit Radiofrequenzablation in der Lage ist, eine Anti-Tumor-Immunität zu generieren. Der Ansatz vorliegender Studie limitiert die Aussagekraft durch eine geringe Anzahl tumorspezifischer Antigene und durch die Beschränkung auf bestimmte HLA-Typen (HLA-A2, A3, B7) der Patienten, weil HLA-Liganden und T-Zell-Epitope selbst hier nicht in

ausreichendem Maße charakterisiert sind. Für andere, seltenere HLA-Restriktionen sind sogar noch fast keine Liganden bekannt.

Die Ergebnisse sind aber sehr vielversprechend, weil bereits mit dieser limitierten Auswahl von Peptiden bei über 50% der Patienten eine Immunantwort gemessen werden konnte. Die realen Zahlen werden wohl deutlich höher liegen.

Eine histologische Aufarbeitung von behandelten und unbehandelten Herden könnte außerdem Aussagen darüber ermöglichen, ob nach Radiofrequenzablation Unterschiede zu beobachten sind im Vergleich zu Patienten, deren Tumoren chirurgisch reseziert wurden. Interessant wäre dabei zu evaluieren, ob eine verstärkte Infiltration immunkompetenter Zellen in nicht-abladierte Herde stattfindet und welche Zellen den Tumor infiltrieren. Zusätzliche Analysen sollten dann Untersuchungen und Charakterisierungen von TILs sein.

## 8. Zusammenfassung

Die Induktion einer spezifischen Immunantwort gegen den Tumor eines Patienten ist ein wichtiges Ziel der Krebsforschung.

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Ansätze dazu untersucht.

Zum einen wurde eine Vakzinierung gegen Nierenzellcarcinome mit Peptid-beladenen dendritischen Zellen untersucht. Die Peptide, die auf die DCs geladen wurden, wurden dabei auf individueller Basis für jeden einzelnen Patienten ausgewählt. Die Untersuchungen der T-Zell-Antwort zeigten nur bei einem Patienten eine erhöhte Aktivität gegen ein bestimmtes Peptid nach Vakzinierung. Alle anderen untersuchten Patienten zeigten keine erhöhte T-Zell-Aktivität nach Vakzinierung.

Von klinischer Seite aus zeigte sich bei den Patienten keine dauerhafte Stabilisierung oder Regression des Tumors.

Der zweite Ansatz war primär nicht als immunstimulatorische Methode gedacht, sondern zur lokalen Therapie von Primärtumormanifestationen oder Metastasen. Die Radiofrequenzablation ist ein minimal invasives Verfahren zur thermischen Koagulation von Gewebe. Nach den Ergebnissen dieser Arbeit hat sie – neben der lokalen Destruktion – weitergehende Effekte, indem sie eine gegen den Tumor gerichtete Immunantwort stimuliert. Dabei kommt es zu einer Aktivierung antigenspezifischer T-Zellen und einer systemischen Ausschüttung des Hitzeschockproteins HSP70, das als Alarmsignal für das Immunsystem beschrieben wurde. Da kein autologes Tumorgewebe für eine Genexpressionsanalyse und eine Untersuchung von HLA-Liganden zur Verfügung stand, musste auf aus der Literatur bekannte tumorassoziierte Epitope für die Untersuchungen dieser Arbeit zurückgegriffen werden. Bereits in diesem limitierten Ansatz konnte bei über der Hälfte der Patienten eine Immunantwort nach RF-Ablation gemessen werden, die vor Therapie noch nicht oder nicht in diesem Maße detektierbar war.

## 9. Referenzen

Abbas, A.K., K.M. Murphy and A. Sher (1996). "Functional diversity of helper T lymphocytes." Nature **383**(6603): 787-93.

Abrams, S.I., S.N. Khleif, E.S. Bergmann-Leitner, J.A. Kantor, Y. Chung, J.M. Hamilton and J. Schlom (1997). "Generation of stable CD4+ and CD8+ T cell lines from patients immunized with ras oncogene-derived peptides reflecting codon 12 mutations." Cell Immunol **182**(2): 137-51.

Aderem, A. and D.M. Underhill (1999). "Mechanisms of phagocytosis in macropahges." Annu Rev Immunol **17**: 593-623.

Aderem, A. and R.J. Ulevitch (2000). "Toll-like receptors in the induction of the innate immune response." Nature **406**(6797): 782-7.

Alexander, J., J. Sidney, S. Southwood, J. Ruppert, C. Oseroff, A. Maewal, K. Snoke, H.M. Serra, R.T. Kubo and A. Sette (1994). "Development of high potency universal DR-restricted helper epitopes by modification of high affinity DR-blocking peptides." Immunity **1**(9): 751-61.

Allain, J.C., M. Le Lous, S. Bazin, A.J. Bailey and A. Delaunay (1978). "Isometric tension developed during heating of collagenous tissues. Relationships with collagen cross-linking." Biochim Biophys Acta **533**(1): 147-55.

Allison, J.P., A.A. Hurwitz and D.R. Leach (1995). "Manipulation of costimulatory signals to enhance antitumor T-cell responses." Curr Opin Immunol **7**(5): 682-6.

Altman, J.D., P.A. Moss, P.J. Goulder, D.H. Barouch, M.G. McHeyzer-Williams, J.I. Bell, A.J. McMichael and M.M. Davis (1996). "Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes." Science **274**(5284): 94-6.

Ambrosini, G., C. Adida and D.C. Altieri (1997). "A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma." Nat Med **3**(8): 917-21.

Anderson, D.R., A. Grillo-Lopez, C. Varns, K.S. Chambers and N. Hanna (1997). "Targeted anti-cancer therapy using rituximab, a chimaeric anti-CD20 antibody (IDEC-C2B8) in the treatment of non-Hodgkin's B-Zell lymphoma." Biochem Soc Trans **25**(2): 705-8.

Anderton, S.M., R. van der Zee, B. Prakken, A. Noordzij and W. van Eden (1995). "Activation of T cells recognizing self 60-kD heat shock protein can protect against experimental arthritis." J Exp Med **181**(3): 943-52.

Andre, T., C. Louvet, F. Maindrault-Goebel, C. Couteau, M. Mabro, J.P. Lotz, V. Gilles-Amar, M. Krulik, E. Carola, V. Izrael and A. de Gramont (1999). "CPT-11 (irinotecan) addition to bimonthly, high-dose leucovorin and bolus and continuous-infusion 5-fluorouracil (FOLFIRI) for pretreated metastatic colorectal cancer. GERCOR." Eur J Cancer **35**(9): 1343-7.

Andreotti, P.E. and P. Cresswell (1981). "HLA control of interferon production in the human mixed lymphocyte culture." Hum Immunol **3**(2): 109-20.

Angevin, E., F. Kremer, C. Gaudin, T. Hercend and F. Triebel (1997). "Analysis of T-cell immune response in renal cell carcinoma: polarization to type 1-like differentiation pattern, clonal T-cell expansion and tumor-specific cytotoxicity." Int J Cancer **72**(3): 431-40.

Appay, V., D.F. Nixon, S.M. Donahoe, G.M. Gillespie, T. Dong, A. King, G.S. Ogg, H.M. Spiegel, C. Conlon, C.A. Spina, D.V. Havlir, D.D. Richman, A. Waters, P. Easterbrook, A.J. McMichael and S.L. Rowland-Jones (2000). "HIV-specific CD8(+) T cells produce antiviral cytokines but are impaired in cytolytic function." J Exp Med **192**(1): 63-75.

Asal, N.R., D.R. Risser, S. Kadamani, J.R. Geyer, E.T. Lee and N. Cherng (1988). "Risk factors in renal cell carcinoma: I. Methodology, demographics, tobacco, beverage use, and obesity." Cancer Detect Prev **11**(3-6): 359-77.

Balachandran, S., P.C. Roberts, L.E. Brown, H. Truong, A.K. Pattnaik, D.R. Archer and G.N. Barber (2000). "Essential role for the dsRNA-dependent protein kinase PKR in innate immunity to viral infection." Immunity **13**(1): 129-41.

Bates, E.E., O. Ravel, M.C. Dieu, S. Ho, C. Guret, J.M. Bridon, S. Ait-Yahia, F. Briere, C. Caux, J. Banchereau and S. Lebecque (1997). "Identification and analysis of a novel member of the ubiquitin family expressed in dendritic cells and mature B cells." Eur J Immunol **27**(10): 2471-7.

Bauer, S., V. Groh, J. Wu, A. Steinle, J.H. Phillips, L.L. Lanier and T. Spies (1999). "Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA." Science **285**(5428): 727-9.

Belldegrun, A., C.L. Tso, T. Sakata, T. Duckett, M.J. Brunda, S.H. Barsky, J. Chai, R. Kaboo, R.S. Lavey, W.H. McBride and et al. (1993). "Human renal cell carcinoma line transfected with interleukin-2 and/or interferon alpha gene(s): implications for live cancer vaccines." J Natl Cancer Inst **85**(3): 207-16.

Benvenuti, F., C. Lagaudriere-Gesbert, I. Grandjean, C. Jancic, C. Hivroz, A. Trautmann, O. Lantz and S. Amigorena (2004). "Dendritic cell maturation controls adhesion, synapse formation, and the duration of the interactions with naïve T lymphocytes." J Immunol **172**(1): 292-301.

- Berger, D.P., R. Engelhardt and R. Mertelsmann (EcoMed, Landsberg, Germany 2002). "Standardisierte Therapieprotokolle." Das Rote Buch: 845-997.
- Berger, M., G. Bergers, B. Arnold, G.J. Hammerling and R. Ganss (2005). "Regulator of G-protein signalling-5 induction in pericytes coincides with active vessel remodeling during neovascularization." Blood **105**(3): 1094-101.
- Bergsagel, P.L., W.M. Kuehl, F. Zhan, J. Sawyer, B. Barlogie and J. Shaughnessy Jr. (2005). "Cyclin D dysregulation: an early and unifying pathogenic event in multiple myeloma." Blood **106**(1): 296-303.
- Binder, R.J., R. Vatner and P. Srivastava (2004). "The heat-shock protein receptors: some answers and more questions." Tissue Antigens **64**(4): 442-51.
- Biron, C.A., K.B. Nguyen, G.C. Pien, L.P. Cousens and T.P. Salazar-Mather (1999). "Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines." Annu Rev Immunol **17**: 189-220.
- Blachere, N.E., Z. Li, R.Y. Chandawarkar, R. Suto, N.S. Jaikaria, S. Basu, H. Udono and P.K. Srivastava (1997). "Heat shock protein-peptide complexes, reconstituted in vitro, elicit peptide-specific cytotoxic T lymphocyte response and tumor immunity." J Exp Med **186**(8): 1315-22.
- Blank, C., T.F. Gajewski and A. Mackensen (2005). "Interaction of PD-L1 on tumor cells with PD-1 on tumor-specific T cells as a mechanism of immune evasion: implications for tumor immunotherapy." Cancer Immunol Immunother **54**(4): 307-14.
- Bogdan, C. (2000). "The function of type I Interferons in antimicrobial immunity." Curr Opin Immunol **12**(4): 419-24.
- Boon, T., J.C. Cerottini, B. van den Eynde, P. van der Bruggen and A. van Pel (1994). "Tumor antigens recognized by T lymphocytes." Annu Rev Immunol **12**: 337-65.
- Bouvier, M. and D.C. Wiley (1994). "Importance of peptide amino and carboxyl termini to the stability of MHC class I molecules." Science **265**(5170): 398-402.
- Bowman, M.R., M.A. Crimmins, J. Yetz-Aldape, R. Kriz, K. Kelleher and S. Herrmann (1994). "The cloning of CD70 and its identification as the ligand of CD27." J Immunol **152**(4): 1756-61.
- Breloer, M., B. Dorner, S.H. More, T. Roderian, B. Fleischer and A. von Bonin (2001). "Heat shock proteins as 'danger signals': eukaryotic Hsp60 enhances and accelerates antigen-specific IFN-gamma production in T cells." Eur J Immunol **31**(7): 2051-9.

Britten, C.M., R.G. Meyer, T. Kreer, I. Drexler, T. Wolfel and W. Herr (2002). "The use of HLA-A\*0201-transfected K562 as standard antigen-presenting cells for CD8(+) T lymphocytes in IFN-gamma ELISPOT assays." J Immunol Methods **259**(1-2): 95-110.

Bromley, S.K., W.R. Burack, K.G. Johnson, K. Somersalo, T.N. Sims, C. Sumen, M.M. Davis, A.S. Shaw, P.M. Allen and M.L. Dustin (2001). "The immunological synapse." Annu Rev Immunol **19**: 375-96.

Bromley, S.K., A. Iaboni, S.J. Davis, A. Whitty, J.M. Green, A.S. Shaw, A. Weiss and M.L. Dustin (2001b). "The immunological synapse and CD28-CD80-interactions." Nat Immunol **2**(12): 1159-66.

Bronte, V., K. Tsung, J.B. Rao, P.W. Chen, M. Wang, S.A. Rosenberg and N.P. Restifo (1995). "IL-2 enhances the function of recombinant poxvirus-based vaccines in the treatment of established pulmonary metastases." J Immunol **154**(10): 5282-92.

Brooks, J.M., R.J. Murray, W.A. Thomas, M.G. Kurilla and A.B. Rickinson (1993). "Different HLA-B27 subtypes present the same immunodominant Epstein-Barr virus peptide." J Exp Med **178**(3): 879-87.

Brossart, P., S. Wirths, G. Stuhler, V.L. Reichardt, L. Kanz and W. Brugger (2000). "Induction of cytotoxic T-lymphocyte responses in vivo after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells." Blood **96**(9): 3102-8.

Brossart, P., K.S. Heinrich, G. Stuhler, L. Behnke, V.L. Reichardt, S. Stevanovic, A. Muhm, H.G. Rammensee, L. Kanz and W. Brugger (1999). "Identification of HLA-A2-restricted T-cell epitopes derived from the MUC1 tumor antigen for broadly applicable vaccine therapies." Blood **93**(12): 4309-17.

Brossart, P. (2002). "Dendritic cells in vaccination therapies of malignant diseases." Transfus Apheresis Sci **27**(2): 183-6.

Brunda, M.J., L. Luistro, R.R. Warrier, R.B. Wright, B.R. Hubbard, M. Murphy, S.F. Wolf and M.K. Gately (1993). "Antitumor and antimetastatic activity of interleukin 12 against murine tumors." J Exp Med **178**(4): 1223-30.

Bukowski, R.M. (2000). "Cytokine combinations: therapeutic use in patients with advanced renal cell carcinoma." Semin Oncol **27**(2): 204-12.

Burnet, F.M. (1959). "The clonal selection theory of acquired immunity." London; Cambridge University Press.

Burnette, W.N. (1981). "'Western blotting': electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A." Anal Biochem **112**(2): 195-203.

Burrows, S.R., T.B. Sculley, I.S. Misko, C. Schmidt and D.J. Moss (1990). "An Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T cell epitope in EBV nuclear antigen 3 (EBNA 3)." J Exp Med **171**(1): 345-9.

Burrows, S.R., N. Kienzle, A. Winterhalter, M. Bharadwaj, J.D. Altman and A. Brooks (2000). "Peptide-MHC class I tetrameric complexes display exquisite ligand specificity." J Immunol **165**(11): 6229-34.

Bustin, S.A. (2000). "Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays." J Mol Endocrinol **25**(2): 169-93.

Butterfield, L.H., A. Koh, W. Meng, C.M. Vollmer, A. Ribas, V. Dissette, E. Lee, J.A. Glaspy, W.H. McBride and J.S. Economou (1999). "Generation of human T-cell responses to an HLA-A2.1-restricted peptide epitope derived from alpha-fetoprotein." Cancer Res **59**(13): 3134-42.

Butterfield, L.H., W.S. Meng, A. Koh, C.M. Vollmer, A. Ribas, V.B. Dissette, K. Faull, J.A. Glaspy, W.H. McBride and J.S. Economou (2001). "T cell responses to HLA-A\*0201-restricted peptides derived from human alpha fetoprotein." J Immunol **166**(8): 5300-8.

Caplen, N.J., A. Patel, A. Millward, R.D. Campbell, S. Ratanachaiyavong, F.S. Wong and A.G. Demaine (1990). "Complement C4 and heat shock protein 70 (HSP70) genotypes and type I diabetes mellitus." Immunogenetics **32**(6): 427-30.

Cella, M., D. Jarrossay, F. Facchetti, O. Alebardi, H. Nakajima, A. Lanzavecchia and M. Colonna (1999). "Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon." Nat Med **5**(8): 919-23.

Cerny, A., J.G. McHutchison, C. Pasquinelli, M.E. Brown, M.A. Brothers, B. Grabscheid, P. Fowler, M. Houghton and F.V. Chisari (1995). "Cytotoxic T lymphocyte response to hepatitis C virus-derived peptides containing the HLA A2.1 binding motif." J Clin Invest **95**(2): 521-30.

Chan, D.Y. and F.F. Marshall (1998). "Surgery in advanced and metastatic renal cell carcinoma." Curr Op in Urol **8**: 369-73.

Chang, G.C., H.C. Lan, S.H. Juang, Y.C. Wu, H.C. Lee, Y.M. Hung, H.Y. Yang, J. Whang-Peng and K.J. Liu (2005). "A pilot clinical trial of vaccination with dendritic cells pulsed with autologous tumor cells derived from malignant pleural effusion in patients with late-stage lung carcinoma." Cancer **103**(4): 763-71.

Chen, K.S., J.M. Prahil and H.F. DeLuca (1993). "Isolation and expression of human 1,25-dihydroxyvitamin D3 24-hydroxylase cDNA." Proc Natl Acad Sci USA **90**(10): 4543-7.

Chen, J.S., A.S. Greenberg, Y.Z. Tseng and S.M. Wang (2001). "Possible involvement of protein kinase C in the induction of adipose differentiation-related protein by Sterol ester in RAW 264.7 macrophages." J Cell Biochem **82**(2): 187-99.

Chen, Y., K. Chou, E. Fuchs, W.L. Havran and R. Boismenu (2002). "Protection of the intestinal mucosa by intraepithelial gamma delta T cells." Proc Natl Acad Sci USA **99**(22): 14338-43.

Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." Anal Biochem **162**(1): 156-9.

Chu, R.S., O.S. Targoni, A.M. Krieg, P.V. Lehmann and C.V. Harding (1997). "CpG oligodesoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity." J Exp Med **186**(10): 1623-31.

Chuang, T. and R.J. Ulevitch (2001). "Identification of hTLR10: a novel human Toll-like receptor preferentially expressed in immune cells." Biochim Biophys Acta **1518**(1-2): 157-61.

Cohen, I.R. (1991). "Autoimmunity to chaperonins in the pathogenesis of arthritis and diabetes." Annu Rev Immunol **9**: 567-89.

Coley, W.B. (1893). "The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas: with a report of ten original cases." Am J Med Sci **105**: 487-511.

Coley, W.B. (1894). "The treatment of inoperable malignant tumors with the toxins of erysipelas and the bacillus prodigiosus." Am J Med Sci **108**: 50-68.

Coor, M., A.E. Slanetz, L.F. Boyd, M.T. Jelonek, S. Khilko, B.K. al-Ramadi, Y.S. Kim, S.E. Maher, A.L. Bothwell and D.H. Margulies (1994). "T cell receptor-MHC class I peptide interactions: affinity, kinetics, and specificity." Science **265**(5174): 946-9.

Corn, P.G., E.R. McDonald 3<sup>rd</sup>, J.G. Herman and W.S. El-Deiry (2003). "Tat-binding protein-1, a component of the 26S proteasome, contributes to the E3 ubiquitin ligase function of the von Hippel-Lindau protein." Nat Genet **35**(3): 229-37.

Correale, P., A. Aquino, A. Giuliani, M. Pellegrini, L. Micheli, M.G. Cusi, C. Nencini, R. Petrolì, S.P. Prete, L. de Vecchis, M. Turriziani, G. Giorni, E. Bonmassar and G. Arancini (2003). "Treatment of colon and breast carcinoma cells with 5-fluorouracil enhances expression of carcinoembryonic antigen and susceptibility to HLA-A(\*)02.01 restricted, CEA-peptide-specific cytotoxic T cells in vitro." Int J Cancer **104**(4): 437-45.

Culmann, B., E. Gomard, M.P. Kieny, B. Guy, F. Dreyfus, A.G. Saimot, D. Sereni, D. Sicard and J.P. Levy (1991). "Six epitopes reacting with human cytotoxic CD8+ T cells in the central region of the HIV-1 NEF protein." J Immunol **146**(5): 1560-5.

Czerkinsky, C.C., L.A. Nilsson, H. Nygren, O. Ouchterlony and A. Tarkowski (1983). "A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells." J Immunol Methods **65**(1-2): 109-21.

D'Arsonval, J.A. (1891). "Action physiologique des courants alternatifs." CR Soc Biol **43** :283-6.

Daniels, M.A. and S.C. Jameson (2000). "Critical role for CD8 in T cell receptor binding and activation by peptide/major histocompatibility complex multimers." J Exp Med **191**(2): 335-46.

Davis, M.M. and P.J. Bjorkman (1988). "T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition." Nature **334**(6181): 395-402.

De Rosa, L., G. Anghel, A. Pandolfi, M. Riccardi, R. Amodeo and I. Majolino (2004). "Hemopoietic recovery and infectious complications in breast cancer and multiple myeloma after autologous CD34+ cell-selected peripheral blood progenitor cell transplantation." Int J Hematol **79**(1): 85-91.

DeBlas, A.L. and H.M. Cherwinski (1983). "Detection of antigens on nitrocellulose paper immunoblots with monoclonal antibodies." Anal Biochem **133**(1): 214-9.

Delneste, Y. (2004). "Scavenger receptors and heat-shock protein-mediated antigen cross-presentation." Biochem Soc Trans **32**(Pt 4): 633-5.

Denkberg, G., C.J. Cohen and Y. Reiter (2001). "Critical role for CD8 in binding of MHC tetramers to TCR: CD8 antibodies block specific binding of human tumor-specific MHC-peptide tetramers to TCR." J Immunol **167**(1): 270-6.

Dessen, A., C.M. Lawrence, S. Cupo, D.M. Zaller and D.C. Wiley (1997). "X-ray crystal structure of HLA-DR4 (DRA\*0101, DRB\*0401) complexed with peptide from human collagen II." Immunity **7**(4): 473-81.

DiBrino, M., T. Tsuchida, R.V. Turner, K.C. Parker, J.E. Coligan and W.E. Biddison (1993). "HLA-A1 and HLA-A3 T cell epitopes derived from influenza virus proteins predicted from peptide binding motifs." J Immunol **151**(11): 5930-5.

Dickson, J.A. and S.K. Calderwood (1980). "Temperature range and selective sensitivity of tumors to hyperthermia: a critical review." Ann N Y Acad Sci **335**: 180-205.

Ding, Y.H., K.J. Smith, D.N. Garboczi, U. Utz, W.E. Biddison and D.C. Wiley (1998). "Two human T cell receptors bind in a similar diagonal mode to the HLA-A2/Tax peptide complex using different TCR amino acids." Immunity **8**(4): 403-11.

Disis, M.L., H. Bernhard, F.M. Shiota, S.L. Hand, J.R. Gralow, E.S. Huseby, S. Gillis and M.A. Cheever (1996). "Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: an effective adjuvant for protein and peptide-based vaccines." Blood **88**(1): 202-10.

Dittman, J., K. Keller-Matschke, T. Weinschenk, T. Kratt, T. Heck, H.D. Becker, S. Stevanovic, H.G. Rammensee and C. Gouttefangeas (2005). "CD8+ T-cell response against MUC1-derived peptides in gastrointestinal cancer survivors." Cancer Immunol Immunother **54**(8): 750-8.

Donnes, P. and A. Elofsson (2002). "Prediction of MHC class I binding peptides, using SVMHC." BMC Bioinformatics **3**(1): 25.

Dowdy, S.F., P.W. Hinds, K. Louie, S.I. Reed, A. Arnold and R.A. Weinberg (1993). "Physical interaction of the retinoblastoma protein with human D cyclins." Cell **73**(3): 499-511.

Druey, K.M., K.J. Blumer, V.H. Kang and J.H. Kehrl (1996). "Inhibition of G-protein-mediated MAP kinase activation by a new mammalian gene family." Nature **379**(6567): 742-6.

Dudley, M.E., J.R. Wunderlich, P.F. Robbins, J.C. Yang, P. Hwu, D.J. Schwartzentruber, S.L. Topalian, R. Sherry, N.P. Restifo, A.M. Hubicki, M.R. Robinson, M. Raffeld, P. Duray, C.A. Seipp, L. Rogers-Freezer, K.E. Morton, S.A. Mavroukakis, D.E. White and S.A. Rosenberg (2002). "Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes." Science **298**(5594): 850-4.

Dulin, N.O., A. Sorokin, E. Reed, S. Elliott, J.H. Kehrl and M.J. Dunn (1999). "RGS3 inhibits G protein-mediated signalling via translocation to the membrane and binding to G $\alpha$ 11." Mol Cell Biol **19**(1): 714-23.

Dunn, G.P., A.T. Bruce, H. Ikeda, L.J. Old and R.D. Schreiber (2002). "Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape." Nat Immunol **3**(11): 991-8.

Durai, M., R.S. Gupta and K.D. Moudgil (2004). "The T cells specific for the carboxyl-terminal determinants of self (rat) heat shock protein 65 escape

tolerance induction and are involved in regulation of autoimmune arthritis." J Immunol **172**(5): 2795-802.

Durbin, J.E., A. Fernandez-Sesma, C.K. Lee, T.D. Rao, A.B. Frey, T.M. Moran, S. Vukmanovic, A. Garcia-Sastre and D.E. Levy (2000). "Type I IFN modulates innate and specific antiviral immunity." J Immunol **164**(8): 4220-28.

Ehrlich, P. (Pergamon, London, England 1956). "On immunity with special reference to cell life: Cronian lecture." The collected papers of Paul Ehrlich II: Immunology and Cancer Research: 148-92.

Elgert, K.D., D.G. Alleva and D.W. Mullins (1998). "Tumor-induced immune dysfunction: the macrophage connection." J Leukoc Biol **64**(3): 275-90.

Elsasser-Beile, U., M. Rindsfuser, T. Grussenmeyer, W. Schultze-Seemann and U. Wetterauer (2000). "Enhanced expression of IFN-gamma mRNA in CD4(+) or CD8(+) tumour-infiltrating lymphocytes compared to peripheral lymphocytes in patients with renal cell cancer." Br J Cancer **83**(5): 637-41.

Engelhardt, R., A. Mackensen, C. Galanos and R. Andreesen (1990). "Biological response to intravenously administered endotoxin in patient with advanced cancer." J Biol Response Mod **9**(5): 480-91.

Engelhardt, R., A. Mackensen and C. Galanos (1991). "Phase I trial of intravenously administered endotoxin (*Salmonella abortus equi*) in cancer patients." Cancer Res **51**(10): 2524-30.

Engvall, E. and P. Perlman (1971). "Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G." Immunochemistry **8**(9): 871-4.

Epping, M.T., L. Wang, M.J. Edel, L. Carlee, M. Hernandez and R. Bernards (2005). "The human tumor antigen PRAME is a dominant repressor of retinoic acid receptor signalling." Cell **122**(6): 835-47.

Ezekowitz, R.A., K. Sastry, P. Bailly and A. Warner (1990). "Molecular characterization of the human macrophage mannose receptor: demonstration of multiple carbohydrate recognition-like domains and phagocytosis of yeast in Cos-1 cells." J Exp Med **172**(6): 1785-94.

Falk, K., O. Rotzschke, S. Stevanovic, G. Jung and H.G. Rammensee (1991). "Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules." Nature **351**(6324): 290-6.

Falk, K. and O. Rotzschke (1993). "Consensus motifs and peptide ligands of MHC class I molecules." Semin Immunol **5**(2): 81-94.

Fallarino, F., C. Uyttenhove, T. Boon and T.F. Gajewski (1999). "Improved efficiency of dendritic cell vaccines and successful immunization with tumor antigen peptide-pulsed peripheral blood mononuclear cells by coadministration of recombinant murine interleukin-12." Int J Cancer **80**(2): 324-33.

Farkas, B., M. Hantschel, M. Magyarlaki, B. Becker, K. Scherer, M. Landthaler, K. Pfister, M. Gehrman, C. Gross, A. Mackensen and G. Multhoff (2003). "Heat shock protein 70 membrane expression and melanoma-associated marker phenotype in primary and metastatic melanoma." Melanoma Res **13**(2): 147-52.

Faure, O., S. Graff-Dubois, L. Bretaudeau, L. Derre, D.A. Gross, P.M. Alves, S. Cornet, M.T. Duffour, S. Chouaib, I. Miconnet, M. Gregoire, F. Jotereau, F.A. Lemonnier, J.P. Abastado and K. Kosmatopoulos (2004). "Inducible Hsp70 as target of anticancer immunotherapy: Identification of HLA-A\*0201-restricted epitopes." Int J Cancer **108**(6): 863-70.

Fearon, E.R. and B. Vogelstein (1990). "A genetic model for colorectal tumorigenesis." Cell **61**(5): 759-67.

Fehrenbach, E., A.M. Niess, R. Veith, H.H. Dickhuth and H. Northoff (2001). "Changes of HSP72-expression in leukocytes are associated with adaptation to exercise under conditions of high environmental temperature." J Leukoc Biol **69**(5): 747-54.

Feil, G., M. Leipoldt, H.J. Nelde, A. Wunderer, H.W. Wechsel, P. Kaiser and K.H. Bichler (1999). "Loss of chromosomes in clear cell renal cell carcinoma and in corresponding renal parenchyma." Anticancer Res **19**(2C): 1477-82.

Feil, G., B. Mittermuller, K.H. Bichler, A. Wunderer, H.W. Wechsel, H.J. Nelde and F. St. Krause (1999b). "DNA cytophotometry in renal cell carcinoma: a significant prognostic factor?" Anticancer Res **19**(2C): 1483-6.

Ferrone, S. and F.M. Marincola (1995). "Loss of HLA class I antigens by melanoma cells: molecular mechanisms, functional significance and clinical relevance." Immunol Today **16**(10): 487-94.

Fiberg, R.W., F. Re, L. Popova, D.T. Golenbock and E.A. Kurt-Jones (2004). "Cell activation by Toll-like receptors: role of LBP and CD14." J Endotoxin Res **10**(6): 413-8.

Fields, S.Z., D.R. Budman, R.R. Young, W. Kreis, R. Ingram, P. Schulman, R.C. Cherny, J. Wright, J. Behr, C. Snow and L.P. Schacter (1996). "Phase I study of high-dose etoposide phosphate in man." Bone Marrow Transplant **18**(5): 851-6.

Fink, A.L. (1999). "Chaperone-mediated protein folding." Physiol Rev **79**(2): 425-49.

Fiorillo, M.T., L. Meadows, M. D'Amato, J. Shabanowitz, D.F. Hunt, E. Appella and R. Sorrentino (1997). "Susceptibility to ankylosing spondylitis correlates with the C-terminal residue of peptides presented by various HLA-B27 subtypes." Eur J Immunol **27**(2): 368-73.

Fisk, B., T.L. Blevins, J.T. Wharton and C.G. Ioannides (1995). "Identification of an immunodominant peptide of HER-2/neu protooncogene recognized by ovarian tumor-specific cytotoxic T lymphocyte lines." J Exp Med **181**(6): 2109-17.

Flad, T., B. Spengler, H. Kalbacher, P. Brossart, D. Baier, R. Kaufmann, P. Bold, S. Metzger, M. Bluggel, H.E. Meyer, B. Kurz and C.A. Muller (1998). "Direct identification of major histocompatibility complex class I-bound tumor-associated peptide antigens of renal cell carcinoma cell line by a novel mass spectrometric method." Cancer Res **58**(24): 5803-11.

Flannery, C.R. (2006). "MMPs and ADAMTSs: functional studies." Front Biosci **11**: 544-69.

Frank, M.M. and L.F. Fries (1991). "The role of complement in inflammation and phagocytosis." Immunol Today **12**(9): 322-6.

Fremont, D.H., M. Matsumura, E.A. Stura, P.A. Peterson and I.A. Wilson (1992). "Crystal structures of two viral peptides in complex with murine MHC class I H-2Kb." Science **257**(5072): 919-27.

Fremont, D.H., W.A. Hendrickson, P. Marrack and J. Kappler (1996). "Structures of an MHC class II molecule with covalently bound single peptides." Science **272**(5264): 1001-4.

Fulwyler, M.J. (1974). "Status quo in flow-through cytometry." J Histochem Cytochem **22**(7): 605-6.

Funato, T., J. Satoh and T. Sasaki (1998). "[Quantitative PCR system]." Rinsho Byori **46**(5): 399-405.

Gabrilovich, D.I., H.L. Chen, K.R. Girgis, H.T. Cunningham, G.M. Meny, S. Nadaf, D. Kavanaugh and D.P. Carbone (1996). "Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells." Nat Med **2**(10): 1096-103.

Gabrilovich, D., T. Ishida, T. Oyama, S. Ran, V. Kravtsov, S. Nadaf and D.P. Carbone (1998). "Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically effects the differentiation of hematopoietic lineages in vivo." Blood **91**(11): 4150-66.

Gao, G.F., J. Tormo, U.C. Gerth, J.R. Wyer, A.J. McMichael, D.I. Stuart, J.I. Bell, E.Y. Jones and B.K. Jakobsen (1997). "Crystal Structure of the complex between human CD8 $\alpha\alpha$  and HLA-A2." Nature **387**(6633): 630-4.

Garboczi, D.N., P. Ghosh, U. Utz, Q.R. Fan, W.E. Biddison and D.C. Wiley (1996). "Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2." Nature **384**(6605): 134-41.

Garcia, K.C., M. Degano, L.R. Pease, M. Huang, P.A. Peterson, L. Teyton and I.A. Wilson (1998). "Structural basis of plasticity in T cell receptor recognition of a self-peptide-MHC antigen." Science **279**(5354): 1166-72.

Gaugler, B., N. Brouwenstijn, V. Vantomme, J.P. Szikora, C.W. van der Spek, J.J. Pattard, T. Boon, P. Schrier and B.J. van den Eynde (1996). "A new gene coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human renal carcinoma." Immunogenetics **44**(5): 323-30.

Gay, D., P. Maddon, R. Sekaly, M.A. Talle, M. Godfrey, E. Long, G. Goldstein, L. Chess, R. Axel, J. Kappler and et al. (1987). "Functional interaction between human T-cell protein CD4 and the major histocompatibility complex HLA-DR antigen." Nature **328**(6131): 626-9.

Genbacev, O., A. Krtolica, W. Kaelin and S.J. Fisher (2001). "Human cytotrophoblast expression of the von Hippel-Lindau protein is downregulated during uterine invasion in situ and upregulated by hypoxia in vitro." Dev Biol **233**(2): 526-36.

Gendler, S., J. Taylor-Papadimitriou, T. Duhig, J. Rothbard and J. Burchell (1988). "A highly immunogenic region of a human polymorphic epithelial mucin expressed by carcinomas is made up of tandem repeats." J Bio Chem **263**(26): 12820-3.

Gerosa, F., B. Baldani-Guerra, C. Nisii, V. Marchesini, G. Carra and G. Trinchieri (2002). "Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells." J Exp Med **195**(3): 327-33.

Gervais, D.A., F.J. McGovern, B.J. Wood, S.N. Goldberg, W.S. McDougal and P.R. Mueller (2000). "Radio-frequency ablation of renal cell carcinoma: early clinical experience." Radiology **217**(3): 665-72.

Gilboa, E., S.K. Nair and H.K. Lyerly (1998). "Immunotherapy of cancer with dendritic-cell-based vaccines." Cancer Immunol Immunother **46**(2): 82-7.

Gillams, A.R. and W.R. Lees (2000). "Survival after percutaneous, image-guided, thermal ablation of hepatic metastases from colorectal cancer." Dis Colon Rectum **43**(5): 656-61.

Girardi, M., J. Lewis, E. Glusac, R.B. Filler, L. Geng, A.C. Hayday and R.E. Tigelaar (2002). "Resident skin-specific gammadelta T cells provide local, nonredundant regulation of cutaneous inflammation." J Exp Med **195**(7): 855-67.

Goka, A.K. and M.J. Farthing (1987). "The use of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine as a peroxidase substrate in microplate enzyme-linked immunosorbent assay." J Immunoassay **8**(1): 29-41.

Goldberg, S.N. (2002). "Comparison of techniques for image-guided ablation of focal liver tumors." Radiology **223**(2): 304-7.

Goodman, M.T., H. Morgenstern and E.L. Wynder (1986). "A case-control study of factors affecting the development of renal cell cancer." Am J Epidemiol **124**(6): 926-41.

Goodman, M.D., B.K. Goodman, M.B. Lubin, G. Braunstein, J.I. Rotter and R.R. Schreck (1990). "Cytogenetic characterization of renal cell carcinoma in von Hippel-Lindau syndrome." Cancer **65**(5): 1150-4.

Gordon, S. (1995). "The macrophage." Bioessays **17**(11): 977-86.

Goulder, P.J., A.K. Sewell, D.G. Lalloo, D.A. Price, J.A. Whelan, J. Evans, G.P. Taylor, G. Luzzi, P. Giangrande, R.E. Phillips and A.J. McMichael (1997). "Patterns of immunodominance in HIV-1-specific cytotoxic T lymphocyte responses in two human histocompatibility leukocyte antigens (HLA)-identical siblings with HLA-A\*0201 are influenced by epitope mutation." J Exp Med **185**(8): 1423-33.

Grabar, P. and C.A. Williams Jr. (1955). "[Immunoelectrophoretic method for the analysis of mixtures of antigenic substances]." Biochim Biophys Acta **17**(1): 67-74.

Grabmaier, K., J.L. Vissers, M.C. de Weijert, J.C. Oosterwijk-Wakka, A. van Bokhoven, R.H. Brakenhoff, E. Noessner, P.A. Mulders, G. Merckx, C.G. Figdor, G.J. Adema and E. Oosterwijk (2000). "Molecular cloning and immunogenicity of renal cell carcinoma-associated antigen G250." Int J Cancer **85**(6): 865-70.

Grakoui, A., S.K. Bromley, C. Sumen, M.M. Davis, A.S. Shaw, P.M. Allen and M.L. Dustin (1999). "The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation." Science **285**(5425): 221-7.

Greenlee, R.T., T. Murray, S. Bolden and P.A. Wingo (2000). "Cancer statistics, 2000." CA Cancer J Clin **50**(1): 7-33.

Griffin, T.A., J. Yuan, T. Friede, S. Stevanovic, K. Ariyoshi, S.L. Rowland-Jones, H.G. Rammensee and R.A. Colbert (1997). "Naturally occurring A pocket polymorphisms in HLA-B\*2703 increases the dependence on an accessory

anchor residue at P1 for optimal binding of nonamer peptides." J Immunol **159**(10): 4887-97.

Grosse-Hovest, L., I. Hartlapp, W. Marwan, G. Brem, H.G. Rammensee and G. Jung (2003). "A recombinant bispecific single-chain antibody induces targeted, supra-agonistic CD28-stimulation and tumor cell killing." Eur J Immunol **33**(5): 1334-40.

Grosse-Hovest, L., S. Muller, R. Minoia, E. Wolf, V. Zakhartchenko, H. Wenigerkind, C. Lassnig, U. Besenfelder, M. Muller, S.D. Lytton, G. Jung and G. Brem (2004). "Cloned transgenic farm animals produce a bispecific antibody for T cell-mediated tumor cell killing." Proc Natl Acad Sci USA **101**(18): 6858-63.

Grunebach, F., M.R. Muller and P. Brossart (2005). "RNA transfection of dendritic cells." Methods Mol Med **109**: 47-54.

Haen, S., C. Gouttefangeas, A. Boss, S. Clasen, D. Schmidt, M. Kuczyk, A. Stenzl, H. Schild, P.L. Pereira and H.G. Rammensee (2005). "Radiofrequency ablation may activate the immune system and induce specific anti-tumoral immune responses in cancer patients." Eur Radiol **15**(1 Suppl): C-0611.

Haines, D.E., D.D. Watson and C. Haiperin (1987). "Characteristics of heat transfer and determination of temperature gradient and viability threshold during radiofrequency fulguration of isolated perfused canine right ventricle." Circulation **76**: 278.

Haines, D.E. and A.F. Verow (1990). "Observations on electrode-tissue interface temperature and effect on electrical impedance during radiofrequency ablation of ventricular myocardium." Circulation **82**(3): 1034-8.

Haines D.E. (1993). "The biophysics of radiofrequency catheter ablation in the heart: the importance of temperature monitoring." Pacing Clin Electrophysiol **16**(3.2): 586-91.

Hale, G., S. Bright, G. Chumbley, T. Hoang, D. Metcalf, A.J. Munro and H. Waldmann (1983). "Removal of T cells from bone marrow for transplantation: a monoclonal antilymphocyte antibody that fixes human complement." Blood **62**(4): 873-82.

Hamilton, J.A. and G.P. Anderson (2004). "GM-CSF biology." Growth Factors **22**(4): 225-31.

Hammarstrom, S. (1999). "The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues." Semin Cancer Biol **9**(2): 67-81.

Hammer, M.H., S. Meyer, G. Brestrich, A. Moosmann, F. Kern, L. Tesfa, N. Babel, A. Mittenzweig, C.M. Rooney, W. Hammerschmidt, H.D. Volk and P. Reinke (2005). "HLA type-independent generation of antigen-specific T cells for adoptive immunotherapy." Eur J Immunol **35**(7): 2250-8.

Hand, W.J. and G. ter Haar (1981). "Heating techniques in hyperthermia. I. Introduction and assessment of techniques." Br J Radiol **54**(642): 443-6.

Hand, W.J. (1981). "Heating techniques in hyperthermia. II. Non-ionizing electromagnetic waves." Br J Radiol **54**(642): 446-59.

Handa, K., R. Suzuki, H. Matsui, Y. Shimizu and K. Kamagai (1983). "Natural killer (NK) cells as a responder to interleukin 2 (IL 2). II. IL 2-induced interferon gamma production." J Immunol **130**(2): 988-92.

Harding, F.A., J.G. McArthur, J.A. Gross, D.H. Raulet and J.P. Allison (1992). "CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones." Nature **356**(6370): 607-9.

Harrer, T., E. Harrer, S.A. Kalams, P. Barbosa, A. Trocha, R.P. Johnson, T. Elbeik, M.B. Feinberg, S.P. Buchbinder and B.D. Walker (1996). "Cytotoxic T lymphocytes in asymptomatic long-term nonprogressing HIV-1 infection. Breadth and specificity of the response and relation to in vivo viral quasispecies in a person with prolonged infection and low viral load." J Immunol **156**(7): 2616-23.

Harris, C.E., R.A. Boden and C.R. Astell (1999). "A novel heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-like protein interacts with NS1 of the minute virus in mice." J Virol **73**(1): 72-80.

Hartmann, G., G.J. Weiner and A.M. Krieg (1999). "CpG DNA: a potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells." Proc Natl Acad Sci USA **96**(16): 9305-10.

Havran, W.L., Y.H. Chien and J.P. Allison (1991). "Recognition of self antigens by skin-derived T cells with invariant gamma delta antigen receptors." Science **252**(5011): 1430-2.

Heid, C.A., J. Stevens, K.J. Livak and P.M. Williams (1996). "Real time quantitative PCR." Genome Res **6**(10): 986-94.

Heid, H.W., M. Schnolzer and T.W. Keenan (1996). "Adipocyte differentiation-related protein is secreted into milk as a constituent of milk lipid globule membrane." Biochem J **320**(Pt 3): 1025-30.

Hendrickson, W.A., P.D. Kwong, D.J. Leahy, S.E. Ryu, H. Yamaguchi, S. Fleury and R.P. Sekaly (1992). "Structural aspects of CD4 and CD8 involvement in the cellular immune response." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **57**:549-56.

Hertenstein, B., B. Wagner, D. Bunjes, C. Duncker, A. Raghavachar, R. Arnold, H. Heimpel and H. Schrezenmeier (1995). "Emergence of CD52-, phosphatidylinositolglycan-anchor-deficient T lymphocytes after in vivo application of Campath-1H for refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma." Blood **86**(4): 1487-92.

Hertz, H. (1887). "Ueber sehr schnelle elektrische Schwingungen." Wiedemann Annalen **31**: 421-31.

Higuchi, R., C. Fockler, G. Dollinger and R. Watson (1993). "Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions." Biotechnology (NY) **11**(9): 1026-30.

Hilf, N., H. Singh-Jasuja, P. Schwarzmaier, C. Gouttefangeas, H.G. Rammensee and H.J. Schild (2002). "Human platelets express heat shock protein receptors and regulate dendritic cell maturation." Blood **99**(10): 3676-82.

Hill, A.B., S.P. Lee, J.S. Haurum, N. Murray, Q.Y. Yao, M. Rowe, N. Signoret, A.B. Rickinson and A.J. McMichael (1995). "Class I major histocompatibility complex-restricted cytotoxic T lymphocytes specific for Epstein-Barr virus (EBV)-transformed B lymphoblastoid cell lines against which they were raised." J Exp Med **181**(6): 2221-8.

Hirai, H., M.F. Roussel, J.Y. Kato, R.A. Ashmun and C.J. Sherr (1995). "Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6." Mol Cell Biol **15**(5): 2672-81.

Hoffman, D.R. (1973). "Estimation of serum IgE by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)." J Allergy Clin Immunol **51**(5): 303-7.

Hogervorst, E.J., C.J. Boog, J.P. Wagenaar, M.H. Wauben, R. van der Zee and W. van Eden (1991). "T cell reactivity to an epitope on the mycobacterial 65-kDa heat-shock protein (hsp 65) corresponds with arthritis susceptibility in rats and is regulated by hsp 65-specific cellular responses." Eur J Immunol **21**(5): 1289-96.

Holland, J.M. (1973). "Proceedings: Cancer of the kidney – natural history and staging." Cancer **32**(5): 1030-42.

Huczko, E.L., W.M. Bodnar, D. Benjamin, K. Sakaguchi, N.Z. Zhu, J. Shabanowitz, R.A. Henderson, E. Appella, D.F. Hunt and V.H. Engelhard (1993). "Characteristics of endogenous peptides eluted from the class I molecule HLA-B7 determined by mass spectrometry and computer modelling." J Immunol **151**(5): 2572-87.

Hunt, D.F., A.M. Buko, J.M. Ballard, J. Shabanowitz and A.B. Giordani (1981). "Sequence analysis of polypeptides by collision activated dissociation on a triple quadrupole mass spectrometer." Biomed Mass Spectrom **8**(9): 397-408.

Hunt, D.F., H. Michel, T.A. Dickinson, J. Shabanowitz, A.L. Cox, K. Sakaguchi, E. Appella, H.M. Grey and A. Sette (1992). "Peptides presented to the immune system by the murine class II major histocompatibility complex molecule I-Ad." Science **256**(5065): 1817-20.

Huppert, P.E., J. Trubenbach, F. Schick, P. Pereira, C. Konig and C.D. Claussen (2000). "MRI-guided percutaneous radiofrequency ablation of hepatic neoplasms – first technical and clinical experiences." Rofo **172**(8): 692-700.

Ishida, T., T. Oyama, D.P. Carbone and D.I. Gabrilovich (1998). "Defective function of Langerhans cells in tumor-bearing animals is the result of defective maturation from hemopoietic progenitors." J Immunol **161**(9): 4842-51.

Itoh, K. (1987). "[Tumor infiltrating lymphocytes from human metastatic melanoma." Gan To Kagaku Ryoho **14**(6 Pt 2): 2119-26.

Itoh, T., Y. Orba, H. Takei, Y. Ishida, M. Saitoh, H. Nakamura, T. Meguro, S. Horita, M. Fujita and K. Nagashima (2002). "Immunohistochemical detection of hepatocellular carcinoma in the setting of ongoing necrosis after radiofrequency ablation." Mod Pathol **15**(2): 110-5.

IUPAC-IUB commission (1966). "IUPAC-IUB commission on biochemical nomenclature. Abbreviated designation of amino acid derivatives and peptides. Tentative rules." J Biol Chem **241**(11): 2491-5.

IUPAC-IUB commission (1972). "IUPAC-IUB commission on biochemical nomenclature. Symbols for amino-acid derivatives and peptides. Recommendation (1971)." Biochem J **126**(4): 773-80.

IUPAC-IUB joint commission (1984). "IUPAC-IUB joint commission on biochemical nomenclature. Nomenclature and symbolism for amino acids and peptides. Recommendations 1983." Biochem J **219**(2): 345-73.

Jaeger, E., H. Bernhard, P. Romero, M. Ringhoffer, M. Arand, J. Karbach, C. Ilsemann, M. Hagedorn and A. Knuth (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**(2): 162-9.

Jaeger, E., M. Ringhoffer, H.P. Dienes, M. Arand, J. Karbach, D. Jaeger, C. Ilsemann, M. Hagedorn, F. Oesch and A. Knuth (1996b). "Granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor enhances immune responses to melanoma-associated peptides in vivo." Int J Cancer **67**(1): 54-62.

Jaeger, E., Y.T. Chen, J.W. Drijfhout, J. Karbach, M. Ringhoffer, D. Jaeger, M. Arand, H. Wada, Y. Noguchi, E. Stockert, L.J. Old and A. Knuth (1998). "Simultaneous humoral and cellular immune response against cancer-testis antigen NY-ESO-1: definition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2-binding peptide epitopes." J Exp Med **187**(2): 265-70.

Jaeger, E., M. Maeurer, H. Hohn, J. Karbach, D. Jaeger, Z. Zidianakis, A. Bakhshandeh-Bath, J. Orth, C. Neukirch, A. Necker, T.E. Reichert and A. Knuth (2000). "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**(4): 538-47.

Jaeger, E., D. Jaeger and A. Knuth (2003). "Antigen-specific immunotherapy and cancer vaccines." Int J Cancer **106**(6): 817-20.

Jameson, J.M., G. Cauvi, D.A. Witherden and W.L. Havran (2004). "A keratinocyte-responsive gamma delta TCR is necessary for dendritic epidermal T cell activation by damaged keratinocytes and maintenance in the epidermis." J Immunol **172**(6): 3573-9.

Janeway, C.A. Jr., B. Jones and A. Hayday (1988). "Specificity and function of T cells bearing gamma delta receptors." Immunol Today **9**(3): 73-6.

Janeway, C. (1989). "Immunogenicity signals 1,2,3 ... and 0." Immunol Today **10**(9): 283-6.

Jantzer, P. and D.J. Schendel (1998). "Human renal cell carcinoma antigen-specific CTLs: antigen-driven selection and long-term persistence in vivo." Cancer Res **58**(14): 3078-86.

Jenner, E. (1798). "An inquiry into the causes and effects of the Variolae Vaccinae, a disease discovered in some of the western counties of England, particularly Gloucestershire, and known by the name cow-pox." London; Shury.

Jindal, G., M. Friedmann, J. Locklin and B.J. Wood (2005). "Palliative radiofrequency ablation for recurrent prostate cancer." Cardiovasc Intervent Radiol [Epub ahead of print].

Johnson, M.R., K. Wang, J.B. Smith, M.J. Heslin and R.B. Diasio (2000). "Quantitation of dihydropyrimidine dehydrogenase expression by real-time reverse transcription polymerase chain reaction." Anal Biochem **278**(2): 175-84.

Kadowaki, N., S. Antonenko, J.Y. Lau and Y.J. Liu (2000). "Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity." J Exp Med **192**(2): 219-26.

Kagi, D., F. Vignaux, B. Ledermann, K. Burki, V. Depraetere, S. Nagata, H. Hengartner and P. Goldstein (1994). "Fas and perforin pathways as major mechanisms of T-cell-mediated cytotoxicity." Science **265**(5171): 528-30.

Kalinski, P., C.M. Hilkens, E.A. Wierenga and M.L. Kapsenberg (1999). "T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal." Immunol Today **20**(12): 561-7.

Kammula, U.S., K.H. Lee, A.I. Riker, E. Wang, G.A. Ohnmacht, S.A. Rosenberg and F.M. Marincola (1999). "Functional analysis of antigen-specific T lymphocytes by serial measurement of gene expression in peripheral blood mononuclear cells and tumor specimens." J Immunol **163**(12): 6867-75.

Kammula, U.S., F.M. Marincola and S.A. Rosenberg (2000). "Real-time quantitative polymerase chain reaction assessment of immune reactivity in melanoma patients after tumor peptide vaccination." J Natl Cancer Inst **92**(16): 1336-44.

Kao, G.D., S.B. Malkowicz, R. Whittington, A.V. D'Amico and A.J. Wein (1994). "Locally advanced renal cell carcinoma: low complication rate and efficacy of postnephrectomy radiation therapy planned with CT." Radiology **193**(3): 725-30.

Kaufman, S.H. (1990). "Heat shock proteins and the immune response." Immunol Today **11**(4): 129-36.

Kawagoe, N., I. Shintaku, S. Yutani, H. Etoh, K. Matuoka, S. Noda and K. Itoh (2000). "Expression of the SART3 tumor rejection antigen in renal cell carcinoma." J Urol **164**(6): 2090-5.

Kemeny, N., Y. Huang, A.M. Cohen, W. Shi, J.A. Conti, M.F. Brennan, J.R. Bertino, A.D. Turnbull, D. Sullivan, J. Stockman, L.H. Blumgart and Y. Fong (1999). "Hepatic arterial infusion of chemotherapy after resection of hepatic metastases from colorectal cancer." N Engl J Med **341**(27): 2039-48.

Kendall, C., I. Ionescu-Matiu and G.R. Dreesman (1983). "Utilization of the biotin/avidin system to amplify the sensitivity of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)." J Immunol Methods **56**(3): 329-39.

Kerr, B.M., N. Kienzle, J.M. Burrows, S. Cross, S.L. Silins, M. Buck, E.M. Benson, B. Coupar, D.J. Moss and T.B. Sculley (1996). "Identification of type B-specific and cross-reactive cytotoxic T-lymphocyte response to Epstein-Barr virus." J Virol **70**(12): 8858-64.

Kersh, E.N., A.S. Shaw and P.M. Allen (1998). "Fidelity of T cell activation through multistep T cell receptor zeta phosphorylation." Science **281**(5376): 572-5.

Kessler, J.H., N.J. Beekman, S.A. Bres-Vloemans, P. Verdijk, P.A. van Veelen, A.M. Kloosterman-Joosten, D.C. Vissers, G.J. ten Bosch, M.G. Kester, A. Sijts, J. Wouter Drijfhout, F. Ossendorp, R. Offringa and C.J. Melief (2001). "Efficient identification of novel HLA-A(\*)0201-presented cytotoxic T lymphocyte epitopes in the widely expressed tumor antigen PRAME by proteasome-mediated digestion analysis." J Exp Med **193**(1): 73-88.

Khong, H.T. and N.P. Restifo (2002). "Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes." Nat Immunol **3**(11): 999-1005.

Klein, G., H.O. Sjogren, E. Klein and K.E. Hellstrom (1960). "Demonstration of resistance against methylcholanthrene-induced sarcomas in the primary autochthonous host." Cancer Res **20**: 1561-72.

Kleinschmidt, W.J. and R.M. Schultz (1982). "Similarities of murine gamma interferon and the lymphokine that renders macrophages cytotoxic." J Interferon Res **2**(2): 291-9.

Kondo, T., I. Cortese, S. Markovic-Plese, K.P. Wandinger, C. Carter, M. Brown, S. Leitman and R. Martin (2001). "Dendritic cells signal T cells in the absence of exogenous antigen." Nat Immunol **2**(10): 932-8.

Kovacs, G., A. Emanuel, H.P. Neumann and H.F. Kung (1991). "Cytogenetics of renal cell carcinomas associated with von Hippel-Lindau disease." Genes Chromosomes Cancer **3**(4): 256-62.

Kozak, W., W. Holtl, K. Pummer, U. Maier, K. Jeschke and A. Bucher (1996). "Adrenalectomy – still a must in radical renal surgery?" Br J Urol **77**(1): 27-31.

Kronenberg, M. (2005). "Toward an understanding of NKT cell biology: process and paradoxes." Annu Rev Immunol **23**: 877-900.

Kruger, T., O. Schoor, C. Lemmel, B. Kraemer, C. Reichle, J. Dengjel, T. Weinschenk, M. Muller, J. Hennenlotter, A Stenzl, H.G. Rammensee and S. Stevanovic (2004). "Lessons to be learned from primary renal cell carcinomas: novel tumor antigens and HLA ligands for immunotherapy." Cancer Immunol Immunother **54**(9): 826-36.

Kuno, H. and H.K. Kihara (1967). "Simple microassay of protein with membrane filter." Nature **215**(104): 974-5.

Kupiec-Weglinski, J.W., J.M. Austyn and P.J. Morris (1988). "Migration patterns of dendritic cells in the mouse. Traffic from the blood, and T cell-dependent and –independent entry to lymphoid tissues." J Exp Med **167**(2): 632-45.

Kwon, E.D., A.A. Hurwitz, B.A. Foster, C. Madias, A.L. Feldhaus, N.M. Greenberg, M.B. Burg and J.P. Allison (1997). "Manipulation of T cell

costimulatory and inhibitory signals for immunotherapy of prostate cancer." Proc Natl Acad Sci USA **94**(15): 8099-103.

Landis, S.H., T. Murray, S. Bolden and P.A. Wingo (1999). "Cancer statistics, 1999." CA Cancer J Clin **49**(1): 8-31.

Larsen, M.V., C. Lundegaard, K. Lamberth, S. Buus, S. Brunak, O. Lund and M. Nielsen (2005). "An integrative approach to CTL epitope prediction: A combined algorithm integrating MHC class I binding, TAP transport efficiency, and proteasomal cleavage predictions." Eur J Immunol [Epub ahead of print].

Le Veen, R.F. (1997). "Laser hyperthermia and radiofrequency ablation of hepatic lesions." Semin Interv Radiol **14**: 313-24.

Leach, D.R., M.F. Krummel and J.P. Allison (1996). "Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade." Science **271**(5256): 1734-6.

Lee, P.P., C. Yee, P.A. Savage, L. Fong, D. Brockstedt, J.S. Weber, D. Johnson, S. Swetter, J. Thompson, P.D. Greenberg, M. Roederer and M.M. Davis (1999). "Characterization of circulating T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients." Nat Med **5**(6): 677-85.

Lees, W.R. and A. Gilliams (2005). "Radiofrequency ablation: other abdominal organs." Abdom Imaging [Epub ahead of print].

Lehnert, T. and M. Golling (2001). "Indikation und Ergebnisse der Lebermetastasenresektion." Radiologe **41**(1): 40-8.

Lemmel, C. and S. Stevanovic (2003). "The use of HPLC-MS in T-cell epitope identification." Methods **29**(3): 248-59.

Lencioni, R., D. Cioni, L. Crocetti, C. Franchini, C.D. Pina, J. Lera and C. Bartolozzi (2005). "Early-stage hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis: long-term results of percutaneous image-guided radiofrequency ablation." Radiology **234**(3): 961-7.

Lencioni, R., L. Crocetti, R. Cioni, A. Mussi, G. Fontanini, M. Ambrogi, C. Franchini, D. Cioni, O. Fanucchi, R. Gemignani, R. Baldassarri, C.A. Angeletti and C. Bartolozzi (2004). "Radiofrequency ablation of lung malignancies: where do we stand?" Cardiovasc Intervent Radiol **27**(6): 581-90.

Lipsker, D., U. Ziyhan, D. Spehner, F. Proamer, H. Bausinger, P. Jeannin, J. Salamer, A. Bohbot, J.P. Cazenave, R. Drillien, Y. Delneste, D. Hanau and H. de la Salle (2002). "Heat shock proteins 70 and 60 share common receptors which are expressed on human monocyte-derived but not epidermal dendritic cells." Eur J Immunol **32**(2): 322-32.

Liss, B. (2002). "Improved quantitative real-time RT-PCR for expression profiling individual cells." Nucleic Acids Res **30**(17): e89.

Liu, Y.J., N. Kadowaki, M.C. Rissoan and V. Soumelis (2000). "T cell activation and polarization by DC1 and DC2." Curr Top Microbiol Immunol **251**: 149-59.

Livak, K.J. and T.D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method." Methods **25**(4): 402-8.

Livraghi, T., D. Festi, F. Monti, A. Salmi and C. Vettori (1986). "US-guided percutaneous alcohol injection of small hepatic and abdominal tumors." Radiology **161**(2): 309-12.

Livraghi, T., S.N. Goldberg, F. Monti, A. Bizzini, S. Lazzaroni, F. Meloni, S. Pellicano, L. Solbiati and G.S. Gazelle (1997). "Saline-enhanced radiofrequency tissue ablation in the treatment of liver metastases." Radiology **202**(1): 205-10.

Luckey, C.J., J.A. Marto, M. Partridge, E. Hall, F.M. White, J.D. Lippolis, J. Shabanowitz, D.F. Hunt and V.H. Engelhard (2001). "Differences in the expression of human class I MHC alleles and their associated peptides in the presence of proteasome inhibitors." J Immunol **167**(3): 1212-21.

Lui, K.W., D.A. Gervais, R.A. Arellano and P.R. Mueller (2003). "Radiofrequency ablation of renal cell carcinoma." Clin Radiol **58**(12): 905-13.

Mackensen, A., C. Galanos and R. Engelhardt (1991). "Treatment of cancer patients with endotoxin induces release of endogenous cytokines." Pathobiology **59**(4): 264-7.

Madden, D.R., J.C. Gorga, J.L. Strominger and D.C. Wiley (1992). "The three-dimensional structure of HLA-B27 at 2.1 Å resolution suggests a general mechanism for tight peptide binding to MHC." Cell **70**(6): 1035-48.

Madden, D.R., D.N. Garboczi and D.C. Wiley (1993). "The antigenic identity of peptide-MHC complexes: a comparison of the conformations of five viral peptides presented by HLA-A2." Cell **75**(4): 693-708.

Maecker, B., D.H. Sherr, R.H. Vonderheide, M.S. von Bergwelt-Baildon, N. Hirano, K.S. Anderson, Z. Xia, M.O. Butler, K.W. Wucherpfennig, C. O'Hara, G. Cole, S.S. Kwak, U. Ramstedt, A.J. Tomlinson, R.M. Chiczy, L.M. Nadler and J.L. Schultze (2003). "The shared tumor-associated antigen cytochrome P450 1B1 is recognized by specific cytotoxic T cells." Blood **102**(9): 3287-94.

Maindrault-Goebel, F., C. Louvet, T. Andre, E. Carola, J.P. Lotz, J.L. Molitor, M.L. Garcia, V. Gilles-Amar, V. Izrael, M. Krulik and A. de Gramont (1999). "Oxaliplatin added to the simplified bimonthly leucovorin and 5-fluorouracil

regimen as second-line therapy for metastatic colorectal cancer (FOLFOX6). GERCOR." Eur J Cancer **35**(9): 1338-42.

Malissen, B. and M. Malissen (1996). "Functions of TCR and pre-TCR subunits: lessons from gene ablation." Curr Opin Immunol **8**(3): 383-93.

Maranchie, J.K., J.R. Vasselli, J. Riss, J.S. Bonifacino, W.M. Linehan and R.D. Klausner (2002). "The contribution of VHL substrate binding and HIF1-alpha to the phenotype of VHL loss in renal cell carcinoma." Cancer Cell **1**(3): 247-55.

Marshall, K.W. and J.D. Marks (2001). "Engineering and characterization of a novel fusion protein incorporating B7.2 and an anti-ErbB-2 single-chain antibody fragment for the activation of Jurkat T cells." J Immunother **24**(1): 27-36.

Masuda, Y., S. Sumita, N. Fujimura and A. Namiki (2003). "Geranylgeranylacetone attenuates septic diaphragm dysfunction by induction of heat shock protein 70." Crit Care Med **31**(11): 2585-91.

Matsui, K., J.J. Boniface, P. Steffner, P.A. Reay and M.M. Davis (1994). "Kinetics of T-cell receptor binding to peptide/I-Ek complexes: correlation of the dissociation rate with T-cell responsiveness." Proc Natl Acad Sci USA **91**(26): 12862-6.

McCarter, M.D. and Y. Fong (2000). "Metastatic liver tumors." Semin Surg Oncol **19**(2): 177-88.

McGahan, J.P., W.Z. Gu, J.M. Brock, H. Tesluk and C.D. Jones (1996). "Hepatic ablation using bipolar radiofrequency electrocautery." Acad Radiol **3**(5): 418-22.

McLaughlin, J.P., J. Schlom, J.A. Kantor and J.W. Greiner (1996). "Improved immunotherapy of a recombinant carcinoembryonic antigen vaccine when given in combination with interleukin-2." Cancer Res **56**(10): 2361-7.

McNeil, C. (1998). "Herceptin raises its sights beyond advanced breast cancer." J Natl Cancer Inst **90**(12): 882-3.

Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt and C.A. Janeway, Jr. (1997). "A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity." Nature **388**(6640): 394-7.

Medzhitov, R. and C. Janeway, Jr. (2000). "The Toll receptor family and microbial recognition." Trends Microbiol **8**(10): 452-6.

Mellman, I. and R.M. Steinman (2001). "Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines." Cell **106**(3): 255-8.

Meloni, M.F., S.N. Goldberg, T. Livraghi, F. Calliada, P. Ricci, M. Rossi, D. Pallavicini and R. Campani (2001). "Hepatocellular carcinoma treated with radiofrequency ablation: comparison of pulse inversion contrast-enhanced harmonic sonography, contrast-enhanced power Doppler sonography, and helical CT." AJR Am J Roentgenol **177**(2): 375-80.

Menon, A.G., G.J. Fleuren, E.A. Alphenaar, L.E. Jonges, C.M. Janssen van Rhijn, N.G. Ensink, H. Putter, R.A. Tollenaar, C.J. van de Velde and P.J. Kuppen (2003). "A basal membrane-like structure surrounding tumor nodules may prevent intraepithelial leucocyte infiltration in colorectal cancer." Cancer Immunol Immunother **52**(2): 212-6.

Meraz, M.A., J.M. White, K.C. Sheehan, E.A. Bach, S.J. Rodig, A.S. Dighe, D.H. Kaplan, J.K. Riley, A.C. Greenlund, D. Campbell, K. Carver-Moore, R.N. DuBois, R. Clark, M. Aguet and R.D. Schreiber (1996). "Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signalling pathway." Cell **84**(3): 431-42.

Miao, Y., Y. Ni, S. Mulier, J. Yu, I. De Wever, F. Penninckx, A.L. Baert and G. Marchal (2000). "Treatment of VX2 liver tumors in rabbits with "wet" electrode mediated radiofrequency ablation." Eur Radiol **10**(1): 188-94.

Minter, L.M. and B.A. Osborne (2003). "Cell death in the thymus – it's all a matter of contacts." Semin Immunol **15**(3): 135-44.

Mirghomizadeh, F., S. Kupka and N. Blin (1999). "Assessing genetic heterogeneity of renal cell tumors." Anticancer Res **19**(2C): 1467-70.

Mirza, A.N., B.D. Fornage, N. Sneige, H.M. Kuerer, L.A. Newman, F.C. Ames and S.E. Singletary (2001). "Radiofrequency ablation of solid tumors." Cancer J **7**(2): 95-102.

Mizejewski, G.J. (2001). "Alpha-fetoprotein structure and function: relevance to isoforms, epitopes, and conformational variants." Exp Biol Med (Maywood) **226**(5): 377-408.

Mokyr, M.B., T. Kalinichenko, L. Gorelik and J.A. Bluestone (1998). "Realization of the therapeutic potential of CTLA-4 blockade in low-dose chemotherapy-treated tumor-bearing mice." Cancer Res **58**(23): 5301-4.

Monks, C.R., B.A. Freiberg, H. Kupfer, N. Sciaky and A. Kupfer (1998). "Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells." Nature **395**(6697): 82-6.

Montoya, M.C., D. Sancho, G. Bonello, Y. Collette, C. Langlet, H.T. He, P. Aparicio, A. Alcover, D. Olive and F. Sanchez-Madrid (2002). "Role of ICAM-3 in the initial interaction of T lymphocytes and APCs." Nat Immunol **3**(2): 159-68.

Morimoto, R.I. and M.G. Santoro (1998). "Stress-inducible responses and heat shock proteins: new pharmacologic targets for cytoprotection." Nat Biotechnol **16**(9): 833-8.

Moser, M. (2003). "Dendritic cells in immunity and tolerance – do they display opposite functions?" Immunity **19**(1): 5-8.

Murthy, V.L. and L.J. Stern (1997). "The class II MHC protein HLA-DR1 in complex with an endogenous peptide: implications for the structural basis of the specificity of peptide binding." Structure **5**(10): 1385-96.

Nath, S. and D.E. Haines (1995). "Biophysics and pathology of catheter energy delivery systems." Prog Cardiovasc Dis **37**(4): 185-204.

Naylor, D.J. and F.U. Hartl (2001). "Contribution of molecular chaperones to protein folding in the cytoplasm of prokaryotic and eukaryotic cells." Biochem Soc Symp (68): 45-68.

Nazarenko, I.A., S.K. Bhatnagar and R.J. Hohman (1997). "A closed tube format for amplification and detection of DNA based on energy transfer." Nucleic Acids Res **25**(12): 2516-21.

Nencioni, A., M.R. Muller, F. Grunebach, A. Garuti, M.C. Mingari, F. Patrone, A. Ballesterio and P. Brossart (2003). "Dendritic cells transfected with tumor RNA for the induction of antitumor CTL in colorectal cancer." Cancer Gene Ther **10**(3): 209-14.

Nepom, G.T., J.H. Buckner, E.J. Novak, S. Reichstetter, H. Reijonen, J. Gebe, R. Wang, E. Swanson and W.W. Kwok (2002). "HLA class II tetramers: tools for direct analysis of antigen-specific CD4+ T cells." Arthritis Rheum **46**(1): 5-12.

Nestle, F.O., S. Alijagic, M. Gilliet, Y. Sun, S. Grabbe, R. Dummer, G. Burg and D. Schadendorf (1998). "Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells." Nat Med **4**(3): 328-32.

Neumann, E., A. Engelsberg, J. Decker, S. Storkel, E. Jaeger, C. Huber and B. Seliger (1998). "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**(18): 4090-5.

Neuvians, T.P., I. Gashaw, C.G. Sauer, C. von Ostau, S. Kliesch, M. Bergmann, A. Hacker and R. Grobholz (2005). "Standardization strategy for quantitative PCR in human seminoma and normal testis." J Biotechnol **117**(2): 163-71.

Ni, Y., S. Mulier, Y. Miao, L. Michel and G. Marchal (2005). "A review of the general aspects of radiofrequency ablation." Abdom Imaging [Epub ahead of print].

Noble, P.B., J.H. Cutts and K.K. Carroll (1968). "Ficoll flotation for the separation of blood leukocyte types." Blood **31**(1): 66-73.

Norcross, M.A. (1984). "A synaptic basis for T-lymphocyte activation." Ann Immunol **135D**(2): 113-34.

Norment, A.M. and D.R. Littman (1988). "A second subunit of CD8 is expressed in human T cells." EMBO J **7**(11): 3433-9.

O'Rourke, A.M. and M.F. Mescher (1992). "Cytotoxic T-lymphocyte activation involves a cascade of signalling and adhesion events." Nature **358**(6383): 253-5.

Organ, L.W. (1976). "Electrophysiologic principles of radiofrequency lesion making." Appl Neurophysiol **39**(2): 69-76.

Outzen, H.C. and H.C. Maguire Jr. (1983). "The etiology of renal-cell carcinoma." Semin Oncol **10**(4): 378-84.

Paglia, P., C. Chiodoni, M. Rodolfo and M.P. Colombo (1996). "Murine dendritic cells loaded in vitro with soluble protein prime cytotoxic T lymphocytes against tumor antigen in vivo." J Exp Med **183**(1): 317-22.

Palucka, A.K., M.V. Dhodapkar, S. Pacesny, H. Ueno, J. Fay and J. Banchereau (2005). "Boosting vaccinations with peptide-pulsed CD34+ progenitor-derived dendritic cells can expand long-lived melanoma peptide-specific CD8+ T cells in patients with metastatic melanoma." J Immunother **28**(2): 158-68.

Panelli, M.C., M.P. Bettinotti, K. Lally, G.A. Ohnmacht, Y. Li, P. Robbins, A. Riker, S.A. Rosenberg and F.M. Marincola (2000). "A tumor-infiltrating lymphocyte from a melanoma metastasis with decreased expression of melanoma differentiation antigen recognizes MAGE-12." J Immunol **164**(8): 4382-92.

Panelli, M.C., J. Wunderlich, J. Jeffries, E. Wang, A. Mixon, S.A. Rosenberg and F.M. Marincola (2000b). "Phase 1 study in patients with metastatic melanoma of immunization with dendritic cells presenting epitopes derived from the melanoma-associated antigens MART-1 and gp100." J Immunother **23**(4): 487-98.

Park, M., M. Dean, K. Kaul, M.J. Braun, M.A. Gonda and G. vande Woude (1987). "Sequence of MET protooncogene cDNA has features characteristic of the tyrosine kinase family of growth-factor receptors." Proc Natl Acad Sci USA **84**(18): 6379-83.

Parker, D.C. (1993). "T cell-dependent B cell activation." Annu Rev Immunol **11**: 331-60.

Pascolo, S., M. Schirle, B. Guckel, T. Dumrese, S. Stumm, S. Kayser, A. Moris, D. Wallwiener, H.G. Rammensee and S. Stevanovic (2001). "A MAGE-A1 HLA-A A\*0201 epitope identified by mass spectrometry." Cancer Res **61**(10): 4072-7.

Pass, H.A., S.L. Schwarz, J.R. Wunderlich and S.A. Rosenberg (1998). "Immunization of patients with melanoma peptide vaccines: immunologic assessment using the ELISPOT assay." Cancer J Sci Am **4**(5): 316-23.

Pastorek, J., S. Pastorekova, I. Callebaut, J.P. Mornon, V. Zelnik, R. Opavsky, M. Zat'ovicova, S. Liao, D. Portetelle and E.J. Stanbridge (1994). "Cloning and characterization of MN, a human tumor-associated protein with a domain homologous to carbonic anhydrase and a putative helix-loop-helix DNA binding segment." Oncogene **9**(10): 2877-88.

Patel, S.R. and R.S. Benjamin (2000). "Management of peritoneal and hepatic metastases from gastrointestinal stromal tumors." Surg Oncol **9**(2): 67-70.

Pawlik, T.M., C.R. Scoggins, D. Zorzi, E.K. Abdalla, A. Andres, C. Eng, S.A. Curley, E.M. Loyer, A. Muratore, G. Mentha, L. Capussotti and J.N. Vauthey (2005). "Effect of surgical margin status on survival and site of recurrence after hepatic resection for colorectal metastases." Ann Surg **241**(5): 715-22, discussion 722-4.

Peiper, M., P.S. Goedegebuure, D.C. Linehan, E. Ganguly, C.C. Douville and T.J. Eberlein (1997). "The HER2/neu-derived peptide p654-662 is a tumor-associated antigen in human pancreatic cancer recognized by cytotoxic T lymphocytes." Eur J Immunol **27**(5): 1115-23.

Pereira, P.L., S. Clasen, A. Boss, D. Schmidt, C. Gouttefangeas, C. Burkart, J. Wiskirchen, G. Tepe and C.D. Claussen (2004). "Radiofrequenzablation von Lebermetastasen." Radiologe **44**(4): 347-57.

Pereira, P.L., J. Trubenbach, M. Schenk, J. Subke, S. Kroeber, I. Schaefer, C.T. Remy, D. Schmidt, J. Brieger and C.D. Claussen (2004b). "Radiofrequency ablation: in vivo comparison of four commercially available devices in pig livers." Radiology **232**(2): 482-90.

Pittet, M.J., A. Zippelius, D.E. Speiser, M. Assenmacher, P. Guillaume, D. Valmori, D. Lienard, F. Lejeune, J.C. Cerottini and P. Romero (2001). "Ex vivo IFN-gamma secretion by circulating CD8 T lymphocytes: implications of a novel approach for T cell monitoring in infectious and malignant diseases." J Immunol **166**(12): 7634-40.

Polla, B.S., M. Perin and L. Pizzurki (1993). "Regulation and functions of stress proteins in allergy and inflammation." Clin Exp Allergy **23**(7): 548-56.

Porcher, C., M.C. Malinge, C. Picat and B. Grandchamp (1992). "A simplified method for determination of specific DNA or RNA copy number using quantitative PCR and an automatic DNA sequencer." Biotechniques **13**(1): 106-14.

Prehn, R.T. and J.M. Main (1957). "Immunity to methylcholanthrene-induced sarcomas." J Natl Cancer Inst **18**(6): 769-78.

Probst-Kepper, M., V. Stroobant, R. Kridel, B. Gaugler, C. Landry, F. Brasseur, J.P. Cosyns, B. Weynand, T. Boon and B.J. van den Eynde (2001). "An alternative open reading frame of the human macrophage colony-stimulating factor gene is independently translated and codes for an antigenic peptide of 14 amino acids recognized by tumor-infiltrating CD8 T lymphocytes." J Exp Med **193**(10): 1189-98.

Pulendran, B., J. Banchereau, E. Maraskovsky and C. Maliszewski (2001). "Modulating the immune response with dendritic cells and their growth factors." Trends Immunol **22**(1): 41-7.

Puranam, K.L. and P.J. Blackshear (1994). "Cloning and characterization of RECQL, a potential human homologue of the Escherichia coli DNA helicase RecQ." J Biol Chem **269**(47): 29838-45.

Rai, R., C. Richardson, P. Flecknell, H. Robertson, A. Burt and D.M. Manas (2005). "Study of apoptosis and heat shock protein (HSP) expression in hepatocytes following radiofrequency ablation (RFA)." J Surg Res [Epub ahead of print].

Rammensee, H.G., K. Falk, and O. Rotzschke (1993). "MHC molecules as peptide receptors." Curr Opin Immunol **5**(1): 35-44.

Rammensee, H.G., J. Bachmann, N.P. Emmerich, O.A. Bachor and S. Stevanovic (1999). "SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs." Immunogenetics **50**(3-4): 213-9.

Rao, J.B., R.S. Chamberlain, V. Bronte, M.W. Carroll, K.R. Irvine, B. Moss, S.A. Rosenberg and N.P. Restifo (1996). "IL-12 is an effective adjuvant to recombinant vaccinia virus-based tumor vaccines: enhancement by simultaneous B7-1 expression." J Immunol **156**(9): 3357-65.

Renner, C., W. Jung, U. Sahin, R. Denfeld, C. Pohl, L. Trumper, F. Hartmann, V. Diehl, R. van Lier and M. Pfreundschuh (1994). "Cure of xenografted human tumors by bispecific monoclonal antibodies and human T cells." Science **264**(5160): 833-5.

Rentzsch, C., S. Kayser, S. Stumm, I. Watermann, S. Walter, S. Stevanovic, D. Wallwiener and B. Guckel (2003). "Evaluation of pre-existent immunity in patients with primary breast cancer: molecular and cellular assays to quantify

antigen-specific T lymphocytes in peripheral blood mononuclear cells." Clin Cancer Res **9**(12): 4376-86.

Revy, P., M. Sospedra, B. Barbour and A. Trautmann (2001). "Functional antigen-independent synapses formed between T cells and dendritic cells." Nat Immunol **2**(10): 925-31.

Robson, C.J., B.M. Churchill and W. Anderson (1969). "The results of radical nephrectomy for renal cell carcinoma." J Urol **101**(3): 297-301.

Rosenberg, S.A., B.S. Packard, P.M. Aebersold, D. Solomon, S.L. Topalian, S.T. Toy, P. Simon, M.T. Lotze, J.C. Yang and et al. (1988). "Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report." N Engl J Med **319**(25): 1676-80.

Rosenberg, S.A., J.R. Yannelli, J.C. Yang, S.L. Topalian, D.J. Schwartzentruber, J.S. Weber, D.R. Parkinson, C.A. Seipp, J.H. Einhorn and D.E. White (1994). "Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2." J Natl Cancer Inst **86**(15): 1159-66.

Rosenberg, S.A., J.C. Yang, D.J. Schwartzentruber, P. Hwu, F.M. Marincola, S.L. Topalian, N.P. Restifo, M.E. Dudley, S.L. Schwarz, P.J. Spiess, J.R. Wunderlich, M.R. Parkhurst, Y. Kawakami, C.A. Seipp, J.H. Einhorn and D.E. White (1998). "Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma." Net Med **4**(3): 321-7.

Rotzschke, O., K. Falk, S. Stevanovic, V. Gnau, G. Jung and H.G. Rammensee (1994). "Dominant aromatic/aliphatic C-terminal anchor in HLA-B\*2702 and B\*2705 peptide motifs." Immunogenetics **39**(1): 74-7.

Rowen, L., B.F. Koop and L. Hood (1996). "The complete 685-kilobase DNA sequence of the human beta T cell receptor locus." Science **272**(5269): 1755-62.

Ryan, J. and C. Geczy (1987). "Coagulation and the expression of cell-mediated immunity." Immunol Cell Biol **65**(Pt 2): 127-39.

Sabel, M.S., M.A. Nehs, G. Su, K.P. Lowler, J.L. Ferrara and A.E. Chang (2005). "Immunologic response to cryoablation of breast cancer." Breast Cancer Res Treat **90**(1): 97-104.

Sadovnikova, E., L.A. Jopling, K.S. Soo and H.J. Stauss (1998). "Generation of human tumor-reactive cytotoxic T cells against peptides presented by non-self HLA class I molecules." Eur J Immunol **28**(1): 193-200.

Salazar-Mather, T.P., T.A. Hamilton and C.A. Biron (2000). "A chemokine-to-cytokine-to-chemokine cascade critical in antiviral defense." J Clin Invest **105**(7): 986-93.

Scanlan, M.J., J.D. Gordan, B. Williamson, E. Stockert, N.H. Bander, V. Jongeneel, A.O. Gure, D. Jager, E. Jager, A. Knuth, Y.T. Chen and L.J. Old (1999). "Antigens recognized by autologous antibody in patients with renal-cell carcinoma." Int J Cancer **83**(4): 456-64.

Schag, K., S.M. Schmidt, M.R. Muller, T. Weinschenk, S. Appel, M.M. Weck, F. Grunebach, S. Stevanovic, H.G. Rammensee and P. Brossart (2004). "Identification of C-met oncogene as a broadly expressed tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T-lymphocytes." Clin Cancer Res **10**(11): 3658-66.

Scheibenbogen, C., P. Romero, L. Rivoltini, W. Herr, A. Schmittel, J.C. Cerottini, T. Woelfel, A.M. Eggermont and U. Keilholz (2000). "Quantitation of antigen-reactive T cells in peripheral blood by IFN $\gamma$ -ELISPOT assay and chromium-release assay: a four-centre comparative trial." J Immunol Methods **244**(1-2): 81-9.

Schirle, M., W. Keilholz, B. Weber, C. Gouttefangeas, T. Dumrese, H.D. Becker, S. Stevanovic and H.G. Rammensee (2000). "Identification of tumor-associated MHC class I ligands by a novel T cell-dependent approach." Eur J Immunol **30**(8): 2216-25.

Schmitz, M., P. Diestelkoetter, B. Weigle, F. Schmachtenberg, S. Stevanovic, D. Ockert, H.G. Rammensee and E.P. Rieber (2000). "Generation of survivin-specific CD8<sup>+</sup> T effector cells by dendritic cells pulsed with protein or selected peptides." Cancer Res **60**(17): 4845-9.

Schnell, S. and C. Mendoza (1997). "Theoretical description of the polymerase chain reaction." J Theor Biol **188**(3): 313-8.

Schueller, G., J. Kettenbach, R. Sedivy, A. Stift, J. Friedl, M. Gnant and J. Lammer (2004). "Heat shock protein expression induced by percutaneous radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma in vivo." Int J Oncol **24**(3): 609-13.

Schueller, G., J. Kettenbach, R. Sedivy, H. Bergmeister, A. Stift, J. Friedl, M. Gnant and J. Lammer (2004b). "Expression of heat shock proteins in human hepatocellular carcinoma after radiofrequency ablation in an animal model." Oncol Rep **12**(3): 495-9.

Schutte, B., M. Henfling, W. Kolgen, M. Bouman, S. Meex, M.P. Leers, M. Nap, V. Bjorklund, P. Bjorklund, B. Bjorklund, E.B. Lane, M.B. Omary, H. Jornvall and F.C. Ramaekers (2004). "Keratin 8/18 breakdown and reorganization during apoptosis." Exp Cell Res **297**(1): 11-26.

Sedgwick, J.D. and P.G. Holt (1983). "A solid-phase immunoenzymatic technique for the enumeration of specific antibody-secreting cells." J Immunol Methods **57**(1-3): 301-9.

Seegenschmiedt, M.H., L.W. Brady and R. Sauer (1990). "Interstitial thermoradiotherapy: review on technical and clinical aspects." Am J Clin Oncol **13**(4): 352-63.

Shi, Y., J.E. Evans and K.L. Rock (2003). "Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells." Nature **425**(6957): 516-21.

Shirai, M., H. Okada, M. Nishioka, T. Akatsuka, C. Wychowski, R. Houghten, C.D. Pendleton, S.M. Feinstone and J.A. Berzofsky (1994). "An epitope in hepatitis C virus core region recognized by cytotoxic T cells in mice and humans." J Virol **68**(5): 3334-42.

Shirai, M., T. Arichi, M. Nishioka, T. Nomura, K. Ikeda, K. Kawanishi, V.H. Engelhard, S.M. Feinstone and J.A. Berzofsky (1995). "CTL responses of HLA-A2.1-transgenic mice specific for hepatitis C viral peptides predict epitopes for CTL of humans carrying HLA-A2.1." J Immunol **154**(6): 2733-42.

Shortman, K. and Y.J. Liu (2002). "Mouse and Human dendritic cell subtypes." Nat Rev Immunol **2**(3): 151-61.

Shurin, M.R., Z.R. Yurkovetsky, I.L. Tourkova, L. Balkir and G.V. Shurin (2002). "Inhibition of CD40 expression and CD40-mediated dendritic cell function by tumor-derived IL-10." Int J Cancer **101**(1): 61-8.

Siegal, F.P., N. Kadowaki, M. Shodell, P.A. Fitzgerald-Bocarsly, K. Shah, S. Ho, S. Antonenko and Y.J. Liu (1999). "The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood." Science **284**(5421): 1835-7.

Siperstein, A.E. and A. Gitomirski (2000). "History and technological aspects of radiofrequency thermoablation." Cancer J **6**(4): 5293-303.

Slingluff Jr., C.L., G. Yamshchikov, P. Neese, H. Galavotti, S. Eastham, V.H. Engelhardt, D. Kittlesen, D. Deacon, S. Hibbitts, W.W. Grosh, G. Petroni, R. Cohen, C. Wiernasz, J.W. Patterson, B.P. Conway and W.G. Ross (2001). "Phase I trial of a melanoma vaccine with gp100(280-288) peptide and tetanus helper peptide in adjuvant: immunologic and clinical outcomes." Clin Cancer Res **7**(10): 3012-24.

Smyth, M.J., M.E. Wallace, S.L. Nutt, H. Yagita, D.I. Godfrey and Y. Hayakawa (2005). "Sequential activation of NKT cells and NK cells provides effective innate immunotherapy for cancer." J Exp Med **201**(12): 1973-85.

Snell, G.D. (1964). "Methods for study of histocompatibility genes and isoantigens." Methods Med Res **10**:1-7.

Solbiati, L., T. Livraghi, S.N. Goldberg, T. Ierace, F. Meloni, M. Della noce, L. Cova, E.F. Halpern and G.S. Gazelle (2001). "Percutaneous radio-frequency ablation of hepatic metastases from colorectal cancer: long-term results in 117 patients." Radiology **221**(1): 159-66.

Southern, E.M. and A.R. Mitchell (1971). "Chromatography of nucleic acid digests on thin layers of cellulose impregnated with polyethyleneimine." Biochem J **123**(4): 613-7.

Speiser, D.E., D. Lienhard, N. Rufer, V. Rubio-Godoy, D. Rimoldi, F. Lejeune, A.M. Krieg, J.C. Cerottini and P. Romero (2005). "Rapid and strong human CD8+ T cell responses to vaccination with peptide, IFA, and CpG oligodeoxynucleotide 7909." Blood **115**(3): 739-46.

Spiotto, M.T., P. Yu, D.A. Rowley, M.I. Nishimura, S.C. Meredith, T.F. Gajewski, Y.X. Fu and H. Schreiber (2002). "Increasing tumor antigen expression overcomes "ignorance" to solid tumors via crosspresentation by bone marrow-derived stromal cells." Immunity **17**(6): 737-47.

Spiotto, M.T. and H. Schreiber (2005). "Rapid destruction of the tumor microenvironment by CTLs recognizing cancer-specific antigens cross-presented by stromal cells." Cancer Immun **5**: 8.

Squier, M.K. and J.J. Cohen (1994). "Cell-mediated cytotoxic mechanisms." Curr Opin Immunol **6**(3): 447-52.

Srinivasan, M., S.Z. Domanico, P.T. Kaumaya and S.K. Pierce (1993). "Peptides of 23 residues or greater are required to stimulate a high affinity class II-restricted T cell response." Eur J Immunol **23**(5): 1011-6.

Srivastava, P. (2002). "Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity." Nat Rev Immunol **2**(3): 185-94.

Steimle, V., C.A. Siegrist, A. Mottet, B. Lisowska-Grospierre and B. Mach (1994). "Regulation of MHC class II expression by interferon- $\gamma$  mediated by the transactivator gene CIITA." Science **265**(5168): 106-9.

Stein, M., A. Kuten, J. Halpern, N.M. Coachman, Y. Cohen and E. Robinson (1992). "The value of postoperative irradiation in renal cell cancer." Radiother Oncol **24**(1): 41-4.

Steinman, R.M. and M.C. Nussenzweig (2002). "Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance." Proc Natl Acad Sci USA **99**(1): 351-8.

Steinman, R.M., D. Hawiger, K. Liu, L. Bonifaz, D. Bonnyay, K. Mahnke, T. Iyoda, J. Ravetch, M. Dhodapkar, K. Inaba and M. Nussenzweig (2003). "Dendritic cell function in vivo during the steady state: a role in peripheral tolerance." Ann NY Acad Sci **987**: 15-25.

Stern, L.J. and D.C. Wiley (1994). "Antigenic peptide binding by class I and class II histocompatibility proteins." Structure **2**(4): 245-51.

Stevanovic, S. and H.G. Rammensee (1994). "Identification of T-cell epitopes using allele-specific ligand motifs." Behring Inst Mitt (95): 7-13.

Stevanovic, S. (2002). "Identification of tumour-associated T-cell epitopes for vaccine development." Nat Rev Cancer **2**(7): 514-20.

Steven, N.M., N.E. Annels, A. Kumar, A.M. Leese, M.G. Kurilla and A.B. Rickinson (1997). "Immediate early and early lytic cycle proteins are frequent targets of the Epstein-Barr virus-induced cytotoxic T cell response." J Exp Med **185**(9): 1605-17.

Stockinger, B. (1999). "T lymphocyte tolerance: from thymic deletion to peripheral control mechanisms." Adv Immunol **71**: 229-65.

Stutman, O. (1975). "Immunodepression and malignancy." Adv Cancer Res **22**: 261-422.

Sutmuller, R.P., L.M. van Duivenvoorde, A. van Elsas, T.N. Schumacher, M.E. Wildenberg, J.P. Allison, R.E. Toes, R. Offringa and C.J. Melief (2001). "Synergism of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and depletion of CD25(+) regulatory T cells in antitumor therapy reveals alternative pathways for suppression of autoreactive cytotoxic T lymphocyte responses." J Exp Med **194**(6): 823-32.

Sweeney, J.P., J.A. Thornhill, R. Graiger, T.E. McDermott and M.R. Butler (1996). "Incidentally detected renal cell carcinoma: pathological features, survival trends and implications for treatment." Br J Urol **78**(3): 351-3.

SYFPEITHI. <http://www.uni-tuebingen.de/uni/kxi/>. 1991.

Tada, T., S. Ohzeki, K. Utsumi, H. Takiuchi, M. Muramatsu, X.F. Li, J. Shimizu, H. Fujiwara and T. Hamaoka (1991). "Transforming growth factor-beta-induced inhibition of T cell function. Susceptibility difference in T cells of various phenotypes and functions and its relevance to immunosuppression in the tumor-bearing state." J Immunol **146**(3): 1077-82.

Talmud, P.J., S. Martin, M.R. Taskinen, M.H. Frick, M.S. Nieminen, Y.A. Kesaniemi, A. Pasternack, S.E. Humphries and M. Syvanne (2004). "APOA5 gene variants, lipoprotein particle distribution, and progression of coronary heart disease: results from the LOCAT study." J Lipid Res **45**(4): 750-6.

The MHC sequencing consortium (1999). "Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex." Nature **401**(6756): 921-3.

Thrasher, J.B. and D.F. Paulson (1993). "Prognostic factors in renal cancer." Urol Clin North Am **20**(2): 247-62.

Thoenes, W. and S. Stoerker (1991). "Pathology of benign and malignant renal cell tumors." Urologe A **30**(6): W41-50.

Turner, B., I. Haendle, C. Roder, D. Dieckmann, P. Keikavoussi, H. Jonuleit, A. Bender, C. Maczek, D. Schreiner, P. von den Driesch, E.B. Brocker, R.M. Steinman, A. Enk, E. Kampgen and G. Schuler (1999). "Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces tumor regression of some metastases in advanced stage IV melanoma." J Exp Med **190**(11): 1669-78.

Tomlinson, S. (1993). "Complement defense mechanisms." Curr Opin Immunol **5**(1): 83-9.

Tonegawa, S. (1983). "Somatic generation of antibody diversity." Nature **302**(5909): 575-81.

Tonegawa, S. (1988). "Antibody and T-cell receptors." Jama **259**(12): 1845-7.

Tonegawa, S. (1988 b). "Somatic generation of immune diversity." Biosci Rep **8**(1): 3-26.

Topalian, S.L., D. Solomon and S.A. Rosenberg (1989). "Tumor-specific cytolysis by lymphocytes infiltrating human melanomas." J Immunol **142**(10): 3714-25.

Topalian, S.L. (1994). "MHC class II restricted tumor antigens and the role of CD4+ T cells in cancer immunotherapy." Curr Opin Immunol **6**(5): 741-5.

Touzios, J.G., J.M. Kiely, S.C. Pitt, W.S. Rilling, E.J. Quebbemann, S.D. Wilson and H.A. Pitt (2005). "Neuroendocrine hepatic metastases: does aggressive management improve survival?" Ann Surg **241**(5): 776-83, discussion 783-5.

Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamid gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci USA **76**(9): 4350-4.

Townsend, S.E. and J.P. Allison (1993). "Tumor rejection after direct costimulation of CD8+ T cells by B7-transfected melanoma cells." Science **259**(5093): 368-70.

Townsend, S.E., F.W. Su, J.M. Atherton and J.P. Allison (1994). "Specificity and longevity of antitumor immune responses induced by B7-transfected tumors." Cancer Res **54**(24): 6477-83.

Treves, A.J., T. Tal, V. Barak and Z. Fuks (1981). "Antigen presentation and regulatory functions of human monocytes in the in vitro response of lymphocytes against purified protein derivate of tuberculin (PDD)." Eur J Immunol **11**(6): 487-92.

Tsan, M.F. and B. Gao (2004). "Cytokine function of heat shock proteins." Am J Physiol Cell Physiol **286**(4): C739-44.

Tsang, K.Y., S. Zaremba, C.A. Nieroda, M.Z. Zhu, J.M. Hamilton and J. Schlom (1995). "Generation of human cytotoxic T cell specific for human carcinomembryonic antigen epitopes from patients immunized with recombinant vaccinia-CEA vaccine." J Natl Cancer Inst **87**(13): 982-90.

Tuting, T., C.C. Wilson, D.M. Martin, Y.L. Kasamon, J. Rowles, D.I. Ma, C.L. Slingluff Jr., S.N. Wagner, P. van der Bruggen, J. Baar, M.T. Lotze and W.J. Storkus (1998). "Autologous human monocyte-derived dendritic cells genetically modified to express melanoma antigens elicit primary cytotoxic T cell responses in vitro: enhancement by cotransfection of genes encoding the Th1-biasing cytokines IL-12 and IFN-alpha." J Immunol **160**(3): 1139-47.

Udelsman, R., M.J. Blake and N.J. Holbrook (1991). "Molecular response to surgical stress: specific and simultaneous heat shock protein induction in the adrenal cortex, aorta, and vena cava." Surgery **110**(6): 1125-31.

Udono, H., D.L. Levey and P.K. Srivastava (1994). "Cellular requirements for tumor-specific immunity elicited by heat shock proteins: tumor rejection antigen gp96 primes CD8+ T cells in vivo." Proc Natl Acad Sci USA **91**(8): 3077-81.

Van Baren, N., M.C. Bonnet, B. Dreno, A. Khammari, T. Dorval, S. Piperno-Neumann, D. Lienard, D. Speiser, M. Marchand, V.G. Brichard, B. Escudier, S. Negrier, P.Y. Dietrich, D. Maraninchi, S. Osanto, R.G. Meyer, G. Ritter, P. Moingeon, J. Tartaglia, P. van der Bruggen, P.G. Coulie and T. Boon (2005). "Tumoral and immunologic response after vaccination of melanoma patients with an ALVAC virus encoding MAGE antigens recognized by T cells." J Clin Oncol [Epub ahead of print].

Van der Bruggen, P., C. Traversari, P. Chomez, C. Lurquin, E. de Plaen, B. van den Eynde, A. Knut and T. Boon (1991). "A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes an a human melanoma." Science **254**(5038): 1643-7.

Van der Vliet, H.N., M.G. Sammels, A.C. Leegwater, J.H. Levels, P.H. Reitsma, W. Boers and R.A. Chamuleau (2001). "Apolipoprotein A-V: a novel

apolipoprotein associated with an early phase of liver regeneration." J Biol Chem **276**(48): 44512-20.

Van Eden, W., J.E. Thole, R. van der Zee, A. Noordzij, J.D. van Embden, E.J. Hensen and I.R. Cohen (1988). "Cloning of the mycobacterial epitope recognized by T lymphocytes in adjuvant arthritis." Nature **331**(6152): 171-3.

Van Eden, W., R. van der Zee and B. Prakken (2005). "Heat-shock proteins induce T-cell regulation of chronic inflammation." Nat Rev Immunol **5**(4): 318-30.

Van Elsas, A., R.P. Suttmuller, A.A. Hurwitz, J. Ziskin, J. Villasenor, J.P. Medema, W.W. Overwijk, N.P. Restifo, C.J. Melief, R. Offringa and J.P. Allison (2001). "Elucidating the autoimmune and antitumor effector mechanisms of a treatment based on cytotoxic T lymphocyte antigen-4 blockade in combination with an B16 melanoma vaccine: comparison of prophylaxis and therapy." J Exp Med **194**(4): 481-9.

Van Houwelingen, K.P., B.A. van Dijk, C.A. Hulsbergen-van de Kaa, L.J. Schouten, H.J. Gorissen, J.A. Schalken, P.A. van den Brandt and E. Oosterwijk (2005). "Prevalence of von Hippel-Lindau gene mutations in sporadic renal cell carcinoma: results from The Netherlands cohort study." BMC Cancer **5**(1): 57.

Vandesompele, J., K. de Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. van Roy, A. de Paepe and F. Speleman (2002). "Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes." Genome Biol **3**(7): RESEARCH0034.

Vasir, B., D. Avigan, Z. Wu, K. Crawford, S. Turnquist, J. Ren and D. Kufe (2005). "Dendritic cells induce MUC1 expression and polarization on human T cells by an IL-7-dependent mechanism." J Immunol **174**(4): 2376-86.

Vissers, J.L., I.J. de Vries, M.W. Schreurs, L.P. Engelen, E. Oosterwijk, C.G. Figdor and G.J. Adema (1999). "The renal cell carcinoma-associated antigen G250 encodes a human leukocyte antigen (HLA)-A2.1-restricted epitope recognized by T lymphocytes." Cancer Res **59**(21): 5554-9.

Vonderheide, R.H., W.C. Hahn, J.L. Schultze and L.M. Nadler (1999). "The telomerase catalytic subunit is a widely expressed tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes." Immunity **10**(6): 673-9.

Vonderheide, R.H. and C.H. June (2003). "A translational bridge to cancer immunotherapy: exploiting costimulation and target antigens for active and passive T cell immunotherapy." Immunol Res **27**(2-3): 341-56.

Wagner, J.S., M.A. Adson, J.A. van Heerden, M.H. Adson and D.M. Ilstrup (1984). "The natural history of hepatic metastases from colorectal cancer. A comparison with resective treatment." Ann Surg **199**(5): 502-8.

Wallace, S., C. Charnsangavej, C.H. Carrasco and W. Bechtel (1984). "Infusion-embolization." Cancer **54**(11 Suppl): 2751-65.

Walter, S., G. Bioley, H.J. Buhring, S. Koch, D. Wernet, A. Zippelius, G. Pawelec, P. Romero, S. Stevanovic, H.G. Rammensee and C. Gouttefangeas (2005). "High frequencies of functionally impaired cytokeratin 18-specific CD8<sup>+</sup> T cells in healthy HLA-A2<sup>+</sup> donors." Eur J Immunol **35**(10): 2876-85.

Wang, S.M., J.D. Khandekar, K.L. Kaul, D.J. Winchester and R.I. Morimoto (1999). "A method for the quantitative analysis of human heat shock gene expression using a multiplex RT-PCR assay." Cell Stress Chaperones **4**(3): 153-61.

Wang, B., H. Fujisawa, L. Zhuang, I. Freed, B.G. Howell, S. Shahid, G.M. Shivji, T.W. Mak and D.N. Sauder (2000). "CD4<sup>+</sup> Th1 and CD8<sup>+</sup> type 1 cytotoxic T cells both play a crucial role in the full development of contact hypersensitivity." J Immunol **165**(12): 6783-90.

Wang, R.F. (2001). "The role of MHC class II-restricted tumor antigens and CD4<sup>+</sup> T cells in antitumor immunity." Trends Immunol **22**(5): 269-76.

Wang, C.L. and M. Wabl (2005). "Hypermutation rate normalized by chronological time." J Immunol **174**(9): 5650-4.

Warren, E.H., B.E. Otterud, R.W. Linterman, A.G. Brickner, V.H. Engelhard, M.F. Leppert, P.J. Martin and S.R. Riddell (2002). "Feasibility of using genetic linkage analysis to identify the genes encoding T cell-defined minor histocompatibility antigens." Tissue Antigens **59**(4): 293-303.

Wechsel, H.W., G. Becker, K.H. Bichler, C. Bokemeyer, G. Feil, R.D. Kortmann, W. Loeser, C. Pfannenbergl, H. Pressler and M. Sötkler (2000). "Nierenzellkarzinom – Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge." Tuebingen; Interdisziplinäres Tumorzentrum.

Wedgwood, J.F., L. Hatam and V.R. Bonagura (1988). "Effect of interferon-gamma and tumor necrosis factor on the expression of class I and II major histocompatibility molecules by cultured human umbilical vein endothelial cells." Cell Immunol **111**(1): 1-9.

Weekes, M.P., M.R. Wills, K. Mynard, A.J. Carmichael and J.G. Sissons (1999). "The memory cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to human cytomegalovirus infection contains individual peptide-specific CTL clones that have undergone extensive expansion in vivo." J Virol **73**(3): 2099-108.

Weiner, G.J., H.M. Liu, J.E. Wooldridge, C.E. Dahle and A.M. Krieg (1997). "Immunostimulatory oligodesoxynucleotides containing the CpG motif are

effective as immune adjuvants in tumor antigen immunization." Proc Natl Acad Sci USA **94**(20): 10833-7.

Weinschenk, T., C. Gouttefangeas, M. Schirle, F. Obermayr, S. Walter, O. Schoor, R. Kurek, W. Loeser, K.H. Bichler, D. Wernet, S. Stevanovic and H.G. Rammensee (2002). "Integrated functional genomics approach for the design of patient-individual antitumor vaccines." Cancer Res **62**(20): 5818-27.

Whelan, J.A., P.R. Dunbar, D.A. Price, M.A. Purbhoo, F. Lechner, G.S. Ogg, G. Griffiths, R.E. Phillips, V. Cerundolo and A.K. Sewell (1999). "Specificity of CTL interactions with peptide-MHC class I tetrameric complexes is temperature dependent." J Immunol **163**(8): 4342-8.

Wierecky, J., M. Mueller and P. Brossart (2005). "Dendritic cell-based cancer immunotherapy targeting MUC-1." Cancer Immunol Immunother **28**: [Epub ahead of print].

Wills, M.R., A.J. Carmichael, K. Mynard, X. Jin, M.P. Weekes, B. Plachter and J.G. Sissons (1996). "The human cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to cytomegalovirus is dominated by structural protein pp65: frequency, specificity, and T-cell receptor usage of pp65-specific CTL." J Virol **70**(11): 7569-79.

Wissniowski, T.T., J. Hansler, D. Neureiter, M. Frieser, S. Schaber, B. Esslinger, R. Voll, D. Strobel, E.G. Hahn and D. Schuppan (2003). "Activation of tumor-specific T lymphocytes by radio-frequency ablation of the VX2 hepatoma in rabbits." Cancer Res **63**(19): 6496-500.

Wu, H., P.D. Kwong and W.A. Hendrickson (1997). "Dimeric association and segmental variability in the structure of human CD4." Nature **387**(6632): 527-30.

Wu, J., V. Groh and T. Spies (2002). "T cell antigen receptor engagement and specificity in the recognition of stress-inducible MHC class I-related chains by human epithelial gamma delta T cells." J Immunol **169**(3): 1236-40.

Wu, Y., T. Wan, X. Zhou, B. Wang, F. Yang, N. Li, G. Chen, S. Dai, S. Liu, M. Zhang and X. Cao (2005). "Hsp70-like protein 1 fusion protein enhances induction of carcinoembryonic antigen-specific CD8+ CTL response by dendritic cell vaccine." Cancer Res **65**(11): 4947-54.

Wunderlich, H., S. Schumann, V. Jantitzky, P. Moravek, M. Podhola, H. Kosmehl and J. Schubert (1998). "Increase of renal cell carcinoma incidence in central Europe." Eur Urol **33**(6): 538-41.

Xu, Q., H. Dietrich, H.J. Steiner, A.M. Gown, B. Schoel, G. Mikuz, S.H. Kaufmann and G. Wick (1992). "Induction of arteriosclerosis in normocholesterolemic rabbits by immunization with heat shock protein 65." Arterioscler Thromb **12**(7): 789-99.

Yang, W.L., D.G. Nair, R. Makizumi, G. Gallos, X. Ye, R.R. Sharma and T.S. Ravikumar (2004). "Heat shock protein 70 is induced in mouse human colon tumor xenografts after sublethal radiofrequency ablation." Ann Surg Oncol **11**(4): 399-406.

Yates, J.W., B. Chalmer and F.P. McKegney (1980). "Evaluation of patients with advanced cancer using the Karnofsky performance status." Cancer **45**(8): 2220-4.

Yee, C., J.A. Thompson, P. Roche, D.R. Byrd, P.P. Lee, M. Piepkorn, K. Kenyon, M.M. Davis, S.R. Riddell and P.D. Greenberg (2000). "Melanocyte destruction after antigen-specific immunotherapy of melanoma: direct evidence of t cell-mediated vitiligo." J Exp Med **192**(11): 1637-44.

Young, J.C., V.R. Agashe, K. Siegers and F.U. Hartl (2004). "Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(10): 781-91.

Yu, P., Y. Lee, W. Liu, R.K. Chin, J. Wang, Y. Wang, A. Schietinger, M. Philip, H. Schreiber and Y.X. Fu (2004). "Priming of naive T cells inside tumors leads to eradication of established tumors." Nat Immunol **5**(2): 141-9.

Zabel, U., M. Weeger, M. La and H.H. Schmidt (1998). "Human soluble guanylate cyclase: functional expression and revised isoenzyme family." Biochem J **335**(Pt 1): 51-7.

Zimmermann, K. and J.W. Mannhalter (1996). "Technical aspects of quantitative competitive PCR." Biotechniques **21**(2): 268-72, 274-9.

Zinkernagel, R.M. and P.C. Doherty (1974). "Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system." Nature **248**(450): 701-2.

## 10. Veröffentlichungen

Poster und Vortrag: European Congress of Radiology, Wien März 2005

### **Radiofrequency ablation may activate the immune system and induce specific anti-tumoral immune responses in cancer patients**

Sebastian Haen<sup>1</sup>, Cécile Gouttefangeas<sup>1</sup>, Andreas Boss<sup>2</sup>, Stephan Clasen<sup>2</sup>, Diethard Schmidt<sup>2</sup>, Markus Kuczyk<sup>3</sup>, Arnulf Stenzl<sup>3</sup>, Hansjörg Schild<sup>4</sup>, Philippe L. Pereira<sup>2</sup>, Hans-Georg Rammensee<sup>1</sup>

- <sup>1</sup> Institute for Cell Biology, Department of Immunology, Eberhard-Karls-University, Auf der Morgenstelle 15, D-72076 Tübingen, Germany
- <sup>2</sup> Clinic for Radiology, Eberhard-Karls-University Tübingen, Hoppe-Seyler-Str. 3, D-72076 Tübingen
- <sup>3</sup> Clinic for Urology, Eberhard-Karls-University Tübingen, Hoppe-Seyler-Str. 3, D-72076 Tübingen
- <sup>4</sup> Institute for Immunology, Johannes-Gutenberg-University Mainz, Obere Zahlbacherstr. 67, D-55131 Mainz, Germany

**Purpose:** Percutaneous radiofrequency (RF) ablation causes local coagulation necrosis of tumoral tissues. This could lead to the release of heat shock proteins (HSPs) and to the subsequent activation of an anti-tumoral immune response. Our purpose was to determine if an increased level of HSP70 was measurable in the blood of patients after RF ablation and if CD8<sup>+</sup> T cells specific for tumor-associated antigens could then be detected.

**Methods and Materials:** 20 patients treated with RF ablation for liver metastasis (colorectal or breast carcinomas) or for primary carcinomas of the liver or the kidney were prospectively included in the study. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and serum were isolated from blood samples obtained at predefined time-points before and after RF ablation. We measured serum levels of HSP70 by specific ELISA. PBMCs of HLA-A2<sup>+</sup> patients were stimulated with HLA class I-binding peptides derived from tumor antigens known to be expressed by most of the tumors. Specific IFN $\gamma$  production was subsequently measured by real time RT-PCR.

**Results:** Preliminary results show a transient increase in HSP70 serum levels in several patients one day after RF ablation. Moreover, induction of tumor-antigen specific CD8<sup>+</sup> T lymphocytes was detected at the earliest 3 months after treatment.

**Conclusion:** Production of HSP70 and increase in the activity of antigen-specific CD8<sup>+</sup> T lymphocytes was observed in some patients after RF ablation. Thus, activation of the immune system might represent another beneficial effect of RF-ablation in addition to the local destruction of metastasis or primary carcinomas.

Veröffentlicht in European Radiology [Haen et al. 2005].

# 11. Abkürzungen

Die Abkürzungen für Aminosäuren und Peptide entsprechen den von der IUPAC-, IUB-Kommission für biochemische Nomenklatur herausgegebenen Regeln:

IUPAC-IUB Commission 1966

IUPAC-IUB Commission 1972

IUPAC-IUB Joint Commission 1983

Ab	Antibody
Abb.	Abbildung
ADCC	Antibody Dependent Cell mediated Cytotoxicity
ADFP	Adipose Differentiation-Related Protein
AG	Arbeitsgruppe
Amp.	Ampulle
APC	Allophycocyanin
APC	Antigen Presenting Cell
Apol	Apolipoprotein
APS	Ammoniumpersulfat
BAGE	B melanoma Antigen
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat-Toluidin
BD	Beckton Dickinson
BiP	Binding Protein
BRC	Breast Carcinoma
BSA	Bovine Serum Albumine
bzw.	beziehungsweise
CD	Cluster of Differentiation
CDH	Cadherin
CDK	Cell Division protein Kinase
CEA	Carcinoembryonales Antigen
cDNA	complementary Desoxyribonucleic Acid
CDR	Complementarity-Determining Regions

CMV	Cytomegalovirus
CO	Control
CRC	Colorectal Carcinoma
C <sub>T</sub>	Threshold Cycle
CT	Computertomographie
CTL	Cytotoxic T Lymphocyte
CTLA	Cytotoxic T Lymphocyte Associated Protein
d	Day
DC	Dendritic Cell
DEPC	Diethylpyrokarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic Acid
dsRNA	Double Stranded Ribonucleic Acid
DTT	Dithiothreitol
EBNA	Epstein Barr Virus Nuclear Antigen
EBV	Epstein Barr Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EEF	Eukaryotic Elongation Factor
EGFR	Endothelial Growth Factor Receptor
eIF	Eukaryotic Translation Initiation Factor
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
ELISPOT	Enzyme Linked ImmunoSpot assay
ER	Endoplasmatisches Reticulum
et al.	und andere (lat. et alii)
FACL	Fatty Acid CoA Ligase
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FAM	6-carboxy-Fluorescein
FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FMO	Flavin containing Monooxygenase
FSC	Forward Scatter
FU	Fluorouracil

GAGE	G Melanoma Associated Antigen
GAM	Goat anti Mouse
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
G-CSF	Granulocyte Colony Stimulating Factor
GGA	Geranylgeranylacetone
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
griech.	Griechisch
Gp96	Glycoprotein 96
GRP	Glucosa Related Protein
GUCY	Guanylatcyclase
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCC	Hepatocellular Carcinoma
HCMV	Human Cytomegalovirus
HCV	Hepatitis-C-Virus
HD	Healthy Donor
HE	Haematoxylin und Eosin
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HIF	Hypoxia Inducible Factor
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HLA	Human Leukocyte Antigen
HSP	Heat Shock Protein
HSV	Herpes Simplex Virus
HTLV	Human T cell Leukemia Virus
Hz	Hertz
IBP	Insulin-like growth factor Binding Protein
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
Inf	Influenza
ITAM	Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif

IUB	International Union of Biochemistry
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
i.v.	intravenous
KG	Körpergewicht
KHK	Koronore Herzkrankheit
lat.	lateinisch
LB	Liver Biopsy
LBP	Lipopolysaccharid-Binding Protein
Lck	Lymphocyte-specific protein tyrosine Kinase
LDL	Low Density Lipoprotein
LFA	Leukocyte Function-Associated Antigen
LMP	Latent Membrane Protein
LOX	Lectin-type Oxidized LDL Receptor
LPS	Lipopolysaccharid
MAGE	Melanoma Associated Antigen
MART	Melanoma Antigen Recognized by T cells
MEM-NEAA	Minimal Essential Medium – Non Essential Amino Acids
MHC	Major Histocompatibility Complex
mHSP	Mitochondrial Heat Shock Protein
MICA	MHC complex class I Chain-related A gene
MMP	Matrix Metalloproteinase
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
MRT	Magnetresonanztomographie
MUC	Mucin
MUM	Melanoma Associated Antigen (Mutated)
MW	Molecular Weight
NBT	Nitroblautetrazolium
NHL	Non Hodgkin Lymphom
NK(C)	Natural Killer (Cells)
NKG	Natural Killer Group
NKT	NK1-T-Zellen
NS	Non Structural Protein

NSAP	NS Associated Protein
NSD	Nebenschilddrüse
n.t.	not tested
NY-BR	New York Breast
NY-ESO	New York Esophageal
NY-REN	New York Renal
NZK	Nierenzellkarzinom
PADRE	Pan HLA-DR Binding Epitope
PAGE	Polyacrylamid Gel Electrophoresis
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PE	Phycoerythrin
PEI	Percutaneous Ethanol Installation
Pen-Strep	Penicillin-Streptomycin
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
pH	Potentia Hydrogenii
PHA	Phytohemagglutinin
PKR	Protein Kinase Receptor
PMA	Parametoxamphetamin
PRAME	Preferentially expressed Antigen in Melanoma
PRR	Pattern Recognition Receptor
RAGE	Renal Tumor Antigen
Rb	Retinoblastoma
RCC	Renal Cell Carcinoma
Res.	Restriktion
RF	Radiofrequency
RFA	Radiofrequency Ablation
RGS	Regulator of G-protein Signalling
RNA	Ribonucleic Acid
RPMI	Roosevelt Park Madison Institute
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction

SADA	Serum Antibody Detection Assay
s.c.	subcutan
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SMAC	Supramolecular Activation Cluster
SSC	Side Scatter
Tab.	Tabelle
TAMRA	6-carboxy-tetramethylrhodamin
TCR	T Cell Receptor
TEMED	N,N'-Tetramethyldiamin
TGF	Transforming Growth Factor
Th.	Therapie
TILs	Tumor Infiltrating Lymphocytes
TLR	Toll Like Receptor
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzin
TNF	Tumor Necrosis Factor
TNFSF	Tumor Necrosis Factor Super Family
Tris	Tris[hydroxymethyl]aminomethan
U/min	Umdrehungen pro Minute
US	Ultrasound, bzw. Ultraschall
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
Z.n.	Zustand nach

## Anhang

### Chemotherapie-Protokolle (Berger et al., EcoMed, Landsberg, Germany 2002):

#### FOLFIRI (Andre et al. 1999):

Indikation: Colonicarcinom

Tag	Substanz	Dosierung	Trägerlösung	Appl.	Infusionsdauer	Bemerkungen
1, 15	Irinotecan	180 mg/m <sup>2</sup>		i.v.	2 h	
1, 15	Calciumfolinat	400 mg/m <sup>2</sup>	100 ml NaCl 0,9%	i.v.	30 min	
1, 15	Fluorouracil	400 mg/m <sup>2</sup>		i.v.	Bolus	
1,2; 15-16	Fluorouracil	2400-3000 mg/m <sup>2</sup>		i.v.	48 h	

#### Obligate Prä- und Begleitmedikation

Tag	Zeitl. Ablauf	Substanz	Einzelosis	Trägerlösung	Appl.	Infusionsdauer
1, 15	15' vor Chemotherapie	NaCl 0,9%		1000 ml	i.v.	3 h 15 min.
1, 15	15' vor Chemotherapie	Dexamethason	8 mg	50 ml	i.v.	10 min.
1, 15	15' vor Chemotherapie	Tropisetron	5 mg		i.v.	Bolus

Bedarfsmedikation: Imodium

Kontrollen: Bilirubin, Leberwerte, Kreatinin-Clearance, Differential-Blutbild, Gerinnungsstatus

Dosisreduktion: wenn Neutrophile < 500/μl oder Neutrophile < 1000/μl + Fieber, dann 20% Reduktion

Dosissteigerung: Bei guter Verträglichkeit in Zyklus 1 und 2 5-FU-Dosis Erhöhung.

Wiederholung: d 29

Erfolgsbeurteilung: alle 8 Wochen

FOLFOX (Maindrault-Goebel et al. 1999):

Indikation: Colonicarcinom

Tag	Substanz	Dosierung	Trägerlösung	Appl.	Infusionsdauer	Bemerkungen
1, 15	Oxaliplatin	100 mg/m <sup>2</sup>		i.v.	2 h	
1, 15	Calciumfolinat	400 mg/m <sup>2</sup>	100 ml NaCl 0,9%	i.v.	30 min	
1, 15	Fluorouracil	400 mg/m <sup>2</sup>		i.v.	Bolus	
1,2; 15-16	Fluorouracil	2400-3000 mg/m <sup>2</sup>		i.v.	48 h	

Obligate Prä- und Begleitmedikation

Tag	Zeitl. Ablauf	Substanz	Einzelosis	Trägerlösung	Appl.	Infusionsdauer
1, 15	15' vor Chemotherapie	Glucose 5%		1000 ml	i.v.	3 h 15 min.
1, 15	15' vor Chemotherapie	Dexamethason	8 mg	50 ml	i.v.	10 min.
1, 15	15' vor Chemotherapie	Tropisetron	5 mg		i.v.	Bolus

Kontrollen: Blutbild, Elektrolyte, Leberwerte, Retentionswerte, Haptoglobin

Dosisreduktion: Dosisreduktion 5-FU um 25% bei Mucositis > Grad 2; bei Bilirubin > 5 mg/dl 5-FU meiden.

Dosissteigerung: Bei guter Verträglichkeit in Zyklus 1 und 2 Dosissteigerung von 5-FU

Wiederholung: d 29

Erfolgsbeurteilung: alle 8 Wochen

VIC (Fields et al. 1996):

Indikation: Hochdosis-Chemotherapie

Tag	Substanz	Dosierung	Trägerlösung	Appl.	Infusionsdauer	Bemerkungen
-4 bis -2	Etoposidphosphat	500 mg/m <sup>2</sup>	500 ml NaCl 0,9%	i.v.	30 min.	Menge entsprechend Etoposidanteil
-4 bis -2	Carboplatin	500 mg/m <sup>2</sup>	500 ml Glc 5%	i.v.	18 h	parallel zu Ifosfamid
-4 bis -2	Ifosfamid	4000 mg/m <sup>2</sup>	500 ml NaCl 0,9%	i.v.	18 h	
-1	Therapiepause mind. 24 Stunden					
0	periphere Stammzelltransplantation					

Obligate Prä- und Begleitmedikation

Tag	Zeitl. Ablauf	Substanz	Einzelosis	Trägerlösung	Appl.	Infusionsdauer
-5	Vorbewässerung	NaCl 0,9%		1000 ml	i.v.	12 h
-4 bis +4	kontinuierlich	NaCl 0,9%		3000 ml	i.v.	24 h
-4 bis -2	vor und nach Chemotherapie	Magnesium Mg <sup>2+</sup>	6,3 mval/Amp.	2 Amp./Tag in NaCl 0,9%	i.v.	in Bewässerung
-4 bis -2	15' vor und 8 h nach Chemo	Ondansetron	8 mg		i.v.	Bolus
-4 bis -2	15' vor, 4 h und 8 h nach Chemo	Dexamethason	8 mg	100 ml NaCl 0,9%	i.v.	15 min.
-4 bis -1	parallel zu Ifosfamid	Mesna	4000 mg/m <sup>2</sup>		i.v.	25 h
ab d -4	kontinuierlich	Heparin	15 000 IE		i.v.	24 h
-4 bis -1	kontinuierlich	Natriumbicarbonat	100 mval		i.v.	24 h
-4 bis +2	kontinuierlich	Dopamin	200 mg		i.v.	24 h
ab d +7	morgens	G-CSF	5 µg/kg KG		s.c.	

Bedarfsmedikation: Metoclopramid, Famotidin, Lynestrenol, Sucralfat

Kontrollen: Blutbild, Elektrolyte (besonders Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>), Leberwerte, Retentionswerte, Kreatinin-Clearance, Flüssigkeitsbilanz, Oto-/Neurotoxizität

Dosisreduktion: bei Niereninsuffizienz: Carboplatin-Reduktion; bei Nieren- und Leberstörungen: Ifosfamid-Reduktion

# Danksagungen

Ich möchte mich bedanken bei

- Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee für die Möglichkeit in seiner Abteilung zu arbeiten, für sein offenes Ohr bei allen Problemen und seine Bereitschaft, immer da zu sein, wenn man ihn brauchte.
- Dr. Cécile Gouttefangeas für die beste Betreuung, die man sich wünschen kann, und eine sehr angenehme Zusammenarbeit.
- Prof. Dr. Stefan Stevanović für seine Hilfe in allen Situation und seine Vorarbeit, ohne die meine Arbeit nicht möglich gewesen wäre.



In der Abteilung für Immunologie: Sebastian Attig, Heinrich Griesemann, Dr. Lugder Grosse-Hovest, Patricia Hrstić, Prof. Dr. Gundram Jung, Dr. Steve Pascolo, Jochen Probst, Dr. Oliver Schoor, Dr. Steffen Walter



In der Universitätsklinik für Radiologie: Prof. Dr. Philippe Pereira, Dr. Andreas Boss, Dr. Stephan Clasen, Dr. Diethard Schmidt



In der Universitätsklinik für Urologie: Jörg Hennenlotter, Prof. Dr. Markus Kuczyk, Prof. Dr. Arnulf Stenzl



In der Universitätsklinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie: Prof. Dr. Alfred Königsrainer, Dr. Jasmin Dittmann



In der Universitätsklinik für Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie: Prof. Dr. Hermann Aebert, Dr. Bora Kosan



In der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen: PD Dr. Peter Brossart, PD Dr. Alexandra von Herbay



Im Institut für Immunologie der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz:  
Dipl. Biol. Sylvia Herter, Prof. Dr. Hansjörg Schild

Und unseren Kooperationspartnern: Dr. Sergej A. Nedospasov (Moskau), Dr. Dirk Jäger (Zürich, Heidelberg), Dr. Michael T. Lotze (Pittsburgh)

Der ganzen Mannschaft im Labor für eine sehr angenehme und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und für die Bereitschaft zu helfen, wenn man Hilfe brauchte.

Meinen Freunden Dr. Iris Gehb, Christoph Hetz und Anne Pröhmer.

Meinen Eltern für Ihre jahrelange Unterstützung, ohne die dies alles nicht möglich gewesen wäre.

# Lebenslauf

Name: Sebastian Carsten Peter Haen  
Geburtsdatum: 1. September 1979 in Ulm  
Familienstand: ledig  
Eltern: Dr. med. Susanne Haen, geb. Mackensen  
Ärztin für Pathologie  
Dr. med. Michael Haen  
Arzt für Innere Medizin, Schwerpunkt Hämatologie  
und Onkologie, Nuklearmedizin

Anschrift: Brombergstraße 15  
72070 Tübingen  
Tel.: +49 – (0)7071 – 62683  
sebastian\_haen@hotmail.com

1986 – 1990 Besuch der Grundschule Winkelwiese Waldhäuser  
Ost Tübingen

1990 – 1999 Besuch des Uhlandgymnasiums Tübingen  
Allgemeine Hochschulreife 1999  
Leistungsfächer: Latein und Mathematik  
Sprachenfolge: Latein – Englisch – Griechisch

1999 – 2000 Zivildienst am Universitätsklinikum Tübingen,  
Abteilung für Nuklearmedizin (Ärztlicher Direktor:  
Prof. Dr. Roland Bares)

2000 – 2001 Studium der Humanmedizin an der Freien Universität  
Berlin

2001 – 2007 Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-  
Universität Tübingen

2002 Physikum

2003 1. Staatsexamen

2006 2. Staatsexamen

2006 – 2007 Praktisches Jahr

Tertial Chirurgie: Klinik für Allgemeine, Viszeral- und Transplantationschirurgie (Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Alfred Königsrainer), Klinik für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie (Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Dr. Gerhard Ziemer)

Tertial Ophthalmologie: Manhattan Eye, Ear and Throat Hospital, New York, New York, USA (Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Lawrence Yannuzzi).

Tertial Innere Medizin: Universitätsspital Zürich, Departement für Innere Medizin, Klinik für Onkologie (Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Alexander Knuth)

18.05 2007

3. Staatsexamen