

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

**Identifikation MHC- I- gebundener Liganden  
tumorassoziierter Antigene  
zur Optimierung einer  
individualisierten Vakzinierungstherapie des  
Nierenzellkarzinoms und kolorektalen Karzinoms**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
Maik Häntschel  
aus  
Nürtingen  
2011

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

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

2. Berichterstatter: Professor Dr. H. R. Salih

Meinen Eltern

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>XVIII</b>
<b>Proteinogene Aminosäuren</b> .....	<b>XXIV</b>
<b>I. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>I.1. Aufbau und Aufgaben des Immunsystems</b> .....	<b>1</b>
<b>I.1.1 Das Immunsystem als Rettung</b>	
- schon immer, immer noch und immer mehr ?! .....	1
<b>I.1.2 Bestandteile des Immunsystems</b> .....	<b>5</b>
<b>I.1.2.1 Zellen des Immunsystems</b> .....	<b>5</b>
<b>I.1.2.2 Organe des Immunsystems</b> .....	<b>7</b>
<b>I.1.2.2.1 Primäre lymphatische Organe</b> .....	<b>7</b>
<b>I.1.2.2.2 Sekundäre lymphatische Organe</b> .....	<b>7</b>
<b>I.1.3 Mechanismen des Immunsystems</b> .....	<b>8</b>
<b>I.1.3.1 Unspezifische Immunabwehr</b> .....	<b>8</b>
<b>I.1.3.1.1 Komplementsystem</b> .....	<b>8</b>
<b>I.1.3.1.2 System der mononukleären Phagozyten</b> .....	<b>9</b>
<b>I.1.3.2 Spezifische Immunabwehr</b> .....	<b>9</b>
<b>I.1.3.2.1 Antikörper</b> .....	<b>10</b>
<b>I.1.3.2.1.1 Aufbau und Klassifikation</b> .....	<b>10</b>
<b>I.1.3.2.1.2 Monoklonale Antikörper</b> .....	<b>11</b>
<b>I.1.3.2.1.3 Polyklonale Antikörper</b> .....	<b>12</b>
<b>I.1.3.2.1.4 Antikörperklassen und deren Aufgaben</b> .....	<b>12</b>
<b>I.1.3.2.2 T- Lymphozyten</b> .....	<b>13</b>
<b>I.2. Der Haupt- Histokompatibilitäts- Komplex</b> .....	<b>13</b>
<b>I.2.1 Geschichte und Überblick</b> .....	<b>13</b>
<b>I.2.2 Aufbau des MHC- Komplexes</b> .....	<b>14</b>



<b>I.6.</b>	<b>Epitopvorhersage .....</b>	<b>32</b>
<b>I.6.1</b>	<b>Erste Schritte – in Richtung Peptidcharakterisierung .....</b>	<b>32</b>
<b>I.6.2</b>	<b>Die SYFPEITHI- Datenbank .....</b>	<b>32</b>
<b>I.6.3</b>	<b>Anwendungen und Vorteile der Epitopvorhersage .....</b>	<b>33</b>
<b>I.7.</b>	<b>Immunsystem und maligne Erkrankungen .....</b>	<b>34</b>
<b>I.7.1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>34</b>
<b>I.7.2</b>	<b>Therapie maligner Erkrankungen:</b>	
	Etablierte Verfahren versus neue Therapieansätze .....	35
<b>I.7.3</b>	<b>Immunreaktionen zur Tumorbekämpfung .....</b>	<b>36</b>
<b>I.7.4</b>	<b>Immuntherapie .....</b>	<b>36</b>
<b>I.7.4.1</b>	<b>Die Rolle von CTL und DC .....</b>	<b>37</b>
<b>I.7.4.2</b>	<b>Auswahl des Tumorantigens .....</b>	<b>38</b>
<b>I.7.4.3</b>	<b>Erste Erfolge der Vakzinierungstherapie .....</b>	<b>38</b>
<b>I.8.</b>	<b>Karzinome des Verdauungstraktes .....</b>	<b>39</b>
<b>I.8.1</b>	<b>Das kolorektale Karzinom .....</b>	<b>39</b>
<b>I.8.1.1</b>	<b>Definition des kolorektalen Karzinoms .....</b>	<b>39</b>
<b>I.8.1.2</b>	<b>Epidemiologie des kolorektalen Karzinoms .....</b>	<b>39</b>
<b>I.8.1.3</b>	<b>Ätiologie und Pathogenese des kolorektalen Karzinoms .....</b>	<b>39</b>
<b>I.8.1.4</b>	<b>Histologie des kolorektalen Karzinoms .....</b>	<b>41</b>
<b>I.8.1.5</b>	<b>Molekulare Aspekte des kolorektalen Karzinoms .....</b>	<b>42</b>
<b>I.8.1.6</b>	<b>Lokalisation des kolorektalen Karzinoms .....</b>	<b>42</b>
<b>I.8.1.7</b>	<b>Metastasierung des kolorektalen Karzinoms .....</b>	<b>43</b>
<b>I.8.1.8</b>	<b>Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms .....</b>	<b>43</b>
<b>I.8.1.9</b>	<b>Klinik des kolorektalen Karzinoms .....</b>	<b>44</b>
<b>I.8.1.10</b>	<b>Diagnostik des kolorektalen Karzinoms .....</b>	<b>44</b>
<b>I.8.1.11</b>	<b>Therapie des kolorektalen Karzinoms .....</b>	<b>45</b>
<b>I.8.1.12</b>	<b>Prognose des kolorektalen Karzinoms .....</b>	<b>47</b>
<b>I.8.2</b>	<b>Karzinome der Speiseröhre und des Magens .....</b>	<b>47</b>

<b>I.9</b>	<b>Das Nierenzellkarzinom</b>	<b>48</b>
<b>I.9.1</b>	Definition des Nierenzellkarzinoms	48
<b>I.9.2</b>	Epidemiologie des Nierenzellkarzinoms	48
<b>I.9.3</b>	Ätiologie des Nierenzellkarzinoms	48
<b>I.9.4</b>	Pathogenese des Nierenzellkarzinoms	49
<b>I.9.5</b>	Histologie des Nierenzellkarzinoms	49
<b>I.9.6</b>	Molekulare Aspekte des Nierenzellkarzinoms	50
<b>I.9.7</b>	Lokalisation des Nierenzellkarzinoms und Abgrenzung zum Nierenzelladenom	51
<b>I.9.8</b>	Metastasierung des Nierenzellkarzinoms	52
<b>I.9.9</b>	Stadieneinteilung des Nierenzellkarzinoms	53
<b>I.9.9.1</b>	Staging	53
<b>I.9.9.2</b>	Grading	54
<b>I.9.10</b>	Klinik des Nierenzellkarzinoms	54
<b>I.9.11</b>	Diagnostik des Nierenzellkarzinoms	55
<b>I.9.12</b>	Therapie des Nierenzellkarzinoms	56
<b>I.9.12.1</b>	Operative Therapie	56
<b>I.9.12.2</b>	Immuntherapie	56
<b>I.9.13</b>	Prognose des Nierenzellkarzinoms	57
<b>I.9.14</b>	Prophylaxe des Nierenzellkarzinoms	58
<b>I.10</b>	<b>Zielsetzung der Dissertation</b>	<b>58</b>
<b>I.10.1</b>	Die Auswahl der Karzinome	58
<b>I.10.2</b>	Konkrete Ziele	59
<b>I.10.2.1</b>	Allgemeine und spezielle Charakterisierung der Karzinome	59
<b>I.10.2.2</b>	Optimierung der Ligandenidentifikation	59
<b>I.10.2.3</b>	Ligandenidentifikation zur HLA- Motivverfeinerung	60
<b>I.10.2.4</b>	Identifikation von Peptidliganden im Einsatz zur Vakzinierungstherapie	60

<b>II. Material und Methodik</b> .....	<b>61</b>
<b>II.1. Organigramm</b> .....	<b>61</b>
<b>II.2. Material</b> .....	<b>63</b>
<b>II.2.1 Geräte</b> .....	63
<b>II.2.2 Zubehör und Materialien</b> .....	64
<b>II.2.3 Chemikalien</b> .....	65
<b>II.2.4 Medien und Puffer</b> .....	66
<b>II.3 Tumorgewebe</b> .....	<b>67</b>
<b>II.3.1 Karzinome des Verdauungstraktes</b> .....	67
<b>II.3.1.1 Einverständniserklärung</b> .....	67
<b>II.3.1.2 Präparatübernahme</b> .....	68
<b>II.3.1.3 Zuschneiden des Präparates</b> .....	68
<b>II.3.1.4 Entnahme von Tumorgewebe</b> .....	69
<b>II.3.1.5 Entnahme von Normalgewebe</b> .....	70
<b>II.3.1.6 Entnahme von Blut</b> .....	71
<b>II.3.2 Nierenzellkarzinome</b> .....	71
<b>II.3.2.1 Einverständniserklärung</b> .....	71
<b>II.3.2.2 Übernahme des Präparates</b> .....	71
<b>II.3.2.3 Entnahme von Tumorgewebe</b> .....	72
<b>II.3.2.4 Entnahme von Normalgewebe</b> .....	73
<b>II.3.2.5 Übernahme von Blut</b> .....	74
<b>II.3.3 HLA- Typisierung der Patienten</b> .....	74
<b>II.4. Zellbiologische Methoden</b> .....	<b>75</b>
<b>II.4.1 Zelllinien/ Antikörper</b> .....	75
<b>II.4.2 Kultivierung von Zelllinien</b> .....	75
<b>II.4.3 Lagerung von Zellen</b> .....	76
<b>II.4.3.1 Einfrieren von Zellen</b> .....	76
<b>II.4.3.2 Auftauen von Zellen</b> .....	77

<b>II.4.4</b>	Bestimmung der Lebendzellzahl .....	77
<b>II.4.4.1</b>	Die Zellfärbung .....	77
<b>II.4.4.2</b>	Die Zelldifferenzierung .....	78
<b>II.5.</b>	Immunologische Methoden .....	<b>78</b>
<b>II.5.1</b>	Aufreinigung monoklonaler Antikörper aus Hybridomüberstand .....	78
<b>II.5.1.1</b>	Prinzip .....	78
<b>II.5.1.2</b>	Aufarbeitung des Hybridomüberstandes .....	79
<b>II.5.1.3</b>	Wiederverwendung und Entsorgung des Hybridomüberstandes .....	79
<b>II.5.1.4</b>	Eigenschaften und Herstellung der Protein A- Säule .....	79
<b>II.5.1.4.1</b>	Eigenschaften .....	79
<b>II.5.1.4.2</b>	Herstellung der Protein A- Säule .....	80
<b>II.5.1.4.3</b>	Regeneration der Protein A- Säule .....	80
<b>II.5.1.4.4</b>	Lagerung der Protein A- Säule .....	80
<b>II.5.1.5</b>	Affinitätschromatographie der Antikörper .....	81
<b>II.5.1.5.1</b>	Antikörperbindung .....	81
<b>II.5.1.5.2</b>	Waschen der Säule .....	81
<b>II.5.1.5.3</b>	Säureextraktion der Antikörper .....	81
<b>II.5.1.6</b>	Konzentrationsbestimmung der Antikörper .....	81
<b>II.5.1.7</b>	Affinitätsbestimmung der Antikörper .....	82
<b>II.5.2</b>	Konzentrierung monoklonaler Antikörper .....	82
<b>II.5.3</b>	Durchflusszytometrie (FACS) .....	82
<b>II.5.3.1</b>	Einleitung .....	82
<b>II.5.3.2</b>	Prinzip .....	82
<b>II.5.3.3</b>	Zellfärbung .....	84
<b>II.5.3.4</b>	Auswertung .....	85
<b>II.5.4</b>	Immunpräzipitation und Säureextraktion von MHC- Liganden .....	86
<b>II.5.4.1</b>	Herstellung der Protein A- Säule .....	86
<b>II.5.4.2</b>	Herstellung des Tumorlysates .....	87
<b>II.5.4.2.1</b>	Homogenisierung des Tumorgewebes durch Mixen .....	87
<b>II.5.4.2.2</b>	Homogenisierung des Tumorlysates nach Dounce .....	87

<b>II.5.4.2.3</b>	Homogenisierung des Tumorlysates nach Potter .....	88
<b>II.5.4.2.4</b>	Zentrifugation .....	89
<b>II.5.4.2.5</b>	Filtration .....	89
<b>II.5.4.3</b>	Immunpräzipitation der MHC/ Peptid- Komplexe .....	89
<b>II.5.4.3.1</b>	Prinzip der Immunpräzipitation .....	89
<b>II.5.4.3.2</b>	Durchführung .....	90
<b>II.5.4.4</b>	Säureextraktion von MHC- Liganden .....	91
<b>II.5.4.5</b>	Zentrikon- Filtration zur Peptidgewinnung .....	91
<b>II.6.</b>	Biochemische Methoden .....	<b>92</b>
<b>II.6.1</b>	SDS- Polyacrylamid- Gelelektrophorese (SDS- PAGE) .....	92
<b>II.6.1.1</b>	Das Prinzip der SDS - PAGE .....	92
<b>II.6.1.2</b>	Das SDS - Polyacrylamidgel .....	93
<b>II.6.1.2.1</b>	Komponenten des SDS - Polyacrylamidgels .....	93
<b>II.6.1.2.2</b>	Herstellung des SDS - Polyacrylamidgels .....	93
<b>II.6.1.3</b>	Die Proben .....	94
<b>II.6.1.3.1</b>	Aufbereitung der Proben .....	94
<b>II.6.1.3.2</b>	Auftragen der Proben .....	94
<b>II.6.1.4</b>	Die Gelelektrophorese .....	95
<b>II.6.2</b>	Western Blot .....	95
<b>II.6.2.1</b>	Prinzip .....	95
<b>II.6.2.2</b>	Proteintransfer auf eine Nitrocellulosefolie .....	96
<b>II.6.2.3</b>	Färbung der Nitrozellulosefolie .....	96
<b>II.6.2.4</b>	Antikörperinkubation .....	97
<b>II.6.2.5</b>	Lumineszenzdetektion .....	97
<b>II.7</b>	Analytische Methoden .....	<b>98</b>
<b>II.7.1</b>	Volumenreduktion durch Vakuumkonzentrator .....	98
<b>II.7.2</b>	Bestimmung der optischen Dichte mittels Spektralphotometer .....	98
<b>II.7.3</b>	Reversed- Phase- Chromatographie .....	98
<b>II.7.3.1</b>	Prinzip .....	98
<b>II.7.3.2</b>	Durchführung .....	99

<b>II.7.4</b>	Flüssigkeitschromatographie (HPLC) .....	99
<b>II.7.4.1</b>	Prinzip und Materialien .....	99
<b>II.7.4.2</b>	Waschen und Äquilibrieren der Chromatographiesäule .....	100
<b>II.7.4.3</b>	Vorbereitung der Probe .....	101
<b>II.7.4.4</b>	Laden der Probe .....	101
<b>II.7.4.5</b>	Trennlauf .....	101
<b>II.7.4.6</b>	Reinigung und Lagerung des Systems .....	102
<b>II.7.5</b>	Peptidsequenzanalyse durch Edman- Abbau .....	103
<b>II.7.5.1</b>	Prinzip .....	103
<b>II.7.5.2</b>	Der Abspaltungszyklus .....	103
<b>II.7.5.3</b>	Durchführung und Ergebnis .....	104
<b>II.8.</b>	Massenspektrometrische Analytik .....	<b>105</b>
<b>II.8.1.</b>	MALDI- ToF Massenspektrometrie .....	105
<b>II.8.1.1</b>	Prinzip .....	105
<b>II.8.1.1.1</b>	Ionisation/ Desorption .....	105
<b>II.8.1.1.2</b>	Massenanalyse .....	106
<b>II.8.1.1.3</b>	Detektion .....	107
<b>II.8.1.2</b>	Durchführung .....	107
<b>II.8.1.2.1</b>	Beladen des Targets .....	107
<b>II.8.1.2.2</b>	Probenanalyse .....	108
<b>II.8.2</b>	ESI- Q- ToF- Massenspektrometrie .....	109
<b>II.8.2.1</b>	Vergleich MALDI-/ ESI- Massenspektrometrie .....	109
<b>II.8.2.2</b>	Prinzip .....	110
<b>II.8.2.2.1</b>	Ionisation .....	110
<b>II.8.2.2.2</b>	Massenanalyse .....	111
<b>II.8.2.2.3</b>	Strukturanalyse durch Tandem- Massenspektrometrie .....	112
<b>II.8.2.2.4</b>	Detektion .....	112

<b>III. Ergebnisse</b> .....	<b>113</b>
<b>III.1 Überblick und allgemeine Analyse der Tumoren</b> .....	<b>113</b>
<b>III.1.1 Überblick</b> .....	113
<b>III.1.2 Allgemeine Analyse der Tumoren</b> .....	114
<b>III.1.2.1 Verteilung der verschiedenen Tumorentitäten</b> .....	114
<b>III.1.2.2 Verteilung der Karzinome des Verdauungstraktes</b> nach Lokalisation .....	115
<b>III.1.2.3 Verteilung der Tumoren nach Geschlecht</b> .....	115
<b>III.1.2.3.1 Die Karzinome der Niere</b> .....	116
<b>III.1.2.3.2 Die Karzinome des Verdauungstraktes</b> .....	116
<b>III.1.2.3.3 Die Metastasen der Karzinome des Verdauungstraktes</b> ..	116
<b>III.1.2.4 Verteilung der Tumoren nach Inzidenzalter</b> .....	117
<b>III.1.2.4.1 Inzidenzalter der Karzinome der Niere</b> .....	117
<b>III.1.2.4.2 Inzidenzalter der Karzinome des Verdauungstraktes</b> .....	117
<b>III.1.2.5 Metastasierungsintervalle der Karzinome</b> des Verdauungstraktes .....	118
<b>III.1.2.6 Stadieneinteilung der Tumoren</b> .....	120
<b>III.1.2.6.1 Stadieneinteilung der Karzinome der Niere</b> .....	120
<b>III.1.2.6.1.1 T- Klassifikation der Karzinome der Niere</b> .....	120
<b>III.1.2.6.1.2 N- Klassifikation der Karzinome der Niere</b> .....	120
<b>III.1.2.6.1.3 M- Klassifikation der Karzinome der Niere</b> .....	121
<b>III.1.2.6.1.4 G- Klassifikation der Karzinome der Niere</b> .....	121
<b>III.1.2.6.2 Stadieneinteilung der Karzinome des Verdauungstraktes</b> ..	122
<b>III.1.2.6.2.1 T- Klassifikation der</b> Karzinome des Verdauungstraktes .....	122
<b>III.1.2.6.2.2 N- Klassifikation der</b> Karzinome des Verdauungstraktes .....	123
<b>III.1.2.6.2.3 M- Klassifikation der</b> Karzinome des Verdauungstraktes .....	124
<b>III.1.2.6.2.4 G- Klassifikation der</b> Karzinome des Verdauungstraktes .....	124

<b>III.2</b>	<b>Vorversuche</b>	<b>125</b>
III.2.1	Rationale der Vorversuche	125
III.2.2	Herstellung und Bindungssessay des Antikörpers BB7.2	126
III.2.2.1	Antikörperherstellung und Konzentrationsbestimmung	126
III.2.2.2	Sequenzbestimmung des Antikörpers BB7.2	127
III.2.2.3	FACS- Analyse des Antikörpers BB7.2	127
III.2.3	Herstellung und Bindungssessay des Antikörpers W6/32	129
III.2.3.1	Antikörperherstellung und Konzentrationsbestimmung	129
III.2.3.2	Sequenzbestimmung des Antikörpers W6/32	129
III.2.3.3	FACS- Analyse des Antikörpers W6/32	129
III.2.4	MHC- Expressionsanalyse mittels Western Blot	130
III.2.4.1	Semiquantitative Analyse der Western Blot Ergebnisse	132
III.2.4.2	Grauwertanalyse der Western Blot Ergebnisse	133
III.2.5	MHC- Expressionsanalyse mittels Sequenzanalyse durch Edman- Abbau	133
III.2.6	HLA- Verteilung der analysierten Tumoren	134
III.2.6.1	Häufigkeitsverteilung der HLA- Allele auf den Karzinomen der Niere	134
III.2.6.2	Häufigkeitsverteilung der HLA- Allele auf den Karzinomen des Verdauungstraktes	135
<b>III.3</b>	<b>Identifikation von Peptidliganden auf Karzinomen der Niere</b>	<b>136</b>
III.3.1	Übersicht	136
III.3.2	Aktueller Stand der Peptididentifikation auf Karzinomen der Niere	137
<b>III.4</b>	<b>Identifikation von Peptidliganden auf Karzinomen des Verdauungstraktes</b>	<b>138</b>
III.4.1	Allgemeine Hinweise	138
III.4.1.1	Aktueller Stand der Peptididentifikation auf Karzinomen des Verdauungstraktes	138
III.4.1.2	Fokussierte Ergebnispräsentation	138

<b>III.4.1.3</b>	<b>Erläuterungen zu Tabellen und Abbildungen</b>	<b>138</b>
<b>III.4.1.3.1</b>	<b>Tumorlisten</b>	<b>138</b>
<b>III.4.1.3.2</b>	<b>Edman- Degradation vor Filtration</b>	<b>139</b>
<b>III.4.1.3.3</b>	<b>HLA- Allel- Motive</b>	<b>140</b>
<b>III.4.1.3.4</b>	<b>Edman- Degradation nach Filtration</b>	<b>140</b>
<b>III.4.1.3.5</b>	<b>Flüssigkeitschromatographie (HPLC)</b>	<b>141</b>
<b>III.4.1.3.6</b>	<b>Peptidlisten</b>	<b>141</b>
<b>III.4.2</b>	<b>Karzinome des Ösophagus</b>	<b>142</b>
<b>III.4.2.1</b>	<b>Übersicht</b>	<b>142</b>
<b>III.4.2.2</b>	<b>Das Karzinom OCA 3</b>	<b>143</b>
<b>III.4.2.2.1</b>	<b>Klinische Aspekte zum</b> <b>Patienten mit dem Karzinom OCA 3</b>	<b>143</b>
<b>III.4.2.2.2</b>	<b>Aufbereitung des Karzinoms OCA 3</b>	<b>143</b>
<b>III.4.2.2.3</b>	<b>Die identifizierten Peptidliganden des Karzinoms OCA 3</b>	<b>143</b>
<b>III.4.2.3</b>	<b>Das Karzinom OCA 6</b>	<b>144</b>
<b>III.4.3</b>	<b>Karzinome des Magens</b>	<b>145</b>
<b>III.4.3.1</b>	<b>Übersicht</b>	<b>145</b>
<b>III.4.3.2</b>	<b>Ergebnisse der Peptididentifikation</b>	<b>145</b>
<b>III.4.4</b>	<b>Karzinome des Kolons und Sigmas</b>	<b>145</b>
<b>III.4.4.1</b>	<b>Übersicht</b>	<b>146</b>
<b>III.4.4.2</b>	<b>Das Karzinom CCA 49</b>	<b>147</b>
<b>III.4.4.2.1</b>	<b>Klinische Aspekte zum</b> <b>Patienten mit dem Karzinom CCA 49</b>	<b>147</b>
<b>III.4.4.2.2</b>	<b>Aufbereitung des Karzinoms CCA 49</b>	<b>147</b>
<b>III.4.4.2.3</b>	<b>Die Flüssigkeitschromatographie</b> <b>des Karzinoms CCA 49</b>	<b>147</b>
<b>III.4.4.2.4</b>	<b>Die identifizierten Peptidliganden</b> <b>des Karzinoms CCA 49</b>	<b>148</b>
<b>III.4.4.3</b>	<b>Das Karzinom CCA 60</b>	<b>149</b>
<b>III.4.4.3.1</b>	<b>Klinische Aspekte zum</b> <b>Patienten mit dem Karzinom CCA 60</b>	<b>149</b>
<b>III.4.4.3.2</b>	<b>Aufbereitung des Karzinoms CCA 60</b>	<b>149</b>

<b>III.4.4.3.3</b>	Die Edman- Sequenzanalyse des Karzinoms CCA 60 vor Filtration .....	150
<b>III.4.4.3.4</b>	HLA- Motive des Karzinoms CCA 60 .....	152
<b>III.4.4.3.5</b>	Die Edman- Sequenzanalyse des Karzinoms CCA 60 nach Filtration .....	152
<b>III.4.4.3.6</b>	Die Edman- Sequenzanalyse nach Filtration – Vergleich zweier Analysatoren .....	155
<b>III.4.4.3.7</b>	Die Flüssigkeitschromatographie des Karzinoms CCA 60 .....	156
<b>III.4.4.3.8</b>	Die identifizierten Peptidliganden des Karzinoms CCA 60 .....	157
<b>III.4.4.3.9</b>	Das identifizierte Peptid aus Fraktion 37 .....	159
<b>III.4.4.3.10</b>	Identifizierte Peptide mit Überlänge .....	160
<b>III.4.4.3.11</b>	Peptide des Proteins Vimentin .....	160
<b>III.4.4.3.12</b>	Ursprungsproteine der Peptide DEYIYRHFF und YYIFIPSKF .....	161
<b>III.4.4.4</b>	Das Karzinom CCA 61 .....	161
<b>III.4.4.4.1</b>	Klinische Aspekte zum Patienten mit dem Karzinom CCA 61 .....	161
<b>III.4.4.4.2</b>	Aufbereitung des Karzinoms CCA 61 .....	162
<b>III.4.4.4.3</b>	Die Flüssigkeitschromatographie des Karzinoms CCA 61 .....	162
<b>III.4.4.4.4</b>	Die identifizierten Peptidliganden des Karzinoms CCA 61 .....	163
<b>III.4.4.4.5</b>	Identifizierte Peptide mit verkürzter Länge .....	164
<b>III.4.5</b>	Karzinome des Rektums .....	164
<b>III.4.5.1</b>	Übersicht .....	164
<b>III.4.5.2</b>	Stand der Peptidanalyse der Karzinome des Rektums .....	165
<b>III.5</b>	Identifikation von Peptidliganden auf Metastasen kolorektaler Karzinome .....	<b>165</b>
<b>III.5.1</b>	Allgemeine Hinweise .....	165

<b>III.5.1.1</b>	Stand der Peptididentifizierung der Metastasen kolorektaler Karzinome .....	165
<b>III.5.1.2</b>	Erläuterungen zu Tabellen und Abbildungen .....	165
<b>III.5.2</b>	Lebermetastasen kolorektaler Karzinome .....	166
<b>III.5.2.1</b>	Übersicht .....	166
<b>III.5.2.2</b>	Die Metastase MET 2 .....	166
<b>III.5.2.2.1</b>	Klinische Aspekte zum Patienten mit der Metastase MET 2 .....	166
<b>III.5.2.2.2</b>	Aufbereitung der Metastase MET 2 .....	166
<b>III.5.2.2.3</b>	Die Edman- Sequenzanalyse der Metastase MET 2 vor Filtration .....	167
<b>III.5.2.2.4</b>	HLA- Motive der Metastase MET 2 .....	169
<b>III.5.2.2.5</b>	Die Edman- Sequenzanalyse der Metastase MET 2 nach Filtration .....	170
<b>III.5.2.2.6</b>	Die Flüssigkeitschromatographie der Metastase MET 2 ...	172
<b>III.5.2.2.7</b>	Die identifizierten Peptidliganden der Metastase MET 2 ...	173
<b>III.5.2.2.8</b>	Das identifizierte Peptid TYLEKAIKI aus Fraktion 32 .....	175
<b>III.5.2.3</b>	Die Metastase MET 3 .....	176
<b>III.5.2.3.1</b>	Klinische Aspekte zum Patienten mit der Metastase MET 3 .....	176
<b>III.5.2.3.2</b>	Aufbereitung der Metastase MET 3 .....	176
<b>III.5.2.3.3</b>	Die Flüssigkeitschromatographie der Metastase MET 3 ...	177
<b>III.5.2.3.4</b>	Die identifizierten Peptidliganden der Metastase MET 3 ...	178
<b>III.5.2.4</b>	Die Metastase MET 4 .....	178
<b>III.5.2.4.1</b>	Klinische Aspekte zum Patienten mit der Metastase MET 4 .....	178
<b>III.5.2.4.2</b>	Aufbereitung der Metastase MET 4 .....	179
<b>III.5.2.4.3</b>	Die Flüssigkeitschromatographie der Metastase MET 4 ...	179
<b>III.5.2.4.4</b>	Die identifizierten Peptidliganden der Metastase MET 4 ...	180
<b>III.5.2.5</b>	MET 5 .....	181
<b>III.5.3</b>	Nierenmetastasen kolorektaler Karzinome .....	181



<b>IV.3.3.4.4</b>	Prädiktion und Relevanz der Zwischenanalyse – Zusammenfassung .....	199
<b>IV.3.4</b>	Selektionierte Tumoranalyse .....	199
<b>IV.3.4.1</b>	Tumorspezifische Prädiktoren .....	199
<b>IV.3.4.1.1</b>	Makroskopische Beurteilung und Tumorentität .....	200
<b>IV.3.4.1.2</b>	Tumormasse und MHC- Präsentation .....	200
<b>IV.3.4.1.3</b>	Beurteilung der Tumornekrose .....	201
<b>IV.3.4.2</b>	Prädiktion anhand klinischer Faktoren .....	201
<b>IV.3.5</b>	Limitierung der Peptidausbeute .....	202
<b>IV.3.5.1</b>	Allgemeine Aspekte zur Limitierung der Peptidausbeute .....	202
<b>IV.3.5.2</b>	Limitierung der Peptidausbeute durch Tumoreigenschaften ..	202
<b>IV.3.5.3</b>	Limitierung der Peptidausbeute durch die Methodik .....	203
<b>IV.3.5.4</b>	Limitierung der Peptidausbeute durch multiple Störfaktoren ..	204
<b>IV.4</b>	Identifizierte Peptidliganden zur HLA- Motivverfeinerung .....	<b>205</b>
<b>IV.5</b>	Identifizierte Peptidliganden und ihre Relevanz als Zielstrukturen einer Vakzinierungstherapie .....	<b>208</b>
<b>IV.5.1</b>	Differenzierung und Relevanz von Peptidliganden .....	208
<b>IV.5.2</b>	Darstellung relevanter Peptidliganden .....	209
<b>IV.5.2.1</b>	Peptidliganden des Kolonkarzinoms CCA 49 .....	210
<b>IV.5.2.1.1</b>	Fraktion 27: SLAGGIIGV Heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein K .....	210
<b>IV.5.2.1.2</b>	Fraktion 37: DPFAFIHKI Retinoblastombindungsprotein 2 / -Homolog 1 .....	210
<b>IV.5.2.2</b>	Peptidliganden des Kolonkarzinoms CCA 60 .....	211
<b>IV.5.2.2.1</b>	Fraktion 34: SLPKLLALL Leydigzelltumor- Protein- Homolog (10kDa) .....	211
<b>IV.5.2.2.2</b>	Fraktion 35: NYIDKVRFL, Fraktion 36: EEIAFLKKL Vimentin .....	211
<b>IV.5.2.2.3</b>	Fraktion 37: TYGEIFEKF NADH- Ubiquinon Oxidoreduktase Untereinheit .....	212

<b>IV.5.2.2.4</b>	Fraktion 37: DEYIYRHHF	
	Zellzyklusprotein CPR8 .....	212
<b>IV.5.2.2.5</b>	Fraktion 39: DEGRLVLEF	
	Matrin .....	213
<b>IV.5.2.2.5.1</b>	Physiologische Aufgaben von Matrin .....	213
<b>IV.5.2.2.5.2</b>	Matrin in der Entwicklung kolorektaler Karzinome .....	213
<b>IV.5.2.2.5.3</b>	Matrin in der Entwicklung	
	anderer humaner Neoplasien .....	214
<b>IV.5.2.2.5.4</b>	Matrin bei nicht- malignen	
	Veränderungen des Menschen .....	215
<b>IV.5.2.2.6</b>	Fraktion 41: FYLEGGFSKF	
	Mitogen- aktivierte Protein- Kinase Phosphatase 3 ..	215
<b>IV.5.2.2.7</b>	Fraktion 42: FYPPKVLEF	
	Multifunktionales Protein ADE2 .....	216
<b>IV.5.2.2.8</b>	Fraktion 44: DEINFLARL	
	Cytokeratin 6A .....	216
<b>IV.5.2.2.9</b>	Fraktion 45: DEFKIGELF	
	DNA- abhängige Proteinkinase .....	217
<b>IV.5.2.2.10</b>	Fraktion 46: YYIFIPSKF	
	Hqp0256 Protein/ DEAD Box Protein .....	217
<b>IV.5.2.2.11</b>	Fraktion 48: SYLPLAHMF	
	Synthetase 6 langkettiger Acyl- CoA .....	218
<b>IV.5.2.2.12</b>	Fraktion 48: DEINFLRALY	
	Cytokeratin 4 .....	219
<b>IV.5.2.3</b>	Peptidliganden der Kolonkarzinommetastase MET2 .....	219
<b>IV.5.2.3.1</b>	Fraktion 22: PTDPKVVVY	
	Absent in Melanoma 1 Protein .....	219
<b>IV.5.2.3.2</b>	Fraktion 23: AYVHMTVF	
	Bax Inhibitor-1/ Testis enhanced gene transcript .....	220
<b>IV.5.2.3.3</b>	Fraktion 28: VAVGRALYY	
	„DNA damage“ bindendes Protein 1 .....	220
<b>IV.5.2.4</b>	Peptidliganden der übrigen Tumoren .....	221

<b>IV.5.3</b>	Beurteilung der dargestellten Peptidliganden .....	221
<b>IV.5.4</b>	Relevanz des Ursprungsgewebes .....	223
<b>IV.6</b>	Ergebnisse der Dissertation im Hinblick auf eine effektivere Immuntherapie .....	<b>224</b>
<b>IV.6.1</b>	Basis der Vakzinierungstherapie .....	224
<b>IV.6.2</b>	Bisherige Vakzinierungstherapie .....	225
<b>IV.6.2.1</b>	Vakzinierungstherapie des Nierenzellkarzinoms .....	225
<b>IV.6.2.2</b>	Vakzinierungstherapie des kolorektalen Karzinoms .....	226
<b>IV.6.3</b>	Aktuelle Vakzinierungstherapie – Optimierung durch erzielte Erkenntnisse .....	227
<b>IV.6.5</b>	Perspektive der Vakzinierungstherapie .....	229
<b>IV.7</b>	Schlussfolgerung der Dissertation .....	<b>230</b>
<b>V.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>232</b>
<b>VI.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>233</b>
<b>VI.1</b>	Original- und Übersichtsarbeiten .....	<b>233</b>
<b>VI.2</b>	Originalarbeiten des Autors .....	<b>268</b>
<b>VI.3</b>	Lehrbücher/ Lexika/ Manuale .....	<b>269</b>
<b>VI.4</b>	Referenzen im Internet .....	<b>271</b>
<b>VII.</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>272</b>
<b>VIII.</b>	<b>Lebenslauf</b> .....	<b>275</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Dieses Verzeichnis listet in alphabetischer Ordnung alle im fortlaufenden Dissertationstext, in den Beschreibungen zu bzw. in den Abbildungen und Tabellen verwendete Abkürzungen auf. Die eingesetzten Ziffern- bzw. Buchstabenkombinationen orientieren sich dabei an allgemein verwendeten bzw. international gebräuchlichen Abkürzungen. Zur Veranschaulichung sind diese in der ausgeschriebenen deutschen Formulierung, ansonsten in der englischen Übersetzung durch intensiven Druck hervorgehoben. Zudem enthält das Verzeichnis übliche Abkürzungen einiger Tumor- assoziierter Antigene bzw. Antigenfamilien. Die Abkürzungen der eingesetzten Chemikalien sind Kapitel II.2.3 zu entnehmen.

Å	<b>Angström</b> (molekulare Maßeinheit)
Abb	<b>Abbildung</b>
AcN	<b>Acetonitril</b>
AG	<b>Antigen</b>
AIDS	HI- Virus bedingte erworbene Immunschwäche ( <b>a</b> quired <b>i</b> mmunodeficiency <b>s</b> ndrome)
AS	<b>Aminosäure</b>
(-)AK	(-) <b>Antikörper</b>
APC	Antigen- präsentierende Zellen ( <b>a</b> ntigen <b>p</b> resenting <b>c</b> ell)
APC- Gen	Kodierendes Gen der <b>a</b> denomatösen <b>P</b> olyposis <b>c</b> oli
ATP	<b>Adenosin</b> triphosphat
ATZ -AS/ -Peptid	<b>Anilinothiazolinon- Aminosäure/ -Peptid</b>
β2m, β2M	<b>Beta- 2- Mikroglobulin</b>
BSG	<b>Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit</b>
CCA	Kolonkarzinom ( <b>c</b> olorectal <b>c</b> ancer)
CD	<b>Cluster of Differentiation</b>
CDC27	Zellzyklusprotein 27 ( <b>c</b> ell <b>d</b> ivision <b>c</b> ycle protein <b>27</b> )
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure ( <b>c</b> omplementary <b>d</b> eoxyribo <b>n</b> ucleic <b>a</b> cid)

CDK4	Zyclinabhängige Kinase 4 ( <b>cyclin dependent kinase 4</b> )
CEA	Karzinomembryonales Antigen ( <b>carcinoembryonic antigen</b> )
CNBr	<b>Cyanogenbromid</b>
CT- Antigen	<b>Cancer Testis Antigen</b>
CTL	Zytotoxischer T- Lymphozyt ( <b>cytotoxic T- lymphocyte</b> )
Da	<b>Dalton</b> (atomare Masseneinheit)
DC	Dendritische Zelle ( <b>dendritic cell</b> )
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <b>desoxyribonucleic acid</b> )
DPTU	Diphenylthioharnstoff ( <b>diphenylthiourea</b> )
DTH- Reaktion	Hypersensitivitätsreaktion vom verzögerten Typ ( <b>delayed type hypersensitivity reaction</b> )
ER	<b>Endoplasmatisches Retikulum</b>
EDTA	Äthylendiamidtetraessigsäure ( <b>ethylen diamid tetra acid</b> )
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor ( <b>epidermal growth factor</b> )
ELISA	Enzymgekoppelter Immunabsorptionstest ( <b>enzyme linked immunosorbent assay</b> )
ELISPOT	Enzymgekoppelte Immuntechnik ( <b>enzyme linked immuno spot technique</b> )
ERK	<b>Extrazellulärsignal- regulierende Kinase</b>
ESI	Massenspektrometrisches Ionisationsverfahren <b>Elektrospray- Ionisation</b>
FAB	Massenspektrometrisches Ionisationsverfahren ( <b>fast atom bombardment</b> )
Fab	Antigen- bindendes Fragment des Antikörpers ( <b>fragment antigen binding</b> )
FACS	Durchflusszytometer ( <b>fluorescence activated cell sorter</b> )
FAP	<b>Familiäre adenomatöse Polyposis</b>
Fc	kristallisierbares Fragment des Antikörpers ( <b>fragment crystalizable</b> )
FCS	Fötale Kälberserum ( <b>Fetal calf serum</b> )
FITC	<b>Fluoresceinisothiocyanat</b>
FL- 1	Fluoreszenzsignal beim FACS

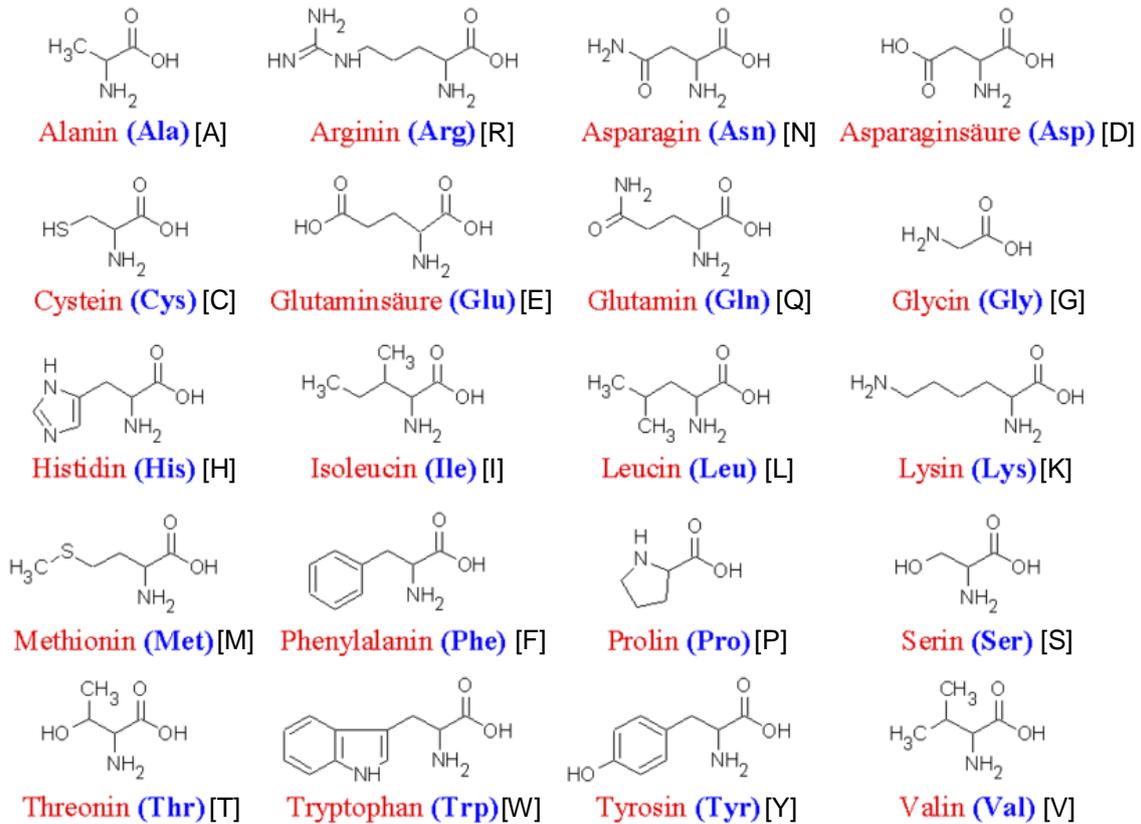
FSC- H	Messsignal beim FACS ( <b>F</b> orward <b>s</b> catter <b>h</b> eight)
FTA- Abs- Test	Fluoreszenz- <i>Treponema pallidum</i> - Antikörper- <b>A</b> bsorptions- <b>T</b> est
FWHM	R- (Mess-) Wert des Massenanalysators ( <b>f</b> ull <b>w</b> idth at <b>h</b> alf <b>m</b> aximum)
G1-4	Tumor <b>g</b> radung 1 - 4
g250	Tumor- assoziiertes Antigen/ Antigenfamilie
GAGE	Tumor- assoziiertes Antigen/ Antigenfamilie
ggf	<b>g</b> egebenenfalls
gp100	Tumor- assoziiertes Antigen/ Antigenfamilie
HAGE	Tumor- assoziiertes Antigen/ Antigenfamilie
Hb	<b>H</b> ämoglobin
Her-2/neu	Humaner epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor 2 ( <b>h</b> uman <b>e</b> pidermal <b>g</b> rowth <b>f</b> actor <b>r</b> eceptor <b>2</b> )
H- Kette	Schwere ( <b>H</b> eavy-) Kette eines Antikörpers
HIV	HI- Virus ( <b>h</b> uman <b>i</b> mmunodeficiency <b>v</b> irus)
HLA	<b>H</b> umanes <b>L</b> eukozyten <b>A</b> ntigen
HNPCC	Hereditäres nichtpolypöses Kolonkarzinom- Syndrom ( <b>h</b> ereditary <b>n</b> on- <b>p</b> olyposis <b>c</b> olorectal <b>c</b> ancer)
HPLC	Flüssigkeitschromatographie ( <b>h</b> igh <b>p</b> erformance <b>l</b> iquid <b>c</b> hromatography)
HRP	Meerrettichperoxidase ( <b>h</b> orseradish <b>p</b> eroxidase)
Ig	<b>I</b> mmunglobulin
IgA	<b>I</b> mmunglobulin der Klasse <b>A</b>
IgD	<b>I</b> mmunglobulin der Klasse <b>D</b>
IgE	<b>I</b> mmunglobulin der Klasse <b>E</b>
IgG	<b>I</b> mmunglobulin der Klasse <b>G</b>
IgM	<b>I</b> mmunglobulin der Klasse <b>M</b>
IP	Isoelektrischer <b>P</b> unkt
IFN	<b>I</b> nterferon
Kap	<b>K</b> apitel
kDa	<b>k</b> ilo <b>D</b> alton = 1000 Dalton (atomare Masseneinheit)

KIA 0205	Tumor- assoziiertes Antigen/ Antigenfamilie
KIP	<b>K</b> inase- interagierendes <b>P</b> rotein
LACS	Langkettige Acyl- CoA- Synthetase (long- chain <b>acyl- CoA synthetase</b> )
LAGE	Tumor- assoziiertes Antigen/ Antigenfamilie
LDH	<b>L</b> aktat <b>d</b> ehydrogenase
LDLR – FUT	Fusionsprotein (low <b>d</b> ensity lipid receptor – <b>f</b> ucosyltransferase)
L- Kette	Leichte ( <b>L</b> ight-) Kette eines Antikörpers
M0-1	<b>M</b> etastasierungsstadium 0 - 1 der TNM- Klassifikation
MAGE-1	Tumor- assoziiertes Antigen/ Antigenfamilie
mAK	<b>m</b> onoklonaler <b>A</b> ntikörper
MALDI	Matritzengebundene Laserdesorptionsionisation (Massenspektrometrisches Ionisationsverfahren) ( <b>m</b> atrix associated laser <b>d</b> esorption ionisation)
MALT	Schleimhautgebundenes/ -integriertes Lymphgewebe ( <b>m</b> ucosa associated lymphatic tissue)
MAP- Kinase	<b>M</b> itogen- aktivierte <b>P</b> roteinkinase
MART-1	Tumor- assoziiertes Antigen/ Antigenfamilie
MG	<b>M</b> olekulargewicht
MHC	Haupt- Histokompatibilitäts- Komplex ( <b>m</b> ajor histocompatibility <b>c</b> omplex)
MMP	<b>M</b> atrix- <b>M</b> etalloproteinase
MPa	<b>M</b> ega <b>P</b> ascal (Druckeinheit)
mRNA	Boten- Ribonukleinsäure ( <b>m</b> essenger <b>r</b> ibonuclein <b>a</b> cid)
MS	<b>M</b> assenspektrometrie
MS/MS Mode	Analysemodus eines Massenspektrometers
MUC-1	Tumor- assoziiertes Antigen/ Antigenfamilie
MUM-1	Tumor- assoziiertes Antigen/ Antigenfamilie
m/z	Masse/ Ladungsquotient
N1-3	Lymphknotenstadium ( <b>n</b> ode) 1 - 4 der TNM- Klassifikation
NY-ESO-1	Tumor- assoziiertes Antigen/ Antigenfamilie

p53	Tumor- assoziiertes Antigen/ Antigenfamilie
PE	<b>Phycoerythrin</b>
PDGF	Blutplättchenähnlicher Wachstumsfaktor ( <b>platelet derived growth factor</b> )
PITC	<b>Phenylisothiocyanat</b>
PTC- Peptid	<b>Phenylthiocarbamoyl- Peptid</b>
PTH- AS	<b>Phenylthiohydantoin- Aminosäure</b>
PM	<b>Prestained Marker</b> (Proteinmarker)
PSA	<b>Prostata- spezifisches Antigen</b>
PTHrP	Parathormon- ähnliches Protein ( <b>parathormon- related peptide/ protein</b> )
RP- HPLC	Reverse Phase- Flüssigkeitschromatographie ( <b>reversed phase high performance liquid chromatography</b> )
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <b>rounds per minute</b> )
SAGE	Tumor- assoziiertes Antigen/ Antigenfamilie
SCID	Schwerer kombinierter Immundefekt ( <b>severe combined immunodeficiency</b> )
SDS- PAGE	Natriumdodecylsulfat- Polyacrylamid- Gelelektrophorese ( <b>sodium dodecylsulfat polyacrylamid gel electrophoresis</b> )
SEV	<b>Sekundärelektronenvervielfacher</b>
SSC- H	Messsignal beim FACS ( <b>Side scatter height</b> )
T1-4	<b>Tumorstadium 1 - 4</b> der TNM- Klassifikation
Tab	<b>Tabelle</b>
TAP	Antigenprozessierungstransporter ( <b>transporter associated with antigen processing</b> )
Tbl	<b>Tablette</b>
TH1 bzw. TH2	<b>T- Helfer- Lymphozyten vom Typ 1 bzw. 2</b>
TNF	<b>Tumor Nekrose Faktor</b>
ToF	Flugzeitanalysator ( <b>Time of Flight</b> )
TRA	Tumorabstoßungsantigen ( <b>tumor rejection antigen</b> )

TRP-2/INT2	Tyrosinase- ähnliches Protein (tyrosinase- related <b>p</b> rotein- <b>2</b> , <b>i</b> ntron <b>2</b> )
TSTA	<b>t</b> umorspezifische <b>T</b> ransplantationsantigene
UICC	<b>U</b> nion internationale <b>c</b> ontre le <b>c</b> ancer
u.a.	unter <b>a</b> nderem
v.a.	vor <b>a</b> llem
Vgl.	<b>V</b> ergleich
z.B.	zum <b>B</b> eispiel

## Proteinogene Aminosäuren



Darstellung der zwanzig proteinogenen Aminosäuren des Menschen. Die chemischen Strukturformeln sind in üblicher Weise mit der organischen Kohlenwasserstoffkette als gezackter Linie dargestellt, ergänzt durch die spezifischen Funktionsgruppen. Neben der ausführlichen Bezeichnung in roter ist der Drei-Buchstaben- Code in blauer und der Ein- Buchstaben- Code der Aminosäure in schwarzer Schrift aufgeführt. Im Dissertationstext, v.a. bei tabellarischen Darstellungen, wird zumeist auf den Ein- Buchstaben- Code zurückgegriffen.

# **I. Einleitung**

## **I.1 Aufbau und Aufgaben des Immunsystems**

### **I.1.1 Das Immunsystem als Rettung**

#### **- schon immer, immer noch und immer mehr ?**

**„Bisher mussten wir uns gegen die Natur behaupten.  
Von nun an müssen wir uns gegen unsere eigene Natur behaupten.“**

**Dennis Gabor (1900- 1979)**

ungar.- brit. Physiker,  
Nobelpreisträger 1971

Diese Aussage des Naturwissenschaftlers Dennis Gabor beschreibt die Beziehung des Menschen zu seiner Umwelt, zur Natur und damit - trotz initial anderer Intention - exakt die Charakteristika des humanen Immunsystems mit dessen Aufgaben und überragenden Leistungen. Doch diese Beziehung zwischen Mensch und Natur ändert sich. Der Mensch ist gezwungen, sich gegen sich selbst zu wenden und sich gegen die eigene Natur zu behaupten. Auch in dieser Hinsicht beschreibt der Physiker sehr treffend das Immunsystem, so dass die Worte von Dennis Gabor als Basis gewählt werden sollen, um die im Rahmen dieser Dissertation erzielten Ergebnisse in Zusammenhang mit dem gesamten menschlichen Leben zu stellen und im Hinblick auf dessen Natur zu sehen.

Auch ohne das stetes Bewusstsein darüber müssen wir uns im Klaren sein:

**Eigentlich befinden wir uns im Kampf !**

**Im fortwährenden Kampf, uns gegen die Natur zu behaupten !**

Die Ebene, auf der sich dieser Kampf abspielt, liegt allerdings im Kleinen und Verborgenen. Es ist der Kampf mit den allseits vorhandenen Mikroorganismen und Partikeln gleich welcher Art und Herkunft. Sie alle richten sich als „Natur“ gegen den Organismus Mensch, der sich fortwährend dagegen behaupten muss.

Bei diesem Kampf ist das humane Immunsystem, ein multizellulärer Organverbund, der in annähernd allen Geweben des menschlichen Körpers vorkommt, von zentraler Bedeutung. Neben unspezifischen Mechanismen tragen v. a. erworbene und auf die einzelnen „Angreifer“ wie Bakterien, Viren und Pilze spezifisch abgestimmte Strategien zur sofortigen Abwehr sowie zum dauerhaften Schutz des Komplexes Mensch bei.

Ausgehend von der Entdeckung der Serumtherapie durch von Behring und Kitasato<sup>1</sup> im 19. Jahrhundert entwickelte sich bis zum heutigen Tag beispielsweise eine ausgefeilte Impfstrategie und damit eine effektive Waffe im Kampf gegen verschiedenste Infektionskrankheiten, an denen über Jahrtausende hinweg unzählige Menschen verstorben waren. Die Impfstherapie selbst basiert wiederum auf den Fähigkeiten des Immunsystems wie Adaptation und zielgerichteter Entwicklung von Antikörpern (AK). Sie spiegelt jedoch nur einen kleinen Teilaspekt der Leistungen des Gesamtkomplexes Immunsystem wieder und lässt nur im Entferntesten erahnen, welche Bedeutung dieses System im menschlichen Organismus hat.

Am eindrücklichsten zeigen sich die Fähigkeiten des Immunsystems jedoch nicht durch Analyse einzelner Funktionen, sondern in den Situationen, in denen diese im menschlichen Körper nicht oder auch nur eingeschränkt zur Verfügung stehen. Dies wird u.a. an seltenen, angeborenen Immundefekterkrankungen wie z.B. dem Di-George-, Louis-Bar- oder Wiskott-Aldrich- Syndrom augenfällig, andererseits anhand „der“ Infektionskrankheit der letzten Jahrzehnte, bei der das Immunsystem selbst angegriffen und zerstört wird, an der erworbene Immunschwächeerkrankung AIDS (**a**quired **i**mmunode**f**iciency **s**yndrom). Wird das Immunsystem auch nur partiell in seiner Funktion eingeschränkt, bricht das gesamte Abwehrsystem in unterschiedlich schnellem Maß, aber kontinuierlich,

---

<sup>1</sup> Von Behring E., Kitasato S. 1890

Schritt für Schritt zusammen. Und soll sich der Mensch ohne Immunsystem, z.B. nach myeloablativer Therapie im Rahmen einer Leukämiebehandlung, gegen die Angreifer von außen zur Wehr setzen, helfen die besten Medikamente nur in einem Intervall von wenigen Tagen oder allenfalls Wochen, bis die Natur in Form von Bakterien, Viren und Pilzen schlussendlich die Oberhand gewinnt. All dies verdeutlicht, welches exzellente und erstaunliche System jedem einzelnen Menschen mit dem humanen Immunsystem Tag für Tag zur Verfügung steht und in welcher Weise wir uns mit dessen Hilfe gegen die Natur behaupten können.

Doch welchen Sinn beinhaltet dann die Äußerung von Dennis Gabor, sich „von nun an gegen **unsere eigene Natur** behaupten zu müssen“. Ist nicht das Immunsystem als lebensnotwendiger Bestandteil des menschlichen Organismus zu sehen und steht uns als eigene Natur gegen die Natur von außen zur Seite? Nun, leider zeigt sich auch beim Immunsystem in gewissen Situationen die Kehrseite der Medaille.

Bei der stetig zunehmenden Zahl allergischer Erkrankungen wie z.B. „den Volkskrankheiten“ Heuschnupfen oder Neurodermitis reagiert das Immunsystem inadäquat: Harmlose Antigene werden als Zielobjekte unnötig oder übermäßig aggressiv bekämpft. Ähnlich verhält es sich mit zahlreichen Krankheiten der verschiedensten Organsysteme, die unter dem Begriff Autoimmunerkrankung subsumiert werden, bei denen körpereigene Strukturen als fremd erkannt und vom Immunsystem attackiert werden.

Mit ähnlichen Problemen müssen auch Ärzte auf dem Gebiet der Transplantationsmedizin kämpfen. Bei adäquater Immunreaktion ist es entscheidend, für jeden einzelnen Patienten die Waage zwischen Immunsuppression und Abstoßungsreaktion im Lot zu halten, um damit die Übertragung fremder Organe zu ermöglichen.

Vielleicht zielte Dennis Gabor mit seiner Äußerung aber noch auf eine ganz andere Tatsache ab. Neben den kardiovaskulären Erkrankungen werden maligne Erkrankungen immer stärker zur einer der führenden Haupttodesursachen in

der modernen Welt<sup>2</sup>. Zwar kennt man zahlreiche exogene Ursache und das Wissen um molekulare bzw. molekulargenetische Genesen mehrt sich täglich, oftmals bleibt die Frage jedoch ungeklärt, weshalb sich körpereigenes Gewebe plötzlich nicht mehr an die Spielregel im menschlichen Organismus hält, wächst und gedeiht, fortwährend, infiltrierend, verdrängend, einfach unaufhaltsam.

Was geschieht in solchen Fällen mit **unserer eigenen Natur**?

Spätestens dann ist es Zeit, uns gegen unsere eigene Natur zu behaupten und zu wehren. Die Frage „Wie?“ scheint einfach beantwortet und das Mittel auf der Hand zu liegen. Haben wir nicht mit unserem eigenen, individuellen Immunsystem, das alles Fremde und Gefährliche effektiv erkennt und bekämpft, bereits *die Waffe* in der Hand bzw. im eigenen Körper präsent? Bleibt nur die Frage, wieso unser Immunsystem im Fall tumoröser Erkrankungen untätig bleibt und uns nicht wie Millionen Mal zuvor bei Seite steht? Warum erkennt es „das Böse“ nicht? Müssen wir ihm sagen, was es zu tun hat?

Ziel muss sein, dem Immunsystem den Feind bzw. das Fremde zu zeigen und klarzumachen, wen es zu bekämpfen hat. Genau mit diesem Ziel beschäftigt sich die vorliegende Dissertation. Wir müssen das bösartige – konkret das maligne entartete – Gewebe analysieren, die Unterschiede zum gesunden Gewebe herausarbeiten und sie dem Immunsystem kenntlich machen. Erst dadurch wird es möglich sein, uns mit unserer eigenen Natur, dem humanen Immunsystem, gegen unsere eigene, aber veränderte Natur in Form entarteter Gewebe zu wehren. Dies würde zu einer individuellen, spezifischen und zielgerichteten, v.a. jedoch extrem effektiven, aber auch natürlichen Therapie maligner Erkrankungen führen.

---

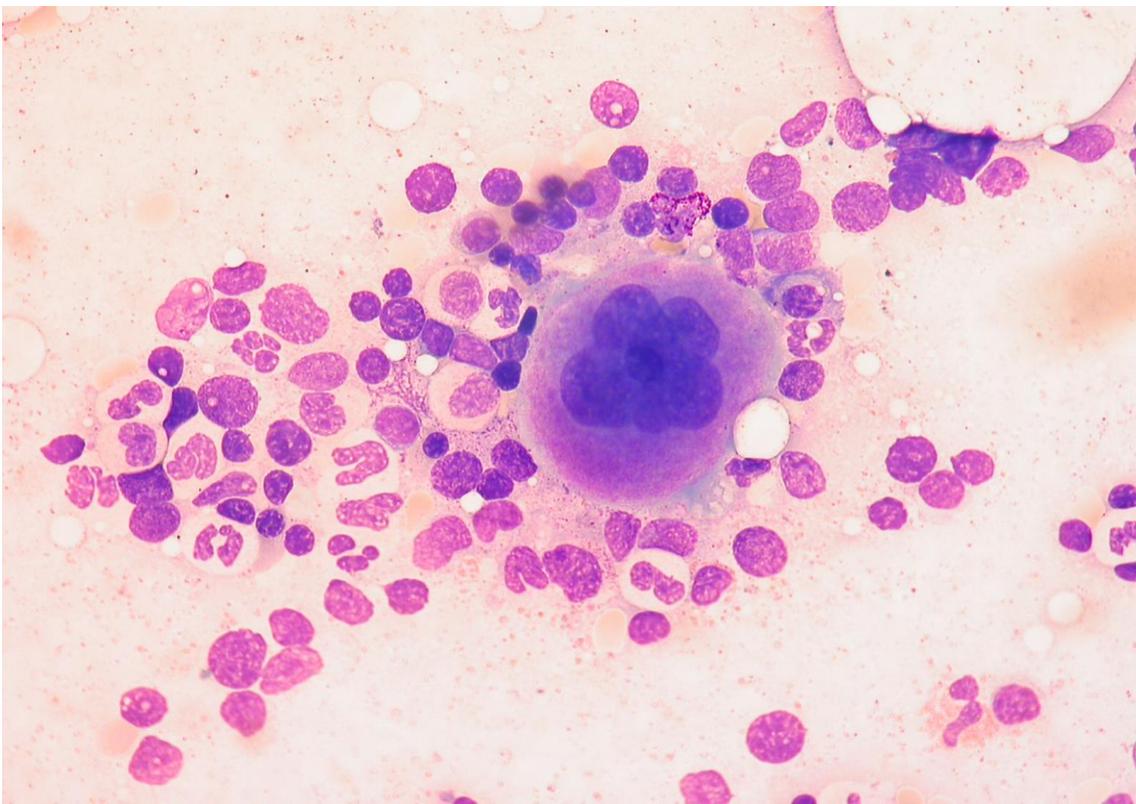
<sup>2</sup> [www.destatis.de](http://www.destatis.de)

## I.1.2 Bestandteile des Immunsystems

### I.1.2.1 Zellen des Immunsystems

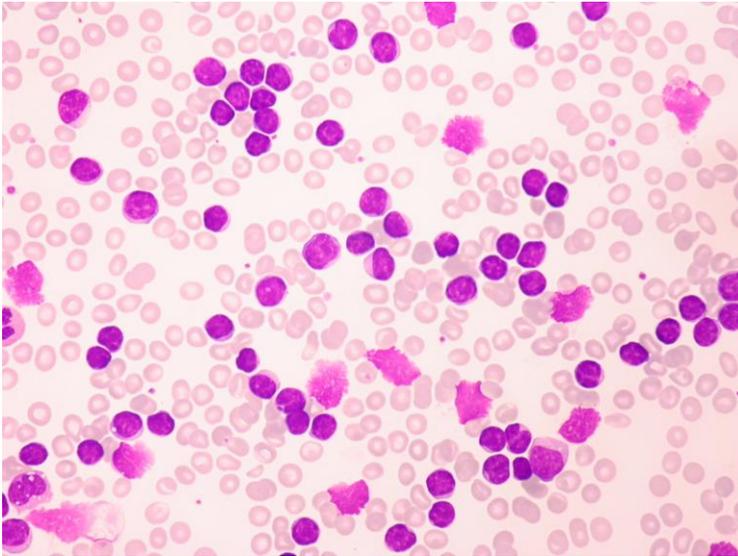
Sämtliche Zellen des Immunsystems sind hochspezialisiert und werden im Rahmen der Hämatopoese aus einer pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle über die Myelopoese einerseits und die Lymphopoese andererseits gebildet. Die Stammzelle ist beim Erwachsenen vor allem im Knochenmark angesiedelt. Aus ihr entwickeln sich alle Immunzellen des Blutes, aber auch Zellen mit immunologischer Funktion im Bereich anderer Gewebe wie z.B. in der Haut, in Lunge und Leber, in Bindegewebe, serösen Höhlen und im Nervensystem.

Bei der Myelopoese werden neben den Erythrozyten, Thrombozyten und Mastzellen polymorphkernige Granulozyten gebildet, die aus neutro-, eosino- und basophilen Subpopulationen bestehen. Die neutrophilen Granulozyten fungieren neben den ebenfalls gebildeten Monozyten durch ihre Phagozytose und den lysosomalen Abbau aufgenommener Partikel als unspezifischer Abwehrmechanismus (vgl. I.1.3.1).



**Abb. 1:** Lichtmikroskopisches Bild eines normalen Knochenmarksausstriches mit polymorphem Bild der verschiedenen Zellpopulationen  
Abbildung aus der zytologischen Bilddatenbank der Medizinischen Klinik II der Universität Tübingen, mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. med. W. Vogel

Über die Lymphopoese entwickeln sich täglich etwa  $10^9$  Lymphozyten in Form von B- und T- Lymphozyten. Sie bilden die tragende Stütze der spezifischen Immunabwehr (vgl. I.1.3.2). Im Gegensatz zu den ausdifferenzierten Zellen der Myelopoese unterscheiden sie sich nur anhand ihrer Oberflächenproteine, nicht jedoch in ihrer mikroskopischen Erscheinung (Abb. 2).



**Abb. 2:** Lichtmikroskopisches Bild eines peripheren Blutausstriches. Das Blut stammt von einem Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie und zeigt morphologisch weitestgehend normale, jedoch eine deutlich vermehrte Anzahl an B-Lymphozyten.

Abbildung aus der zytologischen Bilddatenbank der Medizinischen Klinik II der Universität Tübingen, mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. med. W. Vogel

B- Lymphozyten werden über antigenpräsentierende Zellen unter Einwirkung unterschiedlichster Zytokine zur Produktion spezifischer AK stimuliert (vgl. I.1.3.2.1), um beispielsweise einer bakteriellen Infektion entgegenzuwirken. Nach Überwinden der aktuellen Erkrankung verbleibt ein kleiner Rest der für diese antigene Struktur spezifischen B- Lymphozyten. Diese wandeln sich in Plasma-

zellen um und dienen fortan als immunologisches Gedächtnis. Ein erneuter Kontakt mit demselben Antigen befähigt den Organismus, neben der sehr spezifischen auch eine sehr zügige Immunantwort zu generieren. Dadurch ist es möglich, die Ausbreitung des kausalen Pathogens effektiv und rasch einzudämmen. Dieses Abwehrprinzip, dessen sich der Mensch u.a. beim Impfen bedient, hat seitdem zu einem massiven Rückgang viraler sowie bakterieller Infektionen geführt und stellt auch heute noch als präventive Maßnahme ein entscheidendes Mittel im Kampf gegen Infektionskrankheiten dar.

Auf die Entwicklung und Funktion der T- Lymphozyten wird in Kapitel I.4 näher eingegangen.

### **I.1.2.2 Organe des Immunsystems**

Da eine Immunzelle gleich welcher Art ihren speziellen Aufgaben nachkommen muss, wird sie im Laufe ihrer Entwicklung durch verschiedenste Einflüsse und Faktoren verändert und geprägt. Die Organe des Immunsystems, in denen diese Entwicklung stattfindet, werden in zwei Kategorien aufgeteilt und als primäre bzw. sekundäre lymphatische Organe bezeichnet.

#### I.1.2.2.1 Primäre lymphatische Organe

Als zentrales Organ der primären lymphatischen Organe ist das Knochenmark zu sehen, in dem während der Hämatopoese unspezifische Vorläuferzellen der myeloischen als auch der lymphatischen Reihe heranwachsen (vgl. I.1.2.1).

Im Thymus finden die Prozesse zur Differenzierung und Reifung der **T**(hymus)-Lymphozyten statt. Unter Einwirkung großer Mengen an MHC- Komplexen (vgl. I.2) auf Epithelzellen des Thymus entwickeln sich als Thymozyten die T-Zellen von der Vorläuferzelle bis hin zum reifen, immunologisch kompetenten Lymphozyten. Nur etwa 10% aller ursprünglichen Zellen überleben diesen Prozess, der Rest wird aussortiert und gezielt eliminiert.

Die Entwicklung der B- Lymphozyten erfolgt in der Bursa Fabricii (einer spezialisierten Organttasche beim Vogel) bzw. deren Äquivalent. Beim Menschen wird dieses Bursaäquivalent neben der Leber im Fetalalter durch das Knochenmark gebildet und ist Bildungsort der **B**(ursa)- bzw. **B**(one)-Lymphozyten.

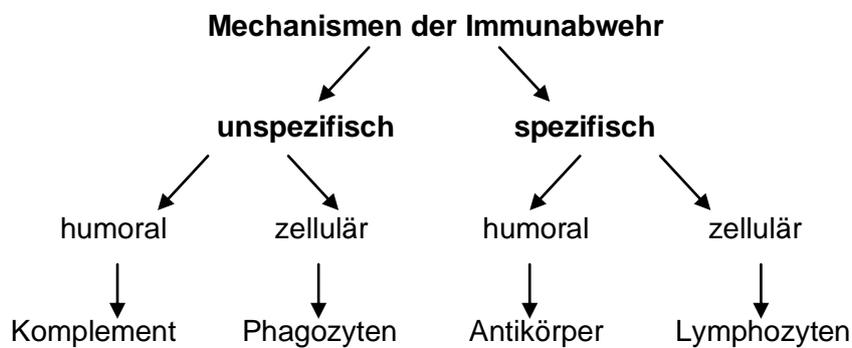
Die entscheidende Gemeinsamkeit beider Entwicklungsprozesse ist die abgeschirmte, antigenunabhängige Entwicklung der Lymphozyten.

#### I.1.2.2.2 Sekundäre lymphatische Organe

Im Gegensatz zu den primären, immunologisch abgeschirmten Organen stehen die sekundären Organe. Durch Kontakt mit antigenen Strukturen werden die Lymphozyten stimuliert und reifen spezifisch aus. Die Antigene werden dafür zumeist über mononukleäre Zellen verarbeitet und präsentiert (vgl. I.1.3.1.2), so dass einerseits B- Lymphozyten zu AK produzierenden Plasmazellen, andererseits T- Lymphozyten ausdifferenzieren. Neben den Lymphknoten übernehmen auch kapselfreie Gewebe, die an Stellen vermehrten Antigenkontaktes auftre-

ten, die Aufgabe der Lymphozytenausreifung. Hierzu zählen die Tonsillen des Waldeyer'scher Rachenrings, die Peyer'schen Plaques in der gastrointestinalen Schleimhaut als MALT (**m**ucosa **a**ssociated **l**ymphatic **t**issue) sowie die Milz. Analog den Lymphknoten lassen sich bei mikroskopischer Betrachtung in der Milz rundliche lymphozytenangereicherte Bezirke in primärem, d.h. unstimuliertem Zustand von Sekundärfollikeln als Ansammlung aktivierter Lymphozyten ausmachen.

### I.1.3 Mechanismen des Immunsystems



**Abb. 3:** Schematische Darstellung der einzelnen Abwehrmechanismen des Immunsystems und der zentralen Effektoren

#### **I.1.3.1 Unspezifische Immunabwehr**

Die einfachste Form der Immunantwort, die unspezifische Immunabwehr, zeichnet sich durch schnell einsetzende, jedoch unspezifische Reaktionsmuster aus. Wichtig ist weniger die vollständige Elimination der Krankheitserreger, sondern deren einstweilige Eindämmung, um den spezifischen Systemen (vgl. I.1.3.2) Zeit zur Entwicklung und Proliferation zu geben. Man unterscheidet das Komplementsystem vom mononukleär-phagozytären System.

##### I.1.3.1.1 Komplementsystem

Im Gegensatz zu den anderen Mechanismen wirkt das Komplement nicht über die Aktivität von Zellen, sondern als humorales Effektorsystem über eine sequenzielle Kaskade von ca. 20 Serumproteinen (vgl. Abb. 3). Diese mündet in einer Opsonierung oder direkten Lyse von Zellen. Daneben findet eine Aktivie-

nung von Zielzellen wie z.B. von Makrophagen statt. Die Aktivierung des Systems erfolgt entweder über AG/AK- Komplexe als klassischer Weg oder alternativ über eine direkte Wirkung auf bakterielle Strukturen.

#### I.1.3.1.2 System der mononukleären Phagozyten

Im Blut als Monozyten bezeichnet sind diese einkernigen Zellen in den verschiedensten Geweben des menschlichen Körpers anzutreffen – als Alveolar-makrophagen in der Lunge, als Langerhanszellen in der Haut oder als Makrophagen in den sekundären lymphatischen Organen (vgl. I.1.2.2.2). Vor allem durch lokale Entzündungsreize aktiviert, wandern die MHC- II präsentierende Zellen (vgl. I.2.2.2) als primäre zelluläre Abwehr zum Infektionsherd. Auf die Phagozytose, die intrazelluläre Aufnahme der Mikroorganismen, folgt die Sezernierung von Lysozym oder ähnlichen Enzymen zu deren Lyse. Antigene aus phagozytierten Partikeln werden nach einer intrazellulären Fragmentierung durch Proteolyse über MHC- II- Moleküle an der Oberfläche der Makrophagen als antigenpräsentierende Zellen exprimiert. Über eine Aktivierung von  $CD4^+$  T-Helfer- Zellen (vgl. I.4) entsteht die Quervernetzung zur spezifischen Immunabwehr, um eine selektive Elimination der Fremdorganismen einzuleiten.

Die Antigenpräsentation auf zellulären Oberflächenmolekülen körpereigener Zellen ist ein entscheidendes Werkzeug in der Verarbeitung von Antigenen durch den menschlichen Körper. Auf dieses Prinzip wird im Rahmen dieser Dissertation wiederholt Bezug genommen.

#### **I.1.3.2 Spezifische Immunabwehr**

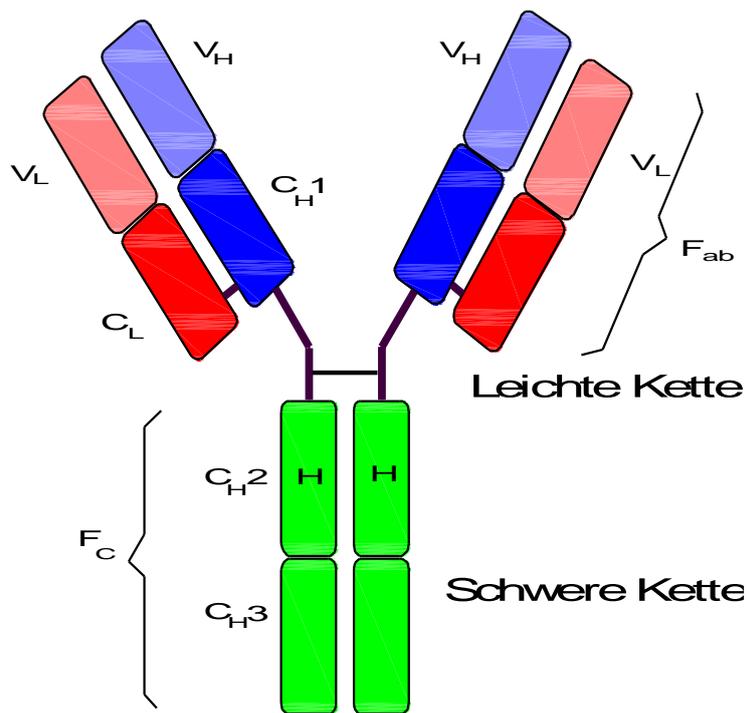
Auch die spezifische Immunantwort stützt sich auf humorale (AK) sowie zelluläre Komponenten (Lymphozyten). Da jedoch sehr selektiv und gezielt auf ein einzelnes Pathogen reagiert wird, benötigt die spezifische Immunantwort Zeit. zur Bildung spezialisierter Zellen und AK. Das Immunsystem muss täglich neue Reaktionsmuster erlernen und diese Form der Abwehr im Laufe des Lebens fortwährend entwickeln und ausbauen. Im Unterschied zur unspezifischen Immunabwehr mit nahezu vollem Potential bereits zum Zeitpunkt der Geburt werden die spezifischen Reaktionsmuster als erworben bezeichnet.

### I.1.3.2.1 Antikörper

#### I.1.3.2.1.1 Aufbau und Klassifikation

Hauptbestandteil des humanen, spezifischen humoralen System sind die als Immunglobuline bezeichneten Serumproteine, die sich in der Elektrophorese der Blutproteine in der  $\gamma$ -Fraktion nachweisen lassen. Prinzipiell besteht jeder

AK bzw. jede AK- Unter- einheit einerseits aus zwei identischen, kurzen Proteinketten mit einer Länge von 220 AS und einem Gewicht von 25 kDa, den leichten bzw. L(ight)-Ketten. Diese werden ergänzt durch zwei identische, schwere oder H(eavy)-Ketten aus ca. 440 bzw. 550 AS mit einem MG von 50 - 70 kDa. Jeweils eine schwe-



re und eine leichte Kette sowie je zwei schwere sind über Disulfidbrücken kovalent miteinander verbunden (vgl. Abb. 4). Neben zwei unterschiedli-

chen, mit  $\kappa$  und  $\lambda$  bezeichneten L-Ketten existieren fünf H- Ketten ( $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\alpha$ ,  $\epsilon$ ,  $\delta$ ). Nach diesen sind die AK in fünf Klassen eingeteilt und werden mit IgG ( $\gamma$ ), IgM ( $\mu$ ),

**Abb. 4:** Schematischer Aufbau eines Antikörpers

Die insgesamt 12 Balken symbolisieren in ihrer Gesamtheit den Y-förmigen AK, hier am Beispiel eines IgG. Farblich abgehoben sind die verschiedenen Domänen des AK aus je 110 AS. Die Verbindung der einzelnen Domänen erfolgt entweder direkt als fortlaufende AS-Kette (zwischen  $C_H1$  und  $C_H2$ ) oder zwischen den Ketten über Disulfidbrücken. Die Kombination verschiedener Domänen ergibt die jeweiligen AK-Fragmente, auf die im Folgenden eingegangen wird:

Balken:

dunkelrot ( $C_L$ ) + hellrot ( $V_L$ )  
 dunkelblau ( $C_H1$ ) + hellblau ( $V_H$ )  
 + grün ( $C_H2, C_H3$ )  
 dunkelrot ( $C_L$ )  
 hellrot ( $V_L$ )  
 dunkelblau ( $C_H1$ )  
 hellblau ( $V_H$ )  
 dunkelblau ( $C_H1$ ) + hellblau ( $V_H$ )  
 + dunkelrot ( $C_L$ ) + hellrot ( $V_L$ )  
 grün ( $C_H2, C_H3$ )  
 hellrot ( $V_L$ ) + hellblau ( $V_H$ )  
 Striche schwarz

Fragment:

leichte Kette (L-chain)  
 schwere Kette  
 konstante Region leichte Kette  
 variable Region leichte Kette  
 $C_H1$ - Region  
 variable Region schwere Kette  
 Fab-Fragment  
 Fc- Fragment  
 Antigen- Bindungsstelle  
 Disulfidbrücken

IgA ( $\alpha$ ) IgE ( $\epsilon$ ) bzw. IgD ( $\delta$ ) bezeichnet. Für AK der Klasse IgG bzw. IgA existieren mit  $\gamma 1 - \gamma 4$  vier bzw. mit  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  zwei verschiedene H- Ketten. Bereiche von ca. 110 AS sowohl der L- als auch der H- Kette bilden durch ihre strukturelle Ähnlichkeit je eine Domäne, doch nur die aminoterminalen Domäne jeder Kette unterliegt einer großen Variabilität. Diese ähnlich der des MHC- Komplexes (vgl. I.2.2) und führt zur immensen Diversivität der AK und damit zur Reaktionsfähigkeit mit einer endlos erscheinenden Anzahl antigen wirkender Strukturen. Hieraus folgt, dass Antigene stets über die variablen Regionen der L- und H- Ketten ( $V_L$  bzw.  $V_H$ ) gebunden werden, während die anderen 110 bzw. 330/ 440 AS der L-/ H- Kette als eine bzw. 3/ 4 konstante Domänen ( $C_L$  bzw.  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}/ C_{H4}$ ) bei AK gleicher Klassen übereinstimmen und komplett identisch sind. Die Behandlung eines Immunglobulins der Klasse IgG mit dem Enzym Papain bewirkt die Spaltung der H-Ketten in der Gelenkregion zwischen  $C_{H1}$  und  $C_{H2}$ , so dass der AK in drei Teile zerfällt. Einerseits ergibt sich das Fc- Fragment (fragment crystalizable), andererseits zwei zueinander identische, jedoch von AK zu AK sehr differente Fab- Fragmente (fragment antigen binding), die aus einer kompletten L- Kette sowie den  $V_H$ - und  $C_{H1}$ - Domänen der H- Kette gebildet werden. Während das Fab- Fragment die variablen, antigenspezifischen Anteile des Immunglobulins enthält, ist das unspezifische Fc-Fragment aus den  $C_{H2}$ - und  $C_{H3}$ - Regionen der H-Kette für die Bindung der Komplementfaktoren (IgG, IgM) an der Zellmembran (IgD, IgE) verantwortlich.

#### *1.1.3.2.1.2 Monoklonale Antikörper*

Plasmazellen als ausdifferenzierte B- Lymphozyten produzieren AK je einer Klasse und Spezifität. Die Gesamtheit aller AK einer Zelle mit identischem Aufbau, Affinität und Spezifität für ein homologes Antigen werden als monoklonal bezeichnet. Zur Verifizierung der Identität ist die Analyse der antigenbindenden, N- terminalen AS- Sequenz notwendig (vgl. Abb. 4, Region  $V_L$  und  $V_H$ ).

Nachdem Milstein, Köhler und Jerne<sup>3</sup> als Erstbeschreiber dieser AK 1984 den Nobelpreis erhielten<sup>4</sup>, stellen mAK heutzutage das zentrale Werkzeug im immunologischen Labor in Analysen wie ELISA, FACS, usw. (vgl. II.5.3) dar.

<sup>3</sup> Köhler G., Milstein C. 1975

<sup>4</sup> [www.nobelprize.org](http://www.nobelprize.org)

Daneben kommen sie in der medizinischen Diagnostik in unzähligen Spezial- sowie Routineuntersuchungen als entscheidendes Agens zum Einsatz. Darüber hinaus werden mAK nichthumanen Ursprungs in humanisierter oder äquivalenter veränderter Form in vielen medizinischen Bereichen als effektive Medikamente eingesetzt wie z.B. bei verschiedensten malignen oder zur Therapie rheumatologischer oder immunologischer Erkrankungen.

#### *1.1.3.2.1.3 Polyklonale Antikörper*

Der Organismus reagiert auf eine fremdartige Struktur mit einer vielschichtigen, möglichst variablen, andererseits jedoch speziell auf die Zielstruktur zugeschnittenen Immunantwort. Diese Reaktion des Immunsystems ist gegen verschiedenste Einzelkomponenten der Gesamtstruktur gerichtet (Epitope), so dass eine Vielzahl von AK unterschiedlicher Spezifität und Affinität hervorgebracht werden. Diese Reaktionskaskade wird im Gegensatz zur oben beschriebenen Monoklonalität mit singulärer Spezifität als polyklonal bezeichnet.

#### *1.1.3.2.1.4 Antikörperklassen und deren Aufgaben*

Als primäres Reaktionsschema ruft die polyklonale Immunabwehr AK der Klasse IgM hervor, die als pentamere Polypeptide aus fünf Einzel- AK bestehen und eine rasche Antigenbindung und -agglutination erzielen. Zeitverzögert werden als Sekundärantwort IgG Monomer- AK gebildet, die im Weiteren als immunologisches Gedächtnis fungieren und neben der Präzipitation vor allem für die Opsonierung der Antigene verantwortlich sind. Die dimeren IgA AK treten als lokale Abwehr v.a. in Sekreten des Gastrointestinal-, Tracheobronchial- und Urogenitaltraktes auf. Monomere AK der Klasse IgD dienen B- Zellen als membranständiger Antigenrezeptor. Ebenfalls membranständig, jedoch v.a. auf eosinophilen und basophilen Granulozyten sowie Mastzellen exprimiert, erfüllen IgE AK u.a. ihre zentrale Rolle bei allergischen Reaktionen vom Soforttyp zur Abwehr pathogener Würmer. Reagiert ein AK neben dem homologen Antigen, gegen das seine Spezifität ursprünglich gerichtet war, zusätzlich mit weiteren Epitopen, wird dies als Kreuzreaktivität bezeichnet.

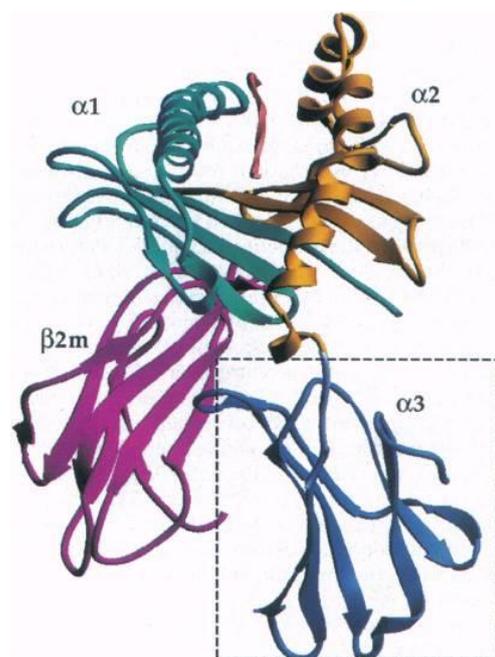
### I.1.3.2.2 T- Lymphozyten

Das komplexe System der spezifischen Immunabwehr auf zellulärer Ebene durch die T- Lymphozyten wird in Kapitel I.4 ausführlich dargestellt.

## I.2. Der Haupt- Histokompatibilitäts- Komplex

### I.2.1 Geschichte und Überblick

Seit dem 3. Jahrhundert nach Christus sind Versuche dokumentarisch belegt, Organe bis hin zu ganzen Organen von Mensch zu Mensch oder von Tier zu Mensch zu verpflanzen. Diese Übertragungen misslangen allerdings stets. Erst 1958 entdeckte der Arzt und spätere Nobelpreisträger Jean Dausset die entscheidenden Strukturen, die über Angehen oder Abstoßung eines Transplantates entscheiden<sup>5</sup>. Diese Transplantationsantigene spielen „die“ zentrale Rolle in der Zellinteraktion und werden deshalb heute als Haupt-Histokompatibilitäts- Komplex bzw. MHC (**m**ajor **h**istocompatibility **c**omplex) bezeichnet. Da sie im menschlichen Organismus vor allem auf Leukozyten exprimiert werden, hat sich hierfür der Begriff HLA (**h**uman **l**eukocyte **a**ntigen) etabliert<sup>6,7</sup>. Die Erkenntnisse von Dausset ermöglichten bereits im Folgejahr die Transplantation einer Niere von einem eineiigen Zwilling auf dessen Geschwister. Durch die identische HLA-Konstellation beider wurde Abstoßungsreaktionen



**Abb. 5:** Kristalline Struktur des MHC Klasse I- Komplexes mit Darstellung der einzelnen Domänen ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  und  $\alpha 3$  sowie  $\beta 2m$ ) in unterschiedlicher Farbgebung (aus Collins E.J. et al., 1995)

<sup>5</sup> www.nobelprize.org

<sup>6</sup> Dausset J. 1981

<sup>7</sup> Marsh S.G. et al. 2005

minimiert und bereits vom damaligen Zeitpunkt ausgehend ein Überleben bei der Zwillingsgeschwister von über 20 Jahren erreicht.

Heutzutage basiert die gesamte Transplantationsmedizin, sowohl von soliden Organen als auch von Knochenmark bzw. hämatopoetischen Stammzellen, auf den Kenntnissen über diese HLA- Allele.

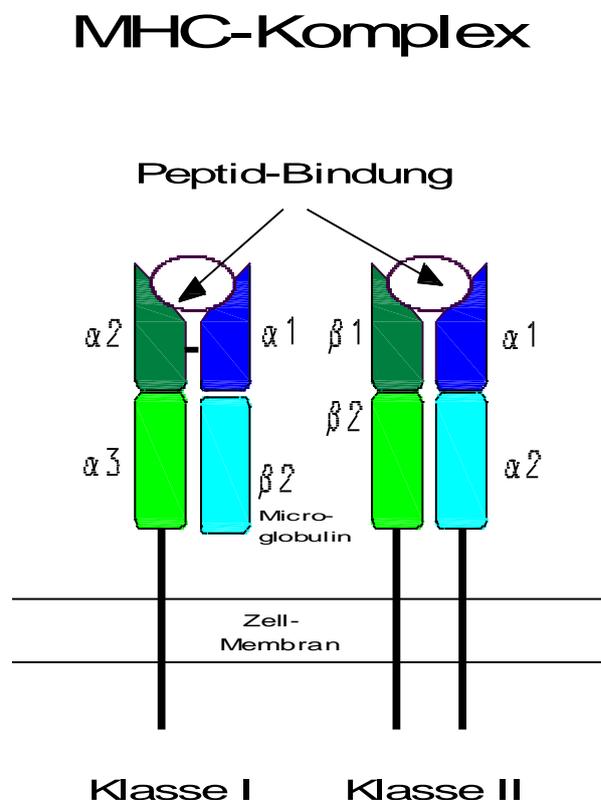
## I.2.2 Aufbau des MHC- Komplexes

Grundsätzlich lässt sich die Gruppe der MHC- Moleküle in zwei, mit I und II bezeichnete Klassen unterteilen. MHC-I- Komplexe sind auf allen kernhaltigen Zellen, mit höchster Expression auf hämatopoetischen Zellen, zu finden. MHC-II- Komplexe hingegen kommen vor allem auf B- Lymphozyten (vgl. I.4), antigenpräsentierenden Zellen wie Makrophagen und dendritischen Zellen, einigen T-Lymphozyten sowie Endothelzellen vor. Ähnlich dem Fab- Fragment der AK (vgl. I.1.3.2.1.1) bestehen beide MHC- Komplexe aus je zwei Proteinketten mit insgesamt vier Domänen (vgl. Abb. 4, 6)<sup>8</sup>.

**Abb. 6:** Schematischer Aufbau der MHC- Komplexe: Klasse I (links) und II (rechts)

MHC- Klasse I: Schwere Kette mit den intrazellulären und transmembranären Anteilen (schwarzer Strich) sowie den extrazellulären Domänen  $\alpha 1$  (dunkelblauer Balken),  $\alpha 2$  (dunkelgrüner Balken),  $\alpha 3$  (hellgrüner Balken). Der hellblaue Balken symbolisiert das nicht kovalent gebundene  $\beta 2$ -Microglobulin. Im eingekerbten Bereich zwischen  $\alpha 1/ \alpha 2$  erfolgt die Bindung des Peptids

MHC- Klasse II: Symmetrisches Heterodimer aus zwei transmembranären Ketten:  $\alpha$ -Kette mit den intrazellulären und transmembranären Anteilen (schwarzer Strich) sowie den extrazellulären Domänen  $\alpha 1$  (dunkelblauer Balken) und  $\alpha 2$  (hellblauer Balken);  $\beta$ -Kette analog der  $\alpha$ -Kette mit den intrazellulären und transmembranären Anteilen (schwarzer Strich) sowie den extrazellulären Domänen  $\beta 1$  (dunkelgrüner Balken) und  $\beta 2$  (hellgrüner Balken)

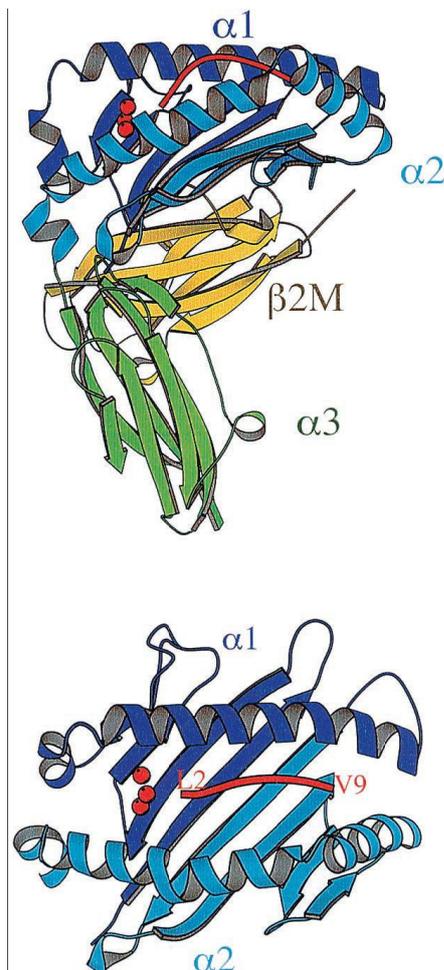


<sup>8</sup> Collins E.J. et al. 1995

### I.2.2.1 MHC- Klasse I

Der MHC I- Komplex besteht aus einer 45 kDa schweren  $\alpha$ - Kette, die drei extrazelluläre Domänen à 90 AS ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ), eine 40 AS lange transmembrane sowie eine 30 AS lange zytoplasmatische Region umfasst, sowie aus dem nicht kovalent gebundenen, 12 kDa schweren  $\beta 2$ - Microglobulin (vgl. Abb. 6, 7).

Die Bindung eines Antigens erfolgt als 8 - 10 AS langes Peptid über Bereiche der  $\alpha 1$ - und  $\alpha 2$ - Domäne<sup>9</sup>. Hierzu bildet der MHC-I- Komplex eine taschenförmige Vertiefung, in die sich das Peptid in ausgestreckter Form exakt einfügt (vgl. Abb.7)<sup>10,11,12</sup>. Die Voraussetzungen, die zur Bindung eines Peptides in dieser Tasche gegeben sein müssen sowie hieraus resultierende Bindungsspezifitäten und -stabilitäten werden separat dargestellt (vgl. I.6). Im Verlauf der Jahre konnten viele verschiedene MHC- I- Komplexe mit unterschiedlichen bindenden



Peptiden kristallisiert und ihre dreidimensionale Struktur dargestellt werden<sup>13</sup>.

#### Abb. 7:

**Oberer Bildabschnitt:** Seitliche Darstellung der kristallinen Struktur des MHC-I- Komplexes (aus Khan et al. 2000)

$\alpha 1$ -Domäne	dunkelblau
$\alpha 2$ -Domäne	mittelblau
$\alpha 3$ -Domäne	grün
Beta-2-Microglob. $\beta 2M$	gelb
Gebund. Peptidligand	rötlich geschlängelte Struktur

**Unterer Bildabschnitt:** Ansicht des MHC-Komplexes von oben mit Aufsicht auf die extrazelluläre Region des Moleküls. In lang gestreckter Form ist in roter Farbe mit L2 und V9 das gebundene Peptid in der Bindungsmulde dargestellt. Die Bindungsmulde besteht aus Faltblattstrukturen am Boden (breite Pfeilstrukturen) sowie Helices als seitliche Begrenzung der Ligantentasche. Durch die gebogene Form der Helices entsteht zudem eine Begrenzung der Taschen in ihrer Längsausdehnung – im Bild links- sowie rechtsseitig. Die Bindung des Peptides (rötlich gestreckte Struktur) erfolgt beim hier gezeigten HLA-A2-Ligand über Leucin an Peptidposition 2 (L2, links) und Valin an Position 9 (V9, rechts).

<sup>9</sup> Rammensee H.-G. et al. 1993

<sup>10</sup> Bjorkman P.J. et al. 1987

<sup>11</sup> Garrett T.P.J. et al. 1989

<sup>12</sup> Khan et al. 2000

<sup>13</sup> Jones E.Y. 1997

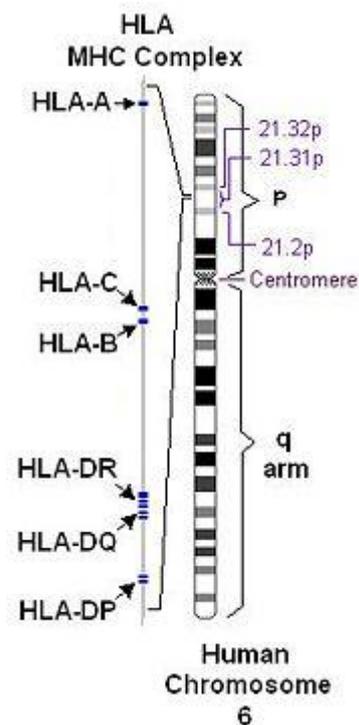
### I.2.2.2 MHC- Klasse II

Im Unterschied zu den asymmetrisch strukturierten MHC-I- Molekülen sind die Komplexe der Klasse II symmetrische Heterodimere (vgl. Abb. 6). Sie werden aus den zwei Polypeptidketten  $\alpha$  und  $\beta$  mit einem MG von 30 - 33 kDa bzw. 27 - 29 kDa gebildet. Beide Ketten bestehen aus zwei Domänen mit einer Länge von ca. 90 AS ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  bzw.  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ), einer 30 AS langen Transmembranregion sowie einer kurzen zytoplasmatischen Region. Die Peptidbindungsstelle der MHC-II- Moleküle liegt im Bereich der  $\alpha 1$ - und  $\beta 1$ -Domäne, bei den MHC-I-Komplexen zwischen der  $\alpha 1$ - und  $\alpha 2$ - Domäne. Durch die beidseits offene Taschenstruktur können auch Peptide von bis zu 20 AS Länge gebunden werden.

### I.2.3 Genetik des MHC

Während der als H-2 bezeichnete MHC- Komplex der Maus auf Chromosom 17 liegt, sind die Gene, die für die unterschiedlichen menschlichen MHC- Moleküle kodieren, auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 aneinandergereiht<sup>14</sup>. Es existieren je drei kodominant exprimierte Gene, die für die schwere Kette des MHC- I- Komplexes (HLA -A, -B und -C) kodieren. Weiter zentromer folgen die Gene der Klasse II für die drei Komplexe HLA -DR, -DP und -DQ mit zwei  $\alpha$ - und  $\beta$ - Ketten sowie einer zusätzlichen  $\beta_3$ - Kette im Bereich des HLA- DR- Gens (vgl. Abb. 8)<sup>15</sup>.

Neben diesen bedeutendsten MHC- Komplexen existieren beim Menschen eine Anzahl Klasse I- bzw. II- Komplexe wie z.B. HLA- C, -E, -F, -G sowie weitere, die ebenfalls in diesem Bereich des



**Abb. 8:** Das Chromosom 6 des Menschen  
Rechtsseitig ist der übliche Aufbau des Chromosoms mit Zentromer (Centromere), kurzem (p-) und langem (q-) Arm gezeigt. Linksseitig ist die Region 21.31p/.32p vergrößert dargestellt und illustriert die Aneinanderreihung der korrelierenden Genabschnitte für die einzelnen MHC-Komplexe

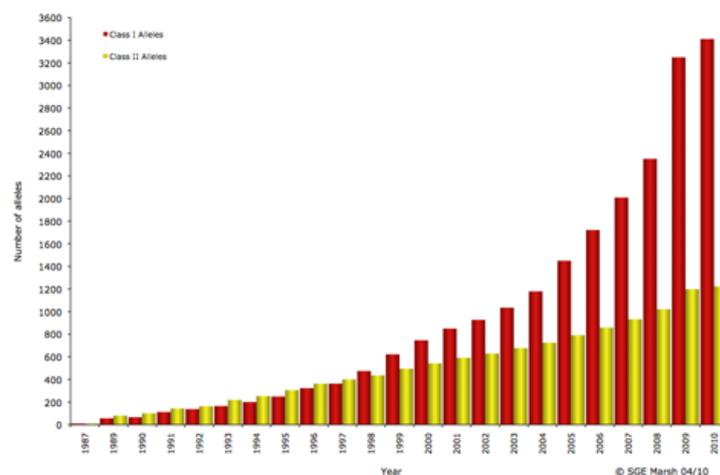
<sup>14</sup> Mungall A.J. et al. 2003

<sup>15</sup> www.wikipedia.org

Chromosom 6 kodiert werden (vgl. Abb. 9)<sup>16,17,18</sup>. Hiervon komplett getrennt liegt das Gen für das  $\beta$ 2- Mikroglobulin als einziger Part der MHC kodierenden Gene auf Chromosom 15.

Während das Wissen zu einigen HLA- Antigenen bislang sehr beschränkt, ihre Rolle in der Antigenprozessierung weitestgehend unklar ist und über andere Funktionen der Komplexe nur rudimentäre Kenntnisse vorliegen, nimmt das Wissen um die zentralen MHC- I- Antigene HLA -A, -B und -C mit stetiger Detektion neuer Allele rasch zu. Abb. 9 veranschaulicht diese beinahe exponentielle Entwicklung der Identifikation menschlichen Klasse I und II Antigene bzw. Allele<sup>19</sup>.

Diese immense Anzahl verschiedenener HLA- Allele (vgl. Tab. 1), basierend auf dem großen Polymorphismus der entsprechenden Gene, führt bei gleichzeitig bestehender Kodominanz der Gene und Expres-



**Abb. 9:** Zeitlicher Verlauf der Identifikation von HLA- Allelen

Ordinate: Absolute Anzahl bekannter Antigene/ Allele

Abszisse: Zeitachse [Jahre]

Farbgebung gemäß abgebildeter Legende<sup>17</sup>

sion sowohl von maternal als auch paternal tradierten Genen zur großen interindividuellen Variation der HLA- Muster und damit der menschlichen Individualität. Zwar bestehen deutliche lokale Häufungen verschiedener HLA- Allele wie z.B. das HLA- A\*02- Allel in der kaukasischen Bevölkerung. Während viele der bekannten HLA- Allele in der Weltbevölkerung in einem nur verschwindend geringen Prozentsatz zu finden sind, ist jedoch nicht im Entferntesten zu erahnen, welche Kombinationsvielfalt der einzelnen Allele besteht und konsekutiv zur Einzigartigkeit eines jeden Individuums beiträgt. Eine aktuelle Auflistung aller

<sup>16</sup> Robinson J. et al. 2000

<sup>17</sup> [www.ebi.ac.uk/imgt/hla](http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla)

<sup>18</sup> [www.anthonynolan.org.uk](http://www.anthonynolan.org.uk)

<sup>19</sup> Schreuder G.M. et al. 2005a-c

HLA- Allele ist im Internet der IMGT/HLA- Datenbank zu entnehmen<sup>13,20</sup>. Im Juni 2010 waren insgesamt 3411 HLA Klasse I-, 1222 HLA Klasse II- und 110 weitere non- HLA- Allele bekannt.

Im Umkehrschluss lässt sich annähernd erahnen, welche Schwierigkeiten sich durch die Vielfalt der Allele für die Transplantationsmedizin auf der Suche nach passen-

		HLA Klasse I									
Gene	A	B	C	E	F	G					
Allele	1001	1605	690	9	21	46					
Proteine	739	1268	513	3	4	15					
		HLA Klasse I - Pseudogene									
Gene	H	J	K	L	P	T	U	V	W	X	
Allele	129	9	6	5	4	0	0	3	0	0	
Proteine	00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

**Tab. 1:** Häufigkeit der einzelnen Allele der MHC Klasse I- Komplexe des Menschen, Stand 07/2010 (adaptiert aus der IMGT/HLA- Sequenzdatenbank<sup>17</sup>)

den Knochenmark- bzw. Stammzellspendern ergeben. Zur Stammzelltransplantation werden deshalb 5 Antigene bzw. 10 Allele (HLA- A, -B, -Cw, -DR, -DQ) herangezogen, die als am stärksten immunogen wirkende Strukturen übereinstimmen sollten.

## I.2.4 Aufgaben der MHC- Komplexe

Bereits in Kapitel I.1.1 wurde auf die herausragende Leistung des menschlichen Immunsystems abgehoben. Da die unterschiedlichen MHC- Komplexe als Oberflächenstrukturen eine zentrale Rolle in der Abwehr fremder Organismen spielen, soll im Folgenden kurz auf ihre Funktion eingegangen werden.

Bei Infektionen des menschlichen Organismus kann prinzipiell zwischen Pathogenen unterschieden werden, die die Zellmembran überwinden, intrazellulär leben und sich dort vermehren wie z.B. Viren, intrazelluläre Bakterien oder Protozoen. Demgegenüber stehen Pathogenen, die sich im inter- bzw. extrazellulären Raum aufhalten und den Organismus von dort aus attackieren.

Während die Bekämpfung letzterer über Mechanismen der unspezifischen Immunabwehr durch Komplementaktivierung, durch mononukleäre Phagozyten sowie AK erfolgt und über v.a. über Klasse II- Moleküle vermittelt werden (vgl.

<sup>20</sup> Robinson J. et al. 2003

I.2.2.2), treten bei der Bewältigung intrazellulärer Pathogene die MHC- Moleküle der Klasse I in den Vordergrund. Im Hinblick auf das Thema dieser Dissertation werden die hierbei ablaufenden Prozesse genauer betrachtet.

Da fremde Antigene von Lymphozyten nicht als isolierte Einzelfaktoren, sondern nur in Verbindung mit körpereigenen Strukturen erkannt werden können, stellt das MHC- Molekül die zentrale Einheit in der Antigenerkennung dar. Nach intrazellulärer Prozessierung (vgl. I.3) werden die Antigene als kurze, an die MHC- Komplexe gebundene Peptide unterschiedlicher Länge an der Zelloberfläche präsentiert (vgl. Abb. 6, 7). Es resultiert die Bildung und Aktivierung spezifischer Lymphozyten<sup>21</sup> mithilfe kostimulatorischer Faktoren wie z.B. Zytokinen, die als antigenunspezifische, interzelluläre Effektorsubstanzen auto-, para- und endokrin wirken.

MHC- I- Komplexe präsentieren üblicherweise Peptide intrazellulärer Partikel und aktivieren das Immunsystem zur Bekämpfung intrazellulärer Organismen, während die Abwehr extrazellulärer Erreger über die Peptidpräsentation auf MHC- Molekülen der Klasse II erfolgt. Hier muss betont werden, dass durch Redundanz bzw. alternative Reaktionsmuster wie z.B. dem crosspriming eine strikte Trennung beiden Prinzipien nur der vereinfachten Didaktik dient, jedoch nicht die Komplexität des Gesamtsystems der menschlichen Immunabwehr erfasst.

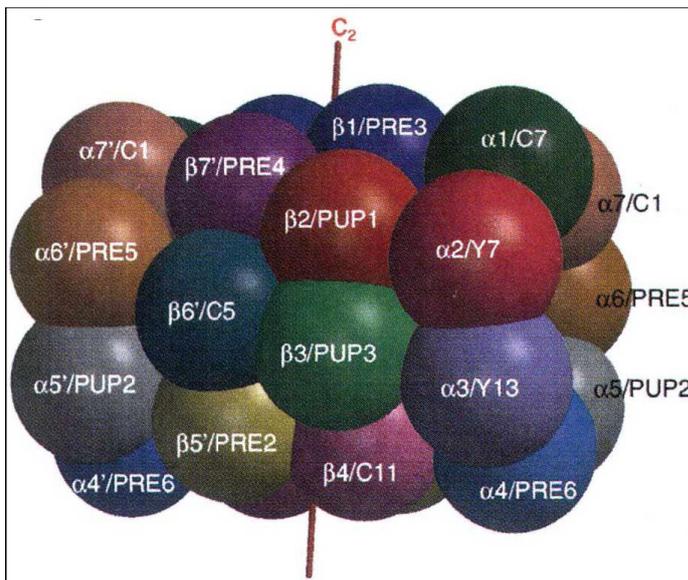
## **I.3. Die Antigenprozessierung**

### **I.3.1 Antigendegradation**

Ein entscheidender Faktor für die Stabilität der MHC Komplexe ist die Bindung der Peptidliganden, die über ein hochspezifisches und äußerst effizientes Degradationssystem mithilfe spezieller Proteine generiert werden. Dabei werden die Liganden aus zytosolisch lokalisierten Proteinen zelleigenen Ursprungs ebenso gebildet wie aus Peptiden fremder Organismen, speziell aus intrazellulären viralen, bakteriellen, fungalen oder protozoalen Proteinen. Auch falsch

---

<sup>21</sup> Bevan M.J. et al. 1995



**Abb. 10:** Dreidimensionales Strukturschema eines Proteasoms der Hefe mit einer Auflösung von etwa 2,4 Å (aus Groll et al. 1997)

In quasi liegender Position lassen sich die aus kugelförmigen Untereinheiten aufgebauten Ringe voneinander abgrenzen. Von links nach rechts folgen ein  $\alpha$ -Ring (hier mit den Untereinheiten  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$  und  $\alpha 7$ ), zwei  $\beta$ -Ringe mit  $\beta 7$ ,  $\beta 6$  und  $\beta 5$  sowie  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$  und  $\beta 4$  und ein weiterer  $\alpha$ -Ring. Bei letzterem sind sämtliche sieben  $\alpha$ -Untereinheiten abzugrenzen.

vermutet, notwendig zu sein<sup>24</sup>. Zur Degradierung wird das Protein durch die Ringe des Proteasoms geschleust und über die katalytischen Enzyme der  $\beta$ -Untereinheiten gespalten. Die Substitution gewisser  $\beta$ -Untereinheiten durch Proteine wie z.B. LMP2, LMP7 oder MECL-1 führt unter Einfluss von  $\gamma$ -IFN zu einem veränderten Schnittmuster<sup>25</sup> und konsekutiv zur differentiellen Antigenverarbeitung. Ähnliche Effekte bewirken zusätzliche Ringproteine wie z.B. PA28, die beidseitig an das Proteasom binden und zu einer gesteigerten Proteolyse intrazellulärer Proteine führen<sup>26</sup>. Eine veränderte Antigenprozessierung ist teilweise auch für eine effektive Tumorkontrolle notwendig<sup>27</sup>.

translatierte Proteine oder Moleküle tumorös entarteter Zellen werden zu Peptiden degradiert. Eine zentrale Rolle in diesem Prozess spielt das Proteasom, eine ATP-abhängige, multikatalytische Protease<sup>22</sup>, die als tonnenförmige 20S Einheit aus vier Ringen à sieben  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Untereinheiten in der Anordnung  $\alpha$ - $\beta$ - $\beta$ - $\alpha$  aufgebaut ist<sup>23</sup>.

Hierbei scheint die Ubiquitinierung als Konjugation von Ubiquitin an Lysinreste der Proteine zur Proteinstabilisierung nicht, wie zeitweise

<sup>22</sup> Rock K.L. et al. 1994

<sup>23</sup> Groll et al. 1997

<sup>24</sup> Lecker S.H. et al. 2006

<sup>25</sup> Kuckelkorn U. et al. 1995

<sup>26</sup> Groettrup M. et al. 1995

<sup>27</sup> Schultz E.S. et al. 2002

### **I.3.2 Peptidtransport**

Um das Peptid nach dessen Generierung an den MHC- Komplex zu binden, muss der Ligand in das endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert werden. Meistens erfolgt dies ATP- abhängig durch den heterodimeren TAP- Komplex (transporter associated with antigen processing).

### **I.3.3 Bildung des MHC- I- Komplexes**

Im ER wird der MHC- I- Komplex aus  $\alpha$ - Kette,  $\beta$ 2- Microglobulin und einem Peptid mithilfe von „Anstandsdamen“, den Chaperonen wie z.B. Calnexin, zusammengesetzt. Nach nicht kovalenter Bindung an die Calnexin assoziierte  $\alpha$ - Kette wird Calnexin durch Calreticulin, ein anderes Chaperon, ersetzt. Über Tapasin, ein weiteres, prolinreiches Peptid, bindet TAP und übernimmt den MHC- Komplex von Calreticulin. An TAP gebunden fügt sich das passende Peptid in die Ligantentasche ein und stabilisiert den Komplex<sup>28,29</sup>. Daneben scheinen im äußerst komplexen und hier nur skizzierten Prozess der MHC- I- Komplexbildung auch die Chaperone gp96 und Hsp70 eine Rolle bei der Peptidbeladung zu spielen<sup>30</sup>. Zudem scheint auch eine TAP- unabhängige Ligandenbildung möglich zu sein<sup>31</sup>. Versuche an Bakterien bestätigten trotz der Vielzahl beteiligter Moleküle die Effizienz der Prozessierung der MHC- I- Antigene<sup>32</sup>.

## **I.4. Die T- Lymphozyten**

T- Lymphozyten stellen die Vertreter der erworbenen spezifischen Immunabwehr dar und umfassen die zentralen Regulationseinheiten sowie die spezifischen Effektoren des Immunsystems. Sie ermöglichen nicht nur die gezielte zelluläre Immunantwort, sondern daneben auch unzählige weitere Prozesse der

---

<sup>28</sup> Ortmann B. et al. 1994

<sup>29</sup> Suh W. K. et al. 1994

<sup>30</sup> Udono H. et al. 1993

<sup>31</sup> Weinzierl A.O. et al. 2008

<sup>32</sup> Villanueva M.S. et al. 1994

Immunabwehr und gewährleisten, dass alle Abläufe gezielt und effektiv, kontrolliert und geregelt, dosiert und adaptiert, also „in den richtigen Bahnen“ verlaufen. Nach Reifungsprozessen in Thymus und den sekundären lymphatischen Organen (vgl. I.1.2.2.1, I.1.2.2.2) verfügen die T- Lymphozyten über diese spezifischen Fähigkeiten. Auf diese T- Zell- vermittelten Immunphänomene, den Aufbau, die Einteilung und die Funktion der T- Zellen soll im Folgenden genauer eingegangen werden.

#### I.4.1 Funktion der T- Lymphozyten

Die Reaktionsmuster der Lymphozyten sind vielfältig. T- Zellen regulieren die Abwehr und Abtötung intrazellulärer Keime wie z.B. Bakterien. Sie führen zur Eliminierung virusinfizierter Zellen und beeinflussen über die Stimulation von B- Zellen die spezifische humorale Immunität. T- Zellen erkennen veränderte Zellen und leiten die selektive Destruktion möglicher tumorös entarteter Zellen ein. Sie vermitteln die allergische Reaktion vom verzögerten Typ und führen zur Organabstoßung nach allogener Transplantation.

Auf ihre entscheidende Rolle in der Tumorgenese, -überwachung und -eliminierung wird sich die

Dissertation konzentrieren.

Hierbei wird allerdings weniger die T-Zell-Reaktion

selbst analysiert, vielmehr sollen

Strukturen definiert werden, die

als Stimulus zur

konsekutiven T- Zell- Aktivierung beitragen können.



**Abb. 11:** „Transplantation gegen Wirt- Erkrankung“ (Graft versus Host Disease) der Haut eines Patienten nach allogener Stammzelltransplantation als Beispiel einer T- Zell- vermittelten immunologischen Reaktion

Mit freundlicher Genehmigung von PD Dr. med. W. Bethge, Medizinische Klinik II, Universität Tübingen

### I.4.2 Einteilung der T- Lymphozyten

Sämtliche Fähigkeiten der Lymphozyten lassen sich bei genauer Betrachtung als Effekt zweier Wirkmechanismen zusammenfassen: Einerseits ist dies die Fähigkeit zu regulieren und benachbarte Zellen in ihrer Funktion zu unterstützen, zu kontrollieren und zu regulieren. Sie helfen diesen und bewirken über sezernierte Zytokine eine gesteigerte oder verminderte Reaktivität der Zielzelle. Andererseits besitzen T- Zellen die Fähigkeit zu reagieren und können Zellen oder sonstige Organismen wie Bakterien oder Viren selbstständig lysieren und direkt zerstören. Beide Wirkungen vereint lassen sich auch in der Wirkung der T- Lymphozyten auf Tumoren beobachten.

Entsprechend ihrer Fähigkeiten teilen sich die T- Lymphozyten in Subpopulationen von T- Helferzellen mit zwei unterschiedlichen Subtypen und von zytolytischen T- Zellen auf. Zudem existiert die Gruppe der Suppressor- T- Zellen. Während allen T- Lymphozyten das Oberflächenprotein CD3 gemeinsam ist, lassen sich die Subpopulationen anhand der Oberflächenmoleküle CD4 (T- Helferzellen) und CD8 (zytolytische sowie Suppressor- T- Zellen) unterscheiden. Die CD Bezeichnung (**cluster of differentiation**) hat sich als Klassifikation verschiedener Zelloberflächenstrukturen durchgesetzt, anhand der sich Zellen nach Ursprung, Reifegrad und Spezialisierung differenzieren lassen<sup>33,34,35</sup>.

### I.4.3 T- Zell- Rezeptorkomplex

Analog der spezifischen Antigenerkennung durch AK besitzen T- Zellen ein spezialisiertes Oberflächenprotein, das MHC- Komplex gebundene Antigene erkennt und als zentrales Membranprotein mit **T- Zell- Rezeptor** bezeichnet wird. Aus einer  $\alpha$ - und  $\beta$ - Kette mit einem MG von je 43 - 45 kDa zusammengesetzt und über Disulfidbrücken vernetzt, ähnelt sein Aufbau dem eines AK. Der Rezeptor ist monovalent und besitzt lediglich eine Bindungsstelle. Analog zu AK finden sich variable Anteile zur Bindung der Antigene, die T- Zell- Epitope sowie

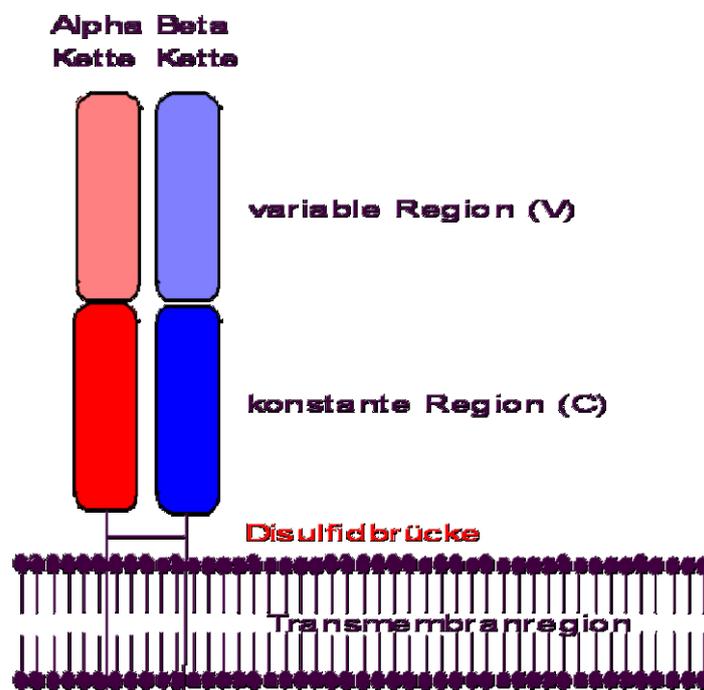
---

<sup>33</sup> Zola H et al. 2003

<sup>34</sup> www.hcdm.org

<sup>35</sup> Mason D. et al. 2002

# T-Zell-Rezeptor



**Abb. 12:** Schematischer Aufbau des T-Zell-Rezeptors Domäne:

dunkelrot+ hellrot:	Alpha- ( $\alpha$ -) Kette
dunkelblau+hellblau:	Beta- ( $\beta$ -) Kette
dunkelrot:	konstante Region (C) der $\alpha$ -Kette
hellrot:	variable Region (V) der $\alpha$ -Kette
dunkelblau:	konstante Region (C) der $\beta$ -Kette
hellblau:	variable Region (V) der $\beta$ -Kette
hellrot+hellblau:	Antigen- Bindungsstelle

Die Zellmembran wurde in üblicher Weise durch zwei Lagen einzelner punkt-/strichförmig symbolisierter langkettiger Fettsäuren dargestellt. Die schwarzen, an die konstante Region bindenden Striche, zeigen die transmembranäre Region der einzelnen Ketten, die den T-Zell-Rezeptor in der Zellmembran verankert. Über Disulfidbrücken werden beide Einzelketten zum Gesamtkomplex kombiniert.

## I.4.4 T- Zell vermittelte Immunität

Die Unterschiede der T- Zellen in ihrer Oberflächenstruktur ( $CD4^{+/-}$  bzw.  $CD8^{+/-}$ ) äußern sich funktionell in unterschiedlichen Reaktionsmustern auf Fremdan Antigene. Die T- Zell- Rezeptoren bzw. -epitope von  $CD4^{+}$ -Zellen erkennen zumeist nur auf MHC- II präsentierte Antigene, so dass T- Helferzellen primär mit anti-

konstante, wenig variierende Anteile des Rezeptors im membranahen sowie transmembranären Bereich (vgl. I.1.3.2.1.1, I.2.2.2).

Wie die MHC- Liganden unterliegen auch die T- Zell-Rezeptoren, speziell die antigenbindenden T- Zell-Epitope, intensiver Forschung, so dass fortwährend neue Epitope identifiziert werden<sup>36</sup>. Die Funktion eines weiteren T- Zell- Rezeptors, bestehend aus  $\gamma$ - und  $\delta$ - Kette, der nur auf 3-5% aller T- Lymphozyten ( $CD4^{-}$  und  $CD8^{-}$ ) exprimiert wird, ist bislang nicht vollständig verstanden<sup>37,38</sup>.

<sup>36</sup> Boss C.N. et al. 2007

<sup>37</sup> Pardoll et al. 1987

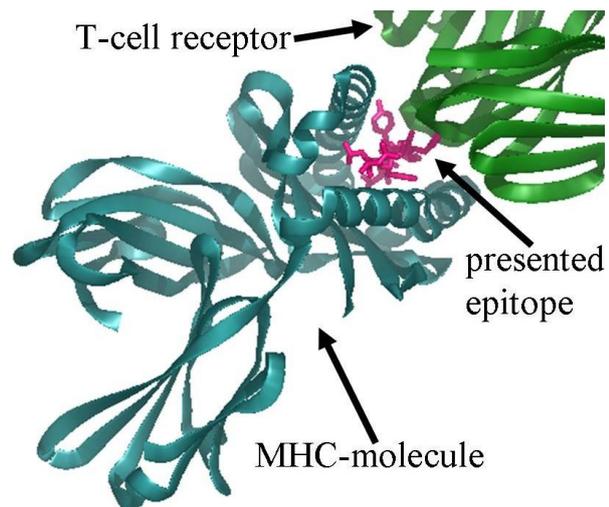
<sup>38</sup> Krangel M.S. et al. 1987

genpräsentierenden Zellen wie Makrophagen und dendritischen Zellen interagieren (vgl. I.1.3.1.2, I.2.4). Dieses als Restriktion bezeichnete Phänomen führt andererseits zur Reaktion MHC- I exprimierender Peptide nur mit T- Zell-Rezeptoren CD8<sup>+</sup>-Zellen (vgl. Abb. 13)<sup>39</sup>. Bindet MHC an den T- Zellrezeptor unter Kostimulation von CD3, CD4 bzw. CD8 und einigen weiteren akzessorischen Molekülen mündet dies in einer Aktivierung der T- Zellen, die ihrerseits über Lymphokine weitere Zellen beeinflussen können.

Neben den Lymphokinen lassen sich Monokine, Interleukine, Interferone und weitere Stimulations- und Wachstumsfaktoren nachweisen, die unter dem Begriff Zytokine subsummiert werden und als humorale Mediatorsubstanzen verschiedenste Aufgaben in der zellulären Interaktion erfüllen.

Eine Subpopulation der T- Helferzellen, die Typ I- oder TH1- Zellen fördern die Reifung zytolytischer T- Zellen und die Aktivierung von Makrophagen. TH2- Zellen hingegen bewirken die Ausdifferenzierung von Plasmazellen und eosinophilen

Granulozyten. Im Gegensatz dazu werden die MHC- I präsentierenden Zellen durch die zytolytischen CD8<sup>+</sup>- T- Zellen erkannt und zerstört, indem Zytolysine und Perforine als porenförmige Moleküle in die Zellmembran integriert werden. Alternativ wird über verschiedene Proteasen eine Apoptose der Zelle induziert. Auch Fas oder APO- 1 vermittelte Apoptosewege können durch CD8<sup>+</sup>- T- Zellen forciert werden<sup>40,41</sup>. Während wiederholt auf das Schlüssel/ Schloss- Prinzip als zentrales Wirkungsmuster abgehoben wurde, bewirken Superantigene wie z.B.



**Abb. 13:** Darstellung der Interaktion von MHC I mit T- Zell- Rezeptor und enthaltenem Peptid (aus Garboczi D.N., et al. Nature 1996)

Grün: T- Zell- Rezeptor (T-cell receptor)  
 Petrol: MHC- Komplex (MHC-molecule, nach hinten gekippter Elchkopf, vgl. Abb. 5)  
 Pink: gebundener Ligand (presented epitope)

<sup>39</sup> Garboczi D.N. et al. 1996

<sup>40</sup> King L.B. et al. 1993

<sup>41</sup> Casiano C.A. et al 1996

Exotoxine von Strepto- oder Staphylokokken eine direkte Vernetzung von MHC-Komplex und T-Zell-Rezeptor ohne vorige Antigenprozessierung, ohne kostimulatorische Signale und damit ohne Spezifität. Eine oligoklonale T-Zell-Aktivierung mit massiver Zytokinausschüttung ist die Folge<sup>42</sup>.

Zusammenfassend leistet das T-Zell-System über die vier zentralen Funktionsmechanismen mit Aktivierung zytolytischer T-Zellen, Aktivierung antigenpräsentierender Zellen, Aktivierung eosinophiler Granulozyten bzw. Mastzellen und Induktion der humoralen Immunantwort durch Plasmazellen über T-Helferzellen seinen Anteil am immunologischen Abwehrsystem des menschlichen Körpers.

## **I.5. Die Tumorantigene**

### **I.5.1 Was sind Tumorantigene?**

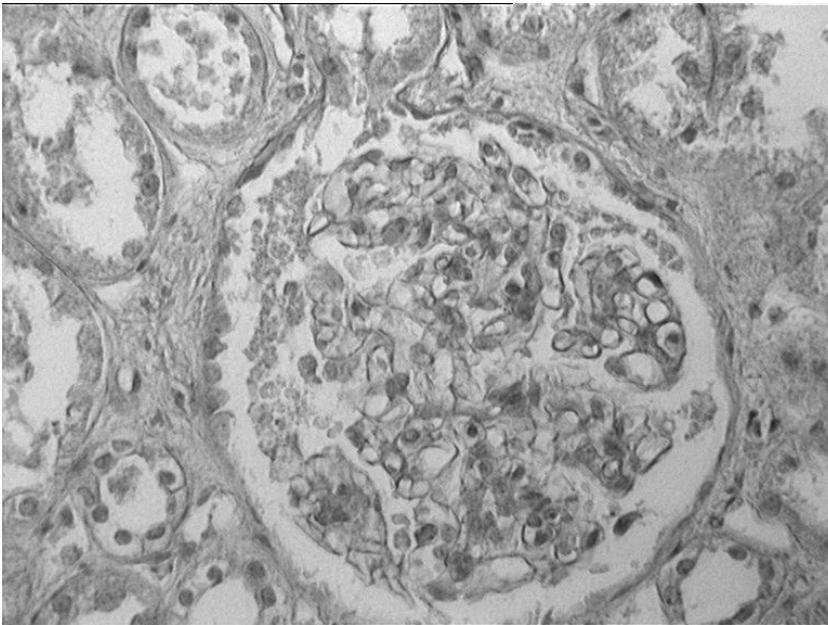
Die Genese tumorös veränderter Gewebe ist mannigfaltig und in vielen Fällen bislang nur unzureichend verstanden. Beim kolorektalen Karzinom wurde mit der Adenom-Karzinom-Sequenz ein Schema proklamiert, das die schrittweise Entwicklung maligner Tumoren beschreibt – vom gesunden Gewebe bis zum vollständig entarteten G3-Tumor (vgl. I.8.1.3). Der direkte Vergleich mikroskopischer Schnitte gesunden und tumorösen Gewebes lässt selbst für einen histologischen Laien schnell erkennen, dass unverändertes Organparenchym und hieraus hervorgegangenes Tumorgewebe oftmals keine oder allenfalls marginale Gemeinsamkeiten aufweisen (vgl. Abb. 14, 15). Rückblickend auf Kapitel I.1 bleibt die Frage, warum unser Immunsystem nach einer Entwicklung und Perfektionierung über Jahrtausende diese „offensichtlichen“ Unterschiede nicht zu erkennen vermag? Was nützen uns seine Fähigkeiten, wenn es „nur“ Bakterien zu erkennen vermag, „Tumoren aber freien Lauf lässt“. Kann es sich nicht den „Bedürfnissen der Zeit“ anpassen und Tumoren eliminieren?

Diesen provokanten Äußerungen kann entgegnet werden, dass sich das Immunsystem „sehr wohl“ anpasst und Tumoren ebenso wie Mikroorganismen

---

<sup>42</sup> Abe R. et al. 1988

anhand qualitativ und quantitativ veränderter molekularer Strukturen, den fremden Antigenen, erkennt.



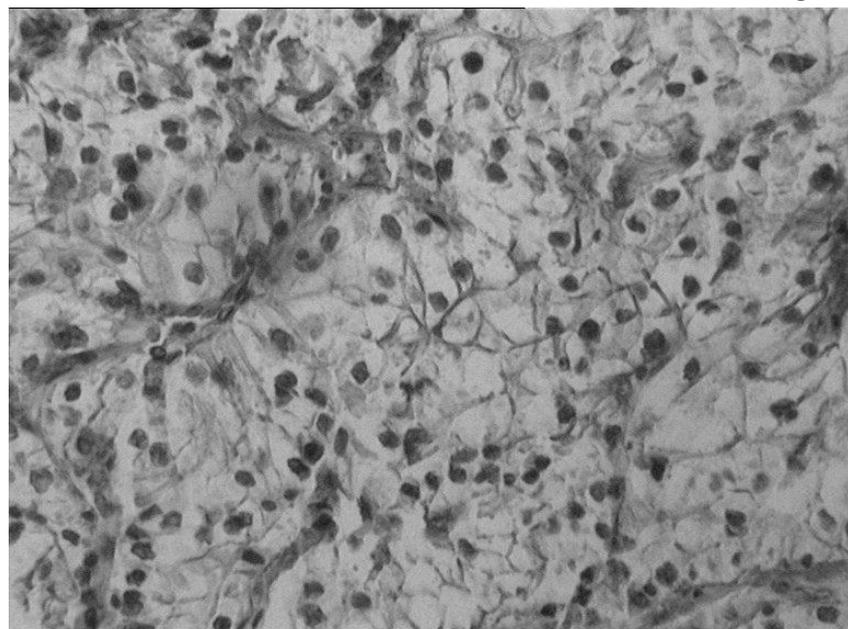
**Abb. 14:** Lichtmikroskopisches Bild regulären Nierenparenchyms ohne Hinweis auf maligne Entartung: Zentral zeigt sich als große, runde Struktur ein Glomerulum, die Ultrafiltrationseinheit der Niere. Die runden Strukturen linksseitig sind quer angeschnittene Tubuli der Niere.

Dieses Bild wurde vom Labor der Urologie der Universität Tübingen (Prof. Dr. A. Stenzl) zur Verfügung gestellt

1991 wurde mit MAGE-1 (melanoma antigen genes) das erste Gen, das für diese Tumorabstoßungsantigene (tumor rejection antigens, TRA) oder tumorspezifischer Transplantationsantigene (TSTA) kodiert, auf Melanomzellen entdeckt<sup>43</sup>. Im Folgejahr wurde das zugehörige, antigen wirkende Epitop charakterisiert, das eine spezifische T- Zell- Antwort hervorruft<sup>44</sup>. Die initialen Schwierigkeiten mit Tumorzelllinien, anhand derer die beschriebenen Untersuchungen

**Abb. 15:** Lichtmikroskopisches Bild eines Nierenzellkarzinoms: Im Gegensatz zu Abb. 14 ist die Ordnung komplett aufgehoben. Reguläre Parenchymstrukturen der Niere wie Glomeruli oder Tubuli sind nicht abzugrenzen. Vielmehr zeigt sich ein verwirrendes Konglomerat unterschiedlicher, irregulärer Zellen.

Dieses Bild wurde vom Labor der Urologie der Universität Tübingen (Prof. Dr. A. Stenzl) zur Verfügung gestellt



<sup>43</sup> van der Bruggen P. et al. 1991

<sup>44</sup> Traversari C. et al. 1992

durchgeführt wurden, konnten dank besserer Ansätze zügig überwunden werden und führen zur fortwährenden Entdeckung neuer Epitope verschiedenster Gewebespezifität, die von autologen T- Lymphozyten erkannt werden.

Damit existieren Strukturen, die Tumorgewebe zu charakterisieren scheinen, sich in Genetik und konsekutiv anhand ihrer Oberfläche von unverändertem Organparenchym unterscheiden und durch diese Merkmale vom Immunsystem erkannt werden. Die Gesamtheit der Antigene einer Tumorerkrankung, die Tumor und Ursprungsgewebe differenzieren, vom Immunsystem erkannt werden und damit eine Immunantwort spezifisch provozieren und produzieren können, werden als Tumorantigene bezeichnet. Durch ihre Eigenschaften, zwischen Tumor und unverändertem Parenchym und damit zwischen „Gut“ und „Böse“ unterscheiden zu können, rückten diese Antigene schnell in das Zentrum wissenschaftlichen Interesses in der Hoffnung, über diese Differenzen gezielte Therapiestrategien entwickeln zu können.

### **I.5.2 Identifizierung der Tumorantigene**

Grundsätzlich existieren zwei Ansätze, über die sich Tumorantigene identifizieren lassen: Die genetische<sup>45</sup> und die biochemische Methode<sup>46</sup>. Bei erstgenannter werden T- Lymphozyten gleicher Spezifität als T- Zell- Klone gegen Tumorzelllinien generiert und bei Reaktivität von T- und Ziel- Zelle das erkannte Antigen über Genexpressionsanalysen identifiziert. Für diese Dissertation wurde der Identifizierungsansatz über die biochemische Methode verfolgt, dieser wird in den Kapitel I.6 sowie II näher dargestellt. Daneben wurde mit dem SEREX-Verfahren (**S**erological identification of recombinantly **e**xpressed antigens) eine serologische, lymphozyten- und tumorzellunabhängige Antigenidentifizierung entwickelt. Über Expressionsklonierung von Tumor- cDNA- Banken anhand des AK Repertoires des einzelnen Tumorpatienten können Antigene systematisch analysiert und erkannt werden<sup>47</sup>.

---

<sup>45</sup> De Plaen E. et al. 1997

<sup>46</sup> Falk K. et al. 1991

<sup>47</sup> Sahin U. et al. 1997

### **I.5.3 Klassifikation der Tumorantigene**

Rasch bestand bei der ständig wachsenden Anzahl an Tumorantigene die Notwendigkeit einer Einteilung. Anhand assoziierter Erkrankungen, möglicher Ursprungsgewebe sowie biologischer und biochemischer Eigenschaften hat sich folgende Kategorisierung der Antigene etabliert.

#### **I.5.3.1 MHC- I restringierte Antigene**

##### **I.5.3.1.1 Cancer-/ Testis- Antigene**

Wie der Name impliziert wurden CT- Antigene sowohl in verschiedensten humanen Tumoren als auch im Parenchym von Hoden und Plazenta gefunden. Während die Reaktivierung üblicherweise stummer Gene in einer Vielzahl unterschiedlichster Tumoren<sup>48</sup> bestätigt werden konnte, ist die physiologische Funktion der CT- Antigene trotz entschlüsselter Gene unklar. Neben der MAGE, BAGE- und GAGE- Familie werden auch LAGE-, HAGE-, SAGE- sowie NY-ESO- 1- Gene zu dieser Gruppe gezählt. Bei nur geringem Kontakt des Hodens zu Immunzellen und daher überschaubaren Nebenwirkungen stellen diese Antigene optimale Zielstrukturen antitumoröser Vakzinierungskonzepte dar.

##### **I.5.3.1.2 Differenzierungsantigene**

Die antigenen Proteine dieser Gruppe konnten aus entdifferenziertem Malignom- sowie physiologischem Ursprungsgewebe isoliert werden, hauptsächlich aus Melanozyten und Melanomen. Hier übernehmen sie Aufgaben der Melaninsynthese<sup>49,50</sup>. Beispiele dieser TRA sind MART- 1, gp100, Tyrosinase oder verwandte Proteine wie Tyrosinase- related protein- 1/ -2. Als Zielantigene bei aktiver Immunisierung wurden hier Fälle von Dedifferenzierung der Tumorzellen im Sinne eines relevanten Escape- Mechanismus beobachtet.

---

<sup>48</sup> De Smet C. et al. 1999

<sup>49</sup> Boon T. et al. 1996

<sup>50</sup> Topalian S.L. et al. 1996

### I.5.3.1.3 Unspezifische Antigene mit karzinomatöser Überexpression

Gene, die für diese Proteine kodieren, konnten in Gewebe verschiedensten Ursprungs gefunden werden und zeigten keine präferentielle tumoröse Expression. Eine primär beobachtete Immuntoleranz der T- Zellen gegenüber den Antigenen verschob sich durch die nachgewiesene Überexpression der Gene auf karzinomatösem Gewebe hin zu einem lytischen Reaktionsmuster. Viele in der Onkologie als Tumormarker eingesetzten Proteine wie z.B.  $\alpha$ - Fetoprotein<sup>51</sup>, CEA (carcinoembryonic antigen), Her- 2/neu, aber auch Proteine wie g250<sup>52</sup>, MUC- 1, p53 oder Telomerase zählen zu dieser Gruppe. Um ein Protein im Hinblick auf seine Relevanz als Zielstruktur einer Immuntherapie exemplarisch herauszugreifen, sei auf das membranständige Her-2/neu- Antigen auf Karzinomen der Mamma hingewiesen. Dieses wird spezifisch über den mAK Herceptin gebunden<sup>53</sup>. Neben diesem AK, der Eingang in die Standardbehandlung des Mammakarzinoms gefunden hat, werden auf gleicher Basis weitere spezifische Moleküle entwickelt, die über diesen Reaktionsweg zu signifikanten Überlebensvorteilen führen und als spezifische immunologische Therapie zur Revolution der Behandlung beitragen, beitragen und beitragen werden<sup>54,55,56</sup>.

### I.5.3.1.4 Tumorspezifische Antigene

Im Gegensatz zu  $\alpha$ - Fetoprotein oder CEA (vgl. I.5.3.1.3) sind Antigene dieser Gruppe - MUM- 1, Caspase- 8, KIA 0205, HLA- A2- R1701 - ausnahmslos auf Tumoren nachzuweisen. Eine Punktmutation im Wildtyp- Gen wie z.B. bei  $\beta$ - Catenin<sup>57</sup> oder CDK4 (Cyclin dependent kinase 4)<sup>58</sup> bedingt die neoplastische Transformation und Gewebeproliferation. Weiterhin konnten tumorspezifische Antigene wie das TRP- 2/ INT2 identifiziert werden, die durch veränderte Spleißvorgänge entstehen<sup>59</sup>. Aufgrund ihrer starken immunogenen Potenz und Spezifität scheinen diese Antigene für den Einsatz zur Immuntherapie optimal.

---

<sup>51</sup> Butterfield, L.H. et al. 1999

<sup>52</sup> Vissers J.L. et al. 1999

<sup>53</sup> Disis M.L. et al. 1994

<sup>54</sup> Smith I. et al. 2007

<sup>55</sup> Castellone M.D. et al. 2005

<sup>56</sup> Piccart- Gebhart M.J. et al. 2005

<sup>57</sup> Robbins P.F. et al. 1996

<sup>58</sup> Wölfel T. et al. 1995

<sup>59</sup> Lupetti R. et al. 1998

### **I.5.3.2 MHC- II restringierte Antigene**

#### I.5.3.2.1 Epitope unmutierter Proteine

Mit der Entdeckung der Tyrosinase im Jahr 1994 wurde der erste Vertreter dieser Gruppe definiert<sup>60</sup>. Erst über vier Jahre später konnten weitere Epitope wie gp100<sup>61</sup>, MAGE-1 bzw.-3 oder NY-ESO-1 exakter charakterisiert werden. Gemeinsam ist allen Epitopen die ansonsten bei Tumorpatienten verminderte oder fehlende Potenz, tumorspezifische CD4<sup>+</sup>- Lymphozyten zu stimulieren.

#### I.5.3.2.2 Epitope mutierter Proteine

Hierunter fallen die ab 1999 bekannten Peptide aus Proteinen wie CDC- 27, LDLR- FUT oder Triosephosphatisomerase<sup>62</sup>.

### **I.5.3.3 Fusionsproteine**

Neben Punktmutationen wurden auch Translokationen ganzer Chromosomen als Mechanismus molekularer Karzinogenese beschrieben. Durch die Umlagerung werden zuvor weit entfernte Gene in räumliche Nähe zueinander gebracht. Die Fusion von Genen und Bildung neuer, teils erkrankungsrelevanter Proteine ist die Folge. Bekanntester und gleichzeitig wichtigster Vertreter ist das bcr- abl Fusionsprotein, das als Philadelphia- Chromosom für die chronisch myeloische Leukämie charakteristisch ist<sup>63,64</sup>. Daneben ließ sich in den vergangenen Jahren eine zunehmende Anzahl ähnlicher Phänomene bei anderen malignen Erkrankungen identifizieren.

Vergegenwärtigt man sich den Quantensprung, der durch den Einsatz von Imatinib als ersten Inhibitor der Tyrosinkinase<sup>65</sup> erzielt werden konnte, wird deutlich, welchen Stellenwert die spezifische Behandlung onkologischer Erkrankungen gewinnt und welche Erfolge zu erreichen sind. Vor diesem Hintergrund tritt die Entdeckung neuer Tumorantigene in den Blickpunkt des Interesses, um über eine zielgerichtete Therapie ähnliche Erfolge zu erreichen, die über Jahrzehnte mittels unspezifischer, „konventioneller“ Chemotherapie nicht möglich war.

---

<sup>60</sup> Topalian S.L. et al. 1994

<sup>61</sup> Li K. et al. 1998

<sup>62</sup> Pieper R. et al. 1999

<sup>63</sup> Bocchia M. et al. 1996

<sup>64</sup> Pawelec G. et al. 1996

<sup>65</sup> O'Brien S.G. et al. 2003

## **I.6. Epitopvorhersage**

### **I.6.1 Erste Schritte – in Richtung Peptidcharakterisierung**

Nachdem die kristalline Struktur des MHC- Komplexes ab 1987 definiert (vgl. I.2.2.1, I.2.2.2) und die Hypothese zur „Mulde“ zwischen  $\alpha$ 1- und  $\alpha$ 2- Domäne als Bindungsort von Liganden verifiziert werden konnte, stellte sich die Frage nach Größe, Zusammensetzung und Charakteristika der bindenden Peptide. Von Maustumorzelllinien wurden die MHC- Komplexe einschließlich der gebundenen Peptide extrahiert. Nach Isolation der Peptide wurde das Ligandom – die Gesamtheit aller gebundenen Peptide – mittels Edman-Sequenzierung analysiert. Erstaunlicherweise zeigten diese gepoolten Analysate großer Zellmengen mit einer Vielzahl unterschiedlicher Peptide trotz differenter Zusammensetzung an bestimmten Stellen dieselbe oder zumindest ähnliche AS. Auch die Länge der Peptide war mit 9 AS in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle identisch. Anhand weiterführender Untersuchungen wurde die Hypothese geäußert, dass die Mulden der einzelnen MHC- Allele als Ligandenbindungstaschen unterschiedlich aufgebaut sind. Aufgrund von Polarität und sterischen Verhältnisse um die Tasche werden bevorzugt Nonapeptide gebunden, die an gewissen Positionen identische oder, bzgl. Polarität, zumindest ähnliche AS enthalten<sup>66</sup>.

### **I.6.2 Die SYFPEITHI- Datenbank**

Vier Jahre später wurde eine erste Auflistung von Peptidliganden und Charakteristika der Bindungstaschen der jeweiligen MHC- I- Allele, fortan als MHC- Motiv bezeichnet, veröffentlicht<sup>67</sup>. Seit 1999 ist eine Datenbank für MHC- Liganden und -Motive frei zugänglich<sup>68</sup>. Benannt nach dem ersten, direkt sequenzierten, natürlichen Peptid<sup>69</sup> findet man unter SYFPEITHI über 7000 Liganden, die auf MHC- Komplexen von Mensch, Maus, Huhn, Affe usw. detektiert wurden<sup>70,71</sup>.

---

<sup>66</sup> Falk K. et al. 1991

<sup>67</sup> Rammensee H.G. et al. 1995

<sup>68</sup> [www.syfpeithi.de](http://www.syfpeithi.de)

<sup>69</sup> Dick T.P. et al. 1998

<sup>70</sup> Rammensee H.G. et al. 1999



**Abb. 16:** Das Logo der SYFPEITHI- Datenbank.

Der Elchkopf leitet sich aus der ähnlich anmutenden Struktur des MHC I-Komplexes ab. Die Schnauze und das Geweih des Elches symbolisieren die schwere Kette, der Hals stellt das  $\beta$ 2- Mikroglobulin des MHC-Komplexes dar (vgl. Abb. 5, 13).

Zudem wird ein Zugriff auf MHC- Allelspezifische Peptidmotive<sup>72</sup>, charakterisierte MHC-Liganden sowie T- Zell-Epitope inklusiv Sequenz, MHC-Spezifität, Bindungsstärke und Ursprungprotein geboten, es existieren Verbindungen zu Publikationen sowie den Datenbanken EMBL (EBML Nucleotide Sequence Database)<sup>73,74</sup> und PubMed<sup>75</sup>. Mit MHC-PEP existiert eine weitere Datenbank MHC- Allelspezifischer Peptide<sup>76</sup>, die neben

Klasse I eine Auflistung von MHC- Klasse II- Epitopen<sup>77</sup> offeriert.

### I.6.3 Anwendungen und Vorteile der Epitopvorhersage

Die Vorteile, die sich aus dem Wissen über die verschiedenen MHC- Motive und damit einhergehend über mögliche Peptidliganden ergeben, sind evident. Während molekulargenetische Ansätze die differente Genexpression in Tumor- und Normalgewebe vergleicht und über aufwändige Verfahren mögliche T- Zell-Bildung und -Bindung eruieren, lässt sich mit der Epitopvorhersage a priori eine geringere Anzahl möglicher Peptide prädiktiert, gegen die eine T- Zell- Antwort generiert werden kann<sup>78</sup>. Hiermit lassen sich entsprechende Peptide aus Tumorzelllinien extrahieren, detektieren und verifizieren<sup>79</sup>.

Als Nachteil dieses Ansatzes muss erwähnt werden, dass sich prädiktierte Peptide bestimmter Proteine zwar möglicherweise perfekt in die Bindungstasche eines MHC- Moleküls einfügen, jedoch ungeklärt bleibt, ob diese Peptide auch

<sup>71</sup> Schuler M.M. et al. 2007

<sup>72</sup> Falk K. et al. 1994 a

<sup>73</sup> www.ebi.ac.uk/embl

<sup>74</sup> Cochrane G. et al. 2008

<sup>75</sup> www.ncbi.nlm.nih.gov

<sup>76</sup> Brusica V. et al. 1998

<sup>77</sup> Bian H. et al. 2004

<sup>78</sup> Wang B. et al. 2002

<sup>79</sup> Schirle M. et al. 2001

als natürliche Liganden tatsächlich in vitalen Zellen gebildet werden. Doch auch die intrazelluläre Antigenprozessierung kann im weiteren Verlauf mithilfe spezieller Algorithmen wie z.B. PProC<sup>80, 81, 82</sup> exakt beschrieben und vorhergesagt werden, so dass sich diese Befürchtung relativiert.

Für diese Dissertation wurde der Weg der Epitopvorhersage zur Identifizierung tumorspezifischer Antigene beschränkt (vgl. I.10.2) und mögliche Liganden über eine direkte, T- Zell- unabhängige Analyse von nativem Tumorgewebe über massenspektrometrische Verfahren charakterisiert. Im Gegensatz zu bisherigen Genexpressionsanalysen konnte konkretere und exaktere Informationen über Antigenexpression und -präsentation im Tumorgewebe gewonnen werden.

## **I.7. Immunsystem und maligne Erkrankungen**

### **I.7.1 Einleitung**

Maligne Erkrankungen existieren seit Bestehen der Menschheit. Während fossile Knochen aus der Steinzeit Knochentumoren aufwiesen, wurden bei ägyptischen Mumien Osteosarkome und Kopf/Hals- Tumoren in Manuskripten erstmals schriftlich fixiert. Die ältesten Beschreibungen gehen dabei in das 16. Jh v.Chr. zurück, im Edwin Smith Papyrus wurden acht Fälle von Ulzera und Tumoren der Brust erwähnt. Während in der Antike diese Phänomene als unheilbare Einzelfälle angesehen wurde und einen raschen Tode zur Folge hatten, treten Tumorerkrankungen in der Neuzeit aufgrund besserer medizinischer Versorgung und stetig steigende Lebenserwartung zunehmend in den Vordergrund. Die Angst vor „Krebs“ ist weit verbreitet, so dass jeder Mensch, zumindest in seinem persönlichen Umfeld, mittel- oder unmittelbar mit bösartigen Krankheiten konfrontiert wird. Lange Krankheitsperioden, Ausfall an Arbeitskraft und hohe Behandlungskosten bei teils infausten Prognosen stellen weitreichende Folgen auch für die Gesellschaft dar. Primäre und sekundäre Präventions-

---

<sup>80</sup> Haderer K.P. et al. 2004

<sup>81</sup> Kuttler C. et al. 2000

<sup>82</sup> Nussbaum A.K. et al. 2001

konzepte werden verfolgt und optimiert, trotzdem werden zahlreiche Malignome erst in weit fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert und schränken die Behandlungsmöglichkeiten ein. Folglich ist das Streben nach neuen, verbesserten Diagnostik- und Therapieverfahren auf kaum einem Gebiet der Medizin größer als in der Hämatonkologie.

### **I.7.2 Therapie maligner Erkrankungen:**

#### **Etablierte Verfahren versus neue Therapieansätze**

Während Chirurgie und Radiatio als lokalisierte Therapieverfahren im lokal fortgeschrittenen Stadium kaum, im metastasierten Stadium der Erkrankung noch seltener zum Einsatz kommen, haben systemische Behandlungen wie z.B. Chemotherapien aufgrund gravierender Nebenwirkungen ihre Limitierungen. Zusätzlich zeigt sich je nach Tumorentität nur eine geringe Therapieeffektivität wie z.B. mit Strahlen- oder Chemotherapie beim Nierenzellkarzinom. Resultierend ist die Entwicklung neuer Therapiekonzepte unabdingbar.

Die chirurgische Therapie verfolgt das Ziel der möglichst kompletten Entfernung der Neoplasie, bei lokalisiertem Befall in kurativer Intention, bei großen Tumormassen als Debulking- Konzept zur Reduktion von Folgekomplikationen im Sinne einer palliativen Therapie. Daneben kann versucht werden, vorangestellt, begleitend oder nachfolgend durch eine systemisch und/ oder lokale chemische (Chemotherapie) oder physikalische Zerstörung (Strahlentherapie) den Tumor zu eliminieren. Die Nebenwirkungen durch Zerstörung gesunden Gewebes spiegeln dabei das Hauptproblem wider.

Gegenüber diesen rein destruirenden Therapien scheint ein zielgerichteter Ansatz mit isolierter Destruktion der Neoplasie unter Aussparung des unveränderten, physiologischen Organparenchyms deutliche Vorteile zu bieten. Ein mögliches Konzept dieser spezifischen Behandlung zielt auf die Utilisation des eigenen Immunsystems ab. Da dies der vorliegenden Dissertation zugrunde liegt, werden im Folgenden die Grundlagen immunologischer Reaktionsmuster in Verbindung mit tumorösen Erkrankungen kurz skizziert.

### **I.7.3 Immunreaktionen zur Tumorbekämpfung**

Dass das körpereigene Immunsystem auch in der Bekämpfung maligner Tumoren von entscheidender Bedeutung sein könnte, ließ sich über Jahrzehnte des 20. Jahrhunderts hinweg erahnen. Bereits in den 80er Jahren zeigte sich, dass nach Applikation der Zytokine Interferon bzw. Interleukin über eine Induktion der Genexpression bzw. gesteigerte T- Zell- Proliferation invasive Tumoren wie Melanome oder metastasierte Nierenzellkarzinome teilweise oder gar komplett eliminiert werden konnten<sup>83,84</sup>. Die Verabreichung autologer Tumorzellen schien das Immunsystem derartig zu modulieren, dass sich vereinzelt Fälle vollständiger Tumorrückbildung beobachten ließen<sup>85</sup>. Doch erst mit der Entdeckung der tumorassoziierten Antigene (vgl. I.5) als detektables Korrelat maligne veränderter Zellen konnte eine Spezifizierung der Strukturen erreicht werden, gegen die eine etwaige Immunreaktion gerichtet sein sollte<sup>86</sup>. Seitdem besteht die Bestrebung, einerseits die Charakterisierung bekannter Tumorantigene zu verbessern bzw. neue zu beschreiben. Andererseits wird dann versucht, diese Antigene als Angriffspunkte für spezifische, zielgerichtete Tumorthérapien zu nutzen.

### **I.7.4 Immuntherapie**

Während anfangs eine tumorbedingte Stimulation des Immunsystems als unwahrscheinlich abgetan wurde, ist heute bekannt, dass die meisten menschlichen Neoplasien primär immunogen wirken. Dabei erkennt das Immunsystem Tumorzellen meist problemlos, deren Eradikation misslingt jedoch. Immunescape- Mechanismen wie z.B. fehlende bzw. heruntergeregelte Expression der MHC- Moleküle<sup>87</sup>, defiziente Antigenprozessierung<sup>88</sup>, Modulation natürlicher Killerzellen, fehlende Kostimulation oder Sekretion immunsuppressiver Faktoren wie TGF- $\beta$ , Prostaglandin oder IL- 10 führen zur ineffektiven Immunantwort<sup>89</sup>.

---

<sup>83</sup> Quesada et al. 1983

<sup>84</sup> Rosenberg S.A. et al. 1985

<sup>85</sup> Herr W. et al. 1994

<sup>86</sup> Renkvist N. et al. 2001

<sup>87</sup> Brasanac D. et al. 1999

<sup>88</sup> Seliger B. et al. 1996

<sup>89</sup> Menetrier-Caux C. et al. 1999

### I.7.4.1 Die Rolle von CTL und DC

Ziel einer erfolgreichen Therapie auf Grundlage des körpereigenen Immunsystems ist demzufolge, das insuffiziente Effektorsystem zu stärken, um eine adäquate Elimination der Malignomzellen zu induzieren. Der zytotoxische T-Lymphozyt (CTL, vgl. I.4) rückt hierbei in das Zentrum des Interesses und gilt als entscheidende Zelle. Neben Antigen und Lymphozyt ist noch eine weitere Zelle unabdingbar. Als professionelle APC (vgl. I.1.3.1.2) führt erst die dendritische Zelle (DC) zusammen mit kostimulatorischen Signalen und Adjuvantien zur Initiierung der zellulären Immunantwort durch den CTL<sup>90,91</sup>.

Nachdem initial reine Peptide, modifizierte Peptide, ganze Tumorproteine oder die kodierende DNA bzw. RNA zum Einsatz kamen, jedoch einen durchschlagenden Erfolg weitestgehend vermissen ließen, schien der Weg zum Erfolg über die stimulatorischen Fähigkeiten der dendritischen Zellen zu führen (vgl. Kapitel IV). Doch auch hier sind aktuell noch viele Fragen ungeklärt, vor allem bzgl. geeigneter Selektion von Antigen und DC, deren Verknüpfung, auch im Zusammenhang mit der CTL, sowie hinsichtlich Aufbereitung oder Verabreichung der Vakzine.

Allein über die Dokumentation der Therapie scheint ein gewisser Konsens zu herrschen. Die initial verwendete delayed type hypersensitivity (DTH-) Reaktion nach intrakutaner Peptidinjektion, die wie die Tuberkulinprobe auf einer Immunreaktion vom verzögerten Typ basiert, ist nur als sehr grober Verlaufsparemeter anzusehen und wurde rasch verlassen. Heutzutage werden v.a. Zytotoxizitätsprüfungen, der ELISPOT<sup>92</sup> oder FACS- Analysen nach Tetramerbindung zum Nachweis spezifischer CTL eingesetzt.

Welche klinische Relevanz sich aus den laborchemischen Daten ableiten lässt und inwieweit sie einen Therapieerfolg prädikieren können, ist bislang weitestgehend unklar und bedarf intensiver Untersuchungen.

---

<sup>90</sup> Steinman R.M. 1991

<sup>91</sup> Stuhler G, Walden P. 1994

<sup>92</sup> Czerkinsky C. et al. 1988

### **I.7.4.2 Auswahl des Tumorantigens**

Während sich Tumorantigene (TRA) als entscheidende Zielstrukturen der Immuntherapie herauskristallisiert haben, bleibt die Frage, welche Antigene aus der breiten Vielzahl (vgl. I.5.3) ausgewählt und kombiniert werden sollten. Der beste Therapieansatz basiert fraglos auf den TRA, die vom zuvor entnommenen Tumorgewebe des jeweiligen Patienten direkt isoliert werden konnten. In dieser Form wäre die Behandlung bestmöglich individualisiert und an die spezifischen Voraussetzungen des einzelnen Patienten adaptiert. Leider liefert die Analyse des Tumormaterials nur selten ein komplettes Antigenpanel, das zur Vakzinierung genutzt werden kann. Zumeist muss deshalb auf bekannte, auf Tumoren gleicher Entität nachgewiesene TRA zurückgegriffen werden. Nichtsdestotrotz wird die Auswahl der konkreten Peptide stets auf die HLA-Klassifikation des Patienten abgestimmt<sup>93</sup>. Um die Patientensicherheit zu gewährleisten und Nebenwirkungen zu minimieren, werden TRA als Targetantigene einer Vakzinierung anhand ihrer Expression in den Geweben des Patienten ausgewählt. So kommen nur Antigene zum Einsatz, die ausschließlich oder zumindest deutlich gesteigert im Tumor exprimiert werden. Die Kombination verschiedener TRA spiegelt sich in einer verminderten Selektion antigendefizienter Tumorzellen und damit einer erfolgsversprechenderen Behandlung wider.

### **I.7.4.3 Erste Erfolge der Vakzinierungstherapie**

Nachdem erste Vakzinierungsansätze ihren Erfolg bei kutanen Melanomen nachweisen konnten<sup>94,95,96</sup>, wurden sowohl beim Nierenzell- als auch beim kolorektalen Karzinom multiple Therapien mit verschiedenen Ansätzen durchgeführt – auf einzelne wird im Rahmen der Diskussion näher eingegangen. Hierunter zeigten sich Stabilisierungen der Tumorerkrankung, aber auch eine Regredienz einzelner Manifestationen (vgl. Abb. 81, 82), so dass an der Universität Tübingen diese Ansätze in mehreren Phase I/II-Studien verfolgt werden konnten<sup>97,98</sup>. Auf dieser Basis gründen die im Folgenden aufgeführten Untersuchungen.

---

<sup>93</sup> Rammensee H.G. et al. 2002

<sup>94</sup> Nestle F.O. et al. 1998

<sup>95</sup> Maeurer M.J. et al. 1996

<sup>96</sup> Sosman J.A. et al. 2002

<sup>97</sup> Wiernecky J. et al. 2005

## **I.8. Karzinome des Verdauungstraktes**

### **I.8.1 Das kolorektale Karzinom**

#### **I.8.1.1 Definition des kolorektalen Karzinoms**

Während die WHO mit ihrer aktuellsten Version der International Classification of Disease<sup>99</sup> mit C18 - C20 bösartige Neubildungen von Kolon, Rektosigmoid und Rektum vor allem aus therapeutischer Sicht unterscheidet, werden für diese Dissertation analog der über Jahrzehnte und auch noch heute utilisierten Einteilung diese ähnlichen Malignome unter der Entität des kolorektalen Karzinoms zusammengefasst. Hierdurch eröffnet sich die Option, die erzielten Ergebnisse auf einer größeren, homogenen Kohorte zu basieren, ohne relevante Einbußen in Kauf nehmen zu müssen

#### **I.8.1.2 Epidemiologie des kolorektalen Karzinoms**

Mit einer Inzidenz von 77 - 90 Fällen und einer Mortalität von 15 - 25 Fällen pro 100.000 Einwohner pro Jahr ist das kolorektale Karzinom das zweithäufigste Malignom des Menschen in Mitteleuropa, beim Mann nach dem Prostatakarzinom, bei der Frau nach dem Mammakarzinom mit einer Inzidenz von 110 bzw. 138 Fälle pro 100.000 Einwohner pro Jahr<sup>100</sup>. Damit erkranken in der Bundesrepublik jährlich 70.000 Menschen an einem kolorektalen Karzinom. Das 5- Jahres- Überleben bewegt sich in einem Rahmen zwischen 53 - 63%, jährlich versterben je ca. 13.000 Männer und Frauen an diesem Tumor als zweithäufigste Krebstodesursache.

#### **I.8.1.3 Ätiologie und Pathogenese des kolorektalen Karzinoms**

Seit längerer Zeit wird proklamiert, dass die Entwicklung kolorektaler Karzinome als sequentieller Prozess anzusehen ist. Dies ist in der sogenannten Adenom-Karzinom-Sequenz zusammengefasst und international anerkannt<sup>101,102</sup>.

---

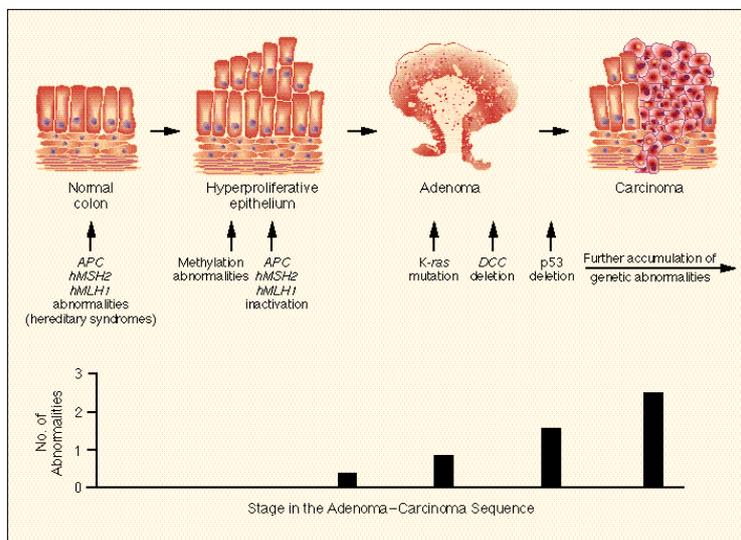
<sup>98</sup> Schmidt S.M. et al. 2010, in Vorbereitung

<sup>99</sup> www.dimdi.de

<sup>100</sup> www.rki.de

<sup>101</sup> Vogelstein B. et al. 1988

Der Übergang von vormalig benigne proliferiertem Gewebe zum Karzinom ist auf molekulargenetischer Ebene durch Veränderungen der Onkogene K-ras sowie der Tumorsuppressorgene APC und DCC sowie p53 nachgewiesen worden (vgl. Abb. 17). Damit sind adenomatöse Veränderungen der Darmwand als *der* Risikofaktor und vor allem bei tubulärer Histologie als erster Schritt in der Sequenz zur Entwicklung kolorektaler Karzinome anzusehen. Dabei erhöhen Anzahl und Größe der intestinalen Proliferationen die Gefahr einer raschen malignen Entartung.



**Abb. 17:** Schematische Darstellung der Adenom- Karzinom-Sequenz als Prototyp einer sequentiellen Tumorgenese. Toribara N.W. et al.<sup>102</sup> zeigen die schrittweisen Veränderungen von unverändertem Kolonparenchym bis hin zum invasiven Karzinom

Vor diesem Hintergrund ist verständlich, dass Menschen mit genetischer Prädisposition zur Entwicklung intestinaler Adenome einem deutlich erhöhten Karzinomrisiko ausgesetzt sind. Die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) wird deshalb als obligate Präkanzerose angesehen. Bei diesen Patienten treten infolge eines Genverlustes des

APC- Genes auf Chromosom 5 hunderte adenomatöser Polypen im Intestinum auf<sup>103</sup>, in steigender Anzahl von proximal nach distal. Folglich ist bis zum 45. Lebensjahr von einer Karzinomentstehung von annähernd 100% auszugehen<sup>104</sup>.

Beim Lynch-Syndrom treten im Median um das 45. Lebensjahr Karzinome, vornehmlich im Kolon aszendens auf. Dieses hereditäre, nichtpolypöse Kolonkarzinom- Syndrom (HNPCC) mit autosomal dominantem Erbgang beruht auf Mu-

<sup>102</sup> Toribara N.W. et al. 1995

<sup>103</sup> Spigelman AD et al. 1989

<sup>104</sup> Gardner E.J. 1951

tationen des Mismatch- Repair- Systems der DNA auf Chromosom 2, 3 oder 7. Zwar entspricht bei dieser Erkrankung die Frequenz der Adenomentwicklung der der Normalbevölkerung, durch die Defekte im Mikrosatelliten- Pathway ist allerdings die Progredienz vom Adenom zum Karzinom deutlich beschleunigt<sup>105</sup>. Neben diesen genetisch bedingten Prädispositionen sind vor allem das Vorliegen chronisch entzündlicher Darmerkrankungen oder familiärer Belastungsprofile bei Karzinomen in der Verwandtschaft 1. Grades als Risikofaktoren zu nennen. Auch eine fett-, protein- bzw. fleischreiche Ernährung<sup>106</sup>, spezielle Formen der Nahrungszubereitung<sup>107</sup>, Übergewicht sowie eine verminderte Ballaststoffzufuhr scheinen neben einer verminderten körperlichen Aktivität zur Karzinogenese beizutragen. Im Gegensatz zum Abusus von Alkohol und Nikotin, der über eine gesteigerte Adenombildung zur vermehrter Karzinomentwicklung beitragen soll<sup>108</sup>, scheint die Einnahme von Inhibitoren der Cyclooxygenase wie Piroxicam oder Acetylsalizylsäure durch Hemmung der Angiogenese zu einer Modulation der lokalen Entzündungsaktivität und verminderten Tumorzellinvasivität und zu führen<sup>109</sup>. Auch die postmenopausale Hormonsubstitution soll über eine verminderte Adenombildung bzw. -rückbildung protektiv wirken<sup>110, 111</sup>.

#### **I.8.1.4 Histologie des kolorektalen Karzinoms**

70% aller kolorektalen Karzinome weisen eine Histologie auf, die sich vom intestinalen Drüsenepithel ableitet. Bei 20% aller kolorektalen Karzinomen treten intrazellulärer Verschleimung in Form eines Siegelringkarzinoms auf, die übrigen 10% werden vornehmlich aus Gallertkarzinomen mit extrazellulären Schleimnestern gebildet. Undifferenzierte Karzinome sowie Adenoakanthome und Plattenepithelkarzinome treten selten auf. Wie bei allen Karzinomen führt die histopathologische Aufarbeitung zum Grading des Gewebes anhand der Zelldifferenzierung (vgl. III.1.2.6.2.4, Abb. 61).

---

<sup>105</sup> Aarnio M. et al. 1995

<sup>106</sup> Slattery M.L. et al. 1998

<sup>107</sup> Sinha R. et al. 2005

<sup>108</sup> Chan AT et al. 2004

<sup>109</sup> Dubé C. et al. 2007

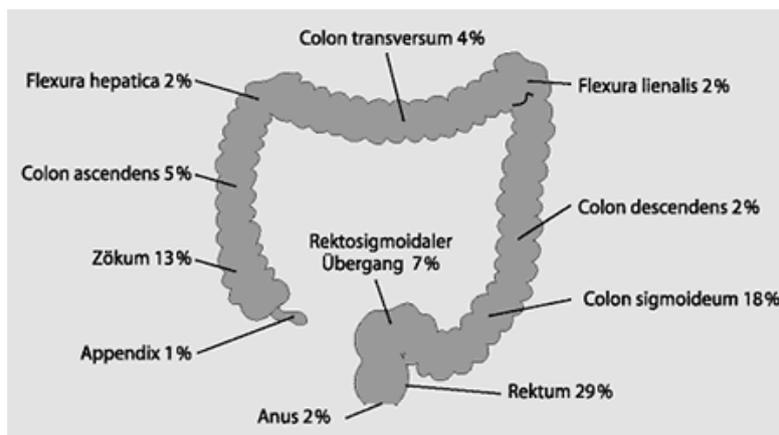
<sup>110</sup> Grodstein F. et al. 1998

<sup>111</sup> Grodstein F. et al. 1999

### I.8.1.5 Molekulare Aspekte des kolorektalen Karzinoms

Während auf zellulärer Ebene ein klares Bild über die sequentielle Entstehung der Erkrankung besteht, haben frühzeitig auch auf molekularer Ebene Erklärungsansätze zum pathogenetischen Verständnis der Erkrankung beigetragen<sup>112</sup>. Es ist bekannt, dass veränderte Onkogene und Tumorsuppressorgene wie mutiertes p53<sup>113</sup>, C-K-ras<sup>114</sup>, DCC sowie HER-2<sup>115</sup>, CEA<sup>116</sup> und viele weitere Faktoren<sup>117</sup> einen entscheidenden Beitrag zur Karzinogenese des Kolonkarzinoms leisten. In Summation ist trotz sämtlicher bekannter Faktoren die Entwicklung dieses Tumors weiterhin als Puzzle zu sehen, bei dem viele Teile fortwährend entdeckt werden, das Gesamtbild jedoch weiterhin noch nicht komplettiert ist. Durch den Einfluss bereits bekannter TRA an der Karzinomentstehung scheinen sich Möglichkeiten zu eröffnen, in diesem Bereich Ansatzpunkte einer Therapie entwickeln zu können.

### I.8.1.6 Lokalisation des kolorektalen Karzinoms



**Abb. 18:** Lokalisationsverteilung kolorektaler Karzinome nach Schmiegel W.: S3-Leitlinie „Kolorektales Karzinom“

Viele kolorektale Karzinome sind im Bereich bis 16 cm ab der Anokutanlinie lokalisiert und damit palpierbar. Gemeinsam mit den Tumoren des Kolon sigmoideum machen diese distalen Malignome knapp 60% und damit

über die Hälfte aller kolorektalen Tumoren aus. Die restlichen Tumoren verteilen sich gemäß Abb. 18 auf das restliche Kolon<sup>118</sup>.

<sup>112</sup> Gold P., Freedman S.O. 1965

<sup>113</sup> Rodrigues N.R. et al. 1990

<sup>114</sup> Bos J.L. 1989

<sup>115</sup> Meltzer S.J. et al. 1987

<sup>116</sup> Muraro R. et al. 1985

<sup>117</sup> Valassiadou K.E. et al. 1997

<sup>118</sup> Schmiegel W. et al. 2008 bzw. 2009

### I.8.1.7 Metastasierung des kolorektalen Karzinoms

Die metastatische Ausbreitung der kolorektalen Karzinome erfolgt auf lymphogenem und hämatogenem Weg. Über die Lymphgefäße entstehen allem regionale Lymphknotenmetastasen perikolisch, perirektal, paraaortal und inguinal sowie im Bereich der Beckenwand und der mesenterialen Gefäße. Die hämatogene Metastasierung folgt dem venösen Abstrom des Kolons über die Vena portae und führt nach der Kaskadentheorie<sup>119</sup> initial zu Tumoren in der Leber als primär drainierendes Organ. Sequentiell folgt die Metastasierung der Lunge. Beim tiefsitzenden Rektumkarzinom ist eine direkte Metastasierung in die Lunge durch den venösen Abfluss über die Vena cava inferior möglich.

### I.8.1.8 Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms

Neben der üblichen TNM- Klassifikation der WHO<sup>120</sup> wird das kolorektale Karzinom gemäß der UICC- Klassifikation (Union internationale contre le cancer) eingeteilt<sup>121</sup>. Die seit 1932 existierende Einteilung nach Dukes<sup>122</sup> wird dagegen zunehmend verlassen. Tab. 2 stellt die unterschiedlichen Einteilungen anhand von Histologie, Lymphknoten- und Fernmetastasierung einander gegenüber. Für das Rektumkarzinom existiert seit 1975 zudem die klinisch orientierte Einteilung nach Mason, die vornehmlich auf die Verschieblichkeit des Tumors auf seiner Unterlage und die Eindringtiefe fokussiert<sup>123</sup>.

**Tab. 2** zeigt mit der TNM- Klassifikation sowie der Einteilung nach UICC und Dukes die verschiedenen Kategorisierungsmöglichkeiten des kolorektalen Karzinoms  
is: in situ

Histologie	TNM-Klassifikation			UICC-Stadium	Dukes-Stadium
	T	N	M		
Carcinoma in situ	is	0	0	0	
Infiltration von Tunica mukosa Tela submukosa	1	0	0	Ia	A
Infiltration von Lamina muscularis propria	2	0	0	Ib	
Infiltration sämtlicher Wand- schichten	3	0	0	II	B
Überschreitung der Darmwand	4	0	0		
Infiltration regionaler Lymphknoten oder Umgebung	1-4	1-3	0	III	C
Fernmetastasierung	1-4	0-3	1	IV	D

<sup>119</sup> Roessner A. et al. 2008

<sup>120</sup> Wittekin C., Meyer H.-J. 2010

<sup>121</sup> Sobin L.H., Wittekin C. 2002

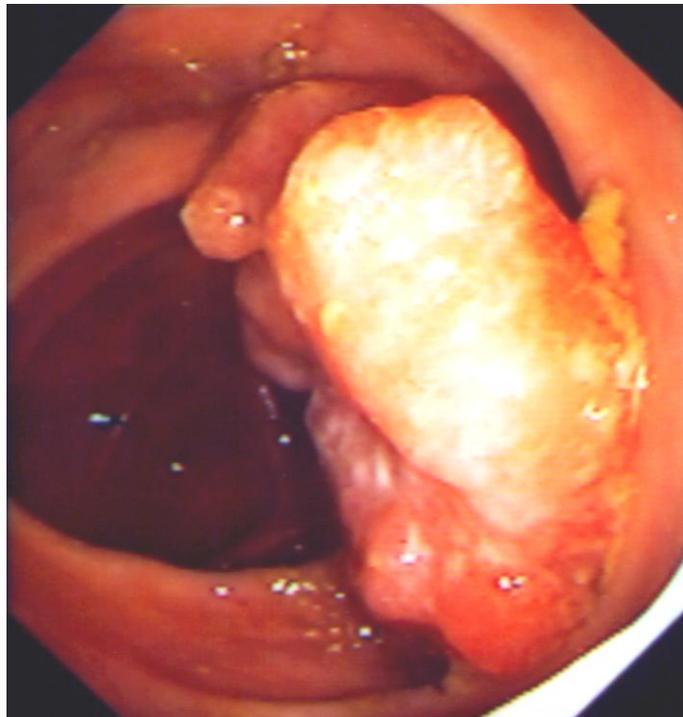
<sup>122</sup> Williams S.T. et al. 1992

<sup>123</sup> Mason A.Y. 1975

### I.8.1.9 Klinik des kolorektalen Karzinoms

Da kolorektale Karzinome zumeist ohne Frühsymptome einhergehen und der Speisebrei luminale Einengungen des Intestinums lange Zeit problemlos passieren kann, tritt eine klinische Manifestation der Tumoren oft erst im fortgeschrittenen Stadium auf. Demzufolge befinden bei Diagnosestellung bereits mehr als ein Drittel der Patienten im Stadium III nach UICC<sup>124</sup>. Neben unspezifischen Beschwerden wie Müdigkeit, Leistungsminderung, Gewichtsreduktion und Nachtschweiß im Sinne einer B- Symptomatik können intestinale Probleme mit Tenesmen, veränderten Stuhlgewohnheiten mit Obstipation oder paradoxen Diarrhoen bis hin zum Subileus oder gar manifesten Ileus auftreten.

Makroskopisch sichtbare Blutbeimengungen im Stuhl können auf einen exophytischen Tumor mit begleitender hypochromer Blutungsanämie hinweisen, während sich zur Detektion okkultur Blutungen der Hemoccult- Test® als Screeninguntersuchung mit einer Sensitivität von ca. 95% etabliert hat<sup>125,126</sup>.



### I.8.1.10 Diagnostik des kolorektalen Karzinoms

Nach Anamneseerhebung und klinischer Untersuchung inklusive rektaler Palpation wird bei Tumorverdacht primär eine Kolo- bzw. Rektosigmoidoskopie durchgeführt. Die Lokalisa-

**Abb. 19** zeigt das koloskopische Bild des Kolonkarzinoms CCA 90 (vgl. Tab. 14). Als dunkler Kreis erscheint das Lumen des Kolons. Von rechts in dieses Lumen hereinragend, aufgrund der starken Lichtquelle der Optik in weißlich-gelblicher Farbe, imponiert der Tumor. Dieser sitzt am rechten Bildrand der normalen Schleimhaut breitbasig auf und wächst exophytisch nach intraluminal vor, wobei er bereits einen Teil des Lumens obstruiert.

Mit freundlicher Genehmigung von Professor Dr. med. A. Königsrainer (Chirurgische Klinik, Universität Tübingen) bereitgestelltes Bild, das während der Koloskopie bei Erstdiagnose des Karzinoms angefertigt wurde.

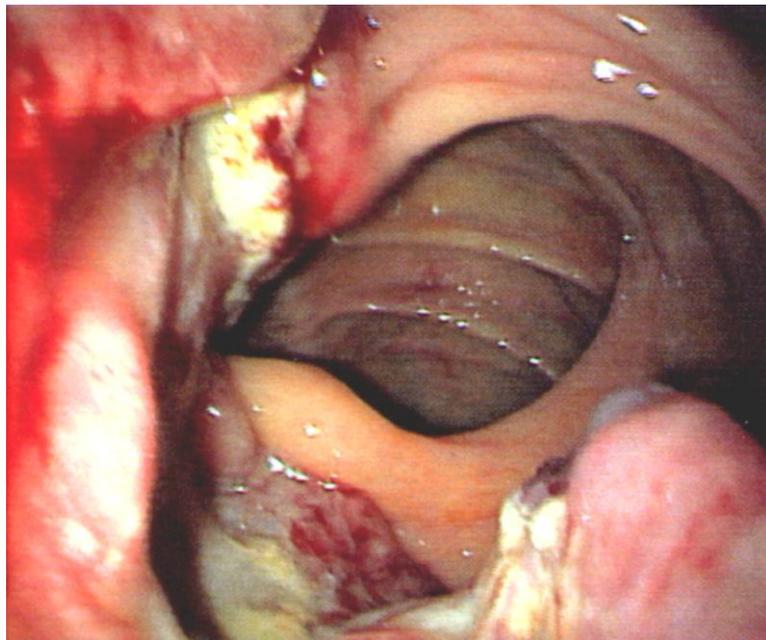
<sup>124</sup> Geißler M., Graeven U. 2005

<sup>125</sup> Souques M., Zummer K. 2000

<sup>126</sup> Chambers K.J., Morgan B.P. 2008

tion und oberflächliche Ausdehnung des Tumors lässt sich hierdurch bestimmen und Biopsien zur histologischen Aufarbeitung gewinnen. Ein komplettes Tumorstaging zur Stadieneinteilung und Therapieplanung wird angeschlossen. Hierbei kommen je nach Befund die abdominelle Sonographie, konventionelles Röntgen sowie radiologische Schnittbildverfahren wie z.B. CT oder MRT zum Einsatz. Wie bei vielen anderen Tumoren existieren auch beim kolorektalen Karzinom zahlreiche Tumormarker, wobei neben CA 19-9, CA 50, CA125, Thyridinkinase und Phosphoexoseisomerase das carcinoembryonale Antigen (CEA) als bedeutendster Marker anzusehen ist<sup>127</sup>. Da das CEA nicht tumorspezifisch ist, findet es seinen Einsatz als Verlaufsparmeter, als Screeninguntersuchung ähnlich dem prostataspezifischen Antigen (PSA) beim Prostatakarzinom hat es keinen Stellenwert.

**Abb. 20** zeigt das koloskopische Bild des Kolonkarzinoms CCA93 (vgl. Tab. 14). Im Unterschied zum exophytischen Wachstum von CCA90 (vgl. Abb. 19) zeigt dieser Tumor ein intraparenchymatöses Wachstumsmuster mit deutlicher Infiltration der gesamten Kolonwand und nur geringer Vorwölbung in das Lumen des Darmes. Durch die infiltrierende Ausbreitung ist die Wand des Kolons an der linken Bildseite deutlich verändert, speziell im Vergleich zur makroskopisch unauffälligen Schleimhaut distal. Der Tumor zeigt sich mit weißlich-gelblicher, teilweise gräulicher Struktur und multiplen Blutauflagerungen bzw. frischen Blutschlieren.



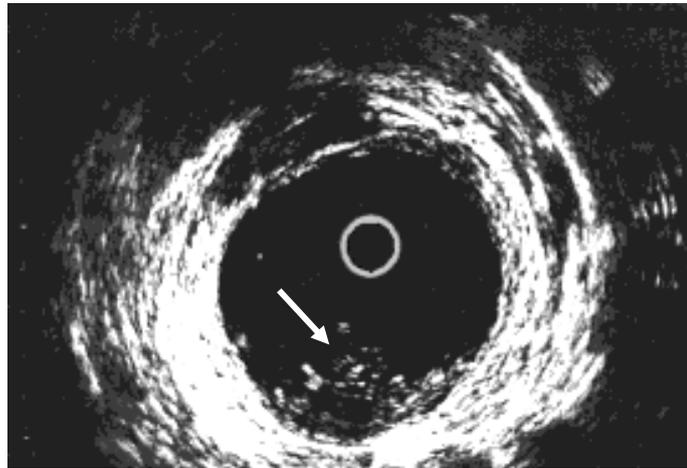
### I.8.1.11 Therapie des kolorektalen Karzinoms

Als primäre Standardtherapie des kolorektalen Karzinoms ist die offene chirurgische Resektion nach onkologischen Kriterien mit vorgegebenem Abstand der Resektionsgrenzen zum Tumor, die R0-Resektion, anzusehen. Beim Rektumkarzinom beinhaltet diese Resektion oft die komplette Entfernung des Mesorektems als totale mesorektale Tumorexzision. Demgegenüber stehen endoskopi-

<sup>127</sup> Muraro R. 1985

sche oder laparoskopische Verfahren zur Abtragung von Polypen, sehr lokalisierten Adenomen oder allenfalls frühen Tumorformen.

Die sich anschließende Behandlung orientiert sich an der Klassifikation des Karzinoms vor der chirurgischen Abtragung sowie an der erreichten chirurgischen Lokaltherapie (Resektionsgrad). Während die chirurgische Resektion weiterhin das zentrale Element



im Komplex der Behandlung des Kolonkarzinoms darstellt, wird sie bereit seit Jahrzehnten durch eine multidisziplinäre Therapie unter Einbeziehung von Chemo- und Strahlentherapie ergänzt. Da

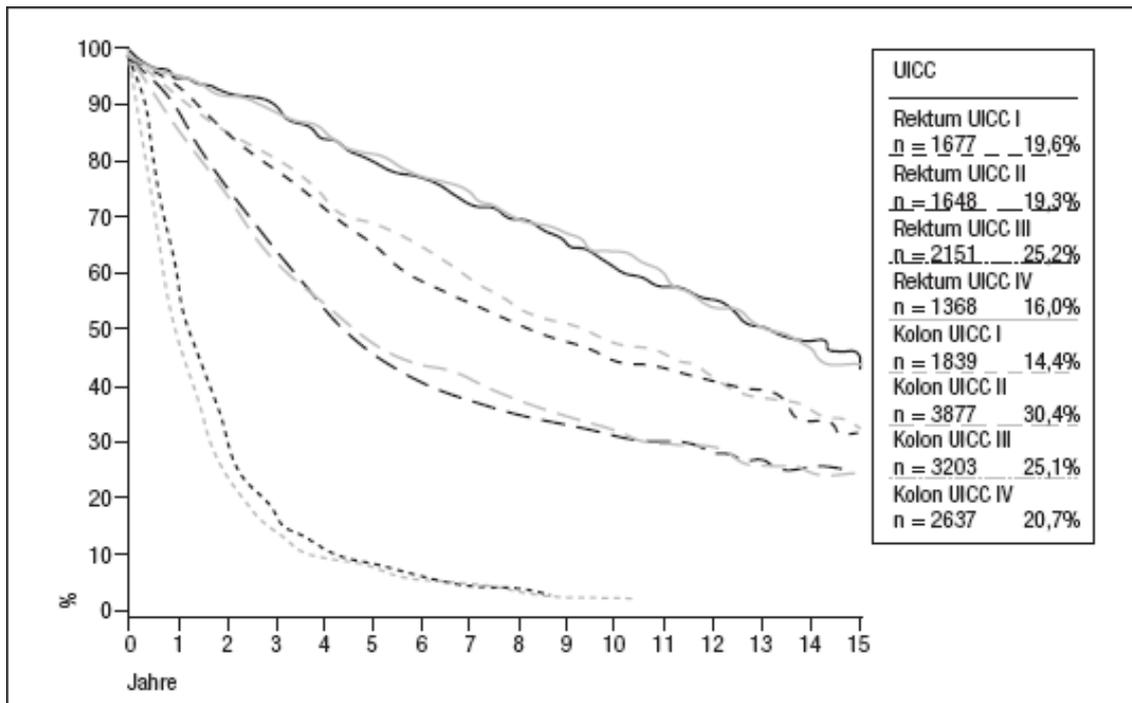
**Abb. 21** zeigt das Bild einer transrektalen Endosonographie, die im Rahmen der Staginguntersuchung vor der jeweiligen Operation durchgeführt wurde. Hierbei handelt es sich um das Bild des villösen Rektumkarzinoms RCA 2 (vgl. III.4.5.1), das mit einem Durchmesser von 4,0 cm als T2 Stadium einkategorisiert wurde. Der weiße Kreis symbolisiert die transrektale Sonde im Lumen des Rektums, die großen ringförmigen weißlichen Strukturen die Wand des Rektums während der weiße Pfeil auf die flockig-weißliche, aufgelockerte Struktur deutet, die als Karzinom zu identifizieren ist.

dieses Vorgehen aufgrund von Entität (Kolon- oder Rektumkarzinom), Stadium, Resektionsgrad, Rezidivsituation, Alter und Zustand des Patienten, Therapiewunsch sowie vielen weiteren Kriterien stets eine individualisierte Entscheidung bleibt, kann und soll in diesem Rahmen keine allgemeingültige Aussage zur differenzierten Tumorthherapie gegeben werden. Zusätzlich muss erwähnt werden, dass diese Therapie einem raschen Wandel unterworfen ist und aufgrund ihrer Komplexität vor allem im Hinblick auf ein individuell adaptiertes Vorgehen den Rahmen dieser Einleitung sprengen würde.

Deshalb darf auf die aktuelle Literatur zur Therapie des kolorektalen Karzinoms z.B. in Form der S3- Leitlinien verwiesen werden<sup>128,129</sup>. Hierauf basierend sollte die Therapieentscheidung stets im interdisziplinären Setting erarbeitet werden.

<sup>128</sup> Schmiegel W. et al. 2008, 2009

<sup>129</sup> www.dgvs.de



**Abb. 22:** Gesamtüberleben der Patienten in Jahren getrennt nach Stadium, Entität (aus Manual Gastrointestinale Tumoren des Tumorzentrums München)<sup>130</sup>

### I.8.1.12 Prognose des kolorektalen Karzinoms

Trotz stetiger Verbesserungen in primärer und sekundärer Prophylaxe, Früherkennung, Diagnostik und Therapie des kolorektalen Karzinoms ist das Überleben der Patienten vor allem in den fortgeschrittenen, z.B. III und IV nach UICC, weiterhin als katastrophal einzuschätzen (vgl. Abb. 22)<sup>131</sup>.

### I.8.2 Karzinome der Speiseröhre und des Magens

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine geringe Anzahl an Karzinomen von Speiseröhre und Magen analysiert (vgl. Kap. III). Erfreulicherweise konnten hierbei einzelne Peptidliganden identifiziert werden. Trotzdem soll der Fokus dieser Dissertation auf das Kolon- und Nierenzellkarzinom gelegt werden, so dass auf eine einleitende Darstellung von Pathogenese, Diagnostik sowie Therapie und Verlauf dieser beiden Tumorentitäten verzichtet wird.

<sup>130</sup> Sendler A. 2006, 2010

<sup>131</sup> Geißler M., Graeven U. 2005

## **I.9. Das Nierenzellkarzinom**

### **I.9.1. Definition des Nierenzellkarzinoms**

Das Nierenzellkarzinom ist mit einem Anteil von 3 - 5% aller Malignome der häufigste maligne epitheliale Tumor der Niere im Erwachsenenalter<sup>132</sup>. Im klinischen Sprachgebrauch sind die ursprünglichen verwendeten, eher irreführenden Bezeichnungen Hypernephrom, hypernephroides Karzinom sowie Grawitz-tumor seit längerem verlassen worden. Grawitz veröffentlichte 1863 erstmals grundlegende morphologische Darstellungen der Nierenzellkarzinoms<sup>133</sup>.

### **I.9.2 Epidemiologie des Nierenzellkarzinoms**

Das Nierenzellkarzinom tritt hauptsächlich ab dem 50. Lebensjahr (mittleres Erkrankungsalter 67 - 71 Jahre) mit einer Inzidenz von 9,9 bzw. 19,2 pro 100.000 Einwohner pro Jahr bei Frauen bzw. bei Männern in Europa auf (vgl. I.8.1.2)<sup>134</sup>. Gehäuft liegt der Tumor bei Syndromen wie z.B. beim von- Hippel- Lindau- Syndrom vor<sup>135</sup>. Nachdem mehr als 40% der Patienten innerhalb der ersten 5 Jahre nach Diagnosestellung versterben, liegt dieser Tumor an sechster Stelle aller krebsbedingten Todesursachen<sup>136,137</sup>.

### **I.9.3 Ätiologie des Nierenzellkarzinoms**

Die Ätiologie des Nierenzellkarzinoms ist weitestgehend unbekannt, obwohl sich der Tumor im Tierversuch z.B. durch Östrogene und Strahlen hervorrufen lässt. Daneben werden Cadmium, Tabakrauch, Trichlorethen, einigen Medikamenten wie z.B. Phenacetin, Calciumantagonisten,  $\beta$ - Blocker sowie dem Kontrastmittel Thorotrast eine gesteigerte Kanzerogenität zugeschrieben<sup>138</sup>.

---

<sup>132</sup> www.rki.de

<sup>133</sup> Grawitz P. 1863

<sup>134</sup> Treiber U. 2008

<sup>135</sup> Latif F. et al. 1993

<sup>136</sup> Godley P.A., Ataga K.I. 2000

<sup>137</sup> Greenle R.T. et al. 2000

<sup>138</sup> Mc Credie M., Stewart J.H. 1992

### **I.9.4 Pathogenese des Nierenzellkarzinoms**

Das Nierenzellkarzinom nimmt vom epithelialen Parenchym der Niere, den Zellen der verschiedenen Tubuli und Sammelrohre, seinen Ausgang, so dass entsprechende Subtyp unterschieden werden können. Im Gegensatz zur Adenokarzinom-Sequenz beim Kolonkarzinom (vgl. Abb. 17) existieren für das Nierenzellkarzinom keine vergleichbaren Pathogenese-Schemata. Tritt der Tumor allerdings im Rahmen von Syndromen wie z.B. dem von Hippel-Lindau-Syndrom auf, scheinen spezielle Entwicklungsmechanismen zu gelten<sup>139</sup>. Auch bei einer Translokation des Chromosoms 3p ist ein familiär gehäuftes Auftreten von Nierenzellkarzinomen zu beobachten<sup>140</sup>.

### **I.9.5 Histologie des Nierenzellkarzinoms**

Im deutschsprachigen Raum basiert die histologische Klassifikation im Wesentlichen auf den Arbeiten von Thoenes<sup>141</sup>, der mit der Mainz-Klassifikation die Tumoren nach zytomorphologischen Kriterien und Wachstumsmustern (kompakt, tubulopapillär, zystisch) einteilt. Im englischen Sprachraum hingegen hat sich die einfachere Einteilung der UICC nach Störkel und Eble (vgl. Tab. 3) durchgesetzt<sup>142,143</sup>.

<p><b>Konventionelles Nierenkarzinom</b> (Häufigkeit ca. 70%)  <i>Entspricht weitgehend dem klarzelligem Karzinom der Mainzklassifikation</i>  <i>Genetik: Deletion auf Chromosom 3p, etwa 50% somatische Mutationen im von Hippel-Lindau-Gen.</i></p> <p><b>Papilläres Nierenkarzinom</b> (Häufigkeit ca. 10–15%)  <i>Entspricht dem chromophilen Nierenkarzinom der Mainzklassifikation</i>  <i>Genetik: Trisomien der Chromosomen 3q, 7, 12, 16, 17, 20 und Verlust des Y-Chromosoms.</i></p> <p><b>Chromophobes Nierenkarzinom</b> (Häufigkeit ca. 5%)  <i>Genetik: Monosomie multipler Chromosomen (1, 2, 6, 10, 13, 17, 21) und Hypodiploidie</i></p> <p><b>Collecting-duct-Karzinome</b> (Häufigkeit ca. 1%)  <i>I: Kubische, zylindrische oder polymorphe Zellen, teils basophil, teils eosinophil</i>  <i>II: Vorwiegend mikrozystisch-papillär, auch tubulär und kompakt; vorwiegend zentrale, papillennahe Lage</i></p> <p><b>Unklassifizierte Nierenkarzinome</b> (Häufigkeit ca. 10%)</p>
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

**Tab. 3** zeigt die zytomorphologisch orientierte UICC Klassifikation nach Störkel aus dem Jahr 1997 (aus dem Manual Urogenitale Tumoren des Tumorzentrums München)<sup>144</sup>

<sup>139</sup> Kim W.Y. 2004

<sup>140</sup> Cohen A.J. et al. 1979

<sup>141</sup> Thoenes et al. 1986

<sup>142</sup> Störkel S. van den Berg E. 1995

<sup>143</sup> Störkel S. et al. 1997

Durch zunehmendes Wissen um genetische Alterationen existiert neben den ursprünglich rein histologischen Einteilungen eine weitere, genetisch orientierte Klassifikation. Die Heidelberg-Klassifikation<sup>145</sup> unterscheidet das konventionelle, das papilläre und das chromophobe Nierenzellkarzinom vom Sammelrohrkarzinom<sup>146</sup> bzw. dem nicht-klassifizierbaren Nierenzellkarzinom. Aufgrund identischer molekulargenetischer Alterationen gleichklassifizierter Tumoren zeigt sich der Vorteil dieser Einteilung in einer verbesserten Einschätzung klinischer Verläufe und damit der Prognose<sup>147</sup>.

### **I.9.6 Molekulare Aspekte des Nierenzellkarzinoms**

Im Laufe der Jahre konnte eine lange Liste von Molekülen erstellt werden, die als biomolekulare Marker eine Prognoseabschätzung zulassen sollen<sup>148</sup>, deren Reliabilität allerdings bislang wenig evaluiert ist. Hierzu zählen unter anderem der nukleäre DNA- Gehalt – als Maß für die Ploidy –, PCNA, p105, Ki67 (MIB-1), p53, Bcl-2, Mdm-2<sup>149</sup>, p21, Onkogene wie c-myc, c-fas oder ras, CD44, E-Cadherin<sup>150</sup>, u-PA oder zytogenetische Faktoren. Zudem wurden G250<sup>151</sup>, HLA-A2<sup>152</sup>, HSP 70-2<sup>153</sup> RAGE, MAGE-2 und PRAME<sup>154,155</sup>, SART 3<sup>156</sup>, HER-2<sup>157</sup> und C-met<sup>158</sup> und viele weitere Aspekte<sup>159</sup> als tumorassoziierte Faktoren beschrieben.

---

<sup>144</sup> Liedl B. 2003

<sup>145</sup> Kovacs G. et al. 1997

<sup>146</sup> Dimopoulos M.A. et al. 1993

<sup>147</sup> Ljungberg B. et al. 1999

<sup>148</sup> Lang H. et al. 2003

<sup>149</sup> Voss R.H. et al. 2000

<sup>150</sup> Shimazui T. et al. 1997

<sup>151</sup> Grabmaier K. et al. 2000

<sup>152</sup> Brändle D. et al. 1996

<sup>153</sup> Gaudin C. et al. 1999

<sup>154</sup> Neumann E. et al. 1998

<sup>155</sup> Kessler J.H. et al. 2001

<sup>156</sup> Kawagoe N. et al. 2000

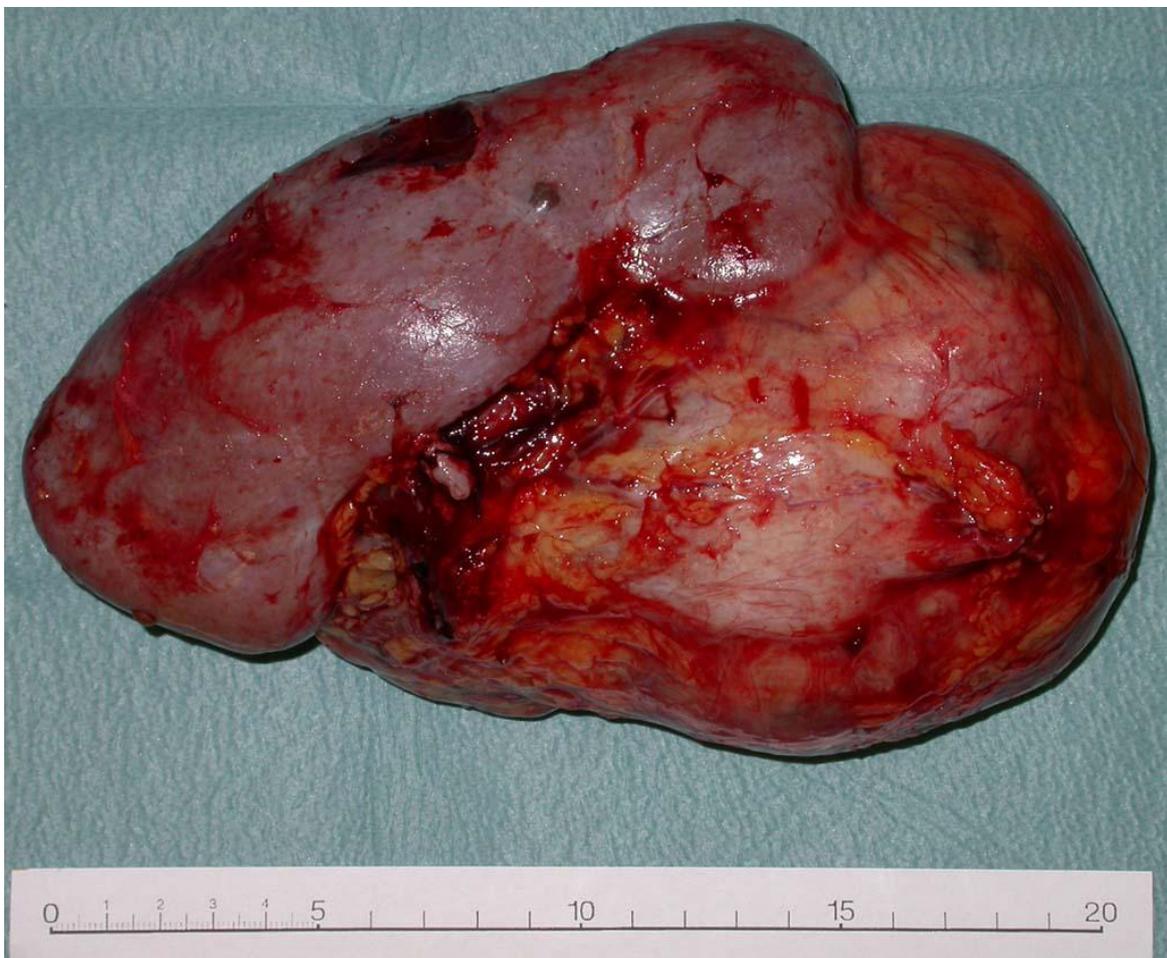
<sup>157</sup> Seliger B. et al. 2000

<sup>158</sup> Schag K. et al. 2004

<sup>159</sup> Yoshino S. et al. 1998

### I.9.7 Lokalisation des Nierenzellkarzinoms und Abgrenzung zum Nierenzelladenom

Das Nierenzellkarzinom geht in über 90% der Fälle vom Nierenparenchyms aus und ist bis zum Stadium T2 auf die Niere begrenzt (vgl. Tab. 4). Im Unterschied zu anderen malignen Systemerkrankungen spielt bei der Abgrenzung benignen von malignen Neoplasien als auch in Bezug auf die T- Klassifikation die Größe eine entscheidende Rolle. So wurden über lange Zeit alle Tumoren unter drei Zentimeter Größe als Adenom klassifiziert – unabhängig ihrer Histologie.



**Abb. 23** zeigt das makroskopische Bild eines großen Nierenzellkarzinoms. Der Tumor wurde en bloc zusammen mit seinem Entstehungsort, der Niere, als Tumornephrektomie durch die Kollegen der Urologischen Klinik Tübingen operativ entfernt. Im direkt postoperativ angefertigten Bild ist die Niere als bohnenförmige, rotgräuliche Struktur, von links unten nach rechts oben ausgerichtet, zu sehen. Die hellroten Auflagerungen zeigen restliche Blutkoagel nach Operation. Die farblich unregelmäßige, große kugelförmige Struktur, die vom Nierenbecken auszugehen scheint und bis über den oberen Pol der Niere hinausragt, ist das über 10 cm durchmessende Nierenzellkarzinom.

Heutzutage ist neben der reinen Größe, die zur Differenzierung von T1a-, T1b- und T2- Tumoren beiträgt v.a. der Bezug des Malignoms zu den benachbarten Strukturen von perirenalem Fett, Nebennieren, Hauptvenen sub- oder supra-diaphragmal sowie der Gerota- Faszie für die Klassifikation entscheidend



**Abb. 24** zeigt das makroskopische Bild eines weiteren Nierenzellkarzinoms. Im Vgl. zu Abb. 23 wurde das komplette Nephrektomiepräparat bereits entlang der Margo lateralis längs eröffnet und aufgeklappt, so dass der Blick auf die Binnenstrukturen frei wird. In diesem Fall ist der gut abzugrenzende, runde Tumor im linken Drittel der Niere durch eine leuchtend weiße Kapsel vergleichsweise deutlich vom umgebenden Nierenparenchym abzugrenzen. Im Unterschied zum Parenchym ist der Tumor ungeordnet aufgebaut, fasrig und blutig durchsetzt als Ausdruck des „überstürzten“, raschen Wachstums.

### **I.9.8 Metastasierung des Nierenzellkarzinoms**

Wie bei andere Karzinomen entscheidet einerseits vor allem die Tatsache der erfolgten Metastasierung, darüber hinaus jedoch auch das Ausmaß, die Größe und Lokalisation von Metastasen entscheidend über die Prognose der Erkrankung<sup>160</sup>. Im Unterschied zu den oben dargestellten Kolonkarzinomen (vgl.

<sup>160</sup> Lang H., Jacqmin D. 2000

I.8.1.7) findet die Metastasierung vor allem über den Blutabfluss der Vena cava inferior statt und zeigt sich damit in der Lunge sowie in Skelett, Nebennieren, kontralateraler Niere und im Gehirn. Weitere bevorzugt betroffene Organe sind Lymphknoten sowie die Leber.

## I.9.9 Stadieneinteilung des Nierenzellkarzinoms

### I.9.9.1 Staging

Ausbreitung	TNM- Klassifikation			UICC-Stadium
	T	N	M	
Carcinoma in situ	is	0	0	0
Tumor-DM < 4cm, organbegrenzt	1a	0	0	I
Tumor-DM > 4cm, < 7cm, organbegrenzt	1b	0	0	
Tumor-DM > 7cm, organbegrenzt	2	0	0	II
T organbegrenzt, 1 regionale N- Metastase	1-3	1		III
T in NN/ Gewebe perirenal, innerhalb der FG	3a		0	
T in VC unterhalb Diaphragma	3b	0		
T in VC bis oberhalb Diaphragma	3c			
T jenseits der FG	4	0,1	0	IV
Jedes T, mehrere regionale N- Metastasen	1-4	2	0	
Jedes T, jedes N, mit Fernmetastasen	1-4	0-2	1	

**Tab .4:** TNM- Klassifikation der UICC, 2002

DM: Durchmesser, FG: Fascia Gerota, N: Lymphknoten, NN: Nebenniere, T: Tumor, VC: Vena Cava, is: Tumor in situ

Während im angloamerikanischen Raum die Einteilung nach Robson<sup>161</sup> favorisiert wird, werden die Nierenzellkarzinome in Europa wie die meisten Malignome anhand der TNM- Klassifikation kategorisiert. Gegenüber der Robson- Klassifikation scheint die Einteilung nach UICC aufgrund der Einbeziehung der Tumorgöße ein prognostisches Potential zu bieten (vg. I.9.7)<sup>162,163</sup>.

Die üblichen TNM- Kriterien ergänzend wird V zur Beschreibung der Tumordinfiltration der Vena cava inferior eingesetzt. Revisionen der Klassifikation in den Jahren 1997 und 2002 bezogen sich vor allem auf die veränderten Cut-off-Größen von Tumor und Lymphknoten von T1/ T2 sowie N1, N2 bzw.N3. Die 7.

<sup>161</sup> Robson C.J. et al. 1969

<sup>162</sup> Kinouchi T. et al. 1999

<sup>163</sup> Wittekind C., Meyer H.-J. 2010

Novellierung aus dem Jahr 2009, die in der Bundesrepublik seit 2010 verwendet wird, führte eine Subklassifikation des T2- Stadiums ein, nach der Tumoren zwischen 7 und 10 cm Größe als T2a, darüber hinaus als T2b bezeichnet werden.

### **I.9.9.2 Grading**

Das histomorphologische Grading der Nierenzellkarzinome gestaltet sich für den Pathologen äußerst schwierig. Andererseits stellt gerade diese Klassifikation einen der wichtigsten prognostischen Faktoren dar, insbesondere in den niedrigen Stadien T1 und T2. Am besten reproduzierbar schien über viele Jahre das System von Syrjanen & Hjelt zu sein<sup>164</sup>, heute wird jedoch vornehmlich den Darstellungen von Medeiros gefolgt<sup>165</sup>. Analog zu anderen Karzinomen findet eine Kategorisierung in drei bzw. vier Grade statt (G1 – gut differenziert, G2 – mäßig differenziert, G3/4 – schlecht differenziert/ undifferenziert), die Zuordnung des Gesamttumors folgt dabei dem höchsten vorkommenden Grad.

### **I.9.10 Klinik des Nierenzellkarzinoms**

Ein Großteil der Erkrankungen mit späterem Nachweis eines Nierenzellkarzinoms verlaufen primär asymptomatisch, es existieren keine spezifischen Frühsymptome. Hierfür spricht, dass der Anteil zufällig entdeckter Nierenzellkarzinome in einem Bereich zwischen 40 – 70% liegt<sup>166,167</sup>.

Treten klinische Symptome auf, ist das Karzinom meistens bereits fortgeschritten und löst durch die Affektion benachbarter Strukturen Symptome aus. Hierbei handelt es sich um das vermeintliche Leitsymptom Hämaturie, das in ca. 60% der Fälle auftritt und durch einen Einbruch des Tumors in das Nierenbecken verursacht wird. Daneben sind Flankenschmerzen (38%), ein tastbarer Flankentumor (21%), unklares Fieber mit gesteigerter Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit sowie eine Varikozele des linken Hodens, durch Stauung der Vena renalis sinistra, typische Befunde. Paraneoplastische Syndrome infolge in-

---

<sup>164</sup> Syrjanen K., Hjelt L. 1978

<sup>165</sup> Medeiros L.J. et al. 1997

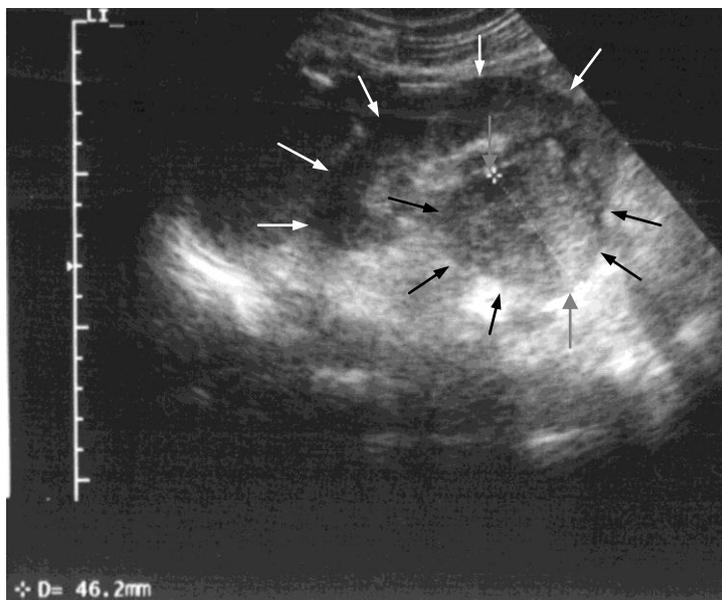
<sup>166</sup> Skinner D.G. et al. 1971

<sup>167</sup> Hellsten S. et al. 1990

adäquater Hormonproduktion von Renin, Erythropoetin oder PTHrP (**parathormon-related protein**) können ebenfalls beobachtet werden. Die klassische klinische Symptomtrias aus Hämaturie, Flankenschmerz und tastbarem Tumor tritt nur in unter zehn Prozent aller Fälle auf.

### I.9.11 Diagnostik des Nierenzellkarzinoms

Aus diesem Grund tritt die klinische Symptomatik zunehmend in den Hintergrund und wird heutzutage durch die übliche Diagnostik mit laborchemischer Analytik, funktionellen Untersuchungen wie Szintigraphien sowie verschiedenen schnittbildgebenden Verfahren abgelöst. Dabei ist die Sonographie als einfaches, billiges und schnell sowie ubiquitär verfügbares Verfahren zu einem Hauptdiagnostikum geworden. Im Einzelfall muss die Diagnostik durch eine renale Angiographie, Phlebographie, seitengetrenter MAG- Clearance oder anderen Verfahren erweitert werden. Nur selten ist eine Tumorbiopsie notwendig und sollte aufgrund erhöhten Risikos der Tumoraussaat vermieden werden.



**Abb. 25** zeigt die Sonographie des Nierenzellkarzinoms NZK 17 (vgl. Kap. III). Die Niere ist im Längsschnitt in Form der dunklen Nierenrinne mit dem typischen bohnenförmigen Umriss (Markierung mit weißen Pfeilen) abzugrenzen. Das große Karzinom imponiert als graue rundliche Struktur auf der rechten Bildhälfte (schwarze Pfeile) und wächst verdrängend in Richtung Nierenbecken. Die grauen Pfeile weisen auf die beiden gestrichelt verbundenen grauen Kreuze hin, die den Durchmesser des Tumors mit 46,2 mm bemessen. (Angabe in der linken unteren Ecke, Referenzskalierung am Bildrand in Zentimeter)

## **I.9.12 Therapie des Nierenzellkarzinoms**

### **I.9.12.1 Operative Therapie**

Die operative Therapie stellt beim Nierenzellkarzinom aus Gründen der relativen Strahlen- und Chemosensibilität seit jeher die Behandlung der ersten Wahl dar, im lokalisierten als auch im metastasierten Stadium. Die Operation wird über einen trans- oder extraperitonealen Zugang durchgeführt, wobei je nach Stadium neben der radikalen Nephrektomie über eine zusätzliche Entfernung von z.B. Fettkapsel, Nebenniere und Lymphknoten individuell entschieden werden muss<sup>168</sup>. Durch verbesserte Früherkennungsmaßnahmen ist eine steigende Anzahl organerhaltender Tumoroperationen mit guten Erfolgen zu verzeichnen<sup>169,170</sup>.

### **I.9.12.2 Immuntherapie**

Neben der Optimierung der operativen Behandlung des Nierenzellkarzinoms wurde seit jeher intensiv nach alternativen bzw. ergänzenden Therapiekonzepten abseits von Strahlen- oder Chemotherapie gesucht, um Behandlungen sowohl in adjuvanter als auch in palliativer Situation verwirklichen zu können.

Die Beobachtung spontaner Remissionen solider Metastasen, die im Bereich der Lungen in nahezu 1% der Fälle nachzuweisen sind, ließ auf eine Immunreaktion des Organismus schließen. Demgegenüber bestehen Hinweise für eine deutlich verminderte und reduzierte Reaktivität des Immunsystems gegenüber Nierenzellkarzinomen<sup>171</sup>.

Bereits 1983 wurden immunmodulatorische Therapiestudien mit unterschiedlichen Zytokinen wie Interferonen oder Interleukinen durchgeführt. Bei teils erheblichen Nebenwirkungen<sup>172</sup> lag die Ansprechrate unter 20%, nur in einzelnen Studien wurde ein Ansprechen von 30% oder mehr beobachtet<sup>173</sup>. Im Laufe der folgenden Jahre zeigte sich in klinischen Vakzinierungsstudien, dass sich unter Einsatz verschiedenster Vakzine eine Steigerung des Ansprechens mit Stabili-

---

<sup>168</sup> Robson C.J. 1963

<sup>169</sup> Morgan W., Zincke H. 1990

<sup>170</sup> Licht M.R., Novick A.C. 1993

<sup>171</sup> Alexander J. et al. 1993

<sup>172</sup> Duensing S. et al. 1996

<sup>173</sup> Quesada et al. 1985

sierung der Erkrankung bis hin zur Regredienz und Remission einzelner Läsionen erzielen lässt (vgl. I.7.4.3 bzw. Kap. IV). Als bahnbrechender Erfolg wurde in den letzten Jahren jedoch der Einsatz von Tyrosinkinaseinhibitoren wie Sorafenib<sup>174</sup> bzw. Sunitinib<sup>175,176</sup> oder von immunmodulatorischen Substanzen wie den m-TOR- Inhibitoren Temsirolimus<sup>177</sup> oder Everolimus<sup>178</sup> propagiert, die ein noch besseres Ansprechen erreichen (vgl. Kap. IV)<sup>179</sup>.

Trotz allem ist bislang noch keine befriedigende Therapie für Patienten mit metastasiertem Nierenzellkarzinom etabliert, die zu einem langfristigeren Überleben der Patienten beiträgt.

### **I.9.13 Prognose des Nierenzellkarzinoms**

Während die TNM- Klassifikation eine genaue Beschreibung der Tumorausbreitung liefert, misslingt der Versuch, aus Tumorstadium eindeutige prognostische Informationen für diese Tumorentität abzuleiten. In den letzten Jahren wurden Prognosescores entwickelt, die anhand einfach zu erhebender Daten wie BSG, LDH, Hb usw. eine Risikostratifizierung erlauben. Aktuell wird zur Differenzierung der Risikoprofile die Einteilung nach Motzer verwendet<sup>180</sup>.

Zusätzlich sollen molekularen Parametern wie Tumorsuppressor- oder Onkogene als auch Proliferations- und Apoptosemarker prognostische Hinweise liefern<sup>181</sup>. Hierzu zählen eine Vielzahl der unter I.9.6 dargestellten molekularen Strukturen. Daneben erwartet man auch von Wachstumsfaktoren wie dem EGF<sup>182</sup>, von TGF- $\beta$  oder Faktoren der Tumorangiogenese.

---

<sup>174</sup> Escudier B. et al. 2007 a

<sup>175</sup> Motzer R.J. et al. 2007

<sup>176</sup> Motzer R.J. et al. 2009

<sup>177</sup> Atkins M.B. et al. 2004

<sup>178</sup> Motzer R.J. et al. 2008

<sup>179</sup> Coppin C. et al. 2008

<sup>180</sup> Motzer R.J. et al. 1999

<sup>181</sup> Pomer S., Staehler G 1996

<sup>182</sup> Hofmockel G. et al. 1997

### **I.9.14 Prophylaxe des Nierenzellkarzinoms**

Die Prophylaxe des Nierenzellkarzinoms bezieht sich vor allem auf die Nachsorge bei Patienten nach Nephrektomie in Form einer sekundären Prophylaxe, damit zur frühzeitigen Detektion eines Rezidivs. Ob in der Primärprophylaxe tumoröser Erkrankungen Ernährungsgewohnheiten eine entscheidende Rolle spielen bzw. ob eine entsprechende Ernährung das Auftreten bestimmter Malignome verhindern kann, wird durch Einzelfallberichte in den Medien oftmals propagiert, eine definitive wissenschaftliche Basis existiert hierfür jedoch nicht<sup>183</sup>.

## **I.10. Zielsetzung der Dissertation**

### **I.10.1 Die Auswahl der Karzinome**

Da sowohl das kolorektale Karzinome als auch das Nierenzellkarzinom in vielen Fällen erst in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert werden, sind die Therapievoraussetzungen oft erschwert. Beim metastasierten kolorektalen Karzinom hat sich eine Polychemotherapie nach dem FOLFOX<sup>184,185</sup>- oder FOLFIRI<sup>186</sup>-Schema als Standardbehandlung etabliert, heutzutage ergänzt durch die Applikation von mAK<sup>187,188</sup>. Beim Nierenzellkarzinom wird seit kurzer Zeit die Angiogenesehemmung als zentrales Therapieziel verfolgt wird. Trotz erzielter Erfolge ist die Behandlung beider Tumorentitäten verbesserungswürdig, im Hinblick auf krankheitsfreies und Gesamtüberleben einerseits, andererseits vor dem Hintergrund gravierender Unverträglichkeiten und Nebenwirkungen. Auf der anderen Seite haben die Erfolge der Immuntherapie des malignen Melanoms gezeigt, dass sich neben einer Verbesserung der Lebensqualität auch die Regredienz von Malignomen und damit verbunden eine bessere Prognose erzielen lässt.

---

<sup>183</sup> Bravi F. et al. 2007

<sup>184</sup> De Gramont A. et al. 2000

<sup>185</sup> André T. et al. 2004

<sup>186</sup> Saltz L.B. et al. 2000

<sup>187</sup> Hurwitz H. et al. 2004

<sup>188</sup> Jonker D.J. et al. 2007

Da beim Nierenzell- als auch beim gastrointestinalen Malignom ein immunogenes Potential bekannt ist, scheinen diese Entitäten hoffnungsvolle Kandidaten für die Entwicklung einer Vakzinierungstherapie zu sein.

### **I.10.2. Konkrete Ziele**

#### **I.10.2.1 Allgemeine und spezielle Charakterisierung der Karzinome**

Um die Ligandenidentifizierung oben genannter Tumorentitäten (vgl. I.10.2.2-I.10.2.4) auf einer festen Basis zu gründen, sollen die verfügbaren Karzinome nicht nur bzgl. der Peptidliganden als Ansatz einer Vakzinierung analysiert werden, sondern darüber hinaus auf vielfältige allgemeine und spezielle Tumorcharakteristika untersucht werden. Hierüber muss bestätigt werden, dass die verwendeten Tumoren als repräsentativ und damit relevant im Bezug auf das Gesamtpatientenkollektiv zu sehen sind. Darüber hinaus besteht die Hoffnung, über einfache Analysen von Inzidenzalter, Geschlecht, Tumorgroße und – gewicht oder ähnliches erste Hinweise auf den Aufarbeitungsprozess oder die Ergebnisse abzuleiten.

#### **I.10.2.2 Optimierung der Ligandenidentifikation**

Da die bisherige Ligandenidentifikation vornehmlich Lysat aus Tumorzellkulturen verwendete, muss diese Methodik auf das differente Ausgangsmaterial in Form von solidem Tumorgewebe adaptiert werden, um möglichst schnell eine optimierte, angepasste Aufarbeitung dieser Gewebe zu erzielen. Zudem wird eine Steigerung der Effizienz antizipiert.

Hierzu sollen alle Ausgangsmaterialien wie beispielsweise AK oder Protein A-Sepharose sowohl initial als auch im Verlauf in ihrer Qualität kontinuierlich überprüft werden, um Probleme auszuschließen oder diese zumindest frühzeitig erkennen und beheben zu können. Zusätzlich sollen alle Aufarbeitungsschritte von der Entnahme des Gewebes bis zur finalen massenspektrometischen Detektion einzeln analysiert, in Dauer und Intensität quantifiziert und nachfolgend hinterfragt werden, um dadurch eine Optimierung jedes einzelnen Prozesses zu evaluieren. Ziel ist, sowohl über verbesserte Materialien und Methoden eine Ef-

fizienzsteigerung bei gleichzeitiger Reduktion der notwendigen Zeit und Kosten zu erreichen. Zusätzlich stellt sich die Frage, ob Kriterien vor oder während der Tumoraufarbeitung zu definieren sind, die eine prospektive Aussage hinsichtlich einer erfolgreichen Tumoraufarbeitung zulassen, so dass ein Teil der Analyseverfahren in ihrer prädiktiven Potenz evaluiert werden sollen.

### **I.10.2.3 Ligandenidentifikation zur HLA- Motivverfeinerung**

Da das hier verwendete Analyseverfahren auf einer bekannten HLA- Typisierung des Ausgangsgewebes gründet und erst durch die Prädiktion möglicher Peptide anhand bekannter HLA- Motive eine Identifikation ermöglicht wird, sollen möglichst viele Peptidliganden – bekannte sowie vor allem bislang unbekannt – auf verschiedenen HLA- Allelen identifiziert werden. Zwar ist von solidem Tumormaterial kein äquivalent großes Ligandom im Vergleich zu Zellkulturlysaten zu erwarten, möglicherweise kann jedoch neben der Bestätigung bestehender HLA- Motive eine Verfeinerung, z.B. durch Neudetektion oder Adaptation von Bindungs- AS erzielt werden. Zusätzlich kann durch neue Liganden das bisherige Angebot der SYFPEITHI- Datenbank erweitert und optimiert werden.

### **I.10.2.4 Identifikation von Peptidliganden**

#### **im Einsatz zur Vakzinierungstherapie**

Als zentrales Ziel ist jedoch die Identifikation neuer Peptidliganden zu sehen, die von tumorassoziierten Antigenen stammen und eine Differenzierung von Tumor- und Normalgewebe zulassen. Sollte sich hiermit eine gezielte T- Zell-Stimulation erreichen lassen, könnten sie als Zielantigene in die bestehenden Immuntherapiekonzepte mit laufenden Phase I/II- Studien integriert werden. Ziel ist, die bisherige Therapie zu erweitern, um durch neue Liganden eine vielfältigere Vakzinierung zu ermöglichen und Escape- Strategien der behandelnden Tumoren zu unterbinden. Hierdurch können eine größere Anzahl an Patienten durch ein vielfältigeres, breitgefächerteres Peptidrepertoire – einhergehend mit einem geringeren Risiko der Resistenzentwicklung – behandelt werden. Am Horizont leuchtet als Fernziel eine individualisierte Behandlung jedes einzelnen Patienten auf der Basis der umfassenden Analyse des eigenen Tumormaterials.

## II. Material und Methodik

### II.1 Organigramm

In diesem Kapitel werden Materialien, Werkzeuge sowie die verschiedenen analytischen Verfahren vorgestellt, die im Rahmen dieser Dissertation zum Einsatz kamen.

Den Anfang bildet ein Flussdiagramm, das verdeutlicht, in welchem Zusammenhang die beschriebenen Methoden zueinander stehen sowie deren konkreten Einsatz im komplexen Prozess der Detektion von Tumorantigenen wiedergibt. Dadurch kann die Identifizierung von der Entnahme des Tumors bis zur exakten Bestimmung der Liganden am Massenspektrometer Schritt für Schritt nachvollzogen werden. Die eingehende Erläuterung jedes einzelnen Aufbereitungsschrittes folgt in den einzelnen Abschnitten dieses Kapitels.

Zur besseren Abgrenzung der jeweiligen Analyseverfahren sind diese im Organigramm gemäß nachfolgender Legende farblich hervorgehoben.

Tumoranalyse	vgl. II.3
HLA- Typisierung	vgl. II.3.3
Zellbiologische Methoden	vgl. II.4
Immunologische Methoden	vgl. II.5
Biochemische Methoden	vgl. II.6
Analytische Methoden	vgl. II.7
Massenspekt. Analyse	vgl. II.8
Ergebnisse	vgl. III

**Abb. 26:** Legende zur farblichen Zuordnung der einzelnen Analyseverfahren

**Abb. 27 (folgende Seite): Organigramm zur Identifizierung von MHC- I gebundenen Peptidliganden**

Die Schritte der Identifizierung werden in Form einzelner Kästchen gezeigt. Die Verbindung der Kästchen erfolgt durch Pfeile, die die Abfolge der Einzelprozesse von den vorbereitenden Analysen bis hin zur definitiven Bestimmung der Peptidsequenz zeigen. Einzelne Analyseschritte wurden ihrer jeweils zugrunde liegenden Methodik zugeordnet und farblich markiert.

Die allgemeine Analyse im Hinblick auf Größe, Geschlecht, Stadium der Tumoren usw. wurde anhand der Patientenakten erstellt und ist hier nicht berücksichtigt.

SYFPEITHI: Peptidliganden- Datenbank (vgl. I.6.2)

BB7.2- Zellen: AK BB7.2- produzierende Zellen (vgl. II.4)

Protein A- Säule: Präzipitationssäule aus Protein A- Sepharose (vgl. II.5.1.4)

Zentrikon- Filtration: Ultrafiltration (vgl. II.5.4.5)

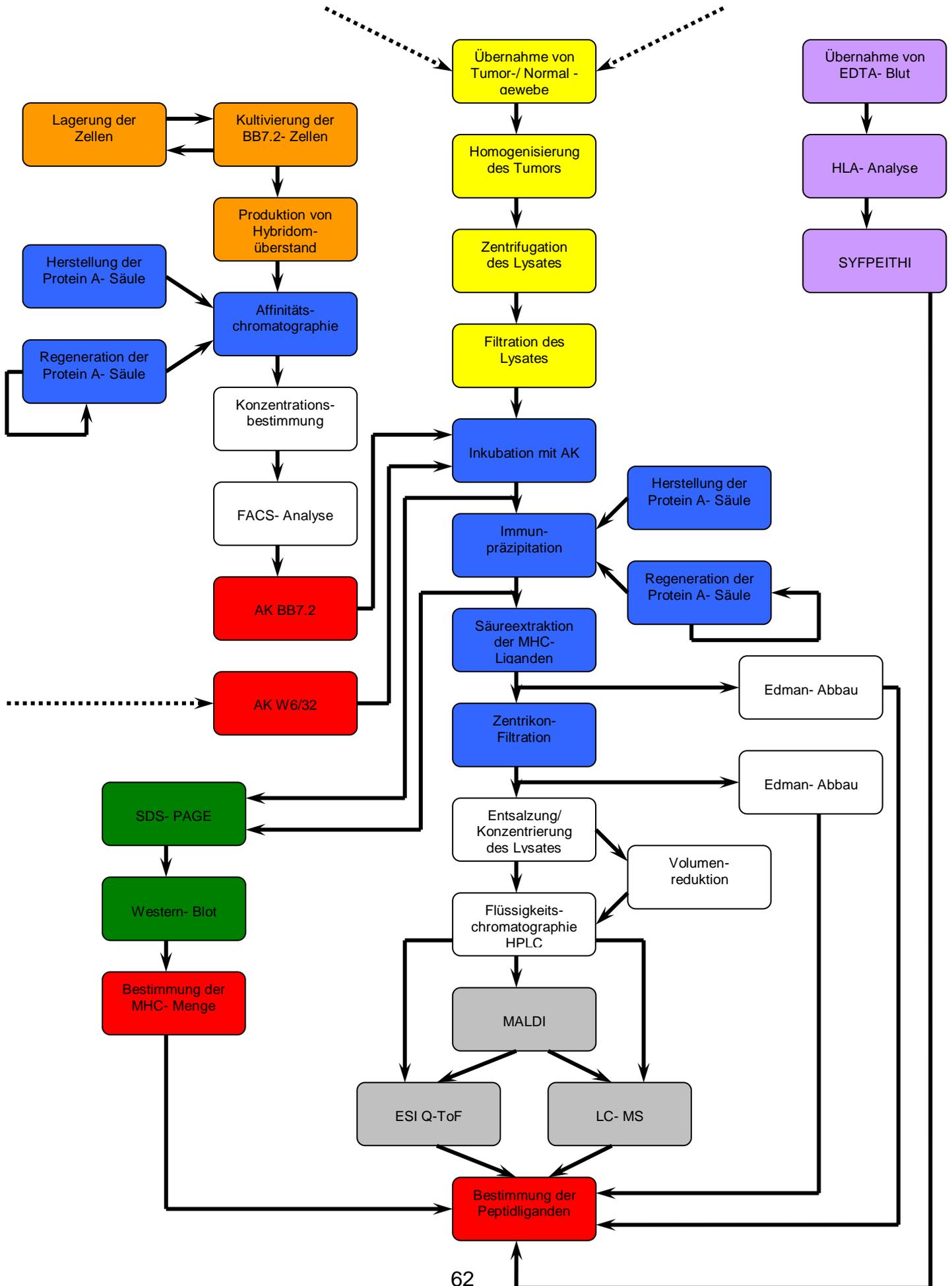
SDS- PAGE: Polyacrylamid- Gelelektrophorese (vgl. II.6.1)

FACS- Analyse: Durchflusszytometrie (vgl. II.5.3)

AK BB7.2, W6/32: Antikörper BB7.2, W6/32 (vgl. II.4.1)

MALDI: MALDI- ToF- Massenspektrometrie (vgl. II.8.1)

ESI Q-ToF: ESI Q-ToF- Massenspektrometrie (vgl. II.8.2)



## II.2 Material

Nachfolgend sind tabellarisch die verwendeten Geräte, Materialien und Utensilien sowie die eingesetzten Chemikalien aufgelistet. Es schließt sich die Beschreibung der notwendigen Medien und Puffer an.

### II.2.1 Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Biofuge 13	Heraeus
Biotech Urospec 3000	Pharmacia
Dounce- Glashomogenisator	Sartorius
Durchflusszytometer FACSCalibur	Becton-Dickinson
Edman- Sequencer Procise 494A	Applied Biosystems, Hewlett Packard
Elektrophorese- Apparatur Mini- Protean II Electrophoresis Cell Entsalzungsanlage	Biorad Hewlett Packard
ESI- Q- ToF- Massenspektrometer	Micromass
Fotostation LAS-1000	Fuji Film
Pistill Glaskolben Größe S/ L	Kleinfeld
Heizblock Thermomixer 5436	Eppendorf
HPLC (SMART®- System)	Pharmacia, Artisan Scientific
Immunoblot Transferkammer	CTI
Küchenmixer	Mulinex
Labotect Inkubator	Forma Scientific
Magnetrührer	Bibby Scientific
MALDI ToF HP G2025A	Hewlett Packard
Megafuge 1.0 R	Heraeus
Mikroskop	Leica
pH- Meter	Knick
PIPETBOY	INTEGRA Bioscience
Potter- Homogenisator RZR 2020	Heidolph
Rotor: Ti45, Ti70	Beckman
Speed- vac	Bachhofer
Sterilbank (Hood)	Integra Bioscience

Transformator zur Elektrophorese  
 Power Pac 200  
 Ultrazentrifuge L- 80  
 Ultrospec 3000  
 Wasserbad  
 Tiefkühlschrank  
 Vortexer

Biorad  
 Beckman  
 Pharmacia Biotech  
 Gesellschaft für Labortechnik mbH  
 Liebherr  
 VWR Scientific Industries

## **II.2.2 Zubehör und Materialien**

<b>Zubehör/ Materialien</b>	<b>Hersteller</b>
Chromatographiesäulen	Biorad, Hewlett- Packard
Chromatographiesäulen EdmanSequencer	Perkin Elmer
Duran Flaschen	Schott
Entwicklerlösung zu Western Blot Chemiluminescence extra plus	NEN Life Science Products
Eppendorf- Tubes (0,2; 0,5; 1,5; 2,0 ml)	Eppendorf
Erlenmeyerkolben verschiedener Volumina	Schott
FACS- Röhrchen	Becton- Dickinson
Falcon- Röhrchen/ -Tubes (50; 15; 7,5 ml)	Greiner
Infusionsspritze	Braun
Magnetrührfische	Bibby Scientific
Mikrotiterplatte (96- Loch, 6- Loch)	Greiner
Monovette® 9ml, mit EDTA- Zusatz	Sarstedt
Nitrocellulosefolie Hybond ECL	Pharmacia
Parafilm®	Brand
Prestained Protein Marker Broad Range	New England Biolabs
Protein A Sepharose CL- 4B	Amershan, Bioscience
Präzipitationssäulen	Biorad
SMART®- Säule: µRPC C2/C18 SC 2.1/10	Amersham, Pharmacia
Sterilfilter 0,2µm (Sartolab- P20)	Sartorius
Ultrazentrifugenröhrchen (25 ml, 88 ml)	Beckman
Whatman® Filterpapier	Whatman
Zellkulturflaschen	Greiner
Zellinkubator	Labotech
Zentrikon- Filter (Centricon YM- 10)	Millipore

**II.2.3 Chemikalien**

A 30%/ Bis 0,8%	Acrylamid/ N,N'- Methylenebisacrylamid
APS	Ammoniumpersulfat
Argon	gasförmig, zur Chromatographie
BSA	bovine serum albumine
CHAPS	3-[N-(3-Cholanamidopropyl)- dimethylammonio]- 1- propansulfonat
CH <sub>3</sub> OH	Methanol 20%
CH <sub>3</sub> CN	Acetonitril
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	Ethanol 80%
C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> OH	2- Propanol
Chemiluminescence	Einsatz zum Western Blot
Complete	Proteaseinhibitor
DHAP	2,5- Dihydroxyacetophenon
DMSO	Dimethylsulfoxid (organisches Lösungsmittel)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure, 5 mM
Glycin	vgl. Anhang
HABA	2'- (4- Hydroxyphenyl)- azo- benzoessäure
HCl	Salzsäure
HEPES	2- (4- (2- Hydroxyethyl)- 1- piperazinyl)- ethansulfonsäure
H <sub>2</sub> O <sub>bd</sub>	zweifach destilliertes Wasser
J	Jod
2- Mercaptoethanol	Spaltung von Disulfidbrücken
NaN <sub>3</sub>	Natriumazid, 0,02%
NaCl	Natriumchlorid, 0,5 M; 1,5 M
Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	Natriumcitrat, 50 mM
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat, 0,1 M
NaOH	Natriumhydroxid = Natronlauge, 0,1 M
Na <sub>2</sub> [B <sub>4</sub> O <sub>5</sub> (OH) <sub>4</sub> ] · 8H <sub>2</sub> O	Natriumborat, 50 mM
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Natriumthiosulfat, 1 M

$(\text{NH}_4)_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$	Ammoniumcitrat
Nonidet P- 40	Chemikalie zur Lösung membranärer Proteine
Ponceau S- Lösung	Azofarbstoff (rot)
Propidiumjodid	Nukleinsäureinterkalator (Farbstoff, vgl. II.5.3.2)
PITC	Phenylisothiocyanat
SDS	Natrium (Sodium-)dodecylsulfat
TEMED	N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin
TFA	Trichloressigsäure, 3%, 25%
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan, pH: 6,8; 8,0; 8,8
Trypanblau	Anionischer Diazofarbstoff aus o-Tolidin

### II.2.4 Medien und Puffer

Die im Folgenden beschriebenen Medien und Puffer wurden vorwiegend für Zellkulturen (vgl. II.4), daneben für die Immunpräzipitation (vgl. II.5.4) und den Western Blot (vgl. II.6.2) benötigt und abgesehen von FCS selbst hergestellt. Die rechtsbündigen Kästchen geben die jeweiligen Ingredienzien wieder.

#### *FCS (Fetal Calf Serum):*

Gemäß der englischen Bezeichnung wird FCS aus dem Blut fötaler Kälber gewonnen. Der natürliche Ursprung birgt im Vergleich zu laborchemisch hergestellten Medien den Vorteil, dass Faktoren wie Vitamine, Spurenelemente, Mineralstoffe usw. a priori enthalten sind, die für das Wachstum von Zellen unter Kulturbedingungen notwendig sind. Vor der Verwendung waren serologische Faktoren (vgl. I.1.3.1) wie z.B. Komplementfaktoren aufgrund ihres Interaktionspotentials zu inaktivieren. Dies erfolgte durch Hitzedenaturierung der Proteine im Wasserbad bei 56°C über 40 Minuten.

#### *RPMI 1640:*

Nach dem Ort der erstmaligen Herstellung, dem **Roswell Park Memorial Institute**, wurde dieses Medium benannt<sup>189</sup>. Die Addition von  $\text{NaHCO}_3$ , HEPES, L-

---

<sup>189</sup> Moore G.E. et al. 1969

Glutamin, Penicillin/Streptomycin, Natriumpyruvat, nicht- essentiellen AS und Mercaptoethanol macht es zum Standardmedium für viele Zellkulturen.

*PBS (Phosphate Buffered Saline)<sup>190</sup>:*

Als Standardpufferlösung fand die phosphatgepufferte Salzlösung PBS Anwendung und war bei vielen der beschriebenen Verfahren im Einsatz. Der pH-Wert wurde mit Salzsäure auf pH 7,40 justiert, dann auf 1000 ml mit Wasser aufgefüllt.

NaCl	8,0 g
KCl	0,2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,44 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,24 g
H <sub>2</sub> O	ad 800 ml/ ad 1000 ml
HCl zur Titrierung des pH-Wertes	

*TBS (Tris Buffered Saline):*

Im Unterschied zu PBS- Salzlösung wurde die TBS-Lösung durch TRIS gepuffert und unter Zugabe von HCl auf den physiologischen pH- Wert eingestellt. TBS wurde u.a. beim Western Blot eingesetzt.

NaCl	8,0 g
KCl	0,2 g
TRIS	3,0 g
H <sub>2</sub> O	ad 800 ml/ ad 1000 ml
HCl zur Titrierung des pH-Wertes	

## II.3 Tumorgewebe

### II.3.1 Karzinome des Verdauungstraktes

In Zusammenarbeit mit der Chirurgischen Klinik der Universität Tübingen (Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. A. Königsrainer, vormals Prof. Dr. med. Dr. h.c. H.-D. Becker) erfolgte die Aufarbeitung von Karzinomen des Verdauungstraktes. Die Legitimation lieferte das Ethikvotum Nr. 272/ 2000.

#### **II.3.1.1 Einverständniserklärung**

Die Aufklärung der Patienten über die Verwendung des intraoperativ entnommenen Gewebes erfolgte im Rahmen der allgemeinen präoperativen Aufklärung durch das chirurgische Operationsteam, spätestens 24 Stunden vor dem Eingriff. Die schriftlich fixierte Einverständniserklärung zur partiellen Verwendung

<sup>190</sup> Dulbecco R. et al. 1954

des tumorösen und normalen Gewebes für klinisch- experimentelle Zwecke nach der pathologischen Analytik sowie zur Blutentnahme zwecks HLA-Typisierung (vgl. II.3.1.6 bzw. II.3.2.5) wurde in der stationären chirurgischen Krankenakte abgeheftet.

### **II.3.1.2 Präparatübernahme**

Nach telefonischer Kontaktaufnahme erfolgte die Übergabe des kompletten Operationspräparates (Kolonteilresektat, Magen(teil-)resektat, Ösophagusteilresektat, atypisches Leberteilresektat) unmittelbar nach Entnahme und makroskopischer Begutachtung durch den Operateur direkt im Operationssaal der Allgemeinchirurgie im Klinikum Schnarrenberg.

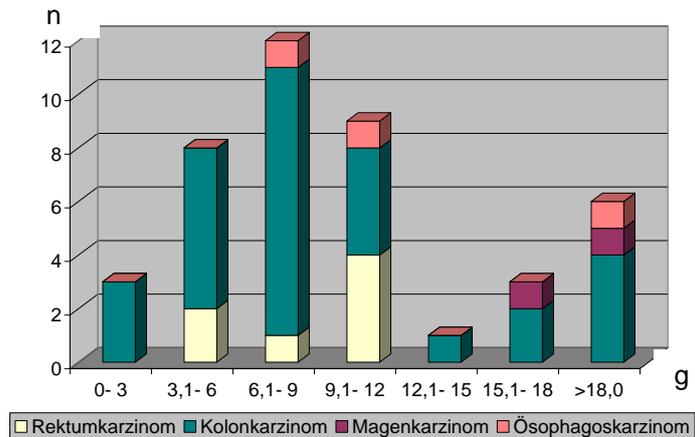
### **II.3.1.3 Zuschneiden des Präparates**

Im Vorraum wurde das entnommene Präparat zuerst im Ganzen makroskopisch hinsichtlich Infiltrationstiefe des Tumors, Überschreitung der Organgrenzen, usw. begutachtet. Die Palpation des bislang uneröffneten Präparates zur Abschätzung der Gesamtausdehnung, Tumorlokalisation und -ausbreitung schloss sich an. Danach wurde das Operationspräparat längsseitig (bei kolorektalen Karzinomen dem Verlauf einer Taenie folgend, bei Magenkarzinomen entlang der großen Krümmung) vollständig eröffnet. Hierbei war zu beachten, bei der Schnittführung den Tumor strikt zu umgehen und dessen Integrität zu wahren. Dadurch wurde sichergestellt, dass die anschließende histopathologische Aufarbeitung des Resektates unter keinen Umständen behindert, erschwert oder gar verfälscht wurde.

Das eröffnete Präparat wurde anschließend unter laufendem, kaltem Wasser sorgfältig gereinigt. Nach erneuter makroskopischer Begutachtung des offenliegenden Tumors erfolgte die Freigabe durch den Operateur und der Transport des Präparates in unfixiertem Zustand in das Schnellschnittlabor der Pathologie im OP- Trakt des Klinikums Schnarrenberg.

### II.3.1.4 Entnahme von Tumorgewebe

Die Entnahme des Tumorgewebes zur weiteren Verarbeitung fand stets und unter der freundlichen Mithilfe des Pathologen aus dem Institut für Allgemeine Pathologie der Universität Tübingen (Ärztlicher Direktor Prof. Dr. med. F. Fend, vormals Prof. Dr. med. B. Bültmann) im Schnellschnittlabor des Klinikums Schnarrenberg statt. Unnötig lange Transporte der Präparate in unfixiertem Zustand wurden dadurch vermieden. Durch die

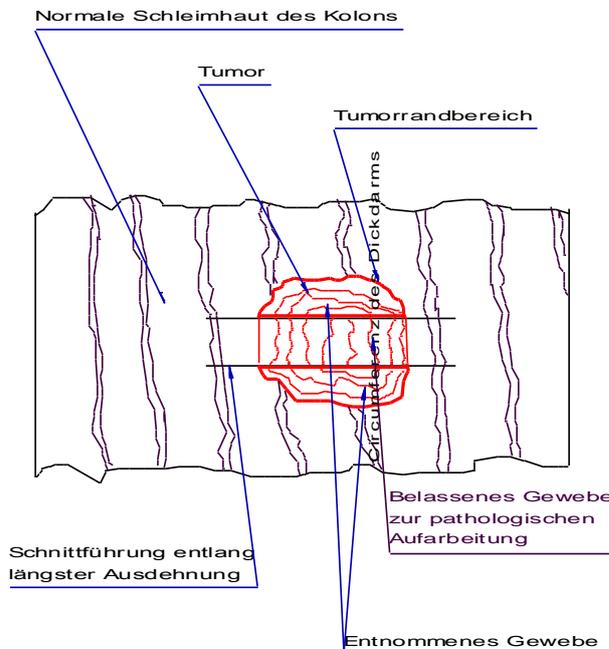


**Abb. 28** veranschaulicht die Masse der Karzinome des Verdauungstraktes, die für diese Dissertation aufgearbeitet wurden. Diese wurden in Gewichtsklassen zu je drei Gramm zusammengefasst. Meist konnten Massen zwischen drei und zwölf Gramm asserviert werden, im Durchschnitt ca. 8,8 g Gewebe pro Tumor. Allein bei vier Kolonkarzinomen und je einem Ösophagus- sowie Magenkarzinom konnten Gewebemassen von bis zu 56 Gramm den weiteren Untersuchungen zugeführt werden.

Abszisse: Absolute Tumormasse in Gramm [g]  
 Ordinate: Absolute Anzahl der Tumoren [n]

Zusammenarbeit konnte sichergestellt werden,

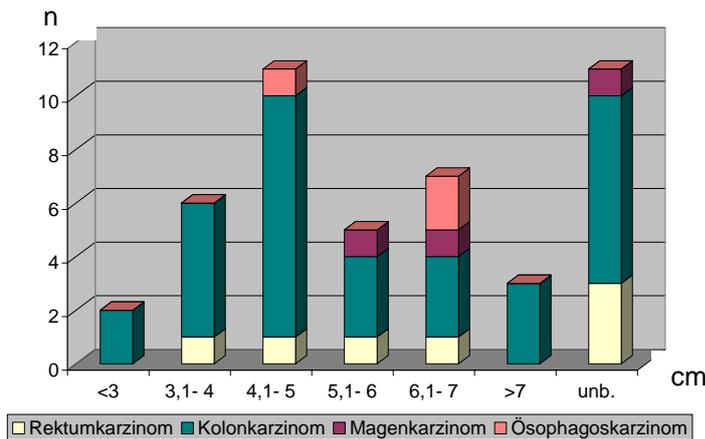
dass die Masse des entnommenen Tumorgewebes für die folgenden Analysen in unserem Labor einerseits zwar möglichst groß war (vgl. Abb. 28), andererseits eine exakte Stadieneinteilung des Tumors durch die Pathologie in keinerlei Hinsicht beeinträchtigt wurde. Am eröffneten Präparat wurde durch den Pathologen die makroskopische Beurteilung des Tumors durch Inspektion und Palpation vorgenommen. Anhand dessen detaillierter Instruktionen erfolgte die selbstständige



**Abb. 29** zeigt die Planskizze zur Entnahme nativen, unfixierten Tumormaterials am Beispiel eines Kolonresektats

### Tumorentnahme.

Der Tumor wurde mit zwei parazentralen, parallelen Schnitten in Richtung der maximalen Ausbreitung des Tumors in drei Teile zerlegt (vgl. Abb. 29). Der mittlere Steg des Tumors, der zentrale, maximal periphere sowie Anteile mit maximaler Infiltrationstiefe enthielt, wurde komplett belassen, die seitlichen Tumoranteile oberflächlich mit einer Skalpellklinge entfernt. In den meisten Fällen



**Abb. 30:** Größenverteilung der Karzinome des Verdauungstraktes anhand der maximalen Tumordurchmesser  
 Abszisse: maximaler Tumordurchmesser in cm  
 Ordinate: Absolute Anzahl der Tumoren [n]  
 unb.: unbekannte Größe [cm]

bestand ein maximaler Tumordurchmesser von 3 bis 7 cm. Zu elf Tumoren lagen leider keine ausreichenden Größenangaben vor (vgl. Abb. 30).

Auf die Entnahme von makroskopisch eindeutig reinem Tumorgewebe wurde strikt geachtet. Zum weiteren Transport und zur Lagerung wurde das Gewebe in perforierte 50 ml Tubes gefüllt, gewogen und

in flüssigem Stickstoff zu Fixierung und Arrest der Autolyse schockgefroren. Anschließend erfolgte entweder die sofortige Aufarbeitung des Materials im immunologischen Labor oder die Lagerung bei -80°C im Tiefkühlschrank.

#### II.3.1.5 Entnahme von Normalgewebe

Im Anschluss erfolgte die teilweise Entnahme von Normalgewebe, makroskopisch tumorfreier Schleimhaut. Hierbei wurde in maximaler Entfernung zum Tumor und unter Aussparung anderer Epithelveränderungen, wie z.B. polypöser Adenome, durch flache Schnittführung die Tunica mucosa von der angrenzenden Tunica muscularis abpräpariert, um möglichst organspezifisches Parenchym und wenig Stromagewebe zu asservieren. Nach der Gewichtsbestimmung erfolgte die Fixierung des Gewebes in flüssigem Stickstoff. Das restliche Präparat wurde zur pathologischen Aufarbeitung in Formalin fixiert, beschriftet und die Gewebeentnahme für die Pathologie schriftlich mit Skizze festgehalten.

Die Asservierung unveränderten Normalgewebes offerierte die Möglichkeit, im Falle detektierter Peptide im Tumor eine vergleichende Analyse am vermeintlich nativen Parenchym vorzunehmen und damit Aussagen im Bezug auf das ursprüngliche Normalgewebe und das veränderte Tumorgewebe treffen zu können. Leider standen für sämtliche Tumoren mit identifizierten Peptiden *keine* korrelierenden Normalgewebe zur Verfügung, da lediglich bei einzelnen Tumoren Normalgewebe der Analytik zuging (vgl. Kap. III). Eine direkte Vergleichsanalyse war damit nicht möglich.

### **II.3.1.6 Entnahme von Blut**

Dem Patienten wurde intraoperativ selbstständig 9 ml EDTA- Blut abgenommen, beschriftet und in das Labor des Institutes für Klinische und Experimentelle Transfusionsmedizin (Ärztlicher Direktor Prof. Dr. med. H. Northoff, zu Händen von Frau Prof. Dr. med D. Wernet) gebracht. Die HLA- Typisierung erfolgte dort nach dem unter II.3.3 beschriebenen Vorgehen.

### **II.3.2 Nierenzellkarzinome**

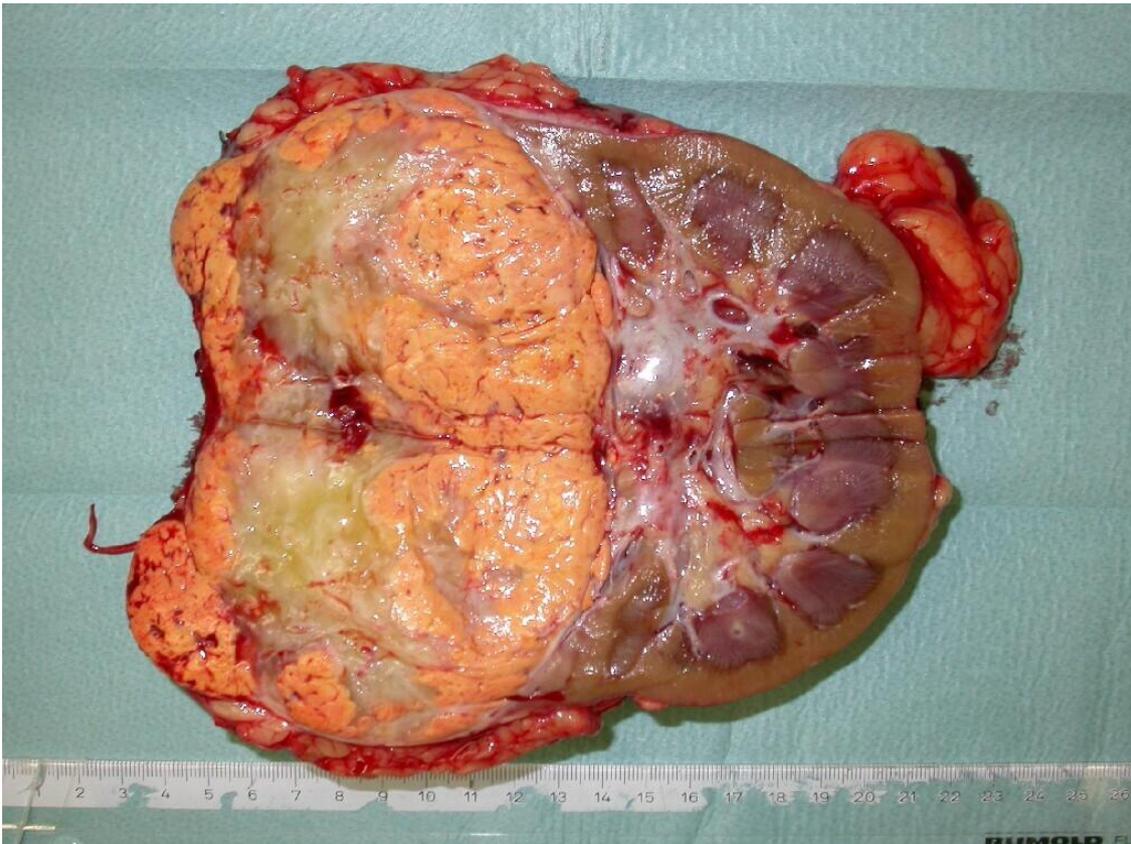
#### **II.3.2.1 Einverständniserklärung**

Die Analyse tumorspezifischer Peptidliganden aus Nierenzellkarzinomen erfolgte in Zusammenarbeit mit der Urologischen Universitätsklinik in Tübingen (Ärztlicher Direktor Prof. Dr. med. A. Stenzl, vormalig Prof. Dr. med. K.-H. Bichler). Entsprechend den Tumoren des Verdauungstraktes erfolgte auch bei diesen Neoplasien die Aufklärung der Patienten über Gewebe- und Blutentnahme durch die Operateure der Urologischen Klinik im Rahmen der präoperativen Aufklärung. Eine schriftliche Einverständniserklärung wurde in analoger Form in der jeweiligen stationären Patientenakte abgelegt.

#### **II.3.2.2 Übernahme des Präparates**

Die Gewebeentnahme bei den Nierenzellkarzinomen erfolgte gemeinsam mit Herrn Dr. Hennenlotter im Speziallabor der urologischen Universitätsklinik.

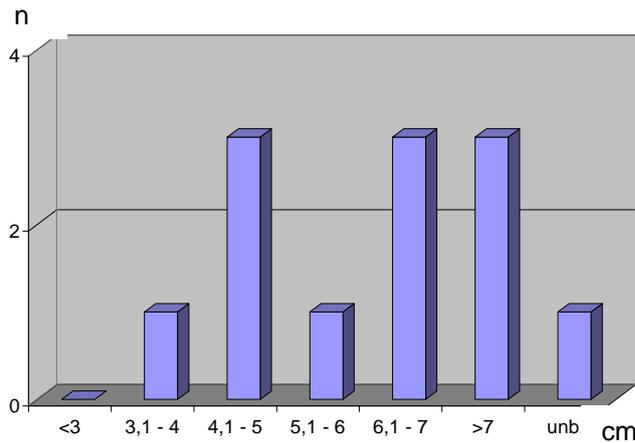
Hierzu wurde das Präparat, zumeist die exstirpierte Niere in toto, unmittelbar nach Nephrektomie in das urologische Labor gebracht. Nach makroskopischer Inspektion und Palpation des Tumors folgten die längsseitige Inzision der Niere entlang der Margo lateralis mittels Skalpell und die komplette Teilung der Niere in zwei Hälften. Am eröffneten Präparat ließ sich der zumeist gelblich imponierende Tumor vom umliegenden Parenchym der Niere makroskopisch eindeutig abgrenzen.



**Abb. 31:** Makroskopisches Bild eines Nephrektomiepräparates kurz nach der operativen Entfernung. Die Niere wurde wie oben beschrieben entlang der Margo lateralis längsseitig eröffnet. Bereits makroskopisch ließ sich das hellgelbe, teils weißliche Tumorgewebe linksseitig ohne erkennbare Binnenstruktur vom zunehmend verdrängten Nierengewebe abgrenzen, das in bräunlicher Farbe die Rinde sowie die drei bis vier residuellen Markpyramiden erkennen lässt.

### II.3.2.3 Entnahme von Tumorgewebe

Gemeinsam mit den Mitarbeitern der Urologie erfolgte die Entnahme des Tumorgewebes. Nach Eröffnung der Nieren wurden aus einer Hälfte des Tumors pyramidenförmige Stücke exzidiert und in perforierte Falcon- Tubes überführt.



**Abb. 32:** Größenverteilung der untersuchten Nierenzellkarzinome anhand des maximalen Tumordurchmessers

Abszisse: Tumordurchmesser [cm]

Ordinate: Absolute Anzahl [n]

unb: unbekannte TumorgroÙe

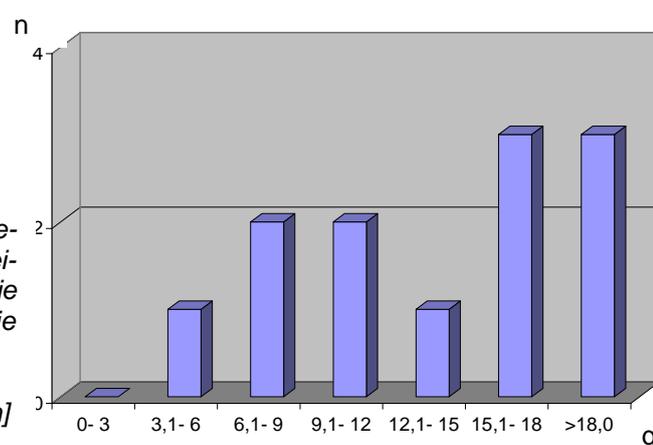
Auf die im Vergleich zu den Karzinomen des Verdauungstraktes veränderte Skalierung ist zu achten

Das asservierte Tumorgewebe wurde gewogen und in flüssigem Stickstoff fixiert ins Labor gebracht. Die andere Nieren- bzw. Tumorthälfte wurde zum pathologischen Staging unverändert sofort fixiert.

Auch bei den Nierenzellkarzinomen bewegte sich die TumorgroÙe in einem Rahmen zwischen 3 und 7 cm. Einzelne Tumoren erreichten eine Ausdehnung von bis zu 10 cm. Aufgrund der häufig späten Manifestation der Nierentumoren und des damit verbundenen fortgeschrittenen Wachstums (vgl. I.9) konnten generell deutlich größere Gewebemengen im Vergleich zu den Karzinomen des Verdauungstraktes gewonnen werden.

Durchschnittlich lag die asservierte Gewebemasse bei 17,2 g (vgl. Abb. 33).

Durchschnittlich lag die asservierte Gewebemasse bei 17,2 g (vgl. Abb. 33).



**Abb. 33** zeigt das Gewicht der Gewebeproben, die von der Urologie zur Verarbeitung zur Verfügung gestellt wurden. Die Tumoren sind in Gewichtskategorien zu je drei g zusammengefasst

Abszisse: Tumormasse in Gramm [g]

Ordinate: Absolute Anzahl der Tumoren [n]

### II.3.2.4 Entnahme von Normalgewebe

Als Normalgewebes wurde makroskopisch unauffälliges, reines Nierenparenchym ohne Kapselanteile aus tumorfernen Bezirken der Niere entnommen, gewogen und bei -80°C eingefroren. Nach Fixierung des restlichen Präparates in Formalin wurde die Gewebeentnahme schriftlich dokumentiert.

### **II.3.2.5 Übernahme von Blut**

Gemeinsam mit dem Gewebe wurde uns beschriftetes EDTA- Blut des jeweiligen Patienten übergeben. Dieses wurde dem Patienten nach erfolgter Zustimmung im Operationssaal entnommen und entsprechend dem Vorgehen bei den Tumoren des Verdauungstraktes zur HLA- Typisierung verwendet (vgl. III.3.1.6, II.3.3).

### **II.3.3 HLA–Typisierung der Patienten**

Die HLA- Typisierung der untersuchten Tumorpatienten wurde durch Frau Prof. Dr. med. D. Wernet im Labor der Transfusionsmedizin am Universitätsklinikum Tübingen vorgenommen.

Diese Typisierung basierte auf einer molekulargenetischen Analyse des gelieferten EDTA- Blutes anhand der Lymphozyten – auf eine eingehende Darstellung wurde wegen fehlender eigenständiger Durchführung verzichtet.

Da die Intention der HLA- Typisierung in der Epitopvorhersage mittels der SYFPEITHI- Datenbank bestand, wurde ursprünglich die Definierung der Obergruppen als ausreichend erachtet. Erst schrittweise ergab sich die Erkenntnis, dass relevante Motivunterschiede nicht nur an den Obergruppen der HLA- Allele gebunden sind (Zwei- Ziffern- Code, vgl. I.2), sondern auch bei identischen Obergruppen durch differente Subklassifizierungen entstehen. Dies trifft u.a. bei dem häufigsten Allel A\*02 mit gravierenden Motivunterschieden der Subklassen zu<sup>191</sup>. Da nur in diesen Fällen eine kostenintensive weitere Kategorisierung der HLA- Subklassen einen Informationszugewinn erbracht hätte, hiermit jedoch ein signifikanter finanzieller Mehraufwand verbunden gewesen wäre, wurde auf die Subklassifizierung generell verzichtet. Entsprechend ergaben sich einzelne Informationslücken, so dass bei einigen wenigen Peptiden der Ligandenlisten in Kapitel III eine exakte Subklassenzuordnung nicht möglich war (vgl. III.4.1.2.6).

---

<sup>191</sup> Barouch D. et al. 1995

## II.4. Zellbiologische Methoden

### II.4.1 Zelllinien

Bezeichnung	Herkunft	Spezifität	AK-Isotyp	Verwendung
W6/32 <sup>192</sup>	Hybridomzelle Maus	Anti- $\alpha$ - HLA -A, -B, -C	IgG <sub>2a</sub>	Eigenproduzierter mAK zur Immunpräzipitation
BB7.2 <sup>193</sup>	Hybridomzelle Maus	Anti- $\alpha$ - HLA -A*02	IgG <sub>2b</sub>	Eigenproduzierter mAK zur Immunpräzipitation
H100.27 R55 <sup>194</sup>	Hybridomzelle Maus	Anti- H2 -K <sup>K</sup>	IgG <sub>2a</sub>	Eigenproduzierter mAK zur Negativkontrolle beim FACS
FITC- konjugierter AK	Hybridomzelle Ziege	Anti- F(ab') der Maus	IgG	Kommerzieller AK zum FACS
Western Blot Erst- AK	Hybridomzelle Maus	Anti- HLA -A, -B, -C	IgG	Kommerzieller AK zum Western Blot
HRP- konjugierter AK	Hybridomzelle	Anti- F(ab') der Maus	IgG	Kommerzieller AK zum Western Blot
JY	EBV-transfor- mierte humane Zelle	HLA -A*0201 -B*0702		Zielzelle beim FACS

**Tab. 5** zeigt die Zelllinien, die zur AK-Produktion bei verschiedenen Indikationen zum Einsatz kamen. Neben den eigenständig kultivierten Zelllinien wurden die Zellen aufgelistet, von denen AK kommerziell bezogen wurden. Die Zelllinie JY mit HLA-A\*- und -B\*-Expression hingegen diente aufgrund ihrer HLA-Expression bei verschiedenen Analysen als Zielstruktur.

### II.4.2 Kultivierung von Zelllinien

Dieser Abschnitt über die Kultivierung von Zelllinien zeigt die Arbeiten zur Anzucht von Zellen, zumeist immortalisierter Hybridomzellen, außerhalb eines Organismus, die einerseits als Bindungszellen in der Durchflusszytometrie, andererseits zur Produktion mAK dienen. Sämtliche Vorgänge mussten zur Vermeidung von Verschmutzung oder Kontamination durch andere Zellen, v.a. durch Bakterien oder Pilze, in gereinigter Atmosphäre unter einer Sterilbank, erfolgen.

<sup>192</sup> Barnstable et al. 1978

<sup>193</sup> Parham et al. 1981

<sup>194</sup> O'Neill H.C. 1984

Die Zellen wurden je nach Verdopplungszeit auf Kulturflaschen unterschiedlicher Größe verteilt und nach Zugabe spezifischer Nährmedien (vgl. II.2.4) im Inkubator angezüchtet. Hierbei war den unterschiedlichen Anforderungen der verschiedenen Zellarten an Temperatur, Atmosphäre, Untergrund usw. Rechnung zu tragen. Bei den hier verwendeten Zelllinien erfolgte die Kultivierung in Inkubatoren bei 37°C Umgebungstemperatur in feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre mit einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 7,5%, primär in 100 ml Kulturflaschen. Als Medium wurde das RPMI Medium mit Zusatz von 5%- bis 10%-igem FCS verwendet. Das Wachstum der Zellen wurde täglich kontrolliert und je nach Expansion ein erneutes Splitten durchgeführt, um optimale Voraussetzungen für das Zellwachstum zu gewährleisten.

Da zur Herstellung der AK in Größenordnungen von mehreren Milligramm sehr große Zellzahlen notwendig waren, wurden die Zellen vom Typ W6/32, BB7.2 und H100 nach initialer Anzucht in 100 ml Kulturflaschen rasch in größere, zwei Liter fassende Rollerflaschen überführt. Erst dadurch ließen sich ausreichende Zellmengen und genügend AK im Hybridomüberstand produzieren. Die Lagerung der Rollerflaschen erfolgte entsprechend den kleinvolumigen Kulturflaschen bei 37°C. Durch langsame Rotation mit zwei Umdrehungen pro Minute wurde eine Adhäsion der Zellen an der Flaschenwand verhindert.

### **II.4.3 Lagerung von Zellen**

Zur Konservierung wurden Zellen bei tiefen Temperaturen, meist bei -196 °C, in flüssigem Stickstoff gelagert. Hierdurch kamen sämtliche biologische, biochemische sowie chemische Reaktionen der Zelle zum Erliegen. Da der Alterungsprozess der Zellen unterbrochen und selbst die Apoptose der Zellen verhindert wurde, war eine längerfristige Asservierung möglich.

#### **II.4.3.1 Einfrieren von Zellen**

Hier wurden die Zellen in spezielle Röhrchen in einer Menge von je 10<sup>6</sup> Zellen aufgeteilt. Nach wiederholtem Waschen mit PBS (vgl. II.2.4) erfolgte die Zugabe von sterilem FCS mit 10%-igem DMSO. Dieses Lösungsmittel wirkt als „Frost-

schutzmittel“ der Kristallisierung von H<sub>2</sub>O entgegen und führt über eine verminderte Volumenexpansion zum Schutz vor Zerstörung der Zellen. Durch die toxische Wirkung bei Normaltemperatur musste nach Zugabe von DMSO eine umgehende Abkühlung der Röhren auf -70°C erfolgen. Eine kurzfristige Zellkonservierung in Gefrierschränken ist bei -20°C zwar möglich, bei einer längerfristigen Lagerung von Zellen sollte jedoch flüssiger Stickstoff bevorzugt werden.

#### **II.4.3.2 Auftauen von Zellen**

Da die angesprochene Toxizität des DMSO auch beim Auftauen der Zellen wieder zum Tragen kommt, musste auch der Auftauvorgang der eingefrorenen Zellen zügig erfolgen. Nach Erwärmung im Wasserbad bei 37°C wurden die Zellen in Kulturmedium aufgenommen, zur Reinigung wiederholt über 3 Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert und in Kulturmedium resuspendiert. Die Kultivierung wurde im Anschluss in kleinvolumigen, meist 6-Loch- Kulturplatten begonnen und nach Expansion der Zellen in kleinen Zellkulturflaschen weitergeführt.

#### **II.4.4 Bestimmung der Lebendzellzahl**

Da analog dem lebenden Organismus auch unter Zellkulturbedingung die Lebenszeit von Zellen begrenzt ist und vor allem Lagerungsprozesse wie Einfrieren und Auftauen das Absterben der Zellen forcieren, musste ein Teil der Zellen in den Kulturen trotz unauffälliger Morphologie als avital betrachtet werden. Nachdem einige Untersuchungen wie die Durchflusszytometrie auf einer bekannten Lebendzellzahl basieren, war eine weitere Differenzierung notwendig. Eine Möglichkeit zur Identifizierung toter Zellen bot die Färbung dieser Zellen.

##### **II.4.4.1 Die Zellfärbung**

Einer Zellsuspension von 20 µl wurde das gleiche Volumen an Trypanblau in einer Konzentration von 0,05% zugesetzt. Da bei toten Zellen die Barrierefunktion der geschädigten Zellmembran aufgehoben ist, dringt Farbstoff ungehindert in die Zellen ein und färbt Zytoplasma und Zellkern. So können gefärbte Zellen als avital identifiziert und von ungefärbten, lebenden Zellen differenziert werden.

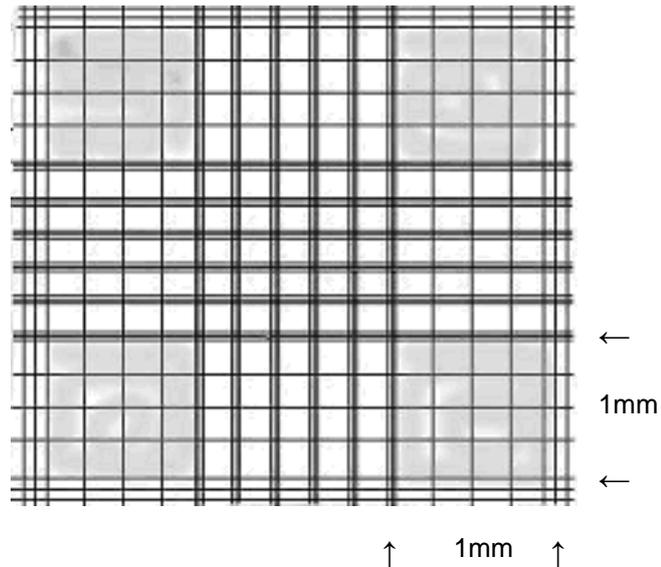
#### II.4.4.2 Die Zelldifferenzierung

Nach der Färbung fand die Zellzahlbestimmung unter dem Mikroskop in der Zählkammer mit Netzeinteilung nach Neubauer statt.

Hierzu wurden die Kammern mit insgesamt 1  $\mu\text{l}$  Zellsuspension gefüllt und die Zellzahl in zwei der neun Großquadrate mit ihren jeweils 16 Kleinquadraten bestimmt (vgl. Abb. 34). Bei einer Fläche von 1  $\text{mm}^2$  und einer Höhe von 0,1 mm

entspricht die Zellzahl der Menge in einem Volumen von  $2 \times 0,1 \text{ mm}^3$ , also  $0,2 \text{ mm}^3$  bzw.  $\mu\text{l}$  (zwei Großquadrate  $\times$  0,1  $\mu\text{l}$ ). Durch die 1:2 Verdünnung mit Trypitanblau (20  $\mu\text{l}$  Farbstoff auf 20  $\mu\text{l}$  Zellsuspension) errechnete sich die Zellzahl pro Milliliter durch Multiplikation mit  $10^4$ .

Die Lebendzellzahl wurde als Quotient aus Lebendzellzahl zu Gesamtzellzahl (Lebendzellzahl und Anzahl gefärbter Zellen) in Prozent ausgedrückt.



**Abb. 34 zeigt eine Zählkammer nach Neubauer**  
 Von den neun Großquadraten sind die vier Quadrate in den Ecken der Kammer grau hinterlegt und in je 16 kleine Quadrate aufgeteilt. Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurden gemäß nebenstehender Erläuterung jeweils zwei der neun Großquadrate ausgezählt.

## II.5. Immunologische Methoden

### II.5.1 Aufreinigung monoklonaler Antikörper aus Hybridomüberstand

#### II.5.1.1 Prinzip

Um den großen Bedarf an AK zu decken, wurden spezifische, mAK produzierende Hybridomzellen (vgl. II.4.1) in zwei Liter fassende Rollerflaschen wiederholt expandiert (vgl. II.4.2). Als Medium diente RPMI mit 5% igem FCS (vgl. II.2.4). Die Verfärbung des Mediums von Rot in ein leuchtendes Gelb durch Anreicherung von Stoffwechselendprodukten, konsekutiver Ansäuerung des Me-

diums und Farbumschlag des zugesetzten Indikators signalisierte den schwindenden Nährstoffgehalt der Lösung und einen Wachstumsstopp der Hybridomzellen. Die residuelle Lebendzellzahl lag zu diesem Zeitpunkt meist um 50%. Durch die angeschlossene Affinitätschromatographie an der Protein A- Säule konnte die Separierung und Konzentrierung der produzierten AK aus dem Überstand erreicht werden.

### **II.5.1.2 Aufarbeitung des Hybridomüberstandes**

Der Hybridomüberstand mehrerer Zellkulturflaschen wurde in Flaschen à zwei Liter Fassungsvermögen vereinigt. Zur Abtötung vitaler Hybridomzellen wurde der Überstand mit Natriumazid bis zu einer Konzentration von 0,02% versetzt. Anschließend wurde der pH- Wert auf 8,0, das Bindungsoptimum der Protein A- Spharose für die Fc- Anteile der AK, eingestellt (vgl. II.5.1.4).

Nach ein- bis zweitägiger Lagerung bei 4°C zur Inaktivierung möglicher Proteinase setzten sich die avitalen Zellen am Flaschenboden ab und lieferten einen zellfreien Überstand. Dieser wurde zur vollständigen Eliminierung der Hybridomzellen durch eine 0,2 µm Membran gefiltert. Es resultierte ein klarer Überstand, aus dem die AK extrahiert werden konnten (vgl. II.5.1.5).

### **II.5.1.3 Wiederverwendung und Entsorgung des Hybridomüberstandes**

Da durch eine einmalige Affinitätschromatographie lediglich ein Teil der enthaltenen AK extrahiert werden konnte, wurde der Hybridomüberstand mindestens ein weiteres Mal an der Chromatographiesäule gebunden. Dabei konnten nochmals respektable AK- Mengen gewonnen werden (vgl. III.2.2, III.2.3). Die Entsorgung des verwendeten Überstandes erfolgte unter Zugabe von 200 ml 1M  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  und 1 g Jod pro 4 Liter Überstand nach zwölf Stunden im Ausguss.

### **II.5.1.4 Eigenschaften und Herstellung der Protein A- Säule**

#### II.5.1.4.1 Eigenschaften

Das Protein A ist ein Protein, das ursprünglich in der Zellwand von Bakterien wie z.B. bei *Staphylococcus aureus* nachgewiesen wurde. Als Pathogenitätsfaktor führt es zur Bindung von Ig über deren Fc- Region (vgl. I.1.3.2.1), verhindert

dadurch die spezifische Bindung der AK und schützt das Bakterium vor Zerstörung. Im Labor wird an Sepharose gebundenes Protein A verwendet, um IgG, aber auch IgM AK zu binden<sup>195</sup>. Hierzu wird die Protein A- Sepharose in eine Glassäule gepackt. 0,2 g Trockensubstanz ergeben nach dem Quellen eine Säule von ca. 1 ml Volumen und ermöglichen bei einem Protein A Gehalt von 3 mg die Bindung von etwa 20 mg humanem IgG. Von einer Konzentration von mehreren hundert Mikrogramm bis wenigen Milligramm AK pro 4 l Hybridomüberstand ausgehend, ist damit eine 3 ml große Säule zur Aufreinigung der AK aus dem Überstand ausreichend. Ein weiterer Vorteil der Protein A- Sepharose liegt in der einfachen Handhabung und der Wiederverwendbarkeit.

#### II.5.1.4.2 Herstellung der Protein A- Säule

Bei Raumtemperatur wurden 0,6 g Protein A- Sepharose (Lagerung bei 4°C) in 5 ml H<sub>2</sub>O<sub>bd</sub> gelöst und für etwa 15 min zum Quellen gebracht. Nach Absetzen der Protein A- Sepharose wurde der Wasserüberstand abpipettiert und die Sepharose in weiteren 5 ml PBS aufgenommen. Nach erneutem, gleichmäßigem Absetzen der Protein A- Sepharose wurde die Säule über eine Pumpe mit 50 ml PBS äquilibriert und stand danach zur Aufreinigung zur Verfügung.

#### II.5.1.4.3 Regeneration der Protein A- Säule

Durch die reversible AK- Bindung war eine wiederholte Verwendung der Protein A- Säule möglich. Hierzu wurde die Sepharose nach Elution in 4 - 5 ml PBS aufgenommen und die Säule neu gepackt. Nach Absetzen des Gels und Ablassen des Überstandes konnte mit PBS äquilibriert und die Säule zu einer erneuten Aufreinigung herangezogen werden.

#### II.5.1.4.4 Lagerung der Protein A- Säule

Zur längerfristiger Aufbewahrung wurden die Säulen mit 50%igem Ethanol gespült und überschichtet gelagert. Die Bindungsfähigkeit der enthaltenen Protein A- Moleküle war nach mehreren Waschschritten mit PBS zur Entfernung des Ethanols wieder komplett hergestellt.

---

<sup>195</sup> Gording, 1978

### II.5.1.5 Affinitätschromatographie der Antikörper

#### II.5.1.5.1 Antikörperbindung

Die Bindung der AK aus dem Hybridomüberstand an die Protein A- Moleküle erfolgte beim Passieren der Sepharosesäule mit einer Geschwindigkeit von wenigen Millilitern Hybridomüberstand pro Minute im alkalischen Milieu.

#### II.5.1.5.2 Waschen der Säule

Im Anschluss wurde die über der Säule stehende AK- Suspension bis knapp über das Säulenniveau abgelassen, die Säule vorsichtig mit PBS überschichtet und mit 50 ml PBS gewaschen, um Verunreinigungen aus der Säule zu entfernen. Die AK verharrten hierbei in ihrer reversiblen Bindung an Protein A.

#### II.5.1.5.3 Säureextraktion der Antikörper

Nach erneutem Ablassen des Überstandes wurde die Säule mit 4,0 ml Citratpuffer überschichtet. Durch die Senkung des pH- Wertes löste sich die reversible Bindung zwischen AK und Protein A., die AK gingen in Lösung. Durch tropfweises Ablassen des Citratpuffers bis auf Säulenniveau wurden die AK aus der Säule eluiert. Die ersten 0,7 ml des Eluates wurden verworfen, die restlichen ca. 3,3 ml Eluat wurden in 9 ml Kopplungspuffer aufgenommen und vorsichtig gemischt. In den sich ergebenden 12,3 ml Lösung lag der AK in stabiler Konfiguration bei annähernd neutralem pH- Wert vor. Bis zur Verwendung wurden die AK im Kühlschrank bei ca. 4 °C gelagert.

#### **Citratpuffer:**

- 50 mM Natriumcitrat
- 0,02% Natriumazid
- pH: 3,0

#### **Kopplungspuffer:**

- 0,5 M NaCl
- 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>
- pH: 8,3

### II.5.1.6 Konzentrationsbestimmung der Antikörper

Die Konzentration der AK ließ sich über die Differenz der optischen Dichte im Vergleich zum Kopplungspuffer am Spektralphotometer (vgl. II.7.2) bestimmen. In speziellen Küvetten wurden Proben des Kopplungspuffers als Referenz sowie AK- Lösungen bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen. Über die Differenz der bestimmten Dichtewerte konnte nach dem Lambert- Beer'schen Gesetz die AK- Konzentration definiert werden. Bei einer OD<sub>280</sub> (optic density bei 280 nm) von z.B. 1,0 lag eine AK- Konzentration von 0,7 mg/ ml vor.

### **II.5.1.7 Affinitätsbestimmung der Antikörper**

Die rein quantitative Auswertung der AK- Proben am Spektralphotometer wurde durch die unter II.5.3 beschriebene Durchflusszytometrie ergänzt, um neben der Konzentration auch die Spezifität bzw. Affinität der AK zu bestimmen.

### **II.5.2 Konzentrierung monoklonaler Antikörper**

Da sich die mAK der Zelllinie BB7.2 nur in sehr niedrigen Konzentrationen aufreinigen ließen, musste im Anschluss an die Extraktion eine Konzentrierung erfolgen. Analog der Aufreinigung aus großvolumigem, niedrig konzentriertem Hybridomüberstand wurde eine Sepharose A- Säule mit mehreren Proben niedrig konzentrierter AK- Lösungen beladen. Die neuerliche Säureextraktion lieferte Chargen mit deutlich höherer Konzentration der enthaltenen AK (vgl. III.2).

### **II.5.3 Durchflusszytometrie (FACS)**

#### **II.5.3.1 Einleitung**

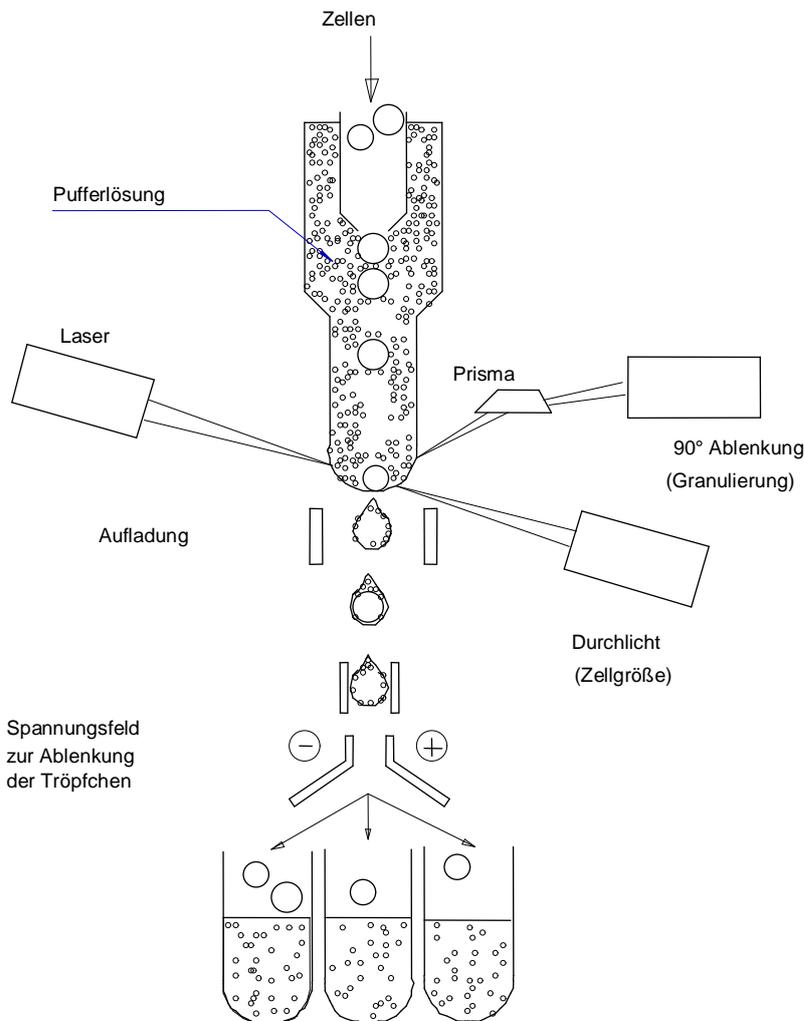
Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Analyse einzelner Zellen in Suspensionen. Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften der Zellen werden hierbei durch spezifisch oberflächlich gebundene AK simultan durch ein FACS (**F**luorescence- **a**ctivated **c**ell **s**orter) ausgewertet und erlauben eine Charakterisierung jeder einzelnen Zelle anhand von Größe, Granularität und Oberfläche.

#### **II.5.3.2 Prinzip**

Eine Suspension mit einer Konzentration von ca.  $10^6$  Zellen pro ml wird durch eine vibrierende Fließkammer befördert, um in Form kleinster Tröpfchen Zelle für Zelle einen Laserstrahl zu passieren. Das monochromatische Licht dieses Argonlasers (Wellenlänge: 488 nm) wird im Bruchteil einer Sekunde durch die jeweilige Zelle spezifisch abgelenkt und als Streu- bzw. Fluoreszenzlicht durch einen Photomultiplier erfasst und verstärkt. Die antegrade Lichtstreuung als FSC (**f**orward **s**catter) korreliert mit der Größe der getroffenen Zelle, die seitliche Lichtstreuung bzw. SSC (**s**ide **s**catter) mit der Granularität bzw. der Kern/

Plasma- Relation der Zelle. Als weitere Parameter können Fluoreszenzsignale bestimmt werden, die sich durch den Einsatz markierter AK ergeben. Hierzu werden Fluoreszenzfarbstoffe an spezifische AK gekoppelt, die entweder verschiedene Oberflächenstrukturen der untersuchten Zelle erkennen (direkte Immunfluoreszenz) oder AK, die bereits an der Zelloberfläche gebunden haben (indirekte Immunfluoreszenz).

Zum Einsatz kommen Farbstoffe, deren Absorptionsmaxima im Wellenlängenbereich des Lasers liegen. Die Fluorochrome FITC (Fluoresceinisothiocyanat, Absorptionsmaximum: 500 nm) und PE (Phycoerythrin, Absorptionsmaximum: 560 nm) entsprechen dieser Anforderung am Besten. Sie emittieren nach Anregung energieärmeres Licht mit 520 nm (FITC) bzw. 570 nm (PE) Wellenlänge.



**Abb. 35: Schematische Zeichnung eines fluoreszenzaktivierten Zellanalysegerätes (FACS):**

Die Zellen werden über eine Kapillare in die Apparatur injiziert und in der mit Pufferlösung gefüllten Fließkammer zu einer Einzelzellsuspension geformt. Nach Austritt aus der Kapillare als kleinste Tröpfchen passieren sie den Laser. Das Durch(gangs)-licht (FSC) definiert die Zellgröße, die seitliche Lichtstreuung (SSC) als 90°- Ablenkung die Granulierung. Über das Prisma umgelenkt, lassen sich fluoreszenzemittierende, gebundene AK auf der jeweiligen Zelle detektieren. Eine Rückkopplung ermöglicht über geänderte Spannungsfelder (Auffadung) eine spezifische Ablenkung und Asservierung der Tröpfchen bzw. Zellen (Zellsorter).

Die emittierte Lichtmenge ist der gebundenen AK/ FITC- (bzw. PE)- Konzentration proportional und erlaubt Aussagen über die Expression von Oberflächenstrukturen wie z.B. den MHC I- Komplex. Differente Zellpopulationen können bei der Auswertung direkt getrennt und einzeln weiter aufgearbeitet werden. Beim Einsatz bekannter Zellen kann durch das FACS die Qualität der eingesetzten AK anhand ihrer Affinität und Spezifität bestimmt werden (vgl. II 5.1.7).

### II.5.3.3 Zellfärbung

Zur Färbung lebender Zellen nach dem Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz wurden in eine 96 well Mikrotiterplatte mit muldenförmigem Boden je 1- 2 x 10<sup>5</sup> Zellen

**FACS-Puffer:**  
 - 2% FCS (vgl II.2.4)  
 - 0,02% NaN<sub>3</sub>  
 in PBS

pro Loch gegeben. Die Lebendzellzahl wurde zuvor in der Neubauer- Zählkammer bestimmt (vgl. II 4.4). Nach dreiminütiger Zentrifugation mit 1500 rpm bei 4°C wurde der Überstand der wells verworfen, die Zellen selbst hafteten fest am Boden der einzelnen Löcher an. Um diese zu lösen wurde kurz gevortext und in jedes well 200 µl FACS- Puffer pipettiert. Dann wurde neuerlich zentrifugiert und die Zellen ein zweites Mal mit FACS- Puffer gewaschen. Dieser „Waschvorgang“ wurde zur Entfernung störender Fremdstoffe zweimal wiederholt.

Anschließend wurde zu diesen Zellen der Erst- AK wie z.B. aus Hybridomüberstand aufgereinigter AK BB7.2 (vgl. II.5.1) in den Verdünnungen 1:10, 1:100 und 1:1000 gegeben und nach Schema in die entsprechenden wells pipettiert. Die folgende Inkubation verlief bei 4°C über 30 min. Als Negativkontrolle wurde neben reinem FACS- Puffer ohne Erst- AK zusätzlich ein nicht bindender Erst- AK, zumeist muriner H-100 AK (vgl. II.4.1), eingesetzt. Zur Entfernung ungebundener Erst- AK wurde die Mikrotiterplatte zentrifugiert, der Überstand der wells verworfen, die Zellen vom Boden gelöst und neuerlich in je 200 µl FACS- Puffer aufgenommen. Drei weitere Reinigungsschritte schlossen sich an, so dass in den wells die Zellen mit unterschiedlichen Mengen gebundener AK vorlagen.

Zu diesen wurde der FITC- gekoppelte Zweit- AK in 1:100 Verdünnung addiert und bei 4°C inkubiert. Nach weiteren 30 min wurde der freie Zweit- AK analog dem Vorgehen beim Erst- AK durch drei Waschschriffe vollständig aus den wells extrahiert und dadurch unspezifische Hintergrundsignale minimiert. Im An-

schluss wurden die Zellen mit gebundenen Erst- und Zweit- AK in je 250 µl Propidiumjodidlösung in spezielle FACS- Röhren aufgenommen und die AK- Bindung am Durchflusszytometer bestimmt.

Alternativ erfolgte die Fixierung der FITC- markierten Zellen durch Zugabe von 100 µl 1%- ger Formalinlösung anstelle von Propidiumjodid. Nach Zugabe

**Propidiumjodidlösung:**

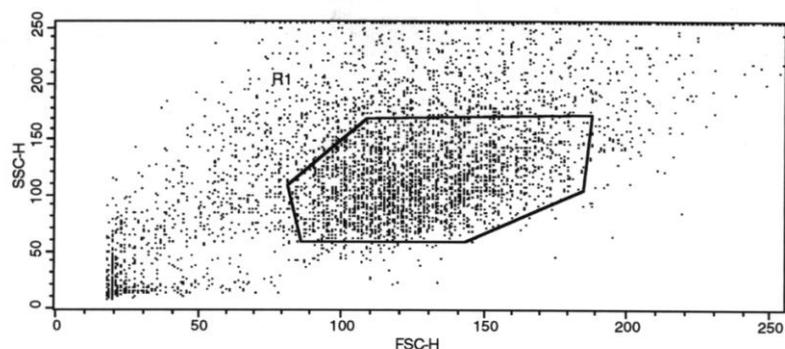
- 5,0 µg/ml Propidiumjodid
- 2% FCS (vgl. II.2.4)
- 0,02% NaN<sub>3</sub>
- in PBS

weiterer 100 µl PBS pro well konnten die fixierten Zellen unter Lichtabschluss bei 4°C asserviert und erst am Folgetag der Analyse zugeführt werden. Dazu wurden die 200 µl Zellsuspension/well direkt in FACS- Röhren übernommen.

### II.5.3.4 Auswertung

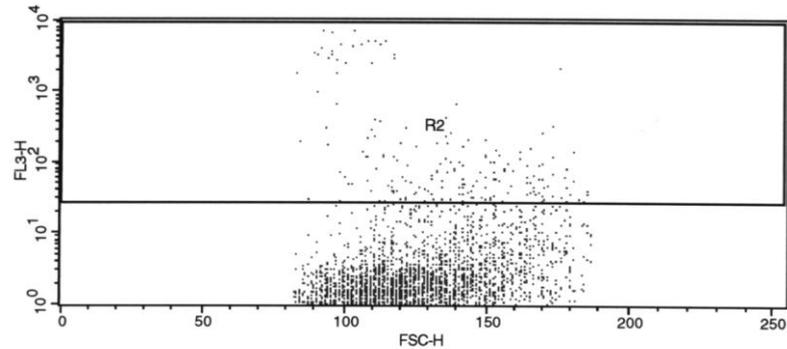
Trotz Bindung verschiedenster AK wurde primär jede Zelle anhand ihrer Größe und Granularität in einem Diagramm dargestellt. Um die folgenden Analysen auf einer einheitlichen Zellpopulation zu basieren, wurde in der Dot Plot Darstellung die interessierende, homogene Zellpopulation anhand eines manuell gesetzten Gates für die folgenden Analysen selektioniert. Von dieser Homogenität abweichende Zellen wie z.B. zu stark oder schwach granulierten Zellen fanden in den anschließenden Analysen keinen Eingang. Da tote Zellen AK unspezifisch absorbieren und zudem das Phänomen der Autofluoreszenz aufweisen können, war es essentiell, diese von lebenden Zellen zu differenzieren. Hierzu wurde der Fluoreszenzmarker Propidiumjodid, der durch defekte Zellmembranen toter Zellen diffundiert, eingesetzt. Nach dessen Zugabe wurde die selektionierte Zellpopulation in einem zweiten Schritt anhand des FL- 3 durch Propidiumjodid analysiert und signalintense Zellen nicht berücksichtigt (vgl. Abb. 37).

**Abb. 36** zeigt das Gating anhand eines Dot Plots zur Qualitätskontrolle des AK W6/32 (vgl. II.4.1). Jede Zelle wurde anhand von Größe (Abszisse: FSC- H bzw. forward light scatter) und Granularität (Ordinate: SSC- H bzw. side light scatter) als einzelner Punkt im Diagramm dargestellt. Das Sechseck zeigt das Gate (mit R1 bezeichnet), mit dessen Hilfe eine einheitliche Population für die weitere Analyse selektioniert wurde.



Zur Differenzierung toter von lebenden Zellen wurde die Population aus Abb. 36 anhand ihrer Propidiumjodidaffinität unterteilt.

**Abb. 37** zeigt das durch Propidiumjodid hervorgerufene Fluoreszenzsignal FL3- H auf der Ordinate, FSC- H auf der Abszisse gibt die Zellgröße an. Man beachte, dass mit der vor-



selektierten Population aus Abb. 36 (FSC-H: 82-190) nur Zellen entsprechender Größe berücksichtigt wurden. Das rechteckige R2- Gate im oberen Diagrammbereich grenzt die Zellen aus, die durch zu starke FL3- Signale als avital anzusehen sind. Die Menge der weiter untersuchten Zellen umfasste die im mittleren und unteren Bereich des Schaubildes, außerhalb des R2-Gates, gezeigten Punkte.

Die Kombination beider Verfahren führte zur Generierung einer homogenen Zellpopulation durch Abgrenzung falsch positiver oder negativer Hintergrundsignale. Diagramme dieser Zellen ohne Zugabe von Erst- oder Zweit- AK dienen für die folgenden Untersuchungen als Referenz. (vgl. III.2.2.3, III.2.3.3).

#### **II.5.4 Immunpräzipitation und Säureextraktion von MHC- Liganden**

Dieses Verfahren ermöglichte es, die MHC- I Komplexe der Tumorzellen von allen übrigen Zellproteinen zu separieren, die gebundenen Peptidliganden aus den Bindungstaschen der Komplexe zu lösen und sie den in Kap. II.7 beschriebenen Analysemethoden zuzuführen. Neben der Massenspektrometrie stellt dieses Verfahren den Kernpunkt zur Identifizierung von Peptidliganden dar.

Um enzymbedingte Peptid- oder Proteindestruktionen zu minimieren, war von besonderer Bedeutung, die gesamte Extraktion unter Temperaturen durchzuführen, bei denen sich sämtliche Enzyme (v.a. Proteasen) in inaktivem Zustand befanden. Aus diesem Grund wurde stets im Kühlraum bei ca. 8°C Umgebungstemperatur sowie mit lokaler Eiskühlung gearbeitet.

##### **II.5.4.1 Herstellung der Protein A- Säule**

Die Herstellung der zur Immunpräzipitation notwendigen Protein A- Säule erfolgte analog der Beschreibung unter II.5.1.4.2. Durch die geringere AK- Menge war allerdings der Einsatz von 0,4 mg Protein A- Sepharose ausreichend.

### II.5.4.2 Herstellung des Tumorlysates

Um die transmembranären MHC- I- Moleküle mitsamt den gebundenen Peptiden freizusetzen und zu analysieren war eine komplette Lyse des Tumorgewebes essentiell. Die folgenden Kapitel beschreiben diesen Lyseprozess vom nativen Ursprungsgewebe bis hin zur Immunpräzipitation der MHC-Komplexe.

#### II.5.4.2.1 Homogenisierung des Tumorgewebes durch Mixen

Das bei -80°C gelagerte, reine Tumorgewebe wurde in tiefgefrorenem Zustand in einen herkömmlichen Küchenmixer gegeben. Ein dem Tumor entsprechendes Volumen an kaltem (4°C), zweifach konzentriertem Aufschlusspuffer wurde addiert und taute das Gewebe an. Mit Parafilm abgedichtet wurde kurz gemixt. Es entstand ein inhomogenes Lysat, das durch das Hämoglobin aus dem Tumor rosa bis orangerot, teilweise dunkelrot war. Unter fortgesetzter Homogenisierung wurden ein bis zwei weitere Volumina Aufschlusspuffer ergänzt, um einer vermehrten Schaumentwicklung durch die Mixerrotation entgegenzuwirken. Die Dauer wurde bewusst kurz gehalten, um eine Erwärmung des Lysates mit dem Risiko einer Aktivierung von Proteasen zu vermeiden. Bei Überführung des Lysates in einen 100 ml Erlenmeyerkolben wurde nach Bedarf weiterer Aufschlusspuffer addiert und damit adhärente Gewebereste von Wand und Deckel des Mixers gelöst. Im Anschluss wurde das Lysat für mindestens eine Stunde auf dem Magnetrührer bei hoher Geschwindigkeit gerührt. Die entstehenden Scher- und Spaltungskräfte des zwitterionischen Detergens CHAPS im Aufschlusspuffer führten zur kombinierten physikalischen und chemischen Zerstörung der Zellmembranen und Freisetzung der transmembranen MHC- Komplexe. Die „complete“- Tabletten dienten als Proteaseinhibitoren dem Schutz der Peptide vor Zerstörung.

**Aufschlusspuffer  
(1x konz.):**  
 - 0,6% CHAPS  
 - 3 Tbl. „complete“-  
 Proteaseinhibitor  
 pro 200 ml in PBS

#### II.5.4.2.2 Homogenisierung des Tumorlysates nach Dounce

Zur Optimierung der Zellmembranspaltung durch Intensivierung des mechanischen Stresses wurde das Lysat im Anschluss in Teilen zu je 15 - 25 ml in einen Dounce- Glashomogenisator (Größe L, Fassungsvermögen 40 ml) gefüllt.

Die beiden zugehörigen Pistill der Größe L und S bewegten sich passgenau im Homogenisator mit einem minimalen Kolben/ Wand- Abstand von 0,1 - 0,15 mm (L- Kolben) bzw. 0,03 - 0,08 mm (S- Kolben). Die hierbei hervorgerufenen Scherkräfte führten zur weiteren Destruktion der Zellmembranen und Freisetzung der MHC- I- Komplexe.

Es stellte sich heraus, dass sich die Konsistenz – vermutlich aufgrund unterschiedlichen Stromaanteile – von Tumorentität zu Tumorentität, darüber hinaus selbst von Tumor zu Tumor, immens unterschied. Konsekutiv variierte die Dauer des Homogenisierens bzw. die Anzahl der notwendigen Homogenisierungsstöße stark. Im Durchschnitt wurde etwa 45 - 60 min mit dem L- Kolben, dann 15 - 30 min mit dem S-Kolben homogenisiert, eine Gesamtdauer von mindestens 60 min sollte nie unterschritten werden (vgl. Kap. IV.). Am Homogenisator haftende Gewebereste wurden danach ebenfalls mit Hilfe von Aufschlusspuffer in das Tumorlysat überführt.

#### II.5.4.2.3 Homogenisierung des Tumorlystates nach Potter

Eine Alternative zum Vorgehen nach Dounce stellte die Homogenisierung nach Potter dar. Durch mechanische Hilfsmittel fand dieses Verfahren v.a. bei adhären, zähen und stark bindegewebig durchsetzten Geweben Anwendung.

Der Aufbau ähnelt dem einer Bohrmaschine, wobei der in das Futter eingespannte Kolben analog dem Glaskolben nach Dounce im umgebenden Glashomogenisator bewegt wird. Durch den Motor mit Rotation des Kolbens ergeben sich Scherkräfte auf das Gewebe, das in Portionen zu 15 - 20 ml bearbeitet wird. Der Kolben/ Wand- Abstand des Potter- Homogenisators entspricht ungefähr dem L- Kolben des Dounce- Homogenisators. Der durch die Rotation bedingten, deutlich gesteigerten Wärmeentwicklung wird durch eine strikte Kühlung des Lysates im Eisbad Rechnung getragen. Trotz größerer Rotationsgeschwindigkeiten beim Vorgehen nach Potter musste von einer schlechteren Homogenisierung ausgegangen werden. Ursächlich waren die ausschließlich orthogonal zur Kolbenlängsachse wirkenden Scherkräften, während bei der Methode nach Dounce auch längs des Kolbens bestehende Kräfte wirken. Zudem wurde trotz beschleunigter mechanischer Rotation durch einen größeren

Kolben/ Wand- Abstand sowie die glattere Kunststoffoberfläche des Potter- Kolbens die notwendige Reibung vermindert. Entsprechend wurde standardmäßig nach Dounce homogenisiert und nur bei Schwierigkeiten auf diese Alternative zurückgegriffen. Dem Arbeitsschritt schloss sich ebenfalls eine Inkubationsphase mit CHAPS über weitere 60 Minuten an.

#### II.5.4.2.4 Zentrifugation

Zur Entfernung grobpartikulärer Strukturen folgten auf die Homogenisierung mehrere Zentrifugationsschritte. Das Lysat wurde in zwei 50 ml Falcon- Röhren überführt und primär bei 4000 rpm in der auf 4°C vorgekühlten Megafuge für 20 min zentrifugiert. Danach wurde der Überstand in zuvor gesäuberte und gekühlte, wiederverwendbare Ultrazentrifugenröhrchen gefüllt. Je nach Lysatvolumen standen Röhrchen mit 25 ml oder 88 ml Fassungsvermögen zur Verfügung. Durch die immense Kraftentwicklung in der Zentrifuge war neben der Intaktheit und dem festen Verschluss der Röhrchen größter Wert auf ein exaktes Austarieren zu legen. Die Röhrchen mussten maximal gefüllt sein und residuelle Luft durch ergänzten Lösungspuffer verdrängt werden, um die Gefahr der Implosion im Vakuum der Ultrazentrifuge zu minimieren. Der Rotor für 25 ml bzw. 88 ml fassende Röhrchen wurde bereits einige Zeit vor Beginn in die Ultrazentrifuge eingesetzt und auf 4°C vortemperiert. Anschließend wurde das Lysat bei 4°C mit 40.000 rpm für 60 min zentrifugiert und hierbei einer Beschleunigung bis zum 235.000- fachen der Erdbeschleunigung ausgesetzt.

#### II.5.4.2.5 Filtration

Zur vollständigen Entfernung residueller Partikel schloss sich an die Ultrazentrifugation eine Sterilfiltration durch eine Celluloseacetat- Membran (0,2 µm) an.

### **II.5.4.3 Immunpräzipitation der MHC/ Peptid- Komplexe**

#### II.5.4.3.1 Prinzip der Immunpräzipitation

Zur Extraktion der MHC- I- assoziierter Peptidliganden wurden AK zum Tumorklysate gegeben. Diese banden spezifisch an die MHC I- Komplexe und konnten analog der AK- Aufreinigung aus Hybridomüberstand (vgl. Kap. II.5.1) über die

Präzipitation an einer Protein A- Säule eluiert werden. Das Eluat beinhaltete damit Komplexe nichtkovalent gebundener Proteine, bestehend aus MHC- I- Molekülen, Peptidliganden sowie spezifischen mAK.

Zur Bindung der MHC- I- Komplexe (inklusive der präsentierten Peptidliganden) standen zwei Sorten mAK aus eigener Aufreinigung zur Verfügung (vgl. II.4.1):

- **BB7.2**<sup>196</sup> mit isolierter Spezifität für das **HLA- A\*02** Molekül sowie
- **W6/32**<sup>197</sup> mit Spezifität für sämtliche **HLA- A, B, C** Moleküle

Entsprechend erfolgte die Präzipitation von HLA- A\*02<sup>+</sup> Tumorgewebe primär mit BB7.2. In einem zweiten Schritt erlaubte die Zugabe von W6/32 die Extraktion sämtlicher restlicher MHC- Komplexe (außer HLA- A\*02) aus dem Lysat. Bei HLA- A\*02<sup>-</sup> Tumorgewebe wurden in einem Schritt sämtliche MHC- Komplexe mittels W6/32 gebunden und extrahiert.

#### II.5.4.3.2 Durchführung

Nach der Sterilfiltration (vgl. II.5.4.2.5) wurden zum klaren Lysat 5 mg AK entsprechend der HLA- Klassifikation des Tumors gegeben und die Lösung unter vorsichtigem Rühren für mindestens 60 min inkubiert. Parallel wurde die Protein A- Säule über eine Pumpe mit einer Flussrate von 2 ml/ min mit PBS gewaschen. Im Anschluss wurde das Lysat zyklisch über die Protein A- Säule geleitet. Die Dauer richtete sich nach der Menge des Lysats. Um zumindest ein dreimaliges Passieren der Säule durch die gesamte Lysatmenge zu gewährleisten, bot es sich an, die Präzipitation für ca. zwölf Stunden über Nacht durchzuführen. Die Komplexe aus MHC, AK und Peptid waren in Folge über den AK nichtkovalent an die Säule gebunden. Nach dieser Bindung wurde die Säule für mindestens 15 min mit Aufschlusspuffer (vgl. II.5.4.2.1), dann über je 30 min mit PBS und H<sub>2</sub>O<sub>bd</sub> gewaschen. Bei großen Mengen eingesetzter AK wurde das Lysat für eine zweite Präzipitation kühl asserviert.

Die Zugabe von 3 ml Citratpuffer führte zur Lösung der MHC/ Peptid/ AK- Komplexe aus ihrer Bindung an die Protein A der Säule (vgl. II.5.1.5.3). Die Elution erfolgte tropfenweise, die ersten 0,5 ml Vorlauf wurden verworfen, die restlichen 2,5 ml Eluat asserviert und sofort weiterverarbeitet. Analog dem Vorgehen bei

---

<sup>196</sup> Parham et al. 1981

<sup>197</sup> Barnstable et al. 1978

der AK- Aufreinigung war es möglich, auch diese Säule nach erneutem Packen und wiederholtem Waschen mit PBS für weitere Präzipitationen zu verwenden (vgl. II.5.1.4.3). Aus Gründen niedriger Affinität des AK BB7.2 wurde der ersten eine zweite identische Präzipitation angeschlossen. Erst danach erfolgte die Inkubation und Präzipitation mit dem AK W6/32. Bei initialer Verwendung von W6/32 war kein sequentielles Vorgehen notwendig. Zur Quantifizierung der enthaltenen MHC- Menge mittels Western Blot (vgl. II.6.2) wurde vor und nach Präzipitation 1 ml Lysat entnommen und bei -80°C eingefroren.

#### **II.5.4.4 Säureextraktion von MHC- Liganden**

Nach der Immunpräzipitation lagen die Peptide in Form nicht- kovalent gebundener MHC/Peptid/AK- Komplexe vor. Um diese zu spalten und die Liganden aus ihrer Bindung zu lösen, wurden den 2,5 ml Eluat 25 µl konzentrierte, 25%ige TFA zugegeben. Die Ansäuerung führte zur Aufspaltung der Molekülkomplexbindungen und zur Zerstörung der Tertiär- und Quartärstruktur der Proteine. Die einzelnen Ketten der MHC- I- Moleküle sowie der AK lagen damit getrennt in Lösung vor, so dass die Peptidliganden aus ihren Bindungstaschen freigesetzt werden konnten. Zur Zwischenanalyse wurde nach der Extraktion eine Probe von 50 µl zur Edman- Sequenzanalyse (vgl. II.7.5) als sogenannte Probe „vor Filtration“ dem Eluat abgezweigt.

#### **II.5.4.5 Zentrikon- Filtration zur Peptidgewinnung**

Um in den 2,5 ml Eluat die MHC- Komplexe und AK von den Peptiden zu trennen, folgte eine Zentrifugation in einer Ultrafiltrationseinheit (Centricon YM- 10) über acht bis zwölf Stunden. Durch die deutlichen Größen- bzw. Massendifferenzen zwischen Peptid und MHC bzw. AK (vgl. I.1.3.2.1 bzw. I.2.2) ergab sich die Trennung. Die 1 kDa schweren Peptide passierten die Filtermembran ungehindert, während die übrigen Proteinmoleküle mit Massen über 10 kDa, dem cut- off des Filters, in der Zentrikon- Einheit retiniert und im Anschluss verworfen wurden. Nach der Zentrikonfiltration wurde vom Eluat eine weitere Probe zur Edman- Sequenzanalyse (vgl. II 5.4.4, II 7.5) „nach Filtration“ entnommen.

## **II.6. Biochemische Methoden**

### **II.6.1 SDS- Polyacrylamid- Gelelektrophorese (SDS- PAGE)**

#### **II.6.1.1 Das Prinzip der SDS- PAGE**

Die SDS- Polyacrylamid- Gelelektrophorese (SDS- PAGE) ist eine häufig eingesetzte, hochauflösende Methode zur Trennung komplexer Proteingemische<sup>198</sup>. Da Proteine unabhängig ihres isoelektrischen Punktes mit dem anionischen Detergens Natriumdodecylsulfat (**S**odium **d**odecyl**s**ulfat bzw. SDS) einen Komplex bilden, kann ein Protein nach Spaltung intramolekularer Bindungen, wie z.B. von Disulfidbrücken, eine seiner Länge proportionale Anzahl stark negativ geladener SDS- Moleküle binden. Diese überdecken die intrinsische Ladung des Proteins, so dass die Ladung des entstandenen Komplexes aus Protein und SDS der Länge des Proteins direkt proportional ist.

Durch Ausnutzung der Ladungsdifferenzen erfolgt die Auftrennung verschiedener Protein/ SDS- Komplexgemische in einem Polyacrylamidgel entlang eines elektrischen Feldes. Die Komplexe „wandern“ im Gel mit unterschiedlicher Geschwindigkeit, abhängig von der Quervernetzung des Gels sowie der Ladung der Protein/ SDS- Komplexe. Durch eine bessere Beweglichkeit nähern sich kurzkettige Proteine trotz geringerer Ladung der Anode schneller als langkettige. Um die Auflösung der Trennung zu steigern, werden zwei unterschiedliche Gele hintereinander geschaltet. Im großporigen, wenig vernetzten Sammelgel werden die Proteinproben auf ein kleines Volumen zu einer schmalen Bande fokussiert, da sie durch einen speziellen Ladepuffer (pH 6,8) zwischen einer Front aus Chlorid und Glycin einzwängt werden. Im anschließenden Trenngel mit Laufpuffer (pH 8,8) überholt die Glycinfront die Chlorid- und Proteinfrent, die Proteine trennen sich als schmale Bande im Gel auf. Anhand der Banden eines definierten Proteinmarkergemisches kann die Molekülmasse der einzelnen Proteine approximiert werden.

---

<sup>198</sup> Laemmli U.K. 1970

## II.6.1.2 Das SDS- Polyacrylamidgel

### II.6.1.2.1 Komponenten des SDS- Polyacrylamidgels

Das Polyacrylamidgel besteht aus linearen Ketten längsvernetzten **Acrylamids** (A), die über Brücken aus **N,N'-Methylbisacrylamid** (Bis) quervernetzt werden. Die Vernetzungsreaktion wird durch den Radikalbildner **N,N,N',N'-Tetramethyl-**

Komponenten	Trenngel			Sammelgel 5%
	8%	10%	12%	
H <sub>2</sub> O <sub>bd</sub>	4,6	4,0	3,3	3,4
A 30% / Bis 0,8%	2,7	3,3	4,0	0,83
1,5 M TRIS (pH: 8,8)	2,5	2,5	2,5	-
1,0 M TRIS (pH: 6,8)	-	-	-	0,63
10% SDS	0,1	0,1	0,1	0,05
10% APS	0,1	0,1	0,1	0,05
TEMED	0,006	0,004	0,004	0,005
Gesamt- volumen	10,0	10,0	10,0	5,0

**Tab. 6** zeigt die Zusammensetzung der drei häufigsten Trenngel (8, 10 und 12%) sowie des Sammelgels (5%) im der SDS- PAGE. Die Angaben in ml erlauben die Herstellung je eines Gels. Die Abkürzungen sind dem Text oder dem Abkürzungsverzeichnis zu entnehmen.

### II.6.1.2.2 Herstellung des SDS- Polyacrylamidgels

Die Herstellung der Gele erfolgte durch Polymerisation der in Tab. 6 aufgeführten Komponenten im Zwischenraum zweier Glasplatten.

Nach Reinigung der Glasplatten mit 80%- igem Alkohol und H<sub>2</sub>O<sub>bd</sub> wurde die Gelapparatur nach den Herstellerangaben zusammengefügt. Durch unterschiedliche Spacer zwischen den Glasplatten konnte die Dicke des Gels variiert werden. Nach Zugabe von TEMED startete die Polymerisationsreaktion, so dass das flüssige Trenngel unmittelbar zwischen die Glasplatten gegossen werden musste. Um eine ebene Gelfront zu erzielen, wurde das Gel zwischenzeitlich mit H<sub>2</sub>O überschichtet. Die Polymerisationsreaktion konnte anhand des

**ethylendiamin TEMED** katalysiert und durch **Ammoniumpersulfat (APS)** stabilisiert. Durch den Einsatz unterschiedlicher Mengen an Acrylamid bzw. Bisacrylamid lässt sich die Quervernetzung und damit die Porengröße der Gele regulieren. Ein auf die Proteingrößen des Gemischs abgestimmtes Gel ermöglicht ein optimales Trennergebnis. Zur Trennung der Proteine aus Tumorlysaten eignete sich vor allem das 10%- ige Trenn- und das 5%- ige Sammelgel.

überschüssigen Gelrestes verfolgt werden, sie dauerte ca. 30 - 60 min. Nach Polymerisation des Trenngels wurde das Wasser entfernt und das Sammelgel analog dem Trenngel hergestellt. Statt der Wasserüberschichtung wurde unmittelbar ein Probenkamm eingesetzt und bis zur vollständigen Polymerisation belassen. Die entstehenden Aussparungen im Sammelgel, je nach Kamm acht bis zwölf Taschen, nahmen im Folgenden die einzelnen Proteingemische auf. Nach Komplettierung der Polymerisation wurde das Gel in die Elektrophoreseapparatur eingespannt und die Kammern mit Laufpuffer aufgefüllt.

<p><b>Laufpuffer:</b>  bei MG 20- 50 kDa:  - MES 250 mM  - TRIS 5 mM  - EDTA 0,5%</p> <p>bei MG &lt; 20 kDa:  - MOPS 250 mM  - TRIS 5 mM  EDTA 0,5%</p>
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

### II.6.1.3 Die Proben

#### II.6.1.3.1 Aufbereitung der Proben

Die Proben (hier: Tumorslysat) wurden mit zweifach konzentriertem Probenpuffer verdünnt, um die Disulfidbrücken der Proteine mit 2-Mercaptoethanol zu spalten. Die fünfminütige Hitzedenaturierung bei 95°C im Heizblock führte anschließend zu einer optimalen SDS- Beladung der nun längsgestreckten Proteinketten.

<p><b>Probenpuffer:</b>  Laemmli 3x- Puffer</p>
-----------------------------------------------------

#### II.6.1.3.2 Auftragen der Proben

Nach Entfernung des Kammes (vgl. II.6.1.2.2) wurden die Probenaschen mit Laufpuffer gesäubert, um Polymerisationsreste zu entfernen und ein gleichmäßige Auftragen der Proben zu gewährleisten. In die einzelnen Taschen wurden wenige Mikroliter Probenlösung pipettiert. Durch die größere Dichte sammelte sich das Probengemisch am Boden der Tasche. Neben den verschiedenen Proben wurde in eine Tasche eine standardisierte Markerproteinmischung zur späteren Korrelation der Ergebnisse gegeben. Auf eine Beladung der randständigen Geltaschen wurde verzichtet, da die apparaturbedingte Inhomogenität des elektrischen Feldes zu einer deutlichen Laufzeitverzerrung führte.

#### **II.6.1.4 Die Gelelektrophorese**

Nach dem Auftragen der Proteine wurde die Apparatur an eine Gleichstromquelle mit 100 V angeschlossen, bis die Lauffront des Markers (Bromphenolblau) das Ende des Gels erreicht hatte. Die Proteine waren entsprechend ihrer Länge längs des Feldes in Banden aufgetrennt.

#### **II.6.2 Western Blot**

##### **II.6.2.1 Prinzip**

Um die durch die SDS- PAGE aufgetrennten Proteine zu visualisieren und zu spezifizieren, mussten sie vom Polyacrylamidgel auf ein zur Analyse geeignetes Material überführt werden. Dieser Vorgang wird analog dem Southern Blot<sup>199</sup> (Nachweis von DNA- Sequenzen) bzw. Northern Blot<sup>200</sup> (Nachweis von RNA- Sequenzen) als Western Blot (Nachweis von Proteinen) bezeichnet<sup>201</sup>.

Hierbei werden die Proteine erneut einem elektrischen Feld ausgesetzt, um sie vom SDS- Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosefolie zu transferieren. Da die SDS- Moleküle während dieses Transfers vom Protein entfernt werden, kann das Protein seine ursprüngliche Struktur zumindest teilweise zurückgewinnen. Die antigenen Determinanten des Proteins treten dadurch wieder zutage und ermöglichen eine Detektion durch spezifische AK (hier: HLA - spezifische murine AK, vgl II.4.1, Tab. 5). Zur Detektion der gebundenen AK wurden Zweit- AK genutzt, die die Fc- Komponente des Erst- AK erkannten (vgl. I.1.3.2.1.1). Da die Zweit- AK zusätzlich über eine Enzymkonjugation verfügten, konnte nach Zugabe eines chemilumineszierenden Enzymsubstrates die Darstellung auf einem lichtsensitiven Film erfolgen.

---

<sup>199</sup> Southern E.M. 1975

<sup>200</sup> Alwine J.C. et al. 1977

<sup>201</sup> Burnette W.N. 1981

### II.6.2.2 Proteintransfer auf eine Nitrocellulosefolie

Das SDS- Polyacrylamidgel wurde der Elektrophoreseapparatur entnommen, das Sammelgel abgetrennt und verworfen. Die Nitrocellulosemembran sowie zwei Whatman- Filter wurden auf die Gelgröße zugeschnitten und in Anodenpuffer, vier weitere Filter und das Polyacrylamidgel in Kathodenpuffer getränkt, abgetropft und in dargestellter Reihenfolge zwischen Graphitanode und -kathode der Blottingapparatur platziert. Auf exaktes Übereinanderschichten der einzelnen Filter ohne Luftblasenbildung

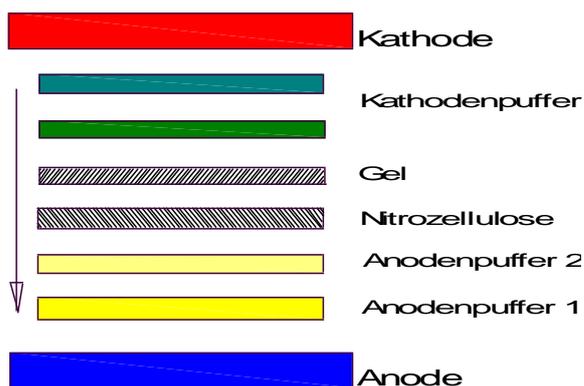
**Anodenpuffer:**

- 36,3 g TRIS
- 20% Methanol ad 100 ml
- pH- Einstellung auf 10,4
- mit 1M HCl bzw. 1M NaOH

**Kathodenpuffer:**

- 5,2 g 6-Aminocapronsäure
- 20% Methanol ad 100 ml
- pH- Einstellung auf 9,4
- mit 1M HCl bzw. 1M NaOH

#### Blot-Aufbau bei Semi-dry Blot



war zu achten, um Kriechströme zu vermeiden und den Transfer zu optimieren. Dieses „Blotten“ dauerte bei einer Stromstärke von 60 mA zwischen 75 und 90 Minuten.

**Abb. 38** zeigt den schematischen Aufbau einer Blottingapparatur zum Proteintransfer von Polyacrylamidgel auf Nitrocellulosefolie. Der Transfer erfolgte in Richtung Anode, wobei zwischen Gel bzw. Nitrocellulose und elektronischem Pol jeweils zwei in Kathoden- bzw. Anodenpuffer getränkte Whatman- Filter eingeschoben wurden

### II.6.2.3 Färbung der Nitrocellulosefolie

Einen ersten Überblick über den Erfolg des Western Blotes lieferte die reversible Proteinfärbung mit Ponceau S-Lösung. Nach dem Proteintransfer wurde die Nitrocellulosefolie unter Schwenken für zwei Minuten mit dieser intensivroten Farblösung inkubiert. Neben den aufgetrennten Proteinen der Analysatlösungen zeigten sich vor allem die Proteine des Markers als rote Banden, die zum späteren Vergleich auf der Folie vorsichtig mit Bleistift markiert wurden. Durch Zugabe von  $H_2O_{bd}$  und mehrmaligem Schütteln entfärbte sich die Folie wieder.

**Ponceau-S-Lösung:**

- 0,2% (w/v) Ponceau-S
- 3% Trichloressigsäure
- in TBS (vgl. II.2.4)

### II.6.2.4 Antikörperinkubation

Vor Inkubation mit dem Erst- AK wurde die Nitrozellulosefolie bei Raumtemperatur in TBB (blocking buffer) über Nacht geschwenkt. Hierdurch wurden sämtliche freie Valenzen der Folie mit Rinderalbumin bedeckt

<b>TBB (blocking buffer):</b> - 0,1% (w/v) Nonidet P-40 - 3% (w/v) BSA - 5 mM EDTA in TBS (vgl. II.2.4)
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

und unspezifische Hintergrundsignale in der folgenden Analytik minimiert. Danach konnte die zweistündige Inkubation mit dem in TBB verdünnten Erst- AK (hier: Maus- AK mit Anti- humaner HLA- A/ B/ C- Spezifität, 1:2000 verdünnt, vgl. II.4.1, Tab. 5) beginnen. Die Verwendung einer Plastiktüte, in der die Membran bei 4°C langsam geschüttelt wurde, sorgte für eine optimale Benetzung bei geringem AK- Bedarf. Drei Waschschrte mit TWB à zehn Minuten bei Raumtemperatur schlossen sich an.

<b>TWB :</b> - 0,1% (w/v) Nonidet P-40 in TBS (vgl. II.2.4)
-------------------------------------------------------------------

Der enzymgekoppelte Zweit- AK (Anti- Maus- AK, HRP- konjugiert, vgl. II.4.1, Tab. 5) wurde in TBB 1: 5000 verdünnt und ebenfalls in einer Plastiktüte für eine Stunde zur Nitrozellulosemembran gegeben. Danach wurde fünf Minuten mit TBS, dreimalig zehn Minuten mit TWB und wiederum fünf Minuten mit TBS gewaschen.

### II.6.2.5 Lumineszenzdetektion

Als Substrat der Meerrettichperoxidase (HRP) wurde das Reagenz eines Fertigkit verwendet (Western Blot Chemiluminescence), mit dem die Nitrozellulosefolie für drei Minuten inkubiert wurde. Im unmittelbaren Anschluss erfolgte die Detektion der Banden über eine Foto Imaging Station. Nach einer Entwicklungszeit zwischen fünf und dreißig Sekunden wurde je nach AK bzw. Enzymaktivität ein digitales Bild erzeugt. Dieses konnte am Computer nicht nur qualitativ, sondern anhand der Graustufungen semiquantitativ ausgewertet werden (vgl. Kap.III).

## **II.7. Analytische Methoden**

### **II.7.1 Volumenreduktion durch Vakuumkonzentrator**

Als präanalytisches Verfahren wird zur Volumenreduktion leichtflüchtiger Lösungen ein im Vakuum arbeitender Konzentrator, der speed- vac, eingesetzt. Hierbei wurde die Lösung (Immunpräzipitat, vgl. Abb. 27) in 1,5 ml Eppendorfgefäßen auf einer Scheibe zentrifugiert. Durch die Zentrifugalkraft wurden die Moleküle der Lösung (hier: Peptide) an den Gefäßboden gepresst. Ein gleichzeitig aufgebautes Vakuum ließ das eiweißfreie Lösungsmittel im Überstand verdampfen. Somit konnte bei konstanter Molekülmenge und reduziertem Lösungsmittelvolumen die Peptidkonzentration der Lösung erhöht werden.

### **II.7.2 Bestimmung der optischen Dichte mittels Spektralphotometer**

Da nach dem Lambert- Beer'schen Gesetz die Lichtabsorption einer Substanzprobe (hier: AK- Lösung) bei 280 nm deren Konzentration proportional ist, ließ sich über

$$E_{\lambda} = -\lg(I/I_0) = c \cdot \alpha_{\lambda} \cdot l$$

mit  $I$  (Intensität des transmittierten Lichtes),

$I_0$  (Intensität des einfallenden Lichtes),

$c$  (Konzentration der absorbierenden Substanz in der Flüssigkeit) und

$\alpha_{\lambda}$  (natürlicher molarer Extinktionskoeffizient)

die Extinktion  $E_{\lambda}$  bestimmen. Diese Absorbanz eines Materials für Licht der Wellenlänge  $\lambda$  entspricht analog II.5.1.6 der Konzentration der Proteinprobe. Als Nullabgleich wurde der als Lösungsmittel verwendete Puffer herangezogen.

### **II.7.3 Reversed- Phase- Chromatographie**

#### **II.7.3.1 Prinzip**

Um das Eluat der MHC- Liganden nach Immunpräzipitation, Säureextraktion und Zentrifugation (vgl. II.1, Abb. 27) für die folgende Peptidsequenzanalyse im Massenspektrometer zu optimieren, war es notwendig, störende Verun-

reinigungen wie z.B. ionische Verbindungen zu eliminieren. Daneben war die Konzentrierung der Peptide in einem kleineren Volumen (vgl. II.7.4) unabdingbar. Beide Ziele waren durch den Einsatz dieses Chromatographieverfahrens zu erreichen.

Die stationäre Phase in Form der Chromatographiesäule besteht aus an Kieselgel gebundene n-Octadecyl- (C-18)- Reste, an denen hydrophobe Peptide gut binden. Unter Einsatz einer polaren, mobilen Phase lassen sich störende Salze ohne Affinität zur Säule entfernen. Unpolare Lösungsmittel hingegen lösen die Peptide aus der nicht-kovalenten Bindung an die Säule und eluieren eine gereinigte, salzfreie Lösung. Durch Verwendung geringer Lösungsmittelvolumina ergab sich eine Volumenreduktion von 2,5 ml auf 100 µl.

### II.7.3.2 Durchführung

Die wiederverwendbare C-18- Säule wurde in die Chromatographieapparatur eingebaut und nacheinander mit je einem Milliliter polarem sowie unpolarer Lösungsmittel (Solvens A bzw. B) gespült. Durch hochgereinigtes, inertes Argongas wurde ein hoher Druck über der Säule aufgebaut. Nach Äquilibrierung mit einem weiteren Milliliter Solvens A wurde das Zentrifiltrat (vgl. II.5.4.5) auf die Säule geladen. Im Filtrat enthaltene Peptide banden an die lipophilen Kohlenwasserstoffketten der stationären Phase, während ungebundene Ionen nach Zugabe eines weiteren Milliliters Solvens A aus der Säule extrahiert wurden. Die Elution mit 100 µl Solvens B löste schließlich sämtliche Peptide aus ihren Bindungen an die C-18- Reste.

**Solvens A (polar):**  
 - 0,1% TFA  
 in H<sub>2</sub>O (für Chromatographie)

**Solvens B (unpolar):**  
 - 50% Acetonitril  
 - 0,1% TFA  
 in H<sub>2</sub>O (für Chromatographie)

## II.7.4 Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

### II.7.4.1 Prinzip und Materialien

Die Hochleistungs- bzw. vormals Hochdruckflüssigkeitschromatographie (**H**igh **P**erformance/ **P**ressure **L**iquid **C**hromatography bzw. HPLC) ermöglicht die Trennung von Einzelsubstanzen eines Stoffgemisches anhand ihrer Hydrophilie



**Abb. 39** zeigt das SMART® System als HPLC- Anlage zur Trennung von Stoffgemischen (Bild der Herstellerfirma Artisan Scientific)

bzw. Lipophilie. Analog der Entsalzung (vgl. II.7.3) werden dabei lipophile Moleküle an einer Reversed- Phase- Chromatographiesäule als stationäre Phase gebunden. Durch kontinuierliches Verändern der Zusammensetzung und damit Polarität der mobilen Phase werden die einzelnen Substanzen nacheinander von der Säule gelöst und separiert aufgefangen. Der Vorteil des hier verwendeten SMART® Systems liegt im konstanten Lösungsmittelfluss, der durch den Einsatz von Spritzenpumpen erzielt wird und zu einer hohen Trennschärfe und

Reproduzierbarkeit der Ergebnisse führt. Die Chromatographiesäule besteht aus an Siliciumdioxid gekoppelten n-Octadecyl- Resten. Die effektivste, nicht-kovalente Bindung existiert bei hydrophoben, nicht ionisierten Molekülen, bei Peptiden demzufolge bei saurem pH- Wert. TFA als Ionenpaarreagenz eignet sich zur Ansäuerung der Trennlösung bestens (Ziel- pH 2,2), da es neben der pH- Einstellung als Gegenion an protonierte Gruppen der Peptide bindet und deren Hydrophobizität verändert, während die UV-Absorption kaum beeinflusst wird. Wegen seiner geringen Viskosität und guten UV-Permeabilität kommt bevorzugt Acetonitril als hydrophobes Lösungsmittel zum Einsatz.

#### II.7.4.2 Waschen und Äquilibrieren der Chromatographiesäule

Nach Einbau von Trennsäule ( $\mu$ RPC C2/C18 SC 2.1/10), Vorsäule und Probenschleife wurde das System mit Solvens B für 15 min gespült. Hierbei wurde die 500  $\mu$ l fassende Probenschleife in das System geschaltet und mitgesäubert.

Im Anschluss erfolgte die Äquilibration mit Solvens A. Durch die höhere Lösungsmittelviskosität stieg hierunter der Druck vor der Trennsäule auf 3,5 - 6,0 MPa, eine Grenze von 10 MPa wurde zur Schonung der Säule nie überschritten.

**Solvens A:**  
**(hydrophiles Lösungsmittel)**  
 - 0,1% TFA  
 in H<sub>2</sub>O (für Chromatographie)

**Solvens B:**  
**(lipophiles Lösungsmittel)**  
 - 80% Acetonitril  
 - 0,08% TFA  
 in H<sub>2</sub>O (für Chromatographie)

#### II.7.4.3 Vorbereitung der Probe

Da sich die HPLC- Trennung direkt an die unter II.7.3 beschriebene Entsalzung anschloss, lag das Peptidgemisch als 100 µl Eluat vor. Zu diesem wurde 0,1%ige TFA- Lösung bis zu einem Gesamtvolumen von 500 µl addiert. Existierten von einem Tumor mehrere Peptideluate, wurden diese vereinigt und das Gesamtvolumen im Vakuumkonzentrator (vgl. II.7.1) auf 100 µl reduziert, bevor sie mit TFA verdünnt wurden.

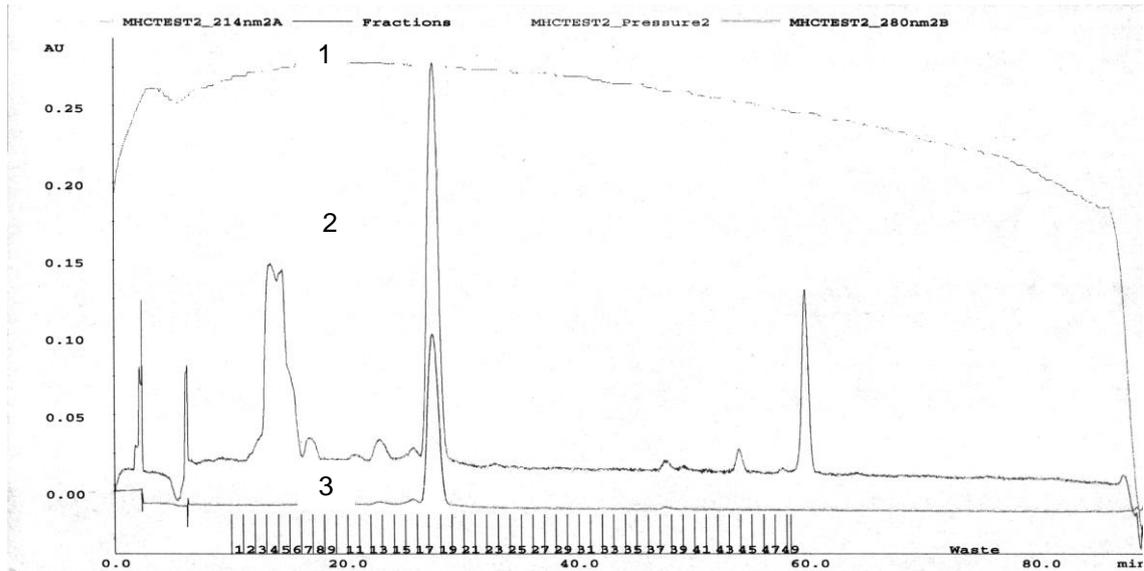
#### II.7.4.4 Laden der Probe

Um die Probe in die 500 µl große Probenschleife zu laden, musste diese vom Durchlauf getrennt werden (Position: Load). Über ein Ventil wurde mit einer Spritze die gesamte Probe direkt in die Probenschleife injiziert. Zu Beginn des Laufes wurde diese Schleife vor die Vor- und Trennsäule zum System geschaltet. Die Probe passierte die Säule, die Peptide banden an die C-18- Reste.

#### II.7.4.5 Trennlauf

Während des neunzigminütigen Trennlaufes wurde bei einer konstanten Flussrate von 150 µl pro Minute der Anteil des lipophilen Solvens B am Lösungsmittelgemisch, von initial 10% ausgehend, kontinuierlich gesteigert. Die resultierende, langsam zunehmende Hydrophobizität der mobilen Lösungsmittelphase führte zu einer schrittweisen Elution der gebundenen Peptide nach ihrer Polarität.

Ab Minute 10 wurde das Eluat entsprechend der Laufrate in einminütigen Fraktionen zu je 150 µl in separaten Gefäßen asserviert. Die minimale Konzentrationsänderung des Lösungsmittelgemisches zwischen Minute 10 und 50 trug zu einer scharfen Trennung von Peptiden ähnlicher Hydrophobizität bei.



**Abb. 40** zeigt das Schaubild einer HPLC des SMART- Systems unter Einsatz einer „leeren“, nur Lösungsmittel enthaltenden Probe. Der Trennlauf wurde als Referenz für die Analysen peptidhaltiger Eluate verwendet und kann zum Vergleich mit den Kurven aus dem Ergebnisteil herangezogen werden.

Ordinate: Optische Extinktion [AU]

Abszisse: Zeit in Minuten [min]. Oberhalb der Abszisse symbolisieren mit 1 bis 49 nummerierte, senkrechte Trennstriche die Intervalle, in denen das Eluat über je eine Minute, von Minute 10 bis Minute 60 des Trennlaufes, in einzelnen Fraktionen asserviert wurde.

Die drei Kurven zeigen:

- 1 Druckverlauf im geschlossenen Kammersystem  
Rascher Druckanstieg bei Trennstart, relative Druckstabilität bei nur geringer Änderung der Lösungsmittelmischverhältnisse, langsamer Druckabfall durch das zunehmend kompressible Lösungsmittelgemisch bei steigendem Acetonitril- Anteil
- 2 Extinktion bei 214 nm Wellenlänge  
Die teils massiven Ausschläge der Extinktionskurve trotz „leerer“ Probe ohne Peptide ließen sich bei sämtlichen Trennläufen zu gleicher Zeit und in identer Ausprägung reproduzieren. Auch wiederholte „Leerläufen“ zeigten unveränderte Ergebnisse. Damit wurden exakt diese Extinktionsmuster als unspezifisches Hintergrundsignal enthaltener Reagenzien interpretiert und folgende Analysen in direkten Vergleich zu diesem Referenzverlauf gesetzt
- 3 Extinktion bei 280 nm Wellenlänge  
Es zeigt sich ein homogeneres Hintergrundsignal ohne Rauschen. Hinweise auf enthaltene Peptide ließen sich aus Extinktionsdifferenzen bei dieser Wellenlänge, wie erwartet, nicht ableiten.

#### II.7.4.6 Reinigung und Lagerung des Systems

Nach Laufende wurde die gesamte Apparatur gründlich mit reinem Solvens B gewaschen, um Substanzreste von der Säule zu entfernen und das System zu reinigen. Im Anschluss konnte mit Solvens A äquilibriert und ein neuer Lauf direkt gestartet werden.

Zum Schutz der wiederverwendbaren Chromatographiesäule wurde bei längerfristiger Lagerung das gesamte System mit 50%- iger Ethanollösung gespült.

## **II.7.5 Peptidsequenzanalyse durch Edman- Abbau**

### **II.7.5.1 Prinzip**

Eine 1949 von Pehr Edman erstmals beschriebene und nach ihm benannte Reaktionskaskade<sup>202</sup> ermöglicht die qualitative und quantitative Sequenzanalyse von Peptiden bzw. Proteinen mit einer Länge von bis zu sechzig AS. Im Gegensatz zur C- terminalen Sequenzanalyse nach Schlack und Kumpf<sup>203</sup> wird beim Edman- Abbau ein Peptid bzw. Protein, am N- Terminus beginnend, AS für AS abgebaut und analysiert.

### **II.7.5.2 Der Abspaltungszyklus**

Pro Abspaltungszyklus lassen sich dabei drei Schritte differieren:

1. Kupplung: Bei alkalischem pH- Wert reagiert Phenylisothiocyanat (PITC) als „Edman- Reagenz“ mit der freien, N- terminalen Aminogruppe des Peptids zum Phenylthiocarbamoylpeptid (PTC- Peptid)
  
2. Spaltung: Der Zusatz wasserfreier TFA führt zur Spaltung des PTC-Peptids in eine Anilinothiazolinon- AS (ATZ- AS) und den um diese AS verkürzten Peptidrest. Mit hydrophobem Lösungsmittel lässt sich die ATZ- AS vom hydrophilen Peptidrest trennen.
  
3. Konvertierung: Danach wird die instabile Ringstruktur der ATZ- AS in die stabile Phenylthiohydantoin- AS (PTH- AS) konvertiert. Diese kann über ein RP-HPLC- System (vgl. II 7.4) isoliert und über den Vergleich der Retentionszeit mit einer Referenzsubstanz identifiziert werden. Über die Fläche des Absorptionspeaks lässt sich eine quantitative Aussage zur enthaltenen AS- Menge in picomol treffen. Der verkürzte, getrocknete Peptidrest kann dann weiter abgebaut und analysiert werden. Als einziges Nebenprodukt tritt Diphenylthioharnstoff auf (DPTU, vgl. Abb. 40), das durch Reaktion von Anilin (hydrolysiertes PITC) mit einem weiteren Molekül PITC entsteht.

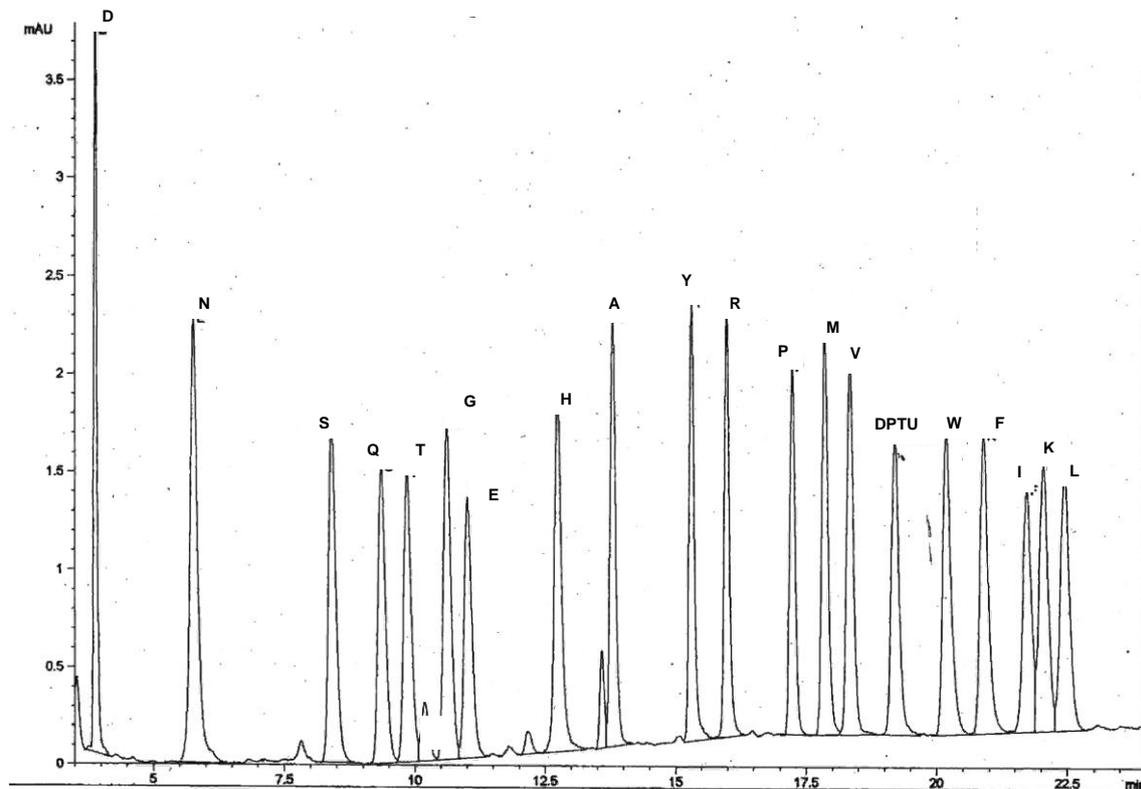
---

<sup>202</sup> Edman P. 1949

<sup>203</sup> Schlack P., Kumpf W. 1926

### II 7.5.3 Durchführung und Ergebnis

Sämtliche Analysen wurden unter Anleitung der chemisch-technischen Assistentinnen Melanie Kraft sowie Patricia Hrstic durchgeführt. 50 µl Peptidlösung nach Säureextraktion (vgl. II.5.4.4) bzw. nach Zentrifiltration (vgl. II.5.4.5) wurden eingesetzt.



**Abb. 41** zeigt die Edman- Sequenzierung einer bekannten Standard- Eichlösung am Procise-Sequenzier (vgl. II.2.1.)

Erkennbar ist anhand eines Sequenzierungszyklus von 22,5 Minuten (die Abszisse gibt die Zeit in Minuten, die Ordinate die Extinktion in nm wieder) das sequentielle Auftreten der einzelnen AS (die Kennung erfolgt anhand der Einzelbuchstabenschreibweise der AS). Anhand ihrer Größe und Polarität von hydrophil nach lipophil treten die AS in der Abfolge Asparaginsäure [D], Asparagin [N], Serin [S], Glutamin [Q], Threonin [T], Glycin [G], Glutamat [E], Histidin [H], Alanin [A], Tyrosin [Y], Arginin [R], Prolin [P], Methionin [M], Valin [V] auf. Nebenprodukt des Konvertierungszyklus ist Diphenylthioharnstoff [DPTU]. Hiernach folgen Tryptophan [W], Phenylalanin [F], Isoleucin [I], Lysin [K] und Leucin [L] auf (vgl. Abkürzungsverzeichnis/ Proteinogene AS). Mit diesem Ergebnis einer geeichten Standardlösung ließen sich anhand von Zeitpunkt und Fläche der peaks einerseits qualitative, andererseits auch quantitative Aussagen zur Zusammensetzung unbekannter Peptidlösungen treffen.

Vor der definitiven Sequenzanalyse im Massenspektrometer konnten einerseits anhand der bekannten N- Termini von AK und MHC quantitative Aussagen zur Menge enthaltener MHC- Komplexe getroffen werden. In Korrelation mit der ursprünglichen Tumormasse konnte damit die initiale MHC- Expression des Tu-

mors bestimmt werden. Andererseits ließ die Analyse nach Zentrifugation erste Aussagen über die Peptidexpression zu, indem die Signalintensivierung an denjenigen AS- Positionen bestimmt wurde, die nach der HLA- Typisierung als Anker- AS im Peptidmotiv anzusehen waren (vgl. I.6).

## **II.8. Massenspektrometrische Analytik**

Die verschiedenen Formen der Massenspektrometrie ermöglichen als wichtiges Verfahren in der Peptidanalytik, die Molekülmasse freier Ionen bzw. deren Masse/ Ladungs- Quotienten ( $m/z$ ) anhand geringster Stoffmengen in Größenordnungen von Femtomol zu bestimmen. Der Aufbau verschiedener Massenspektrometer ähnelt sich und beinhaltet zumeist folgende Komponenten: Das zu analysierende Molekül (hier: Peptid) wird in der **Ionenquelle** in ein Ion überführt, um danach im **Massenanalysator** durch elektrische bzw. magnetische Felder von anderen Molekülen abgetrennt zu werden. Durch die unterschiedlichen ( $m/z$ )- Quotienten erreichen die Analytionen verschiedene Geschwindigkeiten. Durch ihre differierenden Flugzeiten können sie dann im **Detektor** unterschieden werden. Im erstellten Massenspektrum lassen sich die relativen Häufigkeiten der unterschiedlichen ( $m/z$ )- Quotienten ablesen und den Bausteinen der Peptide zuordnen. Eine Darstellung der eingesetzten Massenspektrometer folgt unter II.8.1.- II.8.3.

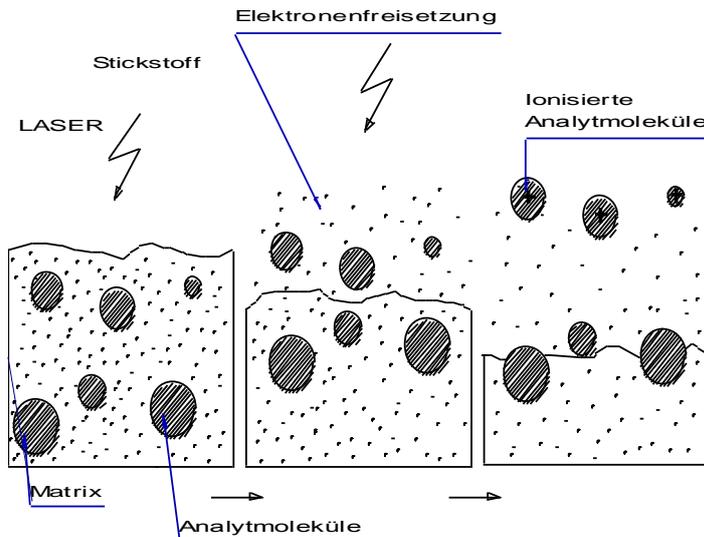
### **II.8.1. MALDI- ToF Massenspektrometrie**

#### **II.8.1.1 Prinzip**

##### **II.8.1.1.1 Ionisation/ Desorption**

Bei der matrixunterstützten Laserdesorptions- Ionisations- Massenspektrometrie (**m**atrix **a**ssociated **l**aser **d**esorption ionisation bzw. MALDI- Massenspektrometrie) wird zur Ionisation der Analytmoleküle eine extrem schonende Technik angewandt. Dies ermöglicht die Analyse auch größerer Peptide bis hin zu Proteinen. Dabei wird die Analytprobe in die Matrix, das Kristallgitter eines organi-

schen Moleküls, eingebettet. Nach kurzzeitigem Laserbeschuss werden aus der



**Abb. 42** illustriert die Ionisation und Freisetzung der Analytprobe bei der MALDI. Nach Einbettung der Moleküle in die Matrix werden durch einstrahlendes Laserlicht die Moleküle ionisiert und die Matrix sukzessive abgebaut. Hieraus resultiert die Freisetzung der ionisierten Analytmoleküle.

Matrix durch Photonenabsorption Elektronen freigesetzt, die auf die Analytmoleküle übergehen können.

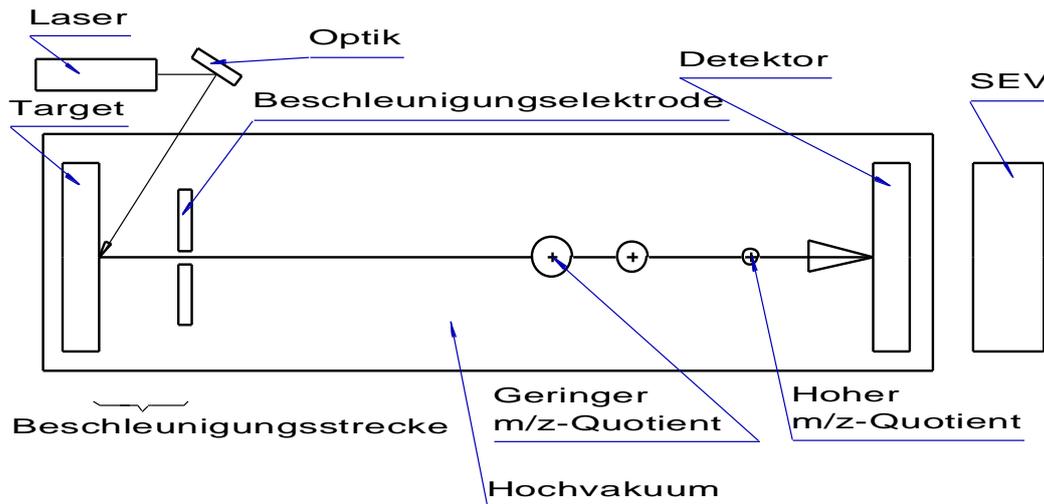
Der verwendete Stickstofflaser mit einer Wellenlänge von 337 nm überträgt zur Schonung der Probe Energien von lediglich  $10^6 - 10^7$  W/cm<sup>2</sup>. Neben Matrixmolekülen lösen sich während der Desorption ionisierte Analytmoleküle aus dem Kristallgitter und gehen in die Gasphase über.

#### II.8.1.1.2 Massenanalyse

Die Massenanalyse erfolgt beim MALDI-MS im Hochvakuum bei ca.  $3,8 \times 10^{-8}$  mbar durch einen Flugzeitanalysator, den sog. ToF (time of flight). Die ionisierten Moleküle werden in einem elektrischen Feld von 28 kV beschleunigt und durchlaufen je nach Analysator eine Flugstrecke von einigen Metern. Da bei gleicher Beschleunigungsspannung die resultierende Geschwindigkeit allein von Masse  $m$  und Ladung  $z$  abhängt, ergeben sich für verschiedene Moleküle unterschiedliche Geschwindigkeiten und damit Flugzeiten auf der Strecke von der Ionisationsquelle bis zum Detektor. Kleine, stark geladene Moleküle mit einem großen Quotienten aus Masse  $m$  und Ladung  $z$  erscheinen früher am Detektor als große, gering geladene Moleküle mit kleinem  $m/z$ . Mittels Referenzsubstanzen lässt sich anhand der benötigten Flugzeit der Masse/ Ladungs-Quotient des jeweiligen Moleküls berechnen. Leider lag die Auflösung im Massenanalysator von Hewlett Packard mit einem R- Wert von 500 FWHM und einer konsekutiven Sensitivität von 100- 500 fmol eher im unteren Bereich.

### II.8.1.1.3 Detektion

Zur Detektion der Analytionen wird deren Signal über einen Sekundärelektronenvervielfacher (SEV) verstärkt, indem jedes einzelne Ion an einer Reihe hintereinandergeschaltener Dioden steigenden Potentials eine „Elektronenlawine“ auslöst und damit ein messbares Signal liefert. Es ergibt sich ein Spektrum der einzelnen  $m/z$ - Quotienten bzw. Massen mit relativer Häufigkeitsverteilung.



**Abb. 43** zeigt schematisch den Aufbau eines Flugzeitanalysator ToF

Mittels LASER, der über eine Optik gelenkt wird, werden aus dem Target (im Falle des MALDI aus einer Matrix) ionisierte Moleküle freigesetzt (vgl. II.8.1.1.1). Nach Beschleunigung über die Strecke bis zur Beschleunigungselektrode ergibt sich in der folgenden Driftzone im Hochvakuum ohne elektrische Feldwirkung eine unterschiedliche Fluggeschwindigkeit der einzelnen Moleküle. In der Zeichnung wird dies in Form große Ionen mit geringem  $m/z$ -Quotient fern des Detektors bzw. durch kleine Ionen mit hohem  $m/z$ - Quotient nahe des Detektors dargestellt.

## II.8.1.2 Durchführung

### II.8.1.2.1 Beladen des Targets

Da die verwendeten Matrices neben der Absorption der Laserphotonen eine Kokristallisation der Analytmoleküle erlauben müssen, stand nur eine kleine Auswahl spezieller, v.a. kleiner, organischer Moleküle als Grundsubstanz zur Verfügung. Bei erwarteten Massen unter 1000 Da wurde 2,5-Dihydroxyacetonphenon (DHAP) eingesetzt, 2'-(4-Hydroxyphenyl)-azo-benzoesäure (HABA) hingegen bei Massen über 4000 Da. Daneben kamen auch Substanzen wie z.B.  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxy-zimtsäure (CCA), Sinapinsäure (SA) oder 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) als Matrices zu Einsatz. Die Herstellung der eingesetzten Matrices DHAP und HABA erfolgte laut nebenstehender Darstellung, wobei

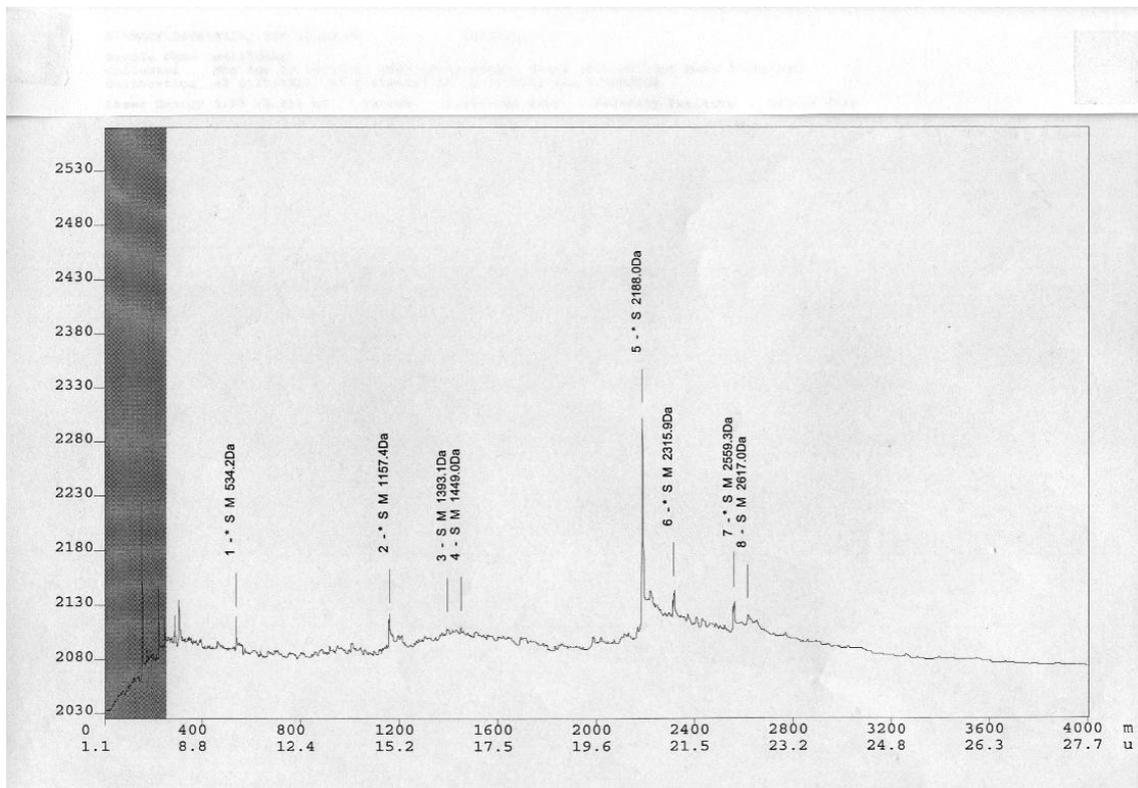
nach Zentrifugation der gesättigte Überstand als Matrix verwendet wurde. Je 0,5 µl dieser Lösung wurde auf die 10 Flächen des Targets pipettiert und unter Sicht das Lösungsmittel im Vakuum vorsichtig verdampft. Es bildete sich ein homogenes Kristallgitter mit glatter Oberfläche. In dieses Gitter wurde das Analysat eingebettet, indem die 0,5 µl Probe auf die kristalline Matrix gegeben und das Lösungsmittel ebenfalls verdampft wurde. Das beladene Target wurde in das Massenspektrometer eingeführt und das Vakuum am Gerät angelegt.

**DHAP:**

- 15 mg DHAP
- 5 mg Ammoniumcitrat
- in 200 µl H<sub>2</sub>O/  
800 µl Isopropanol

**HABA:**

- 15 mg HABA
- 5 mg Ammoniumcitrat
- in 200 µl H<sub>2</sub>O/  
800 µl Ethanol

II.8.1.2.2 Probenanalyse

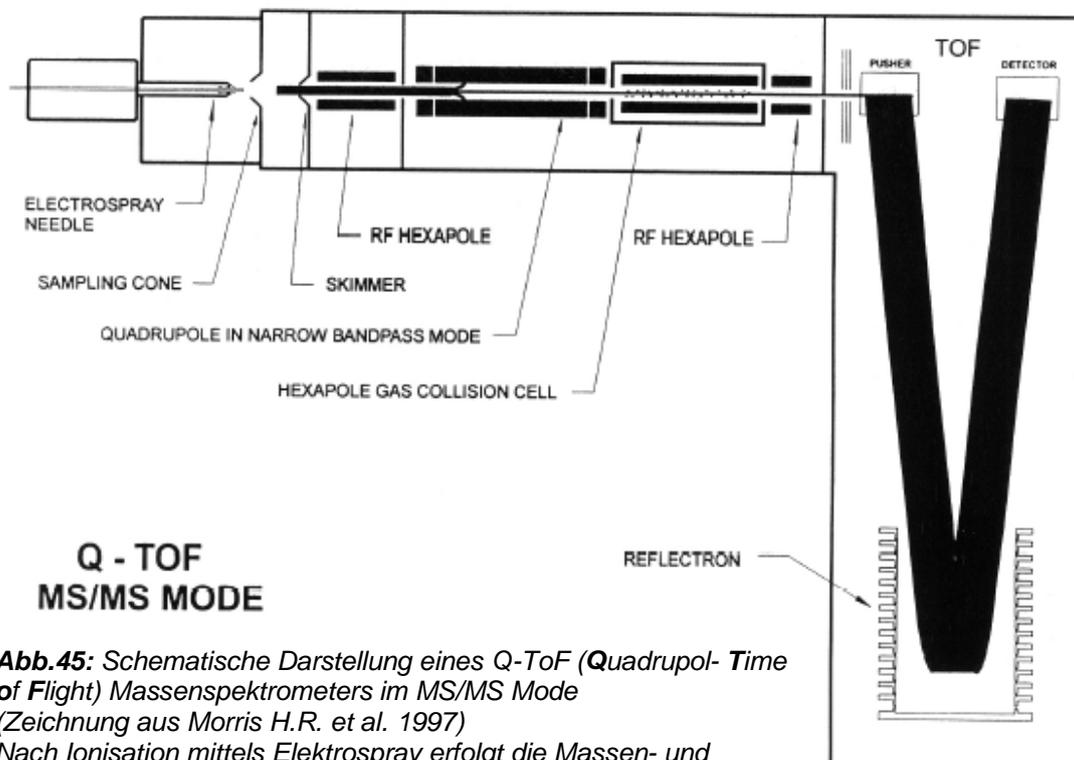
**Abb. 44** zeigt anhand des Tumors CCA31 das Summationsspektrum eines MALDI. Da im Ergebnisteil auf die Darstellung der einzelnen Spektren aus Platz- und Relevanzgründen komplett verzichtet wird, soll dieses Spektrum exemplarisch gezeigt werden. Als Analysat wurde komplett aufgearbeitetes Tumorslysat verwendet. Es zeigen sich acht peaks, fortlaufend nummeriert mit 1 - 8, denen jeweils eine Masse zwischen 534,2 bis 2617 Dalton (Da) zugeordnet ist. Während die meisten peaks unspezifischen Signalen oder Fragmentationen entsprechen, ist peak 5 mit 2188 Da dem Signal eines kompletten Peptides zuzuordnen. In der angeschlossenen Analyse am ESI- ToF konnten keine entsprechenden Signale detektiert werden. Der grau unterlegte Bereich mit  $m < 250$  bzw.  $u < 6$  liegt außerhalb des Messoptimums  
Abszisse: Masse  $m$  [Da] bzw. Masse/Ladungsquotient, Ordinate: Signalintensität

Im Single Shot Modus wurde jede Probe nacheinander mit dem Laser beschossen. Die Laserenergie wurde je nach gemessener Signalintensität schrittweise gesteigert. Zwar lieferten höhere Laserenergien stärkere Signale, führten aber durch vermehrte Störsignale wie z.B. durch abgespaltene Matrixfragmente zu einer geringeren Auflösung. Nacheinander konnten alle 120 Probenareale des Targets einzeln angesteuert werden. Aus Addition dieser Einzelspektren ließ sich ein Summationsspektrum für jedes Probenareal erstellen (vgl. Abb. 44).

Da die Auflösung des MALDI der des ESI- Massenspektrometers deutlich unterlegen war und vor allem keine Fragmentation der Peptide im Sinne eines MS-/MS- Spektrums mit konsekutiver Analyse der kompletten Peptidstruktur möglich war, wurde die Massenspektrometrie am MALDI nur in wenigen Fällen eingesetzt und stattdessen zumeist auf die sensitivere und aussagekräftigere ESI-Q-ToF- Analytik zurückgegriffen.

## II.8.2 ESI- Q- ToF Massenspektrometrie

### II.8.2.1 Vergleich MALDI-/ ESI- Massenspektrometrie



**Abb.45:** Schematische Darstellung eines Q-ToF (Quadrupol- Time of Flight) Massenspektrometers im MS/MS Mode (Zeichnung aus Morris H.R. et al. 1997)  
Nach Ionisation mittels Elektrospray erfolgt die Massen- und Strukturanalyse (vgl. (II.8.2.2.1-4) im Quadrupol sowie nach Fragmentation in der Gaskollisionskammer im folgenden TOF

Neben der matrixassoziierten Laserdesorption existiert mit dem Elektrospray eine weitere, sehr schonende Form der Molekülionisation, die in der **Elektrospray- Ionisations- Massenspektrometrie (ESI- MS)** angewandt wird. Im Unterschied zur MALDI- MS werden im hier eingesetzten Hybrid- Quadrupol- Analysator der Firma Micromass zwei Massenanalysatoren, ein Quadrupol und ein ToF- Analysator hintereinander geschaltet<sup>204</sup>.

### **II.8.2.2 Prinzip**

Analog dem MALDI- MS ist Voraussetzung zur Analyse die Ionisation der Moleküle, um sie als einzelne, getrennte Teilchen in geladenem Zustand im anschließenden Vakuum des Massenanalysators anhand der verschiedenen (m/z)- Quotienten auftrennen zu können.

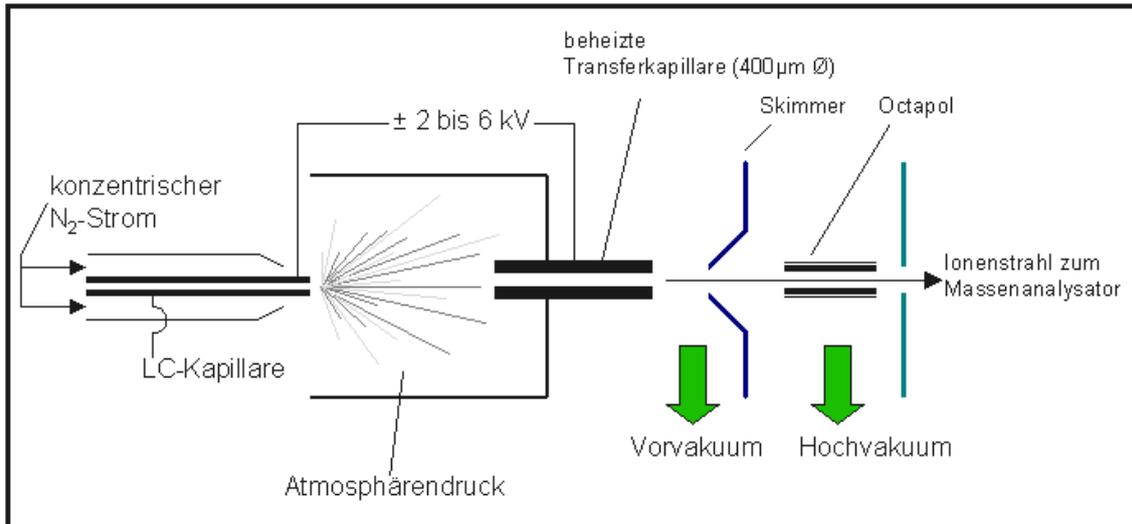
#### II.8.2.2.1 Ionisation

Im Unterschied zu Verfahren wie MALDI oder FAB (fast atom bombardment) werden bei der Elektrospray- Ionisation (ESI) die Analytteilchen nicht durch hochenergetische Stöße ionisiert, vielmehr erfolgt eine Desolvatisierung gelöster Ionen. Dazu werden die Moleküle in flüchtigen Lösungsmitteln gelöst. Um Artefaktsignale weitestgehend zu vermeiden, ist auf die Reinheit der Analytlösung ohne Puffer, Salze oder Detergenzien größten Wert zu legen.

Die Flüssigkeit wird zur Erzeugung eines feinen Sprays durch eine extrem dünne, leitfähige, meist goldüberzogene Glaskapillare mit einem Innendurchmesser von 3 - 5 µm in eine mit Argongas gefüllte Kammer gepresst. Da die Flussrate der Analytflüssigkeit lediglich 5 - 20 nl pro Minute beträgt, können lange Messzeiten erreicht und auch kleinste Mengen an Molekülen detektiert und analysiert werden, so dass eine hohe Empfindlichkeit erzielt wird. Die zwischen Kapillarspitze und Kammerwand anliegende Hochspannung führt dazu, dass sich in die Ionen entsprechend ihrer Ladung in den einzelnen Lösungsmitteltröpfchen ausrichten. Die Tröpfchen werden von der Kapillare in Richtung Massenanalysator beschleunigt und bilden hierbei zur eigenen Stabilisierung den Taylor- Konus, der sich zu einem kontinuierlichen, filamentartigen Flüssigkeitsstrom verjüngt.

---

<sup>204</sup> Morris H.R. et al. 1997



**Abb. 46:** Schematische Darstellung des Ionisationsprozesses bei der ESI- Massenspektrometrie

Über die LC- Kapillare wird das Analysat, umströmt von inertem  $N_2$ - Gas, auf die Transferkapillare hin beschleunigt. Im Vor- bzw. Hochvakuum findet die Verdampfung des Lösungsmittels statt, während die Bündelung der Ionen über den Quadrupol erfolgt. Es resultiert ein Ionenstrahl kleinster Tröpfchen, die im angeschlossenen Massenanalysator fragmentiert und evaluiert werden.

Durch ständiges Verdampfen des flüchtigen Lösungsmittels werden die Tröpfchen stetig kleiner, während bei konstanter Ladung die Ladungsdichte der einzelnen Tröpfchens kontinuierlich ansteigt. Das Rayleigh- Limit gibt die Stabilitätsgrenze an, bei der die abstoßende Coulombkraft der enthaltenen Ladungen die Oberflächenspannung des jeweiligen Tröpfchens gerade übersteigt. Es kommt zu einem schlagartigen Zerfall des Tröpfchens, der Coulomb- Explosion. Entlang des elektrischen Feldes bilden sich durch wiederholte Lösungsmitteldesolvatisierung und Coulomb- Explosionen schließlich feinste Tröpfchen mit einem Durchmesser von ungefähr  $1\ \text{nm}$ , die nur noch ein Analytmolekül enthalten und zur Massenanalyse geeignet sind. Durch einen Strom aus Stickstoffgas (curtain gas) gelangen die einzelnen Tröpfchen von der Ionisationskammer in das Hochvakuum des sich anschließenden Quadrupols (vgl. Abb. 46).

#### II.8.2.2 Massenanalyse

Der Quadrupol des hier verwendeten Massenspektrometers besteht aus vier zueinander parallelen, zylindrischen Metallstäben, die als Elektroden wechselnde Kombinationen aus Gleich- und Wechselfeldern erzeugen. Je nach Spannung und Amplitude der Wechselfelder ist es nur einzelnen Ionen mit

einem bestimmten  $m/z$ - Quotienten möglich, sich auf einer oszillierenden Bahn entlang der Längsachse des Quadrupols zu bewegen und diesen am Ende zu verlassen. Alle anderen Ionen werden im Quadrupol zurückgehalten.

#### II.8.2.2.3 Strukturanalyse durch Tandem- Massenspektrometrie

Durch Hintereinanderschalten zweier Massenanalysatoren ist es im Unterschied zum konventionellen MALDI- Massenspektrometer möglich, Ionen eines bestimmten  $m/z$ - Quotienten näher zu analysieren und nach Fragmentation der Moleküle im Tandem- MS- Experiment ihre exakte Struktur zu definieren. Dazu werden die selektionierten Ionen in die mit Argongas gefüllte Kollisionszelle geleitet, um durch den Zusammenprall mit den Argonatomen in unterschiedliche Bruchstücke zu fraktionieren. Im Feld eines Hexapols werden die entstandenen Fragmentationen gebündelt und erreichen nach Durchtritt durch die Transferlinse den zweiten Massenanalysator, das ToF (time of flight).

#### II.8.2.2.4 Detektion

Die Detektion der unfraktionierten bzw. gesplitteten Ionen erfolgt analog dem MALDI über einen Flugzeitanalysator (ToF) (vgl. II 8.1). Da Peptide bevorzugt an der Peptidbindung brechen, ergeben sich im beschriebenen Tandem- MS- Experiment ausschließlich Fragmentationen des zu untersuchenden Peptides, die aus einer einzelnen AS oder als Fragmentpeptid aus mehreren kompletten AS bestehen. Die Massenanalyse wird als Summationsspektrum sämtlicher Bruchstücke in Form des MS/ MS- Spektrums dargestellt. Da diese Untersuchungen vornehmlich von Biochemikern des Zellbiologischen Institutes Tübingen vorgenommen wurden, wird auf eine eingehende Darstellung verzichtet.

Durch die differente Masse der einzelnen AS war es möglich, sowohl einzelne AS als auch größere Fragmentpeptide des Ursprungsmoleküls wie Dipeptide, Tripeptide, usw. zu identifizieren und damit die AS- Sequenz des ursprünglichen Peptides eindeutig festzulegen. Final war damit der MHC- I- präsentierte Peptidligand eindeutig detektiert.

## III. Ergebnisse

### III.1 Überblick und allgemeine Analyse der Tumoren

#### III.1.1 Überblick

Aufgrund der Vielfalt und Menge an untersuchten Tumoren war es möglich, entgegen einer primär intendierten Analytik von Peptidliganden einzelner, isoliert betrachteter Tumoren, die Aufarbeitung zu einer eingehenden Gesamtanalyse der untersuchten Gewebe auszuweiten. Diese erstreckte sich einerseits auf allgemeine Charakteristika der jeweiligen Tumorentität wie Inzidenzalter oder Geschlechtsverteilung, andererseits auf spezifische Eigenschaften der aufgearbeiteten Gewebe wie Ausdehnung, Masse oder Metastasierungszustand. Dadurch ließen sich über die eigentliche Identifikation von Liganden hinaus wichtige Informationen zum Ausgangsmaterial gewinnen und in Zusammenschau mit der schrittweisen Verbesserung der Tumoraufarbeitung Strategien einer optimierten und weit gefassten Tumoranalytik definieren (vgl. Kap. IV).

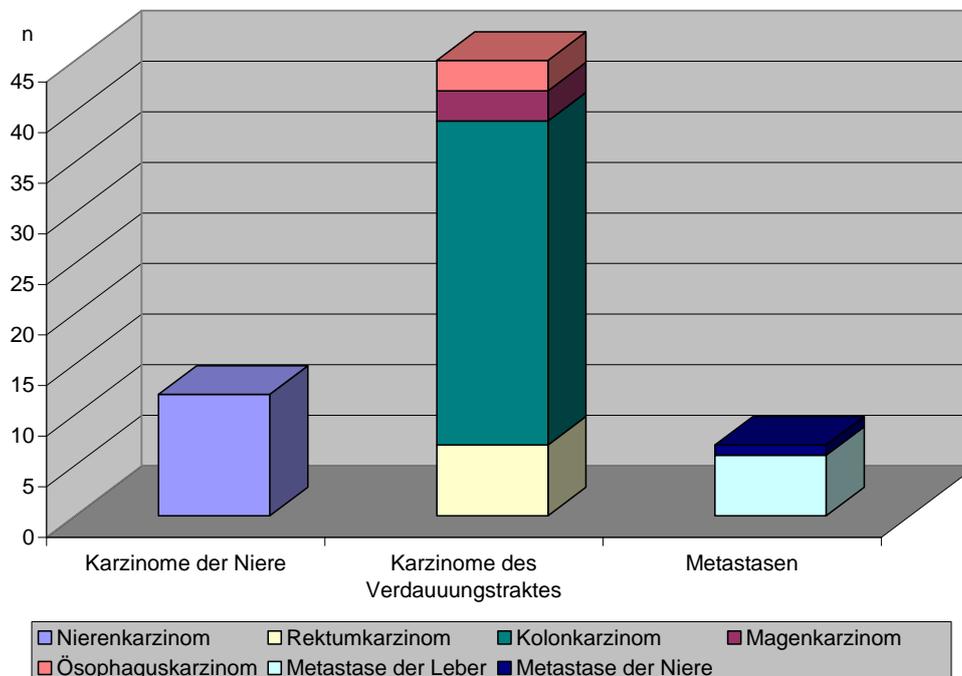
Den Ergebnissen der Ligandenanalyse sollen deshalb im Folgenden die allgemeine Analysen der untersuchten Tumoren vorangestellt werden (vgl. III.1.2). Hieran schließt sich neben den Ergebnissen der Vorversuche (vgl. III.2) die spezielle Analyse der Tumoren mitsamt der Darstellung der identifizierten Peptidliganden im Kontext des jeweiligen Tumors als zentraler Teil dieser Dissertation an (vgl. III.3- III.5).

Die Präsentation der Tumoren folgt einem uniformem Muster mit identer Formierung von Diagrammen und Schaubildern analog Abb. 47, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erleichtern. Unabhängig der erzielten Ergebnisse werden dabei primär Nierentumoren, gefolgt von Tumoren des Verdauungstraktes sowie abschließend Metastasen dargestellt.

### III.1.2 Allgemeine Analyse der Tumoren

#### III.1.2.1 Verteilung der verschiedenen Tumorentitäten

Während der Arbeiten zu dieser Dissertation wurde Gewebe von Karzinomen der Niere, des Verdauungstraktes sowie von Metastasen gastrointestinaler Tumoren analysiert. Insgesamt konnten zwölf Karzinome der Niere, fünfundvierzig Karzinome des Verdauungstraktes sowie acht Metastasen untersucht werden. Abb.47 gibt einen Überblick über die absolute Anzahl und Verteilung sämtlicher Tumoren. Wie oben dargestellt wird in den folgenden Abbildungen auf die hier verwendete Farbgebung zurückgegriffen werden.



**Abb. 47: Überblick über die analysierten Tumoren**

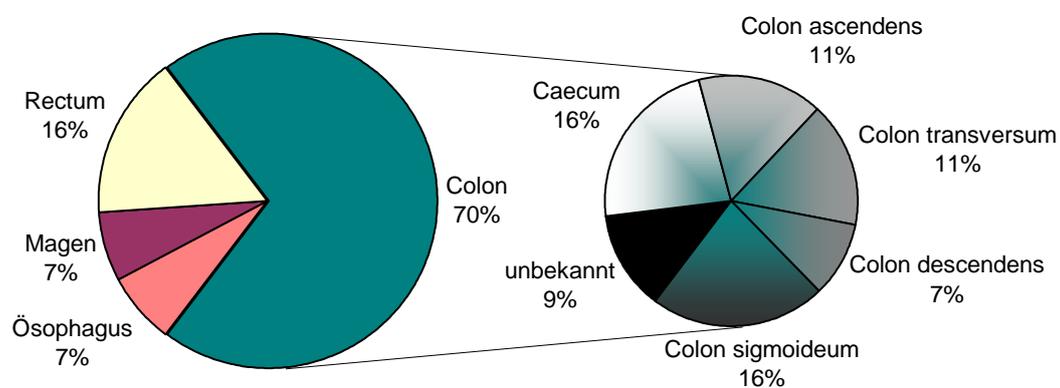
Neben den drei Hauptkategorien ist die Subklassifikation der Karzinome des Verdauungstraktes sowie der Metastasen dargestellt, die Ordinate gibt die absolute Anzahl der Tumoren wieder [n]

Die Daten der einzelnen Karzinome wurden den jeweiligen originalen Patientenakten entnommen. Hierdurch ließen sich neben den elektronisch verfügbaren Daten am Universitätsklinikum Tübingen zusätzliche Informationen aus Arztbriefen oder anderen Dokumenten gewinnen.

Die Analyse tumorspezifischer Daten erfolgte retrospektiv, so dass kein Einfluss auf die untersuchten Parameter genommen werden konnte. Lücken in den resultierenden Datensätzen sind dadurch bedingt.

### III.1.2.2 Verteilung der Karzinome des Verdauungstraktes nach Lokalisation

Während die Nierenzellkarzinome als Entität auf ein Organ, die Niere, begrenzt waren, wurden unter dem Begriff der Karzinome des Verdauungstraktes eine Gruppe ähnlicher Tumoren zusammengefasst, die an verschiedensten Lokalisationen des Intestinums auftraten. Abb. 48 zeigt die entsprechende Verteilung der einzelnen Tumoren und splittet die mit 70% Anteil größte Gruppe, die Karzinome des Kolons, nochmals anhand ihrer exakten Manifestation im Kolon auf.

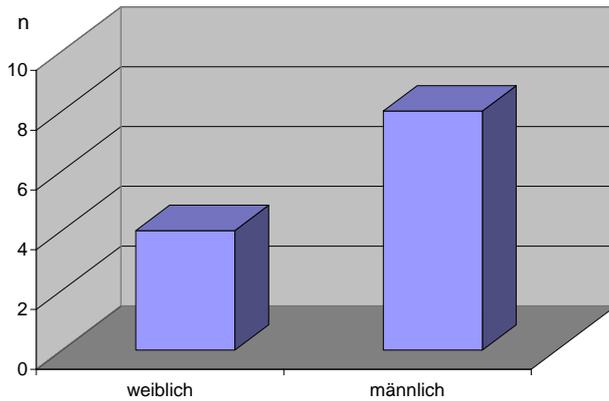


**Abb. 48:** Lokalisationsverteilung der Karzinome des Verdauungstraktes, speziell der Karzinome des Kolons. Gezeigt ist die Subspezifizierung der Tumoren des Kolons, getrennt nach Tumorlokalisation. Die Kolonkarzinome bilden mit 70% Anteil die größte Gruppe der untersuchten gastrointestinalen Karzinome

### III.1.2.3 Verteilung der Tumoren nach Geschlecht

Die Inzidenz und Prävalenz vieler Tumorerkrankungen zeigt mitunter deutliche geschlechtsspezifische Unterschiede, auf die im Folgenden eingegangen wird. Da auf eine jeweils relativ große Probengröße zurückgegriffen werden konnte, erlaubte sich der Vergleich mit den Daten großer Kollektive und weist dabei die gute Repräsentativität des analysierten Kollektivs nach (vgl. Kap. IV).

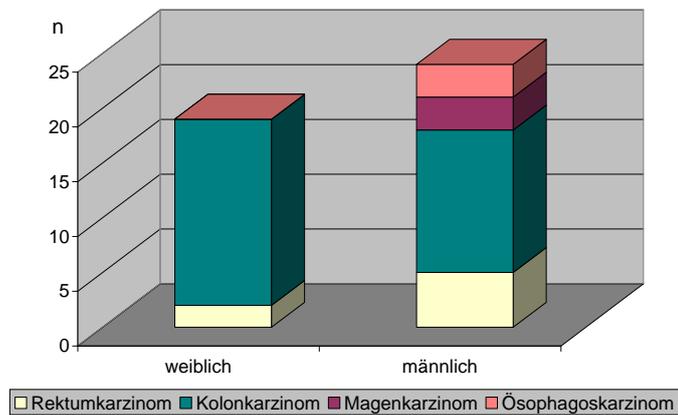
III.1.2.3.1 Die Karzinome der Niere



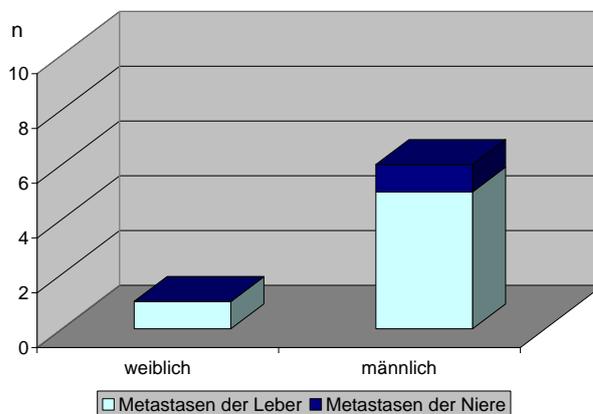
**Abb. 49:** Geschlechtsverteilung der zwölf Patienten mit Nierenzellkarzinom. Die Ordinate gibt die absolute Anzahl der untersuchten Tumoren wieder [n]

III.1.2.3.2 Die Karzinome des Verdauungstraktes

**Abb. 50:** Verteilung der untersuchten Karzinome des Verdauungstraktes nach Geschlecht. Die Ordinate zeigt die absolute Tumoranahl [n]. Die Farbzuzuordnung ist der Legende zu entnehmen. Im Vergleich zu Nierenkarzinomen (Abb.49) und Metastasen (Abb.51) ist auf den veränderten Maßstab zu achten



III.1.2.3.3 Die Metastasen der Karzinome des Verdauungstraktes



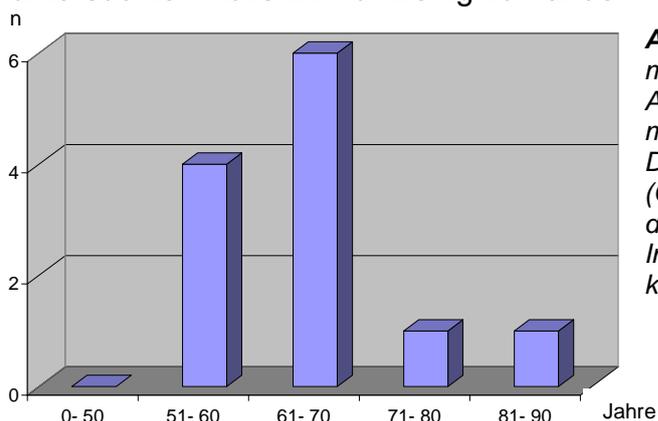
**Abb. 51** zeigt die Geschlechtsverteilung der Patienten, von denen Metastasengewebe untersucht wurde, wobei die Ordinate wiederum die absolute Tumoranahl angibt [n]

### III.1.2.4 Verteilung der Tumoren nach Inzidenzalter

Das Erkrankungsalter unterscheidet sich von Tumorentität zu Tumorentität. Um auch in dieser Beziehung die Repräsentativität der hier analysierten Gewebe zu belegen, wurde das Inzidenzalter des jeweiligen Patienten, getrennt nach Entität, bestimmt. Anhand der Patientenakten wurde versucht, ein exaktes Datum der Erstdiagnose der Tumorerkrankung bei der jeweiligen Patientin bzw. dem jeweiligen Patienten zu bestimmen. Bei fehlender Information wurde das exakt zu terminierende Operationsdatum als Referenzzeitpunkt verwendet und hiermit das Inzidenzalter festgelegt. Dies schien aufgrund der heutzutage nur minimalen Zeitverzögerung von Erstdiagnose bis zum operativen Eingriff als gerechtfertigt, generell ergab sich hieraus eine zeitliche Unschärfe von maximal zehn Tagen. Zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurden Lebensaltersgruppen von je zehn Jahren gebildet. Diese sind getrennt nach Entität in Abb.52, 53 zu sehen. Die Einordnung der Ergebnisse erfolgt vor dem Hintergrund der verfügbaren Literatur im Rahmen der Diskussion unter IV.2.

#### III.1.2.4.1 Inzidenzalter der Karzinome der Niere

Es zeigt sich ein deutlicher Anstieg der Inzidenz der Karzinome ab dem 50. Lebensjahr, Karzinome bei Menschen ab dem 71. Lebensjahr waren in dem untersuchten Kollektiv nur wenig vorhanden.



**Abb. 52:** Inzidenz der Nierenzellkarzinome im untersuchten Patientenkollektiv, in Altersgruppen zu je zehn Jahren zusammengefasst.

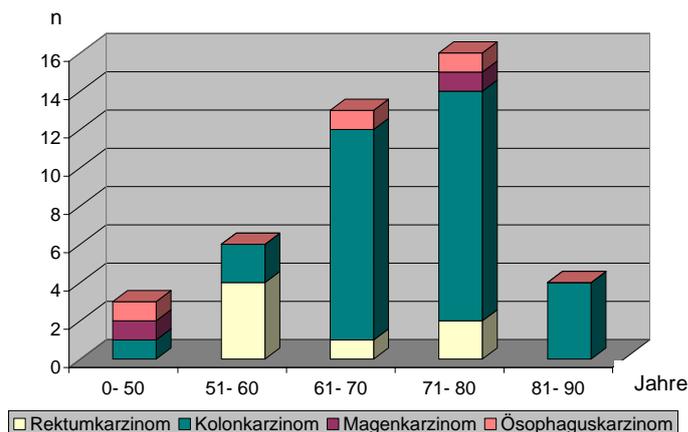
Die Abszisse gibt das Alter in Jahren an (Gruppen zu je zehn Jahren), die Ordinate die absolute Tumoranzahl [n].

In der Gruppe von 0- 50 Jahren traten keine Tumoren auf

#### III.1.2.4.2 Inzidenzalter der Karzinome des Verdauungstraktes

Analog den Nierenzellkarzinomen zeigen auch die intestinalen Karzinome gemäß Abb.53 eine steigende Inzidenz mit dem Alter. Die verminderte Inzidenz über 80 Jahren entspricht einerseits den Daten aus großen Kollektiven – hierauf

wird separat in Kap. IV. eingegangen – und spiegelt andererseits den Bias-Effekt wider, der sich durch in hohem Alter zunehmend individualisierte, an den Allgemeinzustand und Begleiterkrankungen adaptierte Therapiekonzepte ergibt und in einer geringeren Operationsfrequenz mündet. Da in unserem Kollektiv lediglich einer Operation unterzogene Patienten repräsentiert sind – nur von diesen wurde Tumormaterial aserviert –, erscheint die Inzidenz der Erkrankung in hohem Alter falsch niedrig. Erschreckend sind vor allem die drei Karzinome im



jungen Erkrankungsalter mit 41 (Magenkarzinom), 44 (Ösophaguskarzinom) und 47 Jahren (Kolonkarzinom).

**Abb. 53** zeigt die altersspezifische Inzidenz der Karzinome des Verdauungstraktes, in Altersgruppen zu 10 Jahren zusammengefasst (Abszisse). Die Ordinate gibt wiederum die absolute Anzahl der Tumoren an [n]

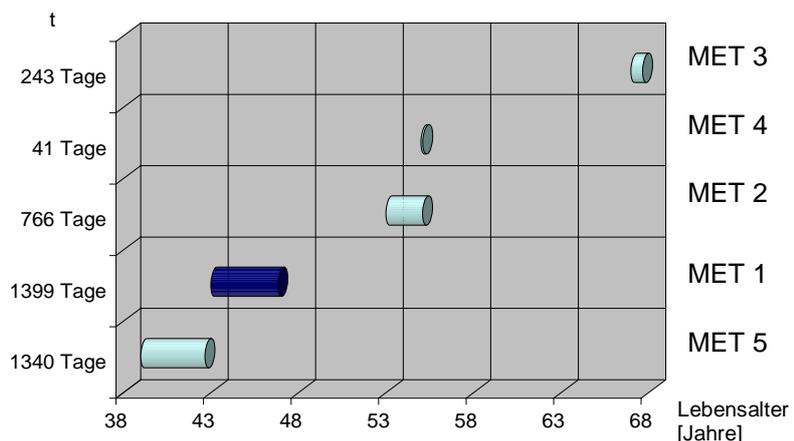
### III.1.2.5 Metastasierungsintervalle der Karzinome des Verdauungstraktes

Als Metastasierungsintervall wurde der Zeitraum bestimmt, der sich von Erstdiagnose des Primärtumors im nicht fernmetastasierten Tumorstadium M0 bis zum erstmaligen Nachweis fernmetastatischer Läsionen unabhängig des Zielorgans ergab.

Bei eingeschränkter Datenverfügbarkeit wurde der Zeitpunkt der Erstdiagnose analog dem unter III.1.2.4 beschriebenen Vorgehen durch den Operationszeitpunkt des Primarius fixiert. Analog wurde der Metastasierungszeitpunkt mit dem Datum der Metastasenoperation gleichgesetzt. Dies erschien legitim, da alternative, nicht operative Therapieansätze in den hier einbezogenen Fällen nicht vollzogen wurden oder konnten und damit die Therapie der Wahl nach Diagnosestellung der Metastasierung deren sofortige Operation darstellte. Die zeitnahe Operation nach Diagnosezeitpunkt wurde in jedem einzelnen Fall in der jeweiligen Patientenakte dokumentiert, so dass die zeitliche Diskrepanz zwischen tatsächlichem Rezidivzeitpunkt und dem als Referenzzeitpunkt herangezogenem Operationsdatum als marginal zu sehen war.

Obwohl bei der hier sehr geringen Fallzahl keine statistischen Aussagen zu treffen waren, zeigte sich bemerkenswert, dass bei beiden Patienten mit jüngerem Inzidenzalter der Primärerkrankung (MET 1: 42 Jahre, MET 5: 38 Jahre) nach deren Operation ein deutlich längeres, zumindest verdoppeltes rezidivfreies Intervall bis zur Fernmetastasierung (1399 bzw. 1340 Tage) erzielt werden konnte im Vergleich zu Patienten mit höherem Inzidenzalter des Primärtumors (MET 2, MET 3, MET 4: 41-766 Tage, vgl. Abb. 54). Leider konnten zu diesem Aspekt trotz intensiver Bemühungen keine weiteren Informationen aquiriert werden, so dass mögliche Ursachen nur spekulativ sind. Aus Sicht des klinisch tätigen Arztes ist zu hoffen, dass das verlängerte Intervall bis zur Metastasierung als Folge einer besseren, da radikaleren Primäroperation oder durch eine erfolgreichere neo- und/ oder adjuvanten Systemtherapie erzielt werden konnte.

**Abb. 54:** Darstellung der als Metastasierungsintervalle bezeichneten Zeiträume [t] von fünf Metastasen kolorektaler Karzinome, gemessen von Diagnose bzw. Operation des Primärtumors (ohne Nachweis einer Fernmetastase zum damaligen Zeitpunkt) bis zur Operation der neu detektierten Fernmetastase. Gezeigt sind von oben nach unten die Metastasen MET 3, MET 4, MET 2 sowie MET 1 und MET 5 (vgl. III.5.2).



Die Sortierung ergab sich aus dem Patientenalter bei Diagnose der Primärerkrankung (nach dem Alter von oben nach unten sortiert). Das rezidivfreie Intervall bzw. Metastasierungsintervall wurde vom Zeitpunkt der Primärdiagnose in Bezug auf das Patientenalter ausgehend als Balken dargestellt. Dieser reicht bis zum Zeitpunkt der Metastasierung.

Die Abszisse gibt das Lebensalter des Patienten in Jahren an, die Ordinate das rezidivfreie Intervall in Korrelation zum jeweiligen Balken in Tagen. Gemäß der Legende zu Abb. 51 (vgl. III.1.2.3.3) sind die Farben der Balken gewählt

Daneben fiel im Vorgriff auf die Daten der Ligandenidentifikation besonders auf, dass bei den Patienten, bei denen nach der Operation des Primärtumors die Entwicklung von Metastasen einen kürzeren Zeitraum in Anspruch nahm (MET 2, MET 3, MET 4), diejenigen Metastasen gefunden wurden, aus denen sich im weiteren Verlauf erfolgreich Peptide extrahieren ließen (vgl. III.5.2).

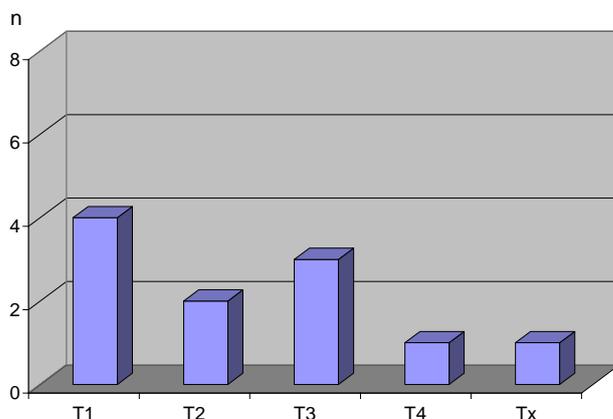
### III.1.2.6 Stadieneinteilung der Tumoren

Zur Stadieneinteilung der Tumoren wurde auf die allgemein anerkannte TNM-Klassifikation<sup>205</sup> in der jeweils aktuellen Version zurückgegriffen (vgl. I.8.1.8 bzw. I.9.9.1). In Bezug auf die differente Klassifikation der Tumoren der hier kumuliert betrachteten Karzinome des Verdauungstraktes wurde die jeweils gültige spezifische Einteilung verwendet.

Im Folgenden sind die T-, N- und M- Klassifikation sämtlicher aufgearbeiteter Tumoren gezeigt, hieran schließt sich die G- Klassifikation der jeweiligen Karzinome an. Konnten aufgrund fehlender Daten einzelne Karzinome nicht eindeutig zugeordnet werden, erfolgte die Einteilung in die nicht spezifizierte Kategorie T<sub>x</sub>, N<sub>x</sub>, M<sub>x</sub> oder G<sub>x</sub>. Die Daten basieren auf der histopathologischen Klassifikation der Gewebe durch das Institut für Allgemeine Pathologie der Universität Tübingen und wurden analog den übrigen Daten den Patientenakten entnommen.

#### III.1.2.6.1 Stadieneinteilung der Karzinome der Niere

##### *III.1.2.6.1.1 T- Klassifikation der Karzinome der Niere*



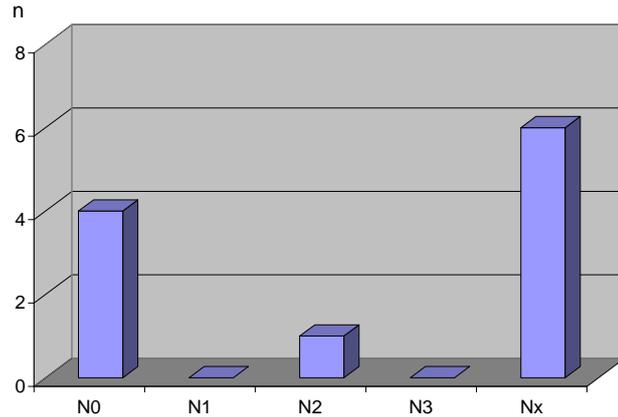
**Abb. 55** zeigt die Einteilung der Nierenkarzinome anhand der Tumorgröße (T- Klassifikation, vgl. I.8.1.8). Die Abszisse stellt die 4 Kategorien T1-T4 sowie die Kategorie Tx dar. Dieser Kategorie wurden Tumoren unbekannter T- Klassifikation zugeordnet. Die Ordinate bildet die absolute Anzahl der untersuchten Tumoren ab [n]

##### *III.1.2.6.1.2 N- Klassifikation der Karzinome der Niere*

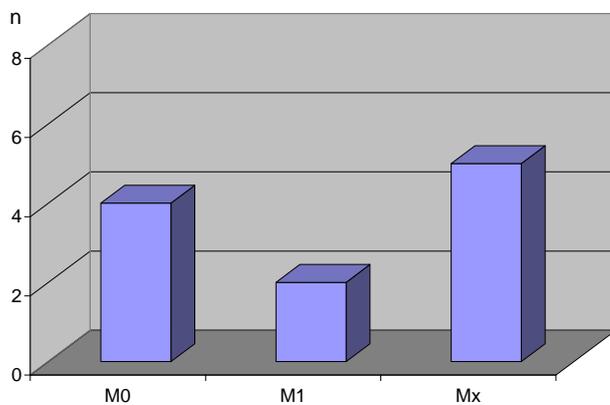
Neben einer größeren Anzahl unbekannter Lymphknotenstadien ist nur ein Tumor mit fortgeschrittener Lymphknotenmetastasierung (N2) untersucht worden. Davon abgesehen wurden keine Lymphknotenmetastasierungen in den hier untersuchten Tumoren beobachtet (Stadium N0).

<sup>205</sup> Sobin L.H., Wittekind C. 2002

**Abb. 56** zeigt die N- Klassifikation der Nierenzellkarzinome (vgl. I.8.1.8)  
 Die Abszisse stellt die einzelnen Stadien dar ( $N_x$  bei unbekanntem Lymphknotenbefall).  
 Die Ordinate zeigt die absolute Anzahl der Karzinome mit Lymphknotenmetastasen [n]



### III.1.2.6.1.3 M- Klassifikation der Karzinome der Niere

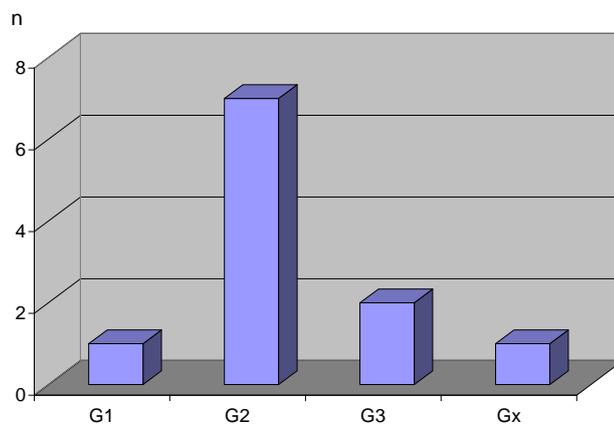


**Abb. 57** zeigt die M- Klassifikation der Nierenzellkarzinome  
 Die Abszisse stellt die einzelnen Stadien dar ( $M_x$  bei unbekanntem Fernmetastasierungsstatus).  
 Die Ordinate zeigt die absolute Anzahl fernmetastasierter Tumoren [n]

### III.1.2.6.1.4 G- Klassifikation der Karzinome der Niere

Während nur ein Tumor nicht zugeordnet werden konnte ( $G_x$ ) und ein zweiter histologisch als gut differenziert beschrieben wurde, konnte bei sämtlichen anderen Karzinomen eine mäßiggradige bis vollständige Entdifferenzierung (G2 bzw. G3) festgestellt werden.

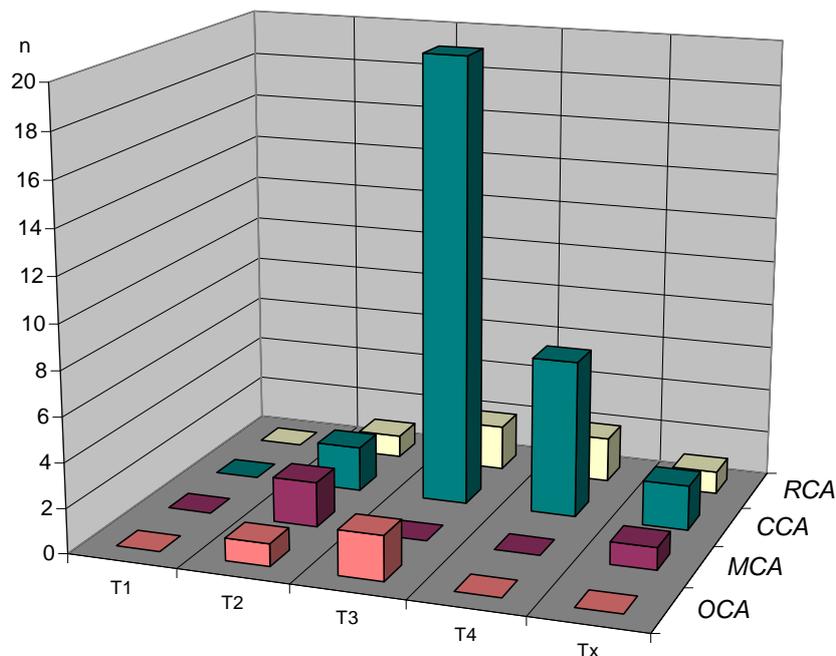
**Abb. 58** zeigt Kategorisierung der Nierenzellkarzinome im Hinblick auf die Tumorzellendifferenzierung  
 Die Abszisse stellt die einzelnen Grading-Kategorien dar ( $G_x$  bei Karzinomen mit unbekannter Gewebsdifferenzierung).  
 Die Ordinate zeigt die absolute Anzahl an Tumoren in der jeweiligen Kategorie [n]



### III.1.2.6.2 Stadieneinteilung der Karzinome des Verdauungstraktes

Da sich weder in der allgemeine Analytik der Karzinomgewebe noch im Speziellen bei der Ligandenidentifikation relevante Diskrepanzen im Bezug auf die unterschiedlichen Primärlokalisationen definieren ließen, wurden die Karzinome von Ösophagus, Magen, Kolon und Rektum wie bereits angedeutet im Folgenden stets unter der Kategorie Karzinome des Verdauungstraktes zusammengefasst. Nach einer teilkumulierten Darstellung in Abb. 47, 48, 50 und 53 wurden die Tumoren hier letztmalig in die Einzelentitäten aufgesplittet und den jeweiligen Stadien zugeordnet. Staging und Grading erfolgte nach den gültigen TNM- bzw. G- Stadieneinteilungen analog I.9.9.

#### *III.1.2.6.2.1 T- Klassifikation der Karzinome des Verdauungstraktes*



**Abb. 59** zeigt die Einteilung der Einzelentitäten der Karzinome des Verdauungstraktes anhand der Tumorgroße (T- Klassifikation)

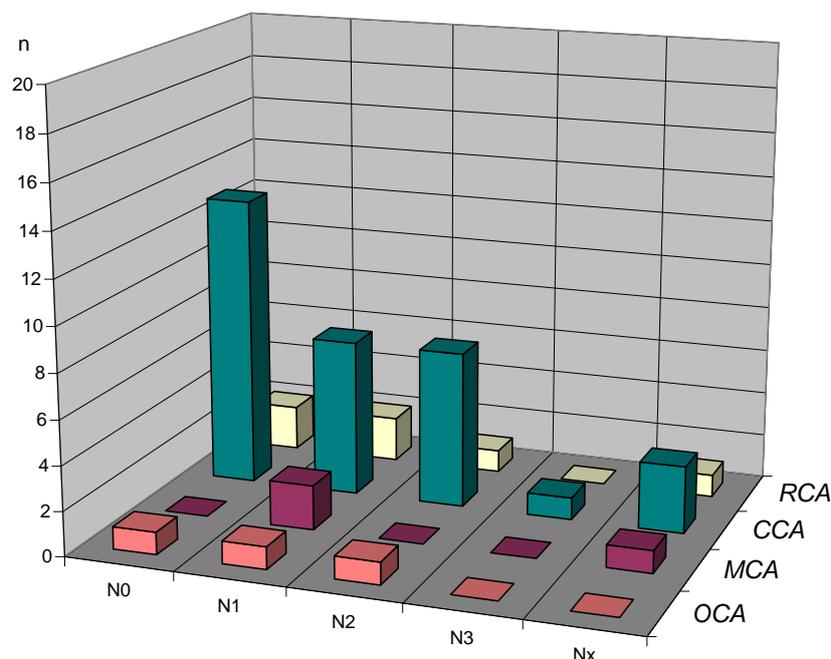
Analog Abb.55 stellt die Abszisse die T- Stadien, die Ordinate die absolute Tumoranzahl dar [n]. Der Kategorie Tx sind Tumoren mit unbekanntem T-Stadium zugeordnet. Die Z- Achse bildet die verschiedenen Tumorentitäten in üblicher Abkürzung ab mit OCA für Ösophaguskarzinom, MCA für Magenkarzinom, CCA für Kolonkarzinom und RCA für Rektumkarzinom

Während Rektumkarzinome beinahe jeden Stadiums untersucht worden waren, war bei allen Tumorentitäten eine überdurchschnittlich große Anzahl an T3- Tumoren augenfällig. Hierfür könnten einerseits vorbestehende Selektionseffekte ursächlich sein, andererseits führt bereits die Operabilität der Erkrankung zu

einer Imbalance der Tumorstadien im Resektionsgut. Da die Tumoranalytik erst ab einer bestimmten Materialmasse sinnvoll ist (vgl. IV.), ergab sich die Präferenzierung größerer Tumoren. Hinzu kam, dass aus den Untersuchungsverfahren der Pathologie zur Stratifizierung und Graduierung der Karzinome eine nicht unerhebliche Reduktion der Gesamttumormasse resultierte, so dass von kleinen Tumoren meistens kein nennenswertes Restgewebe zur weiteren Verarbeitung verblieb. Hierdurch erscheinen Tumoren in frühen Tumorstadien in unserem Kollektiv unterrepräsentiert. Zwar existieren bei intestinalen Tumoren im Unterschied zu anderen Entitäten keine direkten Größenkorrelationen hinsichtlich einzelner Tumorstadien, trotzdem war bei einem frühen Tumorstadium mit z.B. Infiltration bis zur Submukosa (T1) kein ausgedehntes Wachstum und damit keine ausreichende Gewebsmenge zur Ligandenidentifikation zu erwarten.

#### III.1.2.6.2.2 N- Klassifikation der Karzinome des Verdauungstraktes

Analog der Nierenzellkarzinome sind etliche Tumoren ohne bekannte Lymphknotenmetastasen untersucht worden. Daneben zeigten einige Tumoren eine fortgeschrittene Lymphknotenmetastasierung, immerhin wurde ein N3- Kolon-

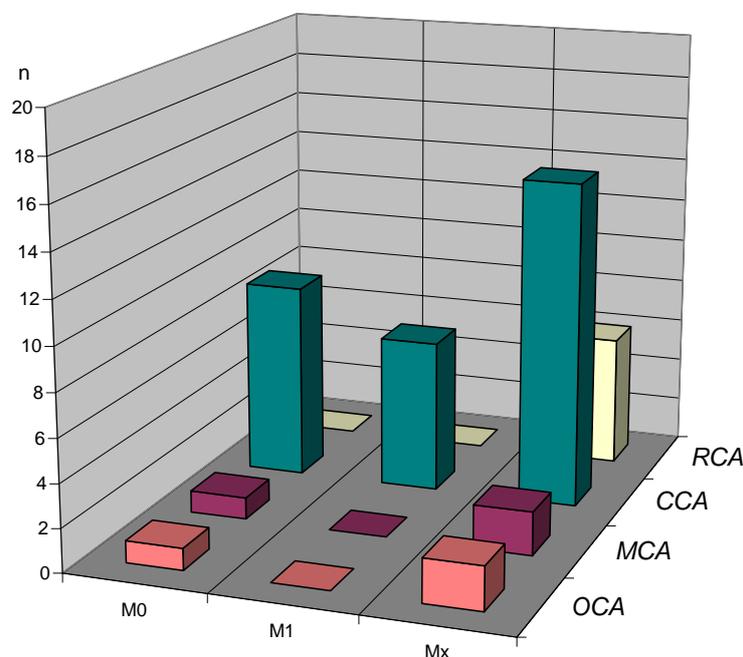


**Abb. 60** zeigt die Einteilung der Einzelentitäten der Karzinome des Verdauungstraktes anhand der Lymphknotenmetastasierung (N- Klassifikation). Die Bezeichnung der Koordinatenachsen, Abkürzungen sowie Farbzuordnungen entsprechen Abb. 59. Der Kategorie Nx sind Tumoren mit unbekannter Lymphknotenmetastasierung zugeordnet

karzinom bearbeitet. Während die T- Klassifikation durch erhebliche Selektionsartefakte beeinflusst wurde, kann für das N- Stadium dieser fortgeschrittenen Karzinome von einer repräsentativen Verteilung ausgegangen werden.

#### III.1.2.6.2.3 M- Klassifikation der Karzinome des Verdauungstraktes

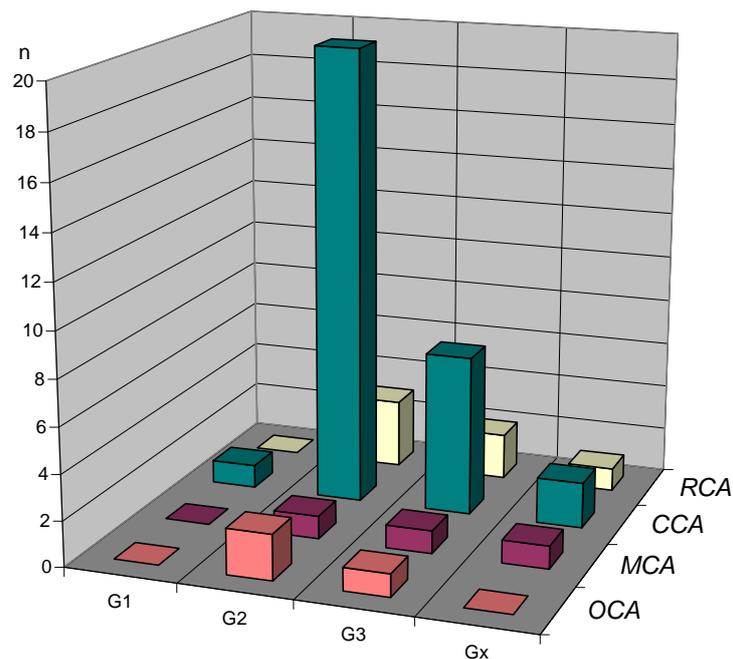
Leider lagen bei sämtlichen Rektumkarzinomen (RCA) keine Daten zur Fernmetastasierung vor. Bei Ösophagus- und Magenkarzinomen (OCA, MCA) war bei je nur einem Tumor eine Fernmetastasierung auszuschließen. Trotz ebenfalls hoher Informationsdefizite bei den Kolonkarzinomen war zumindest bei 9 bzw. 7 Tumoren eine Fernmetastasierung auszuschließen bzw. nachzuweisen.



**Abb. 61** zeigt die Einteilung der Einzelentitäten der Karzinome des Verdauungstraktes anhand der Fernmetastasierung (M- Klassifikation). Die Bezeichnung der Koordinatenachsen, Abkürzungen sowie Farbzuordnungen entsprechen Abb. 59. Der Kategorie Mx sind Tumoren mit unbekannter Fernmetastasierung zugeordnet

#### III.1.2.6.2.4 G- Klassifikation der Karzinome des Verdauungstraktes

Auf der Basis eines nahezu komplett zur Verfügung stehenden Gradings erschreckte die große Anzahl mittel- bis hochgradig entdifferenzierter Tumoren in ausnahmslos allen Lokalisationen. Leider entsprach dies den in Abb.58 dargestellten Daten für die Nierenzellkarzinome, auch diese waren zum Großteil entdifferenziert.



**Abb. 62** zeigt die Einteilung der Einzelentitäten der Karzinome des Verdauungstraktes anhand der Tumorzellendifferenzierung (Grading bzw. G- Klassifikation). Die Bezeichnung der Koordinatenachsen, Abkürzungen sowie Farbzusordnungen entsprechen Abb. 59. Der Kategorie Gx sind Tumoren mit unbekannter Zelldifferenzierung zugeordnet.

## III.2. Vorversuche

### III.2.1 Rationale der Vorversuche

Da die Aufarbeitung der Tumorgewebe von der Gewebeentnahme bis zur finalen Ligandenidentifikation einen komplexen Vorgang darstellt (vgl. II.1, Abb. 27), war neben der exakten Durchführung jedes einzelnen Analyseschrittes der Einsatz perfekter Materialien eine unabdingbare Voraussetzung. Aus diesem Grund wurde unmittelbar vor dem definitiven Einsatz der jeweiligen Substanzen und Geräte deren einwandfreie Qualität nicht nur stichprobenhaft, sondern durchgängig überprüft, um hierdurch bedingte Limitierungen des Gesamtergebnisses weitestgehend auszuschließen. Zusätzlich wurden Zwischenanalysen evaluiert, um mögliche Qualitätsmängel bereits während des Aufarbeitungsprozesses zu detektieren und dadurch unnötige Folgeuntersuchungen zu minimieren. Dies trug zudem zur Kostensenkung der Analytik bei (vgl. Kap. IV). Ziel der Vorver-

suche war damit, einerseits die optimale Qualität der eingesetzten Materialien zu belegen, andererseits mittels Zwischenanalysen eine Erfolg versprechende Tumoraufarbeitung nachzuweisen und damit die Grundlage für konsekutive Untersuchungen zu legen. Da die Darstellung aller Ergebnisse den Rahmen sprengen würde, werden exemplarisch einzelne Beispiele herausgegriffen.

### **III.2.2 Herstellung und Bindungssessay des Antikörpers BB7.2**

Die zur Immunpräzipitation benötigten Menge der mAK BB7.2 und W6/32 (ca. 5 mg pro Präzipitation, vgl. Kap. IV.) überstieg bei der Vielzahl der zu analysierenden Gewebe die Möglichkeit, diese kommerziell als „fertige“ AK zu beziehen. Deshalb wurden die AK selbst hergestellt. Dies bedingte jedoch eine Quantitäts- und Qualitätsbestimmung gemäß den in Kap II. dargestellten Verfahren vor dem definitiven Einsatz zur Immunpräzipitation.

#### **III.2.2.1 Antikörperherstellung und Konzentrationsbestimmung**

Nach Kultivierung der Hybridomzellen (vgl. II.4.2) erfolgte die Aufreinigung der sezernierten AK aus dem Hybridomüberstand durch Bindung an Protein A- Sepharose mit anschließender Säureextraktion (vgl. II.5.1). Es zeigte sich, dass bei Einsatz von ca. 4 Liter Überstand nach 2 Extraktionen insgesamt 2 - 4 mg AK vom Typ BB7.2, in je 12 ml Pufferlösung gelöst, eluiert werden konnten. Bei einer Anzahl von 7 bzw. 5 HLA- A\*02<sup>+</sup> Karzinomen von Niere bzw. Verdauungstrakt ergab sich eine benötigte Mindestmenge von mindestens 60mg AK, so

Chargen Nr.	Volumen [ml]	Extinktion	Konzentration [mg/ml]	Stoffmenge [mg]
1	3,5	0,971	0,68	2,38
2	12,0	0,257	0,18	2,16
3	13,0	0,300	0,21	2,73
4	12,0	0,386	0,27	3,24
5	12,5	0,357	0,25	3,13
6	12,5	0,400	0,28	3,50
7	12,5	0,314	0,22	2,75
8	12,5	0,386	0,27	3,38
9	13,0	0,371	0,26	3,38

dass mit einem Ertrag von 3 mg AK pro vier Liter eine Gesamtmenge von 80 Liter Hybridomlösung produziert werden musste.

**Tab. 7:** Exemplarische Auswahl einiger produzierter Chargen des AK BB7.2. Über die Extinktion ist die Konzentration und die Stoffmenge der Lösung bestimmt worden (vgl. II.5.1.6) Aufgrund der geringen Konzentrationen mussten die Chargen im Anschluss aufkonzentriert werden (vgl. II.5.2)

### III.2.2.2 Sequenzbestimmung des Antikörpers BB7.2

Ergänzend zur rein quantitativen und zudem störanfälligen Konzentrationsbestimmung mittels Spektralphotometrie erfolgte in regelmäßigen Abständen die Sequenzierung der aufgereinigten AK mittels Edman- Abbau (vgl. II.7.5). Neben der Konzentrationsbestimmung war hierdurch eine direkte Proteinsequenzkontrolle der AK möglich. Sowohl für BB7.2 als auch für W6/32 musste die N-terminale Aminosäuresequenz der  $\kappa$ -Kette mit NIVMTQSP sowie der  $\gamma$ -Kette mit EVQLVETY eindeutig zu identifizieren sein (die Nomenklatur der AS in Einzelbuchstabenschreibweise ist dem Anhang zu entnehmen). Zur Illustration sei auf die Ergebnisse der Eluatproben vor Zentrifiltration – wie z.B. in Tab.15, 16, 25, 26 – verwiesen. Ließ sich diese Sequenz nicht eindeutig verifizieren wurde die Analyse auf einem Alternativgerät wiederholt, andernfalls die Probe eliminiert.

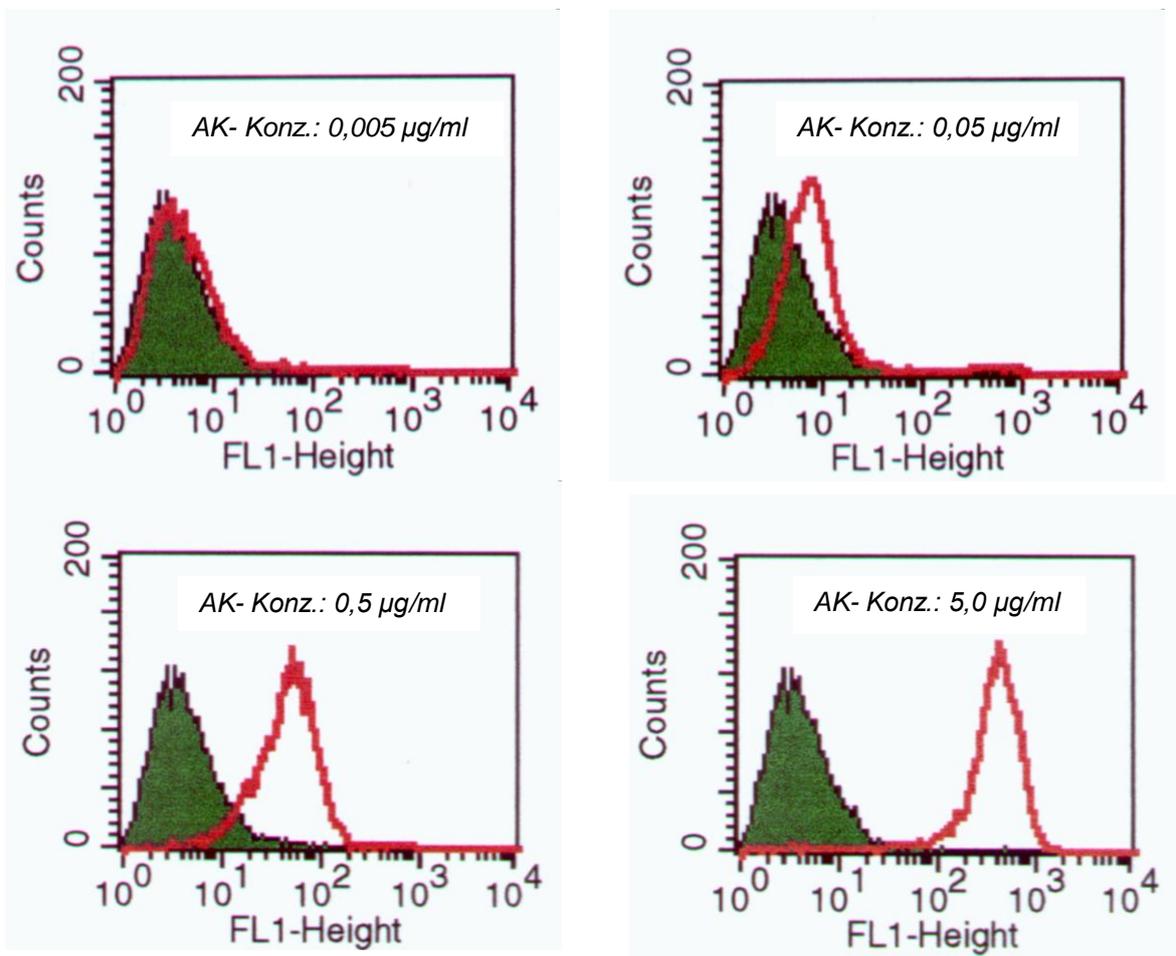
In sämtlichen initial durchgeführten Sequenzierungen konnte obiger Aufbau nachgewiesen werden, so dass der Erfolg der vorangegangenen Immunpräzipitation in allen Fällen bestätigt wurden und deshalb im weiteren Verlauf eine stichprobenartige Analytik ausreichend war. Die bei BB7.2 spektralphotometrisch bestimmten niedrigen AK- Konzentrationen wurden auch mittels Sequenzierung bestätigt. Infolgedessen musste jede Charge mindestens einmal einer Aufkonzentrierung zugeführt werden (vgl. II.5.2).

### III.2.2.3 FACS- Analyse des Antikörpers BB7.2

Zur Bestätigung der spezifischen Bindung wurden sämtliche AK Chargen einer FACS- Analyse gemäß II.5.3 unterzogen. Die nachfolgenden Diagramme illustrieren am Beispiel einer Charge die regelmäßig anzutreffenden Ergebnisse dieser Untersuchung (vgl. II.7.2).

Als flächig grün gefärbte Kurve zeigt sich das unspezifische Hintergrundsignal, das durch Signale der Zielzellen noch vor Zugabe des spezifische AK BB7.2 hervorgerufen wurde. Hierzu wurden zur Affinitätsbestimmung der AK, sowohl vom Typ BB7.2 als auch vom Typ W6/32, Zellen der Zelllinie JY mit membranständiger Expression des HLA-A\*02 Antigen verwendet (vgl. II.4.1, Tab. 5).

Die rote Kurve kennzeichnet die spezifischen Signale der AK BB7.2 über das Fluoreszenzsignal (FL-1) des an BB7.2 gebundenen Zweit- AK. Deutlich ist der Shift der roten Kurve in den Abbildungen von links oben nach rechts unten zu erkennen. Bei gleichem Hintergrundsignal durch eine identische Zellzahl ist dieser Shift als zunehmendes FL-1-Signal infolge vermehrter Bindung des Zweit-AK - von welchem das FL-1-Signal ausgeht - auf den Erst-AK BB7.2 zurückzuführen. BB7.2 seinerseits ist somit in einer zunehmenden Zahl an die Zellen gebunden, bedingt durch die unterschiedlichen Konzentrationen der eingesetzten AK-Lösungen (Verdünnungsstufen von 5 µg/ml bis zu 0,005 µg/ml). Die uniforme rote Kurve der Antikörperaffinität spiegelt die Homogenität und damit die gute Qualität der eingesetzten Antikörper wieder.



**Abb. 63:** Verdünnungsreihe des Antikörpers BB7.2 in steigender AK-Konzentration

Ordinate: Absolute Anzahl an JY-Zellen gebundener Erst-AK, linearer Maßstab (counts)

Abszisse: Signal der gebundenen Zweit-AK, logarithmischer Maßstab (FL1-Height)

Grüne Kurve: Referenzkurve der JY-Zellen ohne Zugabe von Erst- und Zweit-AK

Rote Kurve: Fluoreszenzmarkierter Zweit-AK, an den spezifischen Erst-AK BB7.2 gebunden

### III.2.3 Herstellung und Bindungssessay des Antikörpers W6/32

#### III.2.3.1 Antikörperherstellung und Konzentrationsbestimmung

Mit Unterstützung der chemisch-technischen Assistentin Claudia Falkenburger erfolgten Kultivierung der Hybridomzellen, Aufreinigung und Säureextraktion der produzierten AK sowie die Konzentrationsbestimmung der einzelnen AK-Chargen analog dem Vorgehen bei AK BB7.2 (vgl. III.2.2). Erfreulicherweise war die erzielte AK-Menge aus dem Überstand der W6/32 Hybridomzellen deutlich größer als beim AK BB7.2, so dass eine durchschnittliche AK-Konzentration von 1,2 - 2,0 mg/ml (AK BB7.2: 0,15 - 0,4 mg/ml) gewonnen werden konnte. Da-

Chargen Nr.	Volumen [ml]	Extinktion	Konzentration [mg/ml]	Stoffmenge [mg]
1	9,0	2,380	1,76	15,84
2	11,0	2,280	1,69	18,59
3	11,0	1,829	1,35	14,85
4	9,5	2,380	1,76	16,72
5	11,5	1,670	1,24	14,26
6	9,0	2,640	1,96	17,64
7	7,0	2,100	1,56	10,92
8	10,0	2,110	1,56	15,60

durch konnte bei W6/32 zumeist auf eine anschließende Konzentrierung verzichtet werden.

**Tab. 8:** Exemplarische Auswahl einiger produzierter Chargen des AK W6/32. Über die Extinktion ist die Konzentration und Stoffmenge der Lösung bestimmt worden (vgl. II.5.1.6). Eine Konzentrierung war aufgrund der hohen Primärkonzentration (vgl. Tab. 7) nur in Einzelfällen notwendig (hier nicht gezeigt).

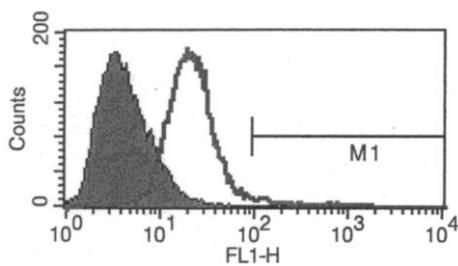
#### III.2.3.2 Sequenzbestimmung des Antikörpers W6/32

Nachdem die anfänglich konsequent durchgeführte Sequenzierung jeder einzelnen AK-Charge reproduzierbare Ergebnisse lieferte und systematische Fehlerquellen ausgeschlossen werden konnten, war im Verlauf analog dem Vorgehen bei BB7.2 eine stichprobenartige Testung einzelner Chargen ausreichend (vgl. III.2.2.2). Auf eine separate Darstellung dieser Ergebnisse wurde aus Relevanz- und Platzgründen verzichtet. Äquivalente Daten wichtigeren Inhaltes werden im Rahmen der Tumorpräzipitation demonstriert werden (vgl. Tab.15, 16, 25, 26).

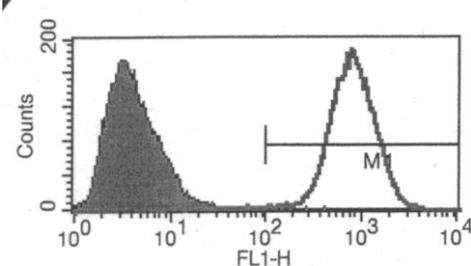
#### III.2.3.3 FACS- Analyse des Antikörpers W6/32

Zur Kontrolle der spezifischen Bindung des mAK W6/32 wurde auch hier auf die FACS-Analyse zurückgegriffen (vgl. II.5.3). Analog AK BB7.2 (vgl. III.2.2.3) werden die Ergebnisse einer exemplarischen Bindungstestung präsentiert, um

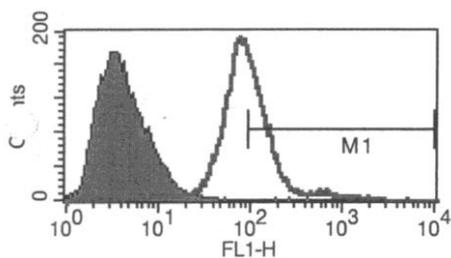
die spezifische Bindung des HLA -A, -B und -C bindenden AK zu demonstrieren. Schön zeigte sich die konzentrationsabhängige Signalsteigerung aufgrund der vermehrten Bindung des AK an die Zielstrukturen (MHC- Komplexe).



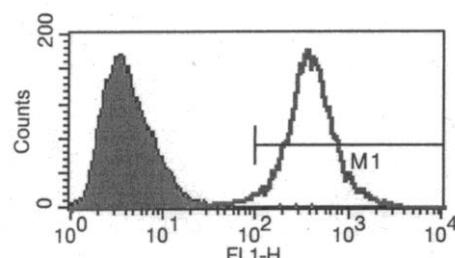
AK- Konz.: 0,01 µg/ml



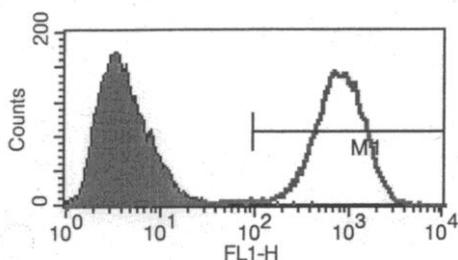
AK- Konz.: 100 µg/ml



AK- Konz.: 0,1 µg/ml



AK- Konz.: 1,0 µg/ml



AK- Konz.: 10,0 µg/ml

Zusätzlich ist der Balken (M1) zur quantitativen Auswertung des FL1-H- Wertes (Medianwertberechnung) eingezeichnet

**Abb. 64:** Verdünnungsreihe des AK W6/32 in steigender Konzentration (AK- Konz). Im Vergleich zu AK BB7.2 (Abb.63) sind die unterschiedliche eingesetzten Konzentrationen zu beachten.

Ordinate: Absolute Anzahl der zellulär gebundenen Erst- AK in linearem Maßstab (Counts)

Abszisse: Fluoreszenzsignal der gebundenen Zweit- AK in logarithmischem Maßstab (FL1-H)

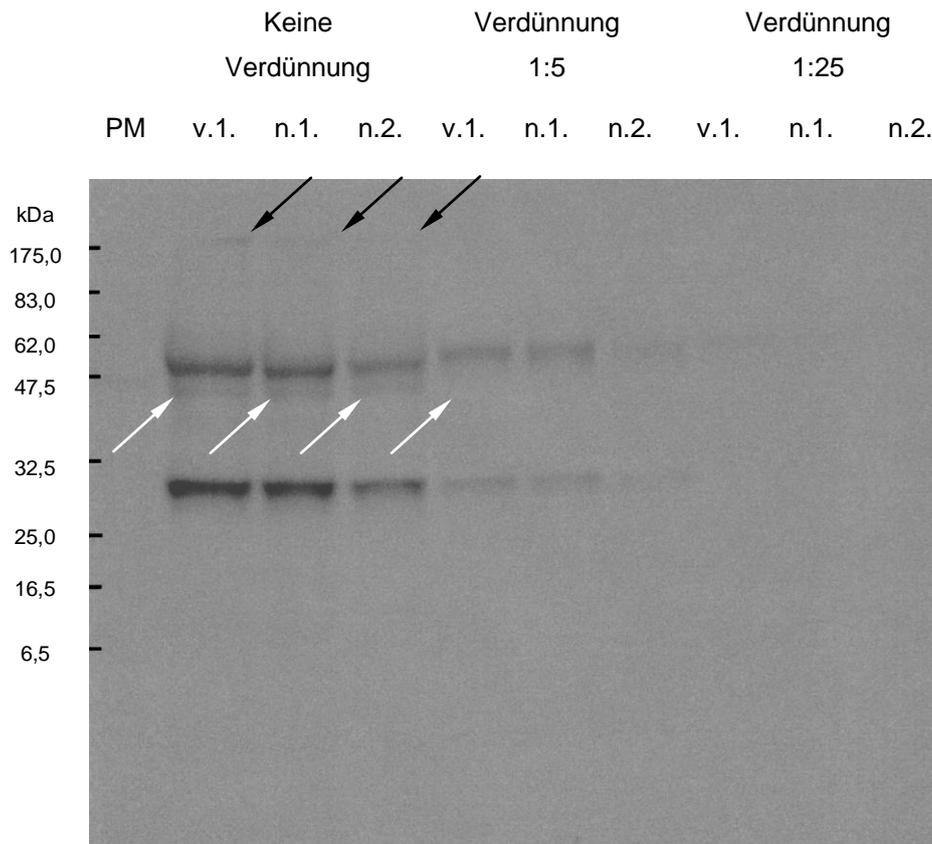
Graugefärbte Fläche: Referenzkurve ohne Zugabe von Erst- und Zweit- AK

Graue Kurve: Signal der fluoreszenzmarkierten Zweit- AK mit Bindung an die spezifisch gebundenen Erst- AK W6/32

### III.2.4 MHC- Expressionsanalyse mittels Western Blot

Um nach einer Immunpräzipitation den Erfolg der MHC- Extraktion abschätzen und die weitere Analytik des asservierten Eluates steuern zu können, musste die extrahierten MHC-Menge quantifiziert. Als primär eingesetzte Methodik wurde auf den Western Blot zurückgegriffen (vgl. II.6.2).

Da jedoch mit der MHC-Expressionsanalyse durch Edman-Abbau (vgl. III.2.5) eine ökonomische, zeitsparende und sehr exakte Methode zur Verfügung stand, wurde der Western-Blot anfänglich nur bei einzelnen Tumoren durchgeführt und im Folgenden präferentiell mit dem Edman- Abbau gearbeitet. Nichts desto trotz zeigt dieses Kapitel exemplarisch die möglichen Ergebnisse und ihre Einordnung in den Tumoraufarbeitungsprozess (vgl. Abb. 27).



**Abb. 65** zeigt den Western Blot nach SDS PAGE des Nierenzellkarzinoms NZK 35. Exemplarisch ist die MHC- Quantifizierung des Tumorlysates zu verschiedenen Zeitpunkten der Immunpräzipitation dargestellt

Je eine Lysatprobe vor der Immunpräzipitation (v.1.), nach der ersten Präzipitation (n.1.) und nach der zweiten Präzipitation (n.2.) wurden hierzu in ursprünglicher Konzentration (hier: 33 g Gewebe/ 175 ml Lysatvolumen) sowie fünf- (1:5) und fünfundzwanzigfacher Verdünnung (1:25) als Proteinprobe aufgetragen. In der ersten Spalte wurde ein genormter Proteinmarker (PM), bestehend aus einem bekannten Proteingemisch, zur Skalierung ergänzt. Dieser lieferte Korrelationsbanden mit bekannten Proteinmassen zwischen 175 und 6,5 kDa (hier durch schwarze Striche markiert) zur Zuordnung der Massen der verschiedenen Proteinmoleküle im Tumorlysate.

Die Ordinate zeigt in nicht linearer, aufsteigender Skala die Molekülmasse in kDa. Die Abszisse ist in die oben dargestellten Spalten aufgeteilt.

Die drei  bei 180 kDa weisen auf die nur schwach zu erkennenden Banden der  $\alpha$ - Kette des MHC- Komplexes (vgl. I.2.2) hin, während die  auf die Banden des nicht-kovalent an den MHC I- Komplex gebundenen  $\beta$ 2- Mikroglobulins bei ungefähr 40 kDa aufmerksam machen. Zusätzlich zeigen sich die Banden bei 50 bzw. 30 kDa als schwere bzw. leichte AK- Kette (vgl. I.1.3.2.1.1).

Abb. 65 zeigt die Ergebnisse des Western Blots bei Tumor NZK 35 (vgl. III.3). Veranschaulicht wird die Abnahme der im Tumorlysat enthaltenen MHC- Menge durch die Immunpräzipitation. In zehn Spalten wurden von links beginnend ein Proteinmarker, das komplett aufgearbeitete Lysat des Karzinoms NZK 35 vor und nach der ersten sowie zweiten Präzipitation in der Ausgangskonzentration, in fünf- und fünfundzwanzigfacher Verdünnung aufgetragen. Aufgrund der grossen Gewebsmenge von 33 Gramm wurde eine zweimalige statt der üblichen singulären Präzipitation des Lysates durchgeführt.

In unverdünntem Zustand, aber auch in der Verdünnung 1:5 waren je zwei Banden deutlich abzugrenzen. Anhand der hier nicht mehr sichtbaren Bande des Proteinmarkers (in der ersten Spalte) konnten diese Banden den Proteinmassen von ca. 50 bzw. 30 kDa zugeordnet werden. Diese entsprechen der schweren bzw. leichten Kette des mAK, hier W6/32. Daneben zeigten sich zwei weitere, schwach abzugrenzende Banden, die durch Scan-, Druck- und Konvertiervorgänge in der hier gedruckten Darstellung nur noch äusserst schwach auszumachen sind. Mit schwarzen Pfeilen markiert zeigte sich eine Bandenfront bei 180 kDa, eine weitere Bande bei ungefähr 45 kDa. Diese wurde mit weißen Pfeilen gekennzeichnet. Hierbei handelte es sich um die  $\alpha$ - Kette des MHC I-Komplexes sowie das  $\beta$ 2- Mikroglobulin.

#### **III.2.4.1 Semiquantitative Analyse der Western- Blot- Ergebnisse**

Nach Identifikation und Zuordnung der einzelnen Banden erlaubte der Western Blot, die Intensität der einzelnen Banden zu beurteilen, um hieraus Rückschlüsse auf die entsprechenden Molekülmengen zu ziehen. Es zeigte sich eine Intensitätsreduktion sämtlicher Banden nach der 1. und 2. Präzipitation im Vergleich zum Zustand vor der Präzipitation. Im Kontext des Versuchsablaufes korrelierte dies mit der intendierten Extraktion der MHC/AK- Komplexe über die AK- Bindung an der Protein A- Sepharose- Säule mit konsekutiver Abnahme der MHC- sowie AK- Menge im Tumorlysat.

### **III.2.4.2 Grauwertanalyse der Western- Blot Ergebnisse**

Über eine grobe, semiquantitative und rein deskriptive Darstellung abnehmender AK- bzw. MHC- Konzentrationen des Tumorlysat hinaus können heutzutage durch den Einsatz moderner Foto- Imaging- Stationen anstatt herkömmlicher lichtsensitiver Filme präzisere Quantitätsbestimmungen in Bezug auf die untersuchten Proteine getroffen werden. Anhand der Menge des eingesetzten Tumorgewebes, dem Lysatvolumen sowie der eingesetzten AK-Menge kann eine Beziehung zu den im Western Blot digital erfassten Grauwerten erstellt werden. Unter eine Korrelation der mittels Edman- Abbau bestimmten MHC- Mengen mit den Grauwerten Proteinbanden im Western Blot lässt sich die Ausgangsmenge der im Tumorlysat enthaltenen MHC- Komplexe definieren. Die Differenz zur MHC- Menge nach der Präzipitation liefert eine quantitative Aussage über die extrahierten MHC- Komplexe.

Dieses Verfahren wurde nur bei wenigen Tumoren angewendet, so dass hier aus Platzgründen auf eine weitere Darstellung verzichtet wird. Der zurückhaltende Einsatz der Methodik war zuletzt vor allem aufgrund eines hohen materiellen, finanziellen und zeitlichen Aufwandes bedingt, zumal die Aufarbeitung des Tumors im Stadium dieser Untersuchung (vgl. Abb. 27) bereits deutlich fortgeschritten war und als Auswahlkriterium im Hinblick auf die weitere Analytik nur eingeschränkt gelten konnte.

### **III.2.5 MHC- Expressionsanalyse mittels**

#### **Sequenzanalyse durch Edman- Abbau**

Neben der MHC- Expressions- bzw. Extraktionsanalyse mittels Western Blot wurde im Anschluss an die Säureextraktion jeweils eine Lösungsprobe zur getrennten MHC- Expressionsbestimmung entnommen. Diese erfolgte über die Sequenzierung mittels Edman- Abbau (vgl. III.2.4). Da wiederum aus Platzgründen sowie im Hinblick auf die Relevanz der Ergebnisse nicht sämtliche Sequenzanalysen einzeln dargestellt werden können, wurden speziell die Ergebnisse der Tumoren ausgewählt, aus denen Peptide bestimmt werden konnten. Diese Daten werden im Kontext der einzelnen Tumoren [vgl. III.4.4.3.3 (Tab.

15, 16), III.4.4.3.5 (Tab. 19, 20), III.5.2.2.3 (Tab. 25, 26), III.5.2.2.5 (Tab. 32)] zusammen mit den übrigen tumorspezifischen Daten dargestellt anstatt kumulativ unter diesem Kapitel der Vorversuche.

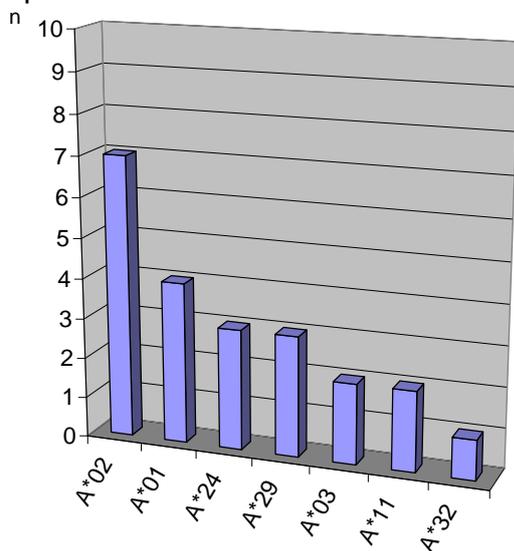
### III.2.6 HLA- Verteilung der analysierten Tumoren

Da die Kenntnis des jeweiligen HLA- Motivs als Voraussetzung für die Peptid-identifikation und damit für die peptidbasierte Vakzinierungstherapie anzusehen ist<sup>206</sup>, wurde jeder Tumor auf seine HLA -A\* sowie -B\* Allele untersucht. Lediglich zu Beginn der Analysen fand für einzelne Tumoren keine Allelidentifikation statt. Die nachfolgenden Abbildungen zeigen die Häufigkeitsverteilung der einzelnen Allele sämtlicher untersuchter Tumoren getrennt nach Entität.

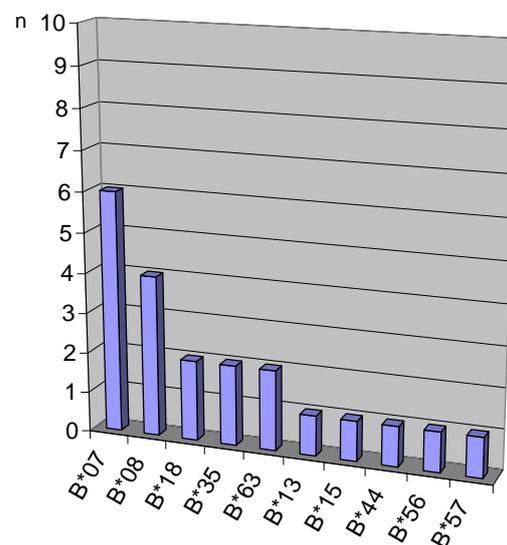
#### III.2.6.1 Häufigkeitsverteilung der HLA- Allele

##### auf den Karzinomen der Niere

Trotz des Polymorphismus der verschiedensten HLA- Allele wurden im kleinen Kollektiv der zwölf Nierenzellkarzinome die unter der kaukasischen Bevölkerung prädominanten Allele A\*02 und B\*07 sehr häufig angetroffen.



**Abb. 66** zeigt die Verteilung des HLA-Allels A\* auf den Karzinomen der Niere, sortiert nach aufgetretener Häufigkeit.  
Abszisse: Bezeichnung des A\* Allels  
Ordinate: Absolute Anzahl des Allels im untersuchten Kollektiv [n]

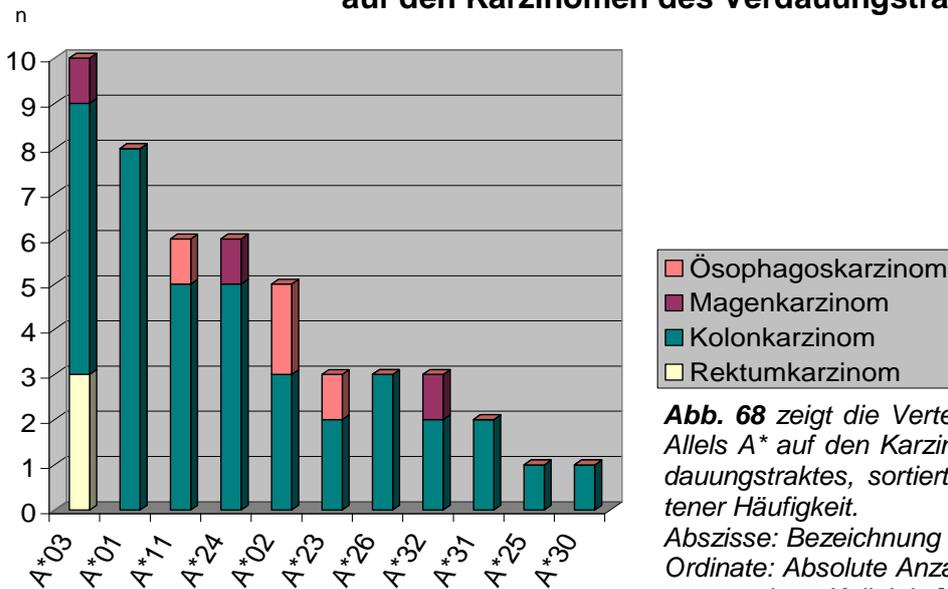


**Abb. 67** zeigt die Verteilung des HLA-Allels B\* auf den Karzinomen der Niere, sortiert nach aufgetretener Häufigkeit.  
Abszisse: Bezeichnung des B\* Allels  
Ordinate: Absolute Anzahl des Allels im untersuchten Kollektiv [n]

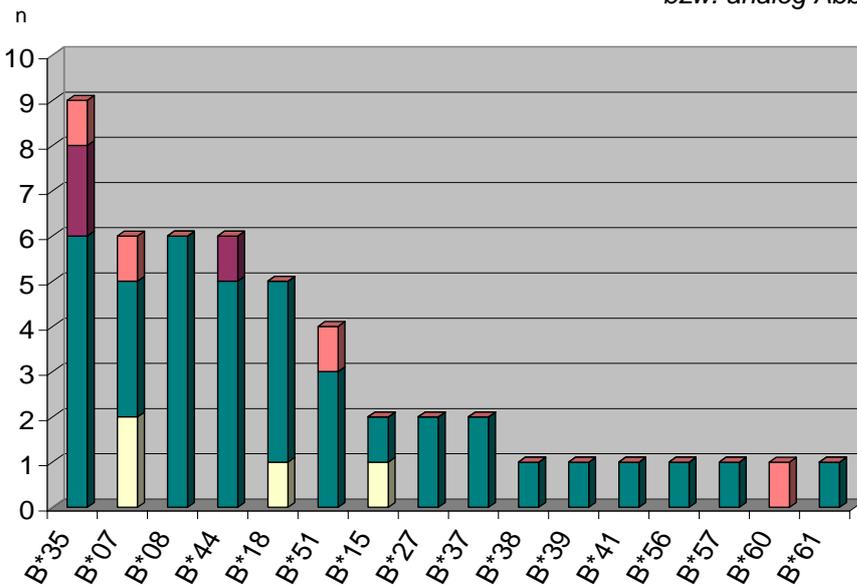
<sup>206</sup> Nagorsen D., Thiel E. 2008

### III.2.6.2 Häufigkeitsverteilung der HLA- Allele

#### auf den Karzinomen des Verdauungstraktes



**Abb. 68** zeigt die Verteilung des HLA-Allels A\* auf den Karzinomen des Verdauungstraktes, sortiert nach aufgetretener Häufigkeit.  
 Abszisse: Bezeichnung des A\* Allels  
 Ordinate: Absolute Anzahl des Allels im untersuchten Kollektiv [n]  
 Übliche Farbgebung gemäß Legende bzw. analog Abb. 47



**Abb. 69** zeigt die Verteilung des HLA-Allels B\* auf den Karzinomen des Verdauungstraktes, sortiert nach aufgetretener Häufigkeit.  
 Abszisse: Bezeichnung des B\* Allels  
 Ordinate: Absolute Anzahl des Allels [n]  
 Übliche Farbgebung gemäß Legende bzw. analog Abb. 47

#### Vorbemerkungen zu den Kapiteln III.3. – III.5

Nachdem im vorhergehenden Kapitel die analysierten Tumoren anhand allgemeiner sowie spezieller Charakteristika in ihrer Gesamtheit näher beleuchtet wurden, wird in den Kapiteln III.3. – III.5 für jede Karzinomentität getrennt auf die Ergebnisse der Peptidanalyse eingegangen (vgl. III.1.1). Jedem Kapitel wurde dazu eine Tabelle vorangestellt, die die analysierten Tumoren jeder Entität einzeln auflistet und neben Tumorausdehnung und -gewicht die HLA- Klassi-

fikation der Karzinome darstellt. Farblich hervorgehoben wurden in diesen Tabellen diejenigen Tumoren, für die bislang Peptidliganden identifiziert wurden. Eine detaillierte Darstellung dieser Tumoren schließt sich der jeweiligen Übersichtstabelle an.

Die Peptidliganden wurden in Form ihrer Peptidsequenz in Einzelbuchstaben-schreibweise sowie ihrer Masse in einer separaten Tabelle aufgelistet. Hieraus läßt sich zudem das Ursprungprotein mit separaten Verweisen auf Proteindatenbanken für jedes einzelne der Peptide entnehmen.

Eine Analyse der einzelnen Peptide unter Berücksichtigung des Ursprungproteins, die Darstellung möglicher Bezüge dieser Proteine zu malignen Erkrankungen und ihre Relevanz im Hinblick auf eine Vakzinierungstherapie schließen sich in Kapitel IV. an.

### **III.3 Identifikation von Peptidliganden** **auf Karzinomen der Niere**

#### **III.3.1 Übersicht**

Alle Nierenzellkarzinome waren mit einem maximalen Tumordurchmesser von mindestens 3,5 cm, zumeist jedoch 5 - 10 cm relativ groß (vgl. Tab. 9, 10, 12, 13), so dass große Tumormassen bis knapp 40 g asserviert werden konnten. Bei einzelnen Tumorpatienten konnte jeweils nur ein Allel für HLA- A\* und/ oder HLA- B\* identifiziert werden. Den Mendel' schen Vererbungsgesetzen zufolge ist von einer Vererbung desselben Allels (A\*02 bei NZK6, B\*07 bei NZK24 und A\*01 bei NZK25) durch die Eltern auszugehen, zumal speziell diese Allele in der kaukasischen Bevölkerung in hoher Frequenz auftreten.

Nr.	Interne Bezeichnung		Tumor- masse [g]	Tumor- grösse [cm]	Tumor- lysat [ml]	HLA- Typisierung der Tumoren			
						HLA-A*		HLA-B*	
1	NZK	5	15,2	4,9	200	1	2	7	8
2	NZK	6	8,2	5,0	80	2	-	18	56
3	NZK	7	17,5	6,4	100	3	29	7	8
4	NZK	17	8	6,5	75	2	11	?	?
5	NZK	23	30	10,0	170	1	2	35	57
6	NZK	24	5,7	3,5	50	2	3	7	-
7	NZK	25	9,5	5,9	75	1	-	7	8
8	NZK	28	14,2	7,0	?	1	29	8	58
9	NZK	29	10	5,0	80	24	29	44	63
10	NZK	30	16,8	9,0	100	2	24	7	15
11	NZK	31	38,2	?	160	2	32	13	35
12	NZK	35	33	8,0	175	11	24	7	18

**Tab. 9** gibt einen Überblick über sämtliche aufgearbeitete Nierenzellkarzinome. Neben einer fortlaufenden Nummerierung sind die interne Nomenklatur, die Tumormasse in g, der maximale Tumorquerdurchmesser am Nephrektomiepräparat in Zentimetern, das verarbeitete Lysatvolumen in Millilitern sowie die Gewebstypisierung des Tumors im Hinblick auf HLA - A\* und -B\* Allele aufgeführt.

Das unbekannte Lysatvolumen von NZK28 bzw. die unbekannte Größe von NZK 31 sind jeweils durch ein ? markiert. Die HLA- Typisierung zeigte bei einzelnen Tumoren eine Homozygotie für HLA- Allele, so dass nur je ein HLA- Allel exprimiert wurde (mit – markiert)

### III.3.2 Aktueller Stand der Peptididentifikation auf Karzinomen der Niere

Alle zwölf Nierenzellkarzinome wurden gemäß dem in Kapitel II beschriebenen Vorgehen inklusive der Auftrennung in der Flüssigkeitschromatographie analysiert (vgl. Abb. 27). Eine abschließende Analyse, d.h. die Ligandenidentifizierung interessanter Einfeldfraktionen am Massenspektrometer, die aufgrund der Komplexität nur von diplomierten Biochemikern durchgeführt werden kann, wurde bislang erst bei drei der zwölf aufbereiteten Tumoren vorgenommen (aktueller Stand und Gründe vgl. Kap IV). Leider ließen sich in diesen drei Tumoren keine spezifischen Peptidliganden identifizieren, so dass solche zum aktuellen Zeitpunkt noch nicht präsentiert werden können. Auch im Hinblick auf die noch folgenden, interessanten Daten anderer Tumoren wurde daher von einer näheren Beschreibung der einzelnen Nierenzellkarzinome Abstand genommen und der Schwerpunkt auf die ausführliche Darstellung derjenigen Tumoren anderer Entitäten gelegt, für die Peptide identifiziert werden konnten.

## **III.4 Identifikation von Peptidliganden auf Karzinomen des Verdauungstraktes**

### **III.4.1 Allgemeine Hinweise**

#### **III.4.1.1 Aktueller Stand der Peptididentifikation auf**

#### **Karzinomen des Verdauungstraktes**

In diesem Kapitel wurden die Ergebnisse der Peptididentifikation der Karzinome des Verdauungstraktes zusammengestellt. Die Bearbeitung bis zur abschließenden Flüssigkeitschromatographie ist identisch mit dem Vorgehen bei den Nierenzellkarzinomen (vgl. Abb. 27). Die finale Peptidanalytik am Massenspektrometer konnte bei einigen Proben ebenfalls noch nicht komplettiert werden. Im Unterschied zur Situation bei den Nierenzellkarzinomen liegen bei den diesen Karzinomen bereits einige wertvolle, im Folgenden dargestellte Ergebnisse vor.

#### **III.4.1.2 Fokussierte Ergebnispräsentation**

Die Karzinome des Verdauungstraktes werden nach Entitäten getrennt präsentiert. Nach einer Übersicht über sämtliche bearbeitete Tumoren jeder Entität - der Tumorliste - wird in jedem Kapitel der Fokus gezielt auf die Tumoren gerichtet, aus denen bislang Peptidliganden identifiziert werden konnten. Dadurch werden die immensen Mengen an generierten Daten gefiltert, hieraus die Essenzen gezogen und das Augenmerk auf die Ergebnisse gerichtet, die als Ziel dieser Dissertation und als möglicher Ansatz neuer Therapien anzusehen sind. (vgl. Kap. IV). Zudem wurden klinische Aspekte der Tumorpatienten in die Präsentation eingeflochten.

#### **III.4.1.3 Erläuterungen zu Tabellen und Abbildungen**

##### **III.4.1.3.1 Tumorlisten**

Diese Tabellen listen entitätenspezifisch alle analysierten Tumoren auf. Neben einer fortlaufende Nummer und der institutsinternen Tumornomenklatur (OCA [Ösophaguskarzinom], MaCa [Magenkarzinom], CCA [Kolonkarzinom], RCA [Rektumkarzinom], MET [Metastase]) wurde die Masse des untersuchten Tu-

morgewebe in Gramm, die initiale maximale Tumorausdehnung am entfernten Organpräparat in Zentimetern sowie das Volumen des resultierenden Tumorly-sates nach Aufarbeitung gezeigt. Abgeschlossen wurde die Darstellung der Tumoren mit der spezifischen HLA- Typisierung der einzelnen Karzinome. Nach Verfügbarkeit wurden die Obergruppen, im Optimalfall ergänzt durch die Subspezifizierungen der HLA- Loci dargestellt. Trotz intensiver retrospektiver Datenakquirierung auch mit Blick auf die Relevanz der HLA- Allele im weiteren Aufarbeitungsprozess, konnten einige Typisierungen nicht erreicht werden und wurden in den Listen deshalb mit ? markiert. Tumoren, für die Peptidliganden identifiziert werden konnten, wurden durch Fettdruck und graue Hinterlegung wie z.B. **CCA 49** hervorgehoben.

#### III.4.1.3.2 Edman- Degradation vor Filtration

Die Proteinsequenzierung mittels Edman- Degradation erfolgte vor sowie nach der Zentrifiltration (vgl. III.4.1.3.4 bzw. Abb. 27). Die Ergebnisse der Sequenzierung werden unabhängig von dem verwendeten Sequenzer stets in Form von Tabellen wiedergegeben, wobei nach Degradation über sieben Zyklen eine entsprechende Anzahl N- terminaler AS aufgelistet ist, so dass die Tabelle stets in 7 Spalten unterteilt ist. Die AS (in Einzelbuchstabenschreibweise beschriftet) sind, nach Polarität sortiert, in einzelnen Zeilen angeordnet.

Aufgeführt sind die Ergebnisse der Edman- Sequenzierung für die Tumoren, bei denen im weiteren Verlauf Liganden identifiziert werden konnten, anhand der Intensitäten der jeweiligen AS im entsprechenden Zyklus. Hohe Werte korrelieren mit häufigem Auftreten der AS, niedrige Werte weisen auf einen seltenen Einbau der AS an der entsprechenden Position in Peptid oder Protein hin.

Da zum Sequenzierungszeitpunkt - vor Filtration - die im Verlauf extrahierten Einzelketten von MHC- Komplex und AK noch enthalten waren, dominierten diese Proteine im Eluat und wiesen damit eine erfolgreiche Immunpräzipitation nach. Zur vereinfachten Übersicht in den Eluattabellen wurde die vier dominierenden Proteinketten wie folgt markiert: Die  **$\alpha$ - Kette des MHC- Komplexes** fett und dunkelgrau, das  **$\beta$ 2- Mikroglobulin** in fetter Kursivschrift hellgrau hinter-

legt, die **schwere Kette des AK** in fetter Schrift dick gestrichelt sowie die *leichte Kette des AK* kursiv und dünn gestrichelt umrandet.

Die N-terminale Sequenz der schweren Kette von W6/32 und BB7.2 ist stets als AS-Sequenz mit der Abfolge **EVQLVER**, die der leichten Kette mit dem Aufbau **DIVMTQS** zu identifizieren (vgl. III.2.2.2 bzw. III.2.3.2).

#### III.4.1.3.3 HLA- Allel- Motive

Zur besseren Einschätzung der Ergebnisse der Edman-Degradation – nach Filtration – wurden vor deren Präsentation die jeweiligen HLA-Motive des Tumorgewebes gemäß den bisherigen Kenntnissen aus der SYFPEITHI<sup>207</sup>-Datenbank (vgl. I.6.2) übernommen. Ähnlich den Ergebnissen der Sequenzanalysen, in Tabellen dargestellt, spiegeln die Spalten die jeweilige AS-Position wieder. **Anker-AS** sind im oberen Tabellenabschnitt fett und unterstrichen auf dunklem Hintergrund dargestellt, **Hilfsanker** fett auf mittelgrauem Hintergrund. Im unteren Teil der jeweiligen Tabelle wurden die bevorzugten AS, unterstrichen und hellgrau hinterlegt, hervorgehoben. Gestrichelte Umrahmungen werden zusätzlich für **HLA-A\***-Allele gewählt, die AS der **HLA-B\***-Allele werden doppelt durchgezogen eingerahmt. Beispielsweise wird der fiktive Wert einer Anker-AS des HLA-A\*-Allel durch **100,00**, ein Hilfsanker des HLA-B\*-Allels durch **50,00** dargestellt.

#### III.4.1.3.4 Edman-Degradation nach Filtration

Auch die Präsentation der Sequenzierungsergebnisse nach Zentrikonfiltration erfolgt tabellarisch. Nach Extraktion von MHC und AK richtet sich das Augenmerk auf die spezifischen AS-Positionen der unmittelbar zuvor präsentierten HLA-Motive (vgl. III.4.1.3.3.). Entsprechend erfolgt die Markierung dieser AS-Positionen nach Filtration als **Anker**, **Hilfsanker** bzw. als bevorzugte AS. Zusätzliche Umrahmungen helfen, zwischen **HLA-A\***- und **HLA-B\***-Allelen zu differenzieren, bei Überschneidungen finden beide Rahmen Anwendung.

<sup>207</sup> [www.syfpeithi.de](http://www.syfpeithi.de)

#### III.4.1.3.5 Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Ergebnisse der flüssigkeitschromatographischen Trennung der Peptidmischungen wurden als zeitliche Verläufe der Extinktion bei 214 nm in Form einer Kurve aufgezeichnet (vgl. II.7.4). Zur Trennung einzelner Peptide wurden einmütige Eluatfraktionen gebildet, in der Abbildung über der Abszisse als senkrechte Trennlinien zu identifizieren. Neben einer zeitlichen Skalierung in Minuten unterhalb, wurde die Abszisse oberhalb mit den geradzahligigen Fraktionsnummern beschriftet. Die Ordinate gibt die Extinktion bei 214 nm wieder.

Die auch in Leerläufen ohne Peptidgemisch auftretenden hohen Ausschläge der Kurve waren bei allen Läufen stets identisch reproduzierbar und als durch Verunreinigungen verursachte Artefakte zu ignorieren (vgl. Abb. 40). Hierbei handelte es sich u.a. um Moleküle, die aus der Wand der Aufbewahrungsgefäße eluiert wurden oder sonstige Störfaktoren, denen keine Bedeutung zuzumessen war. Vielmehr entscheidend für die spätere Peptididentifizierung schienen feine Zacken der Kurve im Bereich zwischen den hohen Ausschlägen zu sein [vgl. III.4.4.2.3 (CCA 49) bzw. III.4.4.3.7 (CCA 60)]. Fraktionen mit identifizierten Peptiden wurden jeweils durch ↘ für ein Peptid, ↘ für zwei Peptide oder ↘ für drei Peptide gesondert gekennzeichnet.

#### III.4.1.3.6 Peptidlisten

Auch die Präsentation der identifizierten Peptidliganden (bei OCA 3, CCA 49, CCA 60, CCA 61, MET 2, MET 3, MET 4) folgt einer standardisierten, tabellarischen Form. In den ersten Spalten wird jedem Peptid die Fraktion der jeweiligen HPLC- Analyse zugeordnet, in der es identifiziert wurde sowie seine Molekülmasse in Dalton. Daran anschließend folgt die Peptidsequenz in Einbuchstaben-schreibweise der AS (vgl. Anhang), wobei entsprechend den bekannten Ligandenmotiven aus der Datenbank SYFPEITHI die **Anker- AS** fett und unterstrichen, **Hilfsanker** fett und bevorzugte AS unterstrichen hervorgehoben werden. Allein die AS Methionin trat in einzelnen identifizierten Peptiden in veränderter, da methylierter Form auf und wird kursiv mit *M* hervorgehoben. Informationen über das Ursprungprotein des jeweiligen Peptids mit Querverweisen auf die SWISS- Prot. Datenbank sowie die Positionierung des Peptids innerhalb

dieses Ursprungsproteins liefern die folgenden Spalten<sup>208</sup>. In der letzten Spalte werden die entsprechenden HLA- Allele aufgelistet, auf denen das Peptid gemäß der Ligandenvorhersage durch SYFPEITHI<sup>209</sup> am ehesten gebunden wurde. Hierbei wurde lediglich auf die Obergruppenbezeichnung der Allele, den Zweizifferncode, zurückgegriffen. Aufgrund Spezifizierung bestehender und Identifikation neuer HLA- Allele, die mitunter differente Bindungsspezifitäten aufweisen, ergab sich teilweise das Problem der initialen HLA- Typisierung der Tumoren, die sich nur auf die Obergruppen beschränkte. In Fällen wie z.B. dem häufig auftretenden HLA- A\*02- Allel, bei dem verfeinerte Peptidmotive existieren und differente Peptidbindungen mit unterschiedlichen Anker, Hilfsanker und bevorzugte AS für einzelne Untergruppen bekannt sind, musste deshalb auf eine Markierung der Bindungsspezifitäten verzichtet werden (vgl. II.3.3).

### III.4.2 Karzinome des Ösophagus

#### III.4.2.1 Übersicht

Nr.	Interne Bezeichnung	Tumormasse [g]	Tumorgröße [cm]	Tumorysate [ml]	HLA- Typisierung der Tumoren			
					HLA-A*	HLA-B*		
1	OCA 3	6,6	7,0 x 5,0	75	?	?	?	?
2	OCA 6	56	4,2	70	2	23(9)	51(5)	60(40)
3	OCA 7	11,6	6,3	90	2	11	7	35

**Tab. 10** zeigt die untersuchten Ösophaguskarzinome. Allgemeine Hinweise zu den einzelnen dargestellten Fakten sowie den verwendeten Markierungen und Formatierungen können Abschnitt III.4.1.3.1 entnommen werden.

Eine HLA- Typisierung für OCA 3 war nicht verfügbar und ist demzufolge mit ? dargestellt

Von dieser Tumorentität wurden insgesamt drei Tumoren der Aufarbeitung zugeführt und diese einschließlich der finalen Ligandenidentifikation komplettiert. Obwohl eine große Gesamttumormasse von knapp 75 g zur Verfügung stand, ließen sich nur von Tumor OCA 3 Liganden extrahieren. Die Darstellung von OCA 3 einerseits sowie Gründe für die erfolglose Aufarbeitung der übrigen Ösophagustumoren andererseits folgen in diesem Kapitel.

<sup>208</sup> [www.expasy.org/sprot](http://www.expasy.org/sprot)

<sup>209</sup> [www.syfpeithi.de](http://www.syfpeithi.de)

### III.4.2.2 Das Karzinom OCA 3

#### III.4.2.2.1 Klinische Aspekte zum Patienten mit dem Karzinom OCA 3

Das Karzinom OCA 3 wurde bei einem Patienten im Alter von 74 Jahren erst-diagnostiziert und als Adenokarzinom am ösophagokardialen Übergang im Stadium pT2 pN1 M0 G3 mit einer Ösophagocardiaresektion und Magenhochzug therapiert, wobei sich in 3 von 13 Lymphknoten Metastasen nachweisen ließen. Im postoperativen Verlauf wurde eine Anastomoseninsuffizienz diagnostiziert und mit Spülung, Drainageeinlage, Übernähung und Stentimplantation behandelt. Das nach 8 Monaten auftretende Lokalrezidiv wurde in palliativer Intention wiederholten endoskopischen laserkoagulierte.

#### III.4.2.2.2 Aufbereitung des Karzinoms OCA 3

Nach der Gewebeentnahme wurde das Karzinom OCA 3 über ein Jahr in gefrorenem Zustand bei -80 °C aufbewahrt, bevor es als 26. Gewebe aufbereitet wurde. Diese Kryokonservierung bei tiefen Temperaturen scheint keinen negativen Einfluss auf die spätere Peptididentifikation zu haben, da auch nach über zwölfmonatiger Lagerung Liganden detektiert werden konnten. Trotz unbekannter HLA-Typisierung wurde das Gewebe aufbereitet, wobei sich keine Besonderheiten zeigten. Auf die Edman- Sequenzierung nach Präzipitation wurde bei unbekanntem Ligandenmotiv verzichtet.

#### III.4.2.2.3 Die identifizierten Peptidliganden des Karzinoms OCA 3

Fraktion	Masse [Da]	Sequenz									Protein	AS-Position	SWISS-Prot.	HLA-Allel
		1	2	3	4	5	6	7	8	9				
22	1049.6	L	P	D	T	L	K	V	T	Y	Integrin beta-2 (Precursor)	374- 382	P05107	?
26	1001.6	G	T	H	K	V	T	V	L	F	Filamin 1	352- 360	P21333	?
28	1029.6	V	M	A	P	R	T	L	L	L	HLA (z.B. CW 0702)	3- 11	O78083	?

**Tab. 11:** Peptidliganden des Ösophaguskarzinoms OCA 3. Allgemeine Hinweise zu den einzelnen dargestellten Fakten sowie den verwendeten Markierungen und Formatierungen können Abschnitt III.4.1.3.6 entnommen werden. Abweichend vom üblichen Vorgehen war bei fehlender HLA- Typisierung des Gewebes (Kennzeichnung mittels ?) keine integrative Betrachtung unter Einbezug der HLA- Motive möglich, so dass die Markierung von spezifischen AS hier fehlt. Methionin M lag im Peptid bei Fraktion 28 in methylierter Form vor (vgl. III.4.1.3.6)

### III.4.2.3 Das Karzinom OCA 6

Trotz frustrierender Aufarbeitung mit ausbleibender Identifikation von Peptidliganden wurde dieses Karzinom in die Präsentation integriert, da gerade von den negativen Ergebnissen ausgehend, entscheidende Schlüsse für die konsekutive Tumoranalytik gezogen werden konnten. Bei OCA 6 wurden 56 g Tumorgewebe untersucht, für diese Entität eine riesige Tumormasse. Allerdings konnten trotz dieser Ausmaße keine Peptide identifiziert werden. Dabei wurde aufgrund der Masse und bei HLA- A\*02 Positivität, je zweimalig, mit speziell großen Mengen AK BB7.2 sowie W6/32 gearbeitet. Bezieht man die Ergebnisse der Edman- Sequenzierung in die Analytik mit ein – bei OCA 6 konnten in den wiederholten Präzipitationen mit AK BB7.2 und W6/32 keinerlei MHC- Komplexe detektiert werden – scheinen sich die Puzzleteile zusammenzufügen:

Die initiale Hoffnung auf Detektion einer großen Bandbreite an Peptiden bei dieser Tumormasse relativierte sich zur Überlegung, dass Tumoren erst aufgrund ausgefeilter Überlebensstrategien, den immun escape Mechanismen, der Überwachung durch das Immunsystem entgehen und eine signifikante Expansion erzielen können. Zu diesen Tumoreigenschaften, den „hallmarks of cancer“<sup>210</sup>, zählt u.a. die Herabregulierung der an der Zelloberfläche präsentierten MHC- Komplexe (vgl. I.7.4). Bei insuffizienter Wachstumskontrolle durch das Immunsystem expandiert das Karzinom nahezu ungehemmt. Die zur Surveillance des Immunsystems notwendigen MHC- Komplexe sind nicht mehr detektabel. Entscheidend ist also weniger die eigentliche Masse des Tumors als vielmehr die Menge an präsentiertem MHC- Komplex und damit an Peptidliganden, um Erfolg versprechende Immunpräzipitation zu antizipieren.

Während in Kapitel IV noch eingehend auf frustrane Peptididentifikation und mögliche Gründe hierfür eingegangen wird, soll bereits hier am Beispiel OCA 6 demonstriert werden, welche Informationen sich aus den am Anfang dieses Kapitels hervorgehobenen, allgemeinen sowie speziellen Tumorcharakteristika ziehen lassen. So kann aus einem 56 g schweren Karzinom kein Peptid erwartet werden! Zusätzlich untermauern diese Kenntnisse die Notwendigkeit der Zwischenanalysen, um aufwändige Verfahren nur selektiv einzusetzen.

---

<sup>210</sup> Hanahan D. et al. 2000

### III.4.3 Karzinome des Magens

#### III.4.3.1 Übersicht

Nr.	Interne Bezeichnung	Tumor-masse [g]	Tumor-grösse [cm]	Tumor-lysat [ml]	HLA- Typisierung der Tumoren			
					HLA-A*		HLA-B*	
1	MaCa 11	21,7	7,0 x 7,0	?	24(9)	-	35	44(12)
2	MaCa 33	?	?	?	?	?	?	?
3	MaCa 35	16	5,5	75	3	32	35	-

**Tab. 12** zeigt die untersuchten Magenkarzinome. Allgemeine Hinweise zu den einzelnen dargestellten Fakten sowie den verwendeten Markierungen und Formatierungen können Abschnitt III.4.1.3.1 entnommen werden.

Leider lagen zu MaCa 33 keinerlei genauere Tumordaten vor, entsprechend erfolgte die generelle Markierung mit ?

#### III.4.3.2 Ergebnisse der Peptididentifikation

Wie bei den Ösophaguskarzinomen wurden auch bei den Magenkarzinomen drei relativ große Tumoren mit einer Gesamtmasse von über 40 g untersucht. Leider bestätigte sich bei diesen Tumoren die bei der Analyse des großen Ösophaguskarzinoms OCA 6 erstellte Hypothese (vgl. III.4.2.3), dass die reine Gewebsmenge über Erfolg oder Misserfolg der Identifizierung von Liganden keine Aussage zulässt. Trotz Erfolg versprechender Ergebnisse in der HPLC- Analytik ließen sich keine Peptide für MaCa11 nachweisen. Ebenso wenig lieferten die Karzinome MaCa 33 und 35 verwertbare Resultate, so dass von einer Darstellung Abstand genommen wurde.

### III.4.4 Karzinome des Kolons und Sigmas

Karzinome dieser Lokalisation stellten mit einer Gesamtzahl von insgesamt 32 Geweben das größte untersuchte Tumorkollektiv dar (vgl. Abb. 47). Es gelang, aus ca. 270 g Gewebe und einem resultierenden Lysatvolumen von über zweitausend Millilitern bislang zumindest aus drei Tumoren eine größere Anzahl an Peptiden zu isolieren.

## III.4.4.1 Übersicht

Nr.	Interne Bezeichnung	Tumor- masse [g]	Tumor- grösse [cm]	Tumor- lysat [ml]	HLA- Typisierung der Tumoren			
					HLA- A*		HLA-B*	
1	CCA 2/1	1,2	?	65	?	?	?	?
2	CCA 2/2	1,2	?	75	?	?	?	?
3	CCA 4	2,9	5,2	40	?	?	?	?
4	CCA 5	3,0	2,5	50	?	?	?	?
5	CCA 6	4,4	4,3 x 4,2	?	?	?	?	?
6	CCA 12	15,9	7,0	75	?	?	?	?
7	CCA 13	10,8	?	80	?	?	?	?
8	CCA 14	12,7	3,5	70	?	?	?	?
9	CCA 16	4,7	3,5	75	1	26	65 (14)	-
10	CCA 19	8,8	2,5	?	3	11	35	44 (12)
11	CCA 21	8,8	6,0	80	1	23 (9)	8	44
12	CCA 22	24,5	4,7	100	31	32	8	44 (12)
13	CCA 24	5,1	8,0 x 1,0	75	?	?	?	?
14	CCA 31	15,9	?	100	1	11	8	35
15	CCA 43	7,1	5	95	24 (9)	32	27	35
16	CCA 48	8,8	3,8 x 2,4	?	1	11	7	8
17	<b>CCA 49</b>	<b>6,8</b>	<b>5,0 x 4,0</b>	<b>85</b>	<b>2</b>	<b>-</b>	<b>7</b>	<b>51</b>
18	CCA 50	5,7	4,0	100	24	31	39	56
19	CCA 51	20,6	6,5 x 5	100	1	-	27	57
20	<b>CCA 60</b>	<b>11,2</b>	<b>10,0 x 7,0</b>	<b>95</b>	<b>24</b>	<b>-</b>	<b>18</b>	<b>44</b>
21	<b>CCA 61</b>	<b>7,0</b>	<b>6,5 x 6,0</b>	<b>80</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>15 (71)</b>	<b>35</b>
22	CCA 81	7,2	5,0	100	11	24	37	41
23	CCA 82	5,0	5,0	100	2	30	18	-
24	CCA 89	20,0	?	100	25	26	18	38
25	CCA 90	7,6	5,0	75	1	26	8	37
26	CCA 92	10,6	4,5 x 3,5	75	1	3	7	18
27	CCA 93	4,8	5,0	75	3	-	35	-
28	CCA 94	?	6,0 x 5,5	?	1	3	8	51
29	CCA 96	24,0	7,5 x 7,0	90	3	11	35	-
30	CCA 100	9,7	4,0 x 2,0	45	23	24	44	51
31	CCA 115T	8,5	?	83	?	?	?	?
32	CCA 115N	8,5	?	58	?	?	?	?

**Tab. 13** listet sämtliche untersuchte Karzinome des Kolons und Sigmas auf. Allgemeine Hinweise zu den einzelnen dargestellten Fakten sowie den verwendeten Markierungen und Formattierungen können III.4.1.3.1 entnommen werden. Wiederum lagen bei einigen Geweben keine Informationen zu Grösse oder HLA- Typisierung vor (mit ? markiert). Bei Homozygotie der HLA- Allele wurde das Feld des korrelierenden Zweitallels mit – beschriftet (vgl. Tab. 9). Die 32. Probe (CCA 115N) bestand nicht aus Tumorgewebe, sondern entsprach unveränderter Kolonschleimhaut, die zur Korrelation mit dem ebenfalls analysierten Kolonkarzinomgewebe CCA 115T aufgearbeitet wurde

### **III.4.4.2 Das Karzinom CCA 49**

#### III.4.4.2.1 Klinische Aspekte zum Patienten mit dem Karzinom CCA 49

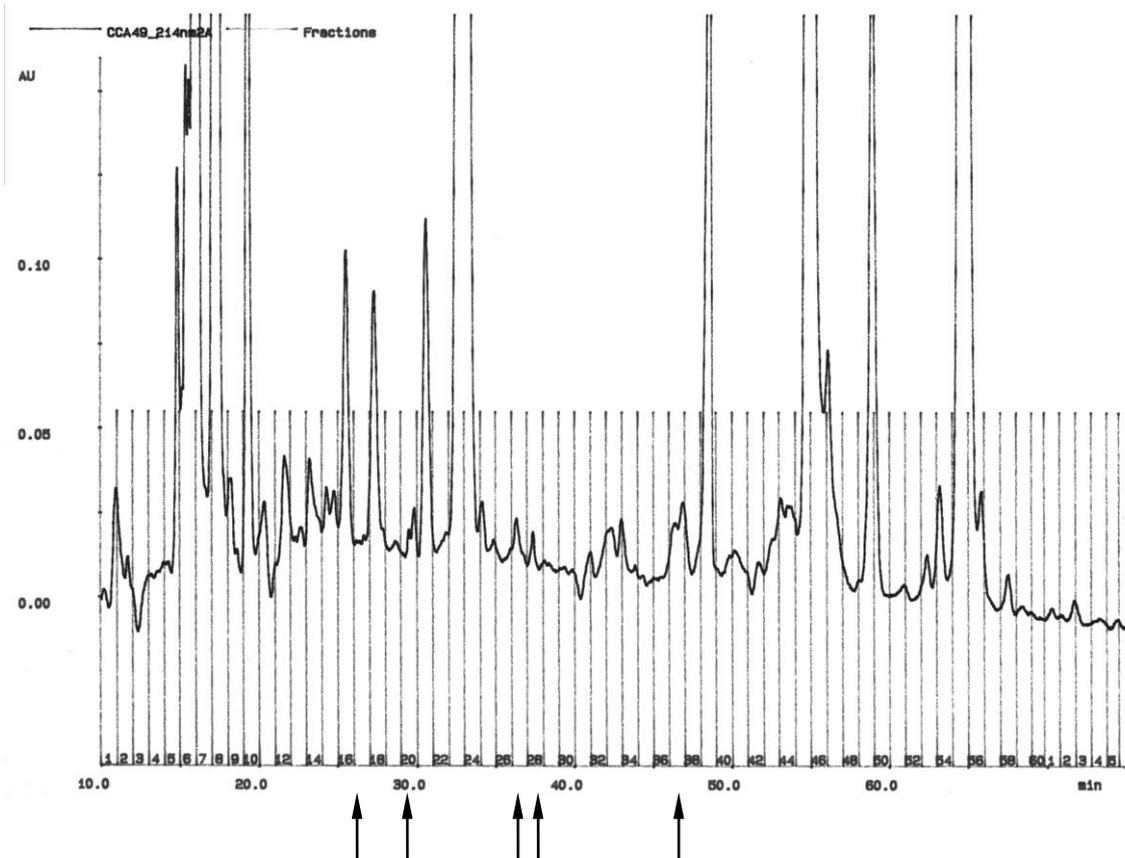
Das Sigmakarzinom CCA 49 im Stadium pT3 N1 M0 G2 trat bei einem männlichen Patienten im Alter von 85 Jahren auf. Nach anhaltend positivem Hämoculttest – trotz Ligaturbehandlung von Hämorrhoiden – wurde das hemizirkuläre, schüsselförmige Adenokarzinom mit Infiltration perikolischen Fett- und Bindegewebes (T3- Stadium) sowie zweier regionärer Lymphknoten (N1- Stadium) diagnostiziert. Ohne Hinweise auf eine lokoregionäre oder systemische Metastasierung wurde eine linksseitige Hemikolektomie mit kurativem Therapieansatz durchgeführt. Eine adjuvante Systemtherapie erfolgte nicht.

#### III.4.4.2.2 Aufbereitung des Karzinoms CCA 49

Die Analytik erfolgte mit leicht verlängerten Inkubationszeiten und Aufschlusszeiten. Bei HLA- A\*02- Positivität wurde primär zweimalig mit AK BB7.2, gefolgt von W6/32 präzipitiert. Sonstige Besonderheiten ergaben sich nicht. Da die Edman- Sequenzierung der folgenden Tumoren interessantere Ergebnisse liefert, wurde im vorliegenden Fall auf die nähere Darstellung bewusst verzichtet.

#### III.4.4.2.3 Die Flüssigkeitschromatographie des Karzinoms CCA 49

Im Vergleich zu anderen Chromatographien wie beispielsweise von CCA 60 (Abb. 71), waren bei CCA 49 trotz identischer Skalierung deutlich intensivere Hintergrundsignale zu verzeichnen, jedoch in Muster und zeitlichem Auftreten unverändert zu den Referenzuntersuchungen (vgl. II.7.4.5, Abb. 40).



**Abb. 70** zeigt die Flüssigkeitschromatographie des Karzinoms CCA 49. Allgemeine Hinweise zu den einzelnen dargestellten Fakten sowie den verwendeten Markierungen und Formatierungen können Abschnitt III.4.1.3.5 entnommen werden.

#### III.4.4.2.4 Die identifizierten Peptidliganden des Karzinoms CCA 49

Frak- tion	Masse [Da]	Sequenz									Protein	AS- Position	SWISS- Prot.	HLA- Allel
		1	2	3	4	5	6	7	8	9				
17	1086.9	D	<u>A</u>	Y	S	F	S	R	K	!	KIA A 0159			B* 51
20	967.5	T	<u>G</u>	Y	L	N	T	V	T	<u>V</u>	GLBP* <sup>211</sup>	192- 200		B* 51
27	785.5	S	<u>L</u>	A	G	G	I	I	G	<u>V</u>	hnRNP K* <sup>212</sup>	154- 162	Q07244	A* 02
28	957.6	L	<u>V</u>	I	<u>E</u>	N	<u>V</u>	A	S	<u>L</u>	EST	7- 15		A* 02
37	1087.6	D	<u>P</u>	F	A	F	I	H	K	!	Retinoblastoma binding protein 2 homolog 1	44- 52	O95811	B* 51

**Tab. 14** zeigt die Peptidliganden der MHC- I- Komplexe, die auf dem Karzinom CCA 49 identifiziert werden konnten. Allgemeine Hinweise zu den einzelnen dargestellten Fakten sowie den verwendeten Markierungen und Formatierungen können Abschnitt III.4.1.3.6 entnommen werden. Die Markierung der motifspezifischen AS bei den Peptiden aus Fraktion 27 und 28 war aufgrund der differenten Untergruppenmotive nur eingeschränkt möglich

<sup>211</sup> Falk K. et al. 1995 a

<sup>212</sup> Diehl M. et al. 1996

Aus Platzgründen wurde auf die übliche Darstellung der MHC- Motive für HLA-A\*02 und -B\*51 verzichtet, diese sind in der SYFPEITHI- Datenbank verfügbar. Die Markierung der Ankeraminosäuren erfolgte in bekannter Weise (vgl. III.4.1.3.6), allerdings musste in diesem Fall den Besonderheiten des HLA-A\*02- Allels Rechnung getragen: Da die HLA- Typisierung der analysierten Tumoren zumeist nur die Obergruppen umfasste, sich bei einigen wie z.B. dem HLA- A\*02- Allel jedoch relevante Motivunterschiede durch differente Untergruppen feststellen ließen, war das Definieren motivspezifischer Aminosäuren nur eingeschränkt möglich.

### **III.4.4.3 Das Karzinom CCA 60**

#### III.4.4.3.1 Klinische Aspekte zum Patienten mit dem Karzinom CCA 60

Bereits im Alter von 52 Jahren manifestierte sich bei diesem Patienten das schüsselförmige, zirkuläre Adenokarzinom des Zökums mit Mittelbauchschmerzen, Diarrhoen sowie einer Tumoranämie. Bei ausgedehntem Wachstum mit Infiltration sämtlicher Wandschichten, perinodalem Befallsmuster, hepatischen Filiae und Lymphangiosis carcinomatosa zeigte sich der Tumor im fortgeschrittenen Stadium pT4 pN2 M1 G2. Der Primarius selbst maß 10 cm x 7 cm und wies eine Eindringtiefe von 4 cm auf, insgesamt konnten acht Lymphknotenmetastasen nachgewiesen werden.

Therapiert wurde mit einer erweiterten, rechtsseitigen Hemikolektomie und einer ausgedehnten Dünndarmresektion unter Mitnahme retroperitonealer Lymphknoten, wobei die Darmpassage mittels einer Ileotransversostomie wiederhergestellt wurde. Über eine anschließende Systemtherapie liegen keine Informationen vor.

#### III.4.4.3.2 Aufbereitung des Karzinoms CCA 60

Die 11,2 g Gewebe des Kolonkarzinoms CCA 60 lieferten 95 ml eines tiefrot gefärbten Lysates, das nach einer langen Aufschlusszeit mit intensivem Douncen sowie einer verlängerten zweiten Aufschlusszeit (vgl. IV.3.2.3) und Zugabe von 5mg W6/32- AK einmalig präzipitiert wurde.

Auffällig war, dass trotz fortgeschrittenem Tumorstadium und ausgedehntem Primarius mit einer Größe von bis zu 10 cm lediglich 11 Gramm Gewebe asserviert werden konnten. Retrospektiv sprechen die Ergebnisse dafür, dass möglicherweise nur die Gewebeteile Verwendung fanden, die makroskopisch vital imponierten (vgl. IV.3.4.1.3). Daneben ließ die Lysatfarbe auf eine signifikante Hämoglobinbeimengung schließen und in Zusammenschau mit der Größe eine suffiziente Gefäßversorgung des Tumors durch Neovaskularisation vermuten.

#### III.4.4.3.3 Die Edman- Sequenzanalyse des Karzinoms CCA 60 vor Filtration

Im Verlauf der Probenanalytik wurden zwei verschiedene Geräte unterschiedlicher Firmen zur Edman- Sequenzierung zum Einsatz gebracht (vgl. II.7.5.4). Dadurch war es möglich, vergleichendes Datenmaterial beider Geräte zu generieren. Die Tab.15 und Tab.16 zeigen eine Gegenüberstellung der Ergebnisse beider Sequenzer bei der Analyse identischer Proben von CCA 60 vor Filtration.

	Zyklus						
	1	2	3	4	5	6	7
A	40,23	35,38	50,39	58,49	75,65	79,95	94,96
D	161,88	43,95	42,62	40,74	42,79	52,74	63,37
E	236,96	63,82	73,98	37,65	41,55	147,91	62,59
F	9,65	30,33	37,03	31,97	47,19	54,21	62,00
G	57,76	45,30	58,10	60,24	79,44	75,03	83,16
H	9,40	12,51	27,07	17,89	16,42	8,46	18,91
I	46,12	507,76	51,33	39,56	42,88	44,92	62,80
K	10,80	32,98	0,00	0,00	0,00	68,39	73,88
L	14,92	49,80	92,31	267,32	101,09	95,81	105,16
M	5,73	10,14	18,15	331,40	48,09	21,52	21,09
N	67,30	16,42	18,68	18,37	22,49	28,85	34,00
P	28,99	32,65	54,70	64,67	83,42	101,04	123,87
Q	6,67	37,90	260,19	53,59	9,18	341,10	89,25
R	18,54	17,22	32,93	35,09	40,24	53,19	98,21
S	54,11	39,84	42,86	53,20	60,84	68,20	247,82
T	14,96	29,32	0,00	75,06	261,41	0,00	100,36
V	19,04	297,93	456,41	134,83	279,19	146,43	155,06
W	7,30	8,80	10,02	7,09	5,53	9,29	15,49
Y	40,48	39,22	46,66	41,71	50,78	52,15	74,42

**Tab. 15** zeigt die Sequenzierungsdaten des Procise- Gerätes für das Eluat von CCA 60 vor Filtration. Allgemeine Hinweise zu den einzelnen dargestellten Fakten sowie den verwendeten Markierungen und Formatierungen können Abschnitt III.4.1.3.2 entnommen werden

	Zyklus						
	1	2	3	4	5	6	7
A	42,10	39,10	47,90	42,20	61,00	73,70	71,60
D	180,00	38,00	39,80	34,60	41,60	48,00	51,30
E	174,40	55,50	55,40	29,60	31,40	125,60	47,50
F	15,80	68,70	25,40	23,50	47,70	41,10	42,80
G	35,00	24,40	44,50	26,20	42,30	49,40	40,40
H	8,40	16,00	34,90	13,50	14,80	15,50	14,90
I	19,50	149,70	19,40	14,10	19,20	18,60	26,90
K	24,30	29,80	45,80	98,60	64,70	76,00	71,60
L	23,70	45,40	86,10	240,00	82,90	64,20	72,90
M	5,90	8,30	12,40	188,00	32,10	15,20	12,90
N	68,90	22,80	21,00	10,60	26,00	48,20	35,40
P	36,50	30,10	39,00	35,10	52,10	62,40	94,80
Q	5,00	35,10	247,70	42,70	60,80	333,20	60,60
R	41,00	24,30	70,90	29,60	35,50	66,50	53,80
S	27,10	15,50	15,50	17,50	19,90	42,10	106,60
T	13,00	16,70	24,50	45,50	203,30	44,50	51,30
V	25,40	185,00	301,70	70,90	165,90	82,90	89,60
W	7,90	9,70	11,70	8,40	11,20	12,60	29,60
Y	39,30	33,20	39,30	30,70	42,60	8,50	61,60

**Tab. 16** zeigt die Sequenzierungsdaten des Hewlett Packard- Gerätes für das Eluat von CCA 60 vor Filtration. Allgemeine Hinweise zu den einzelnen dargestellten Fakten sowie den verwendeten Markierungen und Formatierungen können Abschnitt III.4.1.2.2 entnommen werden

In der Analyse durch beide Geräte (Tab. 15, 16) konnten eindeutig die Sequenzen von  $\alpha$ - Kette (**GSHSMRY**) und  $\beta$ 2-Mikroglobulin (**IQRTPKI**) des MHC- I-Komplexes sowie von schwerer (**E $\bar{V}$ QL $\bar{V}$ ER $\bar{I}$** ) und leichter (**I $\bar{D}$ IV $\bar{M}$ T $\bar{Q}$ S $\bar{I}$** ) Kette des AK W6/32 anhand ihrer N- Termini erkannt werden. Die wiedergegebenen Messwerte beider Apparate lagen zwar in vergleichbaren Bereichen, unterschieden sich numerisch gesehen jedoch teils deutlich voneinander. Entscheidend schien unter der Voraussetzung identischen Ausgangsmaterials und einer jeweils „korrekten“ Analyse ohne systemische Fehler damit weniger der absolute Zahlenwert der einzelnen AS an der jeweiligen Position zu sein. Vielmehr war die Messwertabfolge im Verlauf der Zyklen, von eins bis sieben, für jede einzelne AS entscheidend. Diese Einschätzung war bereits durch viele Voruntersuchungen bekannt. Im konkreten Fall zeigte beispielsweise die AS Isoleucin I in Zyklus 2 einen signifikanten Zahlenwertanstieg, der in den folgenden Zyklen auf ein ähnliches Ausgangsniveau abfiel. Beide Geräte konnten dies in äquivalenter

Präzision nachweisen. Signifikante Unterschiede in der Trennschärfe der einzelnen AS ließen sich weder in dieser noch in weiteren Analysen objektivieren. Damit konnte eine Präferenz eines Gerätes für die Analyse der Tumorpräzipitatproben aus den vergleichenden Analysen nicht abgeleitet werden (vgl. Kap. IV).

#### III.4.4.3.4 HLA- Motive des Karzinoms CCA 60

Zum besseren Verständnis der Ergebnisse der Edman- Sequenzierung nach Filtration (Tab. 19, 20) wurden nachfolgend die HLA- Motive für CCA 60 der SYFPEITHI- Datenbank entnommen und dargestellt (vgl. III.4.4.3.5).

Da für das HLA- Allel B\*18 bislang kein Motiv verfügbar war, werden gemäß der Klassifizierung des Tumors mit Expression lediglich eines HLA A\*- Allels (vgl. Tab. 13) nur die Motive A\*24<sup>213</sup> sowie B\*44<sup>214</sup> gezeigt.

		Zyklus								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Anker	Hilfs- anker		Y		I	F				I
					V					L
Bevorzugte Aminosäure										E
										F
		F	N	D				Q	E	
			E	P				N	K	
			L	E						
			M	K						
			P							
			G							

**Tab. 17** zeigt das Motiv des HLA- Allels A\*24. Allgemeine Hinweise zu den einzelnen dargestellten Fakten sowie den verwendeten Markierungen und Formatierungen können Abschnitt III.4.1.3.3 entnommen werden

		Zyklus								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Anker			E							Y
Bevorzugte Aminosäure										

**Tab. 18** zeigt das Motiv des HLA- Allels B\*44. Allgemeine Hinweise zu den einzelnen dargestellten Fakten sowie den verwendeten Markierungen und Formatierungen können Abschnitt III.4.1.3.3 entnommen werden

#### III.4.4.3.5 Die Edman- Sequenzanalyse des Karzinoms CCA 60 nach Filtration

Durch die Spaltung der MHC/Peptid/AK- Komplexe und Abtrennung von MHC und AK mittels Zentrikon- Filtration (vgl. II.5.4.5) sollten im verbleibenden Eluat lediglich die extrahierten Peptidliganden zu detektieren sein. Abgesehen von

<sup>213</sup> Maier R. et al. 1994

<sup>214</sup> DiBrino M. et al. 1995

Störfaktoren waren die gemessenen Signale damit allein auf die Gesamtheit aller eluierten Peptidliganden des Tumors, das Ligandrom, zurückzuführen. Aus vormaligen Untersuchungen war bekannt, dass es sich hierbei um ein Gemisch aus verschiedenen, teils über tausend Liganden in unterschiedlichen Konzentrationen handelt<sup>215</sup>.

Die Edman- Sequenzierung lieferte das erwartete Ergebnis eines primär als unspezifisches Rauschen imponierenden Analysebildes. Bei genauerer Betrachtung zeigte sich jedoch, dass die beobachteten Signale nicht völlig unspezifisch oder willkürlich waren.

Aminosäure	Zyklus						
	1	2	3	4	5	6	7
A	17,53	11,07	8,93	6,54	5,99	5,33	4,48
D	23,05	8,14	7,02	3,56	7,43	8,73	10,54
E	36,31	30,29	10,08	7,08	4,55	3,19	2,90
F	2,49	4,89	8,36	6,23	7,43	6,75	2,16
G	24,17	23,50	18,98	14,55	10,54	8,54	7,87
H	542,29	464,83	185,67	57,47	18,46	6,22	3,52
I	4,92	3,02	9,81	6,13	8,53	6,90	2,36
K	0,00	0,00	4,54	5,10	4,84	0,00	2,61
L	8,52	6,04	7,68	6,87	7,31	6,17	4,29
M	2,79	2,90	3,41	2,28	2,57	1,52	1,36
N	3,38	1,99	3,71	2,47	2,68	1,91	2,31
P	3,68	4,21	6,09	5,46	4,39	4,28	3,50
Q	0,74	3,64	0,00	3,71	3,30	2,17	2,89
R	3,11	5,78	6,26	5,56	3,32	4,49	4,54
S	14,75	10,92	7,25	5,31	4,21	3,53	3,25
T	20,09	11,13	6,94	5,31	4,39	3,18	3,68
V	12,69	9,74	10,64	8,01	8,42	7,65	6,50
W	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Y	8,07	18,99	5,64	3,87	3,93	3,46	3,56

**Tab. 19** zeigt die Sequenzierung des Eluates von CCA 60 nach Filtration durch das Procise-Gerät. Allgemeine Hinweise zu den einzelnen dargestellten Fakten sowie den verwendeten Markierungen und Formatierungen können Abschnitt III.4.1.3.4 entnommen werden.

Zu beachten ist, dass nicht die gesamte Länge der erwarteten Peptide von zumeist 9 AS sequenziert wurde, sondern lediglich 7 Zyklen und damit die Analyse der sieben N-terminalen AS der Peptide durchgeführt wurde. Da Prolin [P] in Position bzw. Zyklus 4 eine bevorzugte AS sowohl im Motiv von HLA- A\*24 als auch von HLA- B\*44 ist, erfolgte die kombinierte Markierung beider Motive mithilfe einer diagonalen Trennlinie (vgl. III.4.1.3.4)

<sup>215</sup> Schirle M. et al. 2000

Aminosäure	Zyklus						
	1	2	3	4	5	6	7
A	17,50	9,90	7,70	5,50	-	-	-
D	18,00	6,00	4,90	4,00	-	-	-
E	14,30	<b>16,70</b>	10,50	9,70	-	-	-
F	4,20	2,70	2,20	1,50	-	-	-
G	20,30	12,10	10,40	7,00	-	-	-
H	5,60	2,80	2,40	2,00	-	-	-
I	4,50	2,50	2,10	1,10	-	-	-
K	3,90	1,50	2,00	2,50	-	-	-
L	8,90	3,70	3,40	2,90	-	-	-
M	3,20	1,80	4,50	5,70	-	-	-
N	24,20	12,80	9,10	4,70	-	-	-
P	12,40	6,10	4,70	3,40	-	-	-
Q	0,00	5,30	7,90	7,60	-	-	-
R	18,80	11,60	7,30	5,30	-	-	-
S	5,40	2,50	1,80	1,30	-	-	-
T	10,50	4,80	2,90	1,80	-	-	-
V	19,00	11,80	8,60	4,00	-	-	-
W	9,70	5,00	6,50	6,70	-	-	-
Y	9,80	<b>8,40</b>	3,70	2,50	-	-	-

**Tab. 20** zeigt die Sequenzierung des Eluates von CCA 60 nach Filtration durch das Hewlett Packard Gerät. Allgemeine Hinweise zu den einzelnen dargestellten Fakten sowie den verwendeten Markierungen und Formatierungen können Abschnitt III.4.1.3.4 entnommen werden. Aus technischen Gründen wurden im Gegensatz zur Sequenzierung durch das Procise- Gerät hier nur 4 Zyklen analysiert. Die weiteren Zyklen wurden deshalb nicht beschriftet, allein die Markierung der HLA- Motive für HLA- A\*24 und HLA- B\*44 wurden hinterlegt.

Durch Summationseffekte, die sich aufgrund der an einzelnen Positionen identischen AS- Sequenzen bei ansonsten different aufgebauten Peptiden ergaben – hierbei handelte es sich vor allen um die Positionen der Anker- AS –, ließen sich bei der Sequenzierung eines ganzen Tumorigandroms vereinzelt signifikante Signale detektieren.

Im konkreten Fall des CCA 60 fokussierte sich die Betrachtung auf bekannte Anker- AS des HLA- Motivs wie z.B. auf Glutamat E in Position 2 als Anker des HLA- B\*44 Motivs (vgl. Tab. 18): Während der Procise- Sequenzer eine unspezifische Signalerhöhung in Zyklus 1 bei allen AS nachwies, war im folgenden Zyklus in sämtlichen Positionen *außer* bei Glutamat E ein deutlicher Abfall des Signals nachzuweisen. Dieser „relative Anstieg von E“ (vgl. Tab. 19) äußerte sich in der HP- Sequenzierung gar als eindeutiger Anstieg (vgl. Tab. 20). Ähnli-

ches zeigte sich bei der AS Tyrosin Y, dem Anker des Motivs von HLA- A\*24 (vgl. Tab. 17) an Position 2. Hier wies selbst die Procise- Sequenzierung einen evidenten Anstieg nach (vgl. Tab. 19).

Verglichen mit der Edman- Sequenzierung vor Filtration waren die gemessenen Signale der Peptidliganden erwartungsgemäß gering und überhaupt erst abzugrenzen, nachdem sie zuvor komplett durch AK/MHC- Signale überlagert worden waren (vgl. Tab. 15, 16). Andererseits erlaubte erst der Summationseffekt im Bereich der Anker- AS, die Detektionsgrenze der Sequenzer zu überschreiten und verwertbare Signale aus dem Hintergrundrauschen herauszufiltern. Dieser Effekt entspricht in etwa den Summationsspektren, die sich die Massenspektrometrie zu Nutze macht und im Rahmen der Ligandenidentifikation zum Einsatz kam (vgl. II.8.2). Neuerlich wurde deutlich, welche zentrale Rolle die Kenntnis um HLA- Typisierung und -Motiv für die Peptididentifikation spielt. Zusammenfassend konnte damit anhand der Ergebnisse der Edman- Sequenzierung mit Nachweis von Signalintensitäten an den Ankerpositionen auf die Aservierung einer signifikanten Peptidmenge im Eluat rückgeschlossen werden, so dass mit einer erfolgreichen Einzelpeptidanalyse zu rechnen war. Basierend auf diesem Informationsgehalt erhielt die Edman- Sequenzierung nach Filtration als Zwischenanalyseverfahren im Gesamtaufarbeitungsprozess der Tumoren (vgl. Abb. 27) entscheidendes Gewicht (vgl. II.7.5.3 bzw. IV.3.3.5).

#### III.4.4.3.6 Die Edman- Sequenzanalyse nach Filtration

##### – Vergleich zweier Analysatoren

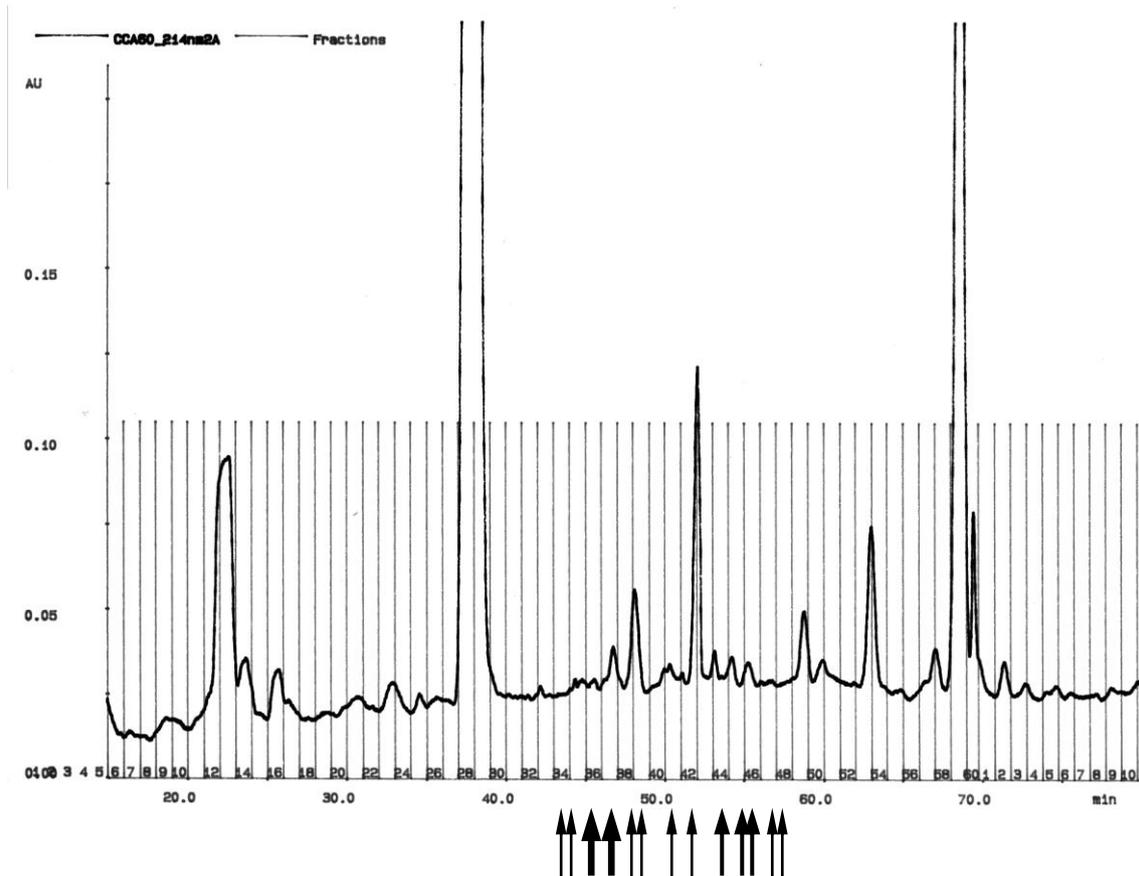
Da bei CCA 60 auch für die Edman- Sequenzierung nach Filtration mit Procise sowie Hewlett- Packard zwei verschiedene Analysatoren zum Einsatz kamen, ergab sich die Möglichkeit, einerseits beide Geräte in der Verarbeitung einer identischen Probe direkt zu vergleichen, andererseits durch Kombination der Ergebnisse erweiterte Kenntnisse über die Eluatprobe zu erlangen.

Im direkten Vergleich zeigten beide Geräte ähnliche Sensitivitätslevel, die sich in parallelen Signalanhebungen im Bereich der Ankeramino-säuren ausdrücken. Das Gerät von Procise wies im Bereich der zyklischen Aminosäure Histidin H

unspezifische Signale nach, die als bekannte Artefakte des Gerätes interpretiert werden müssen (vgl. Tab. 19). Beim HP- Gerät fielen diese Artefakte nicht auf. Andererseits detektierte Procise an den Positionen bevorzugter AS wie z.B. Iso-leucin I in Zyklus 3 eindeutige Signale, während das HP- Gerät in diesen Bereichen keine Signaldifferenzen auszumachen vermochte. Leider wurden durch den HP- Analysator aus technischen Gründen nur vier statt sieben Zyklen ausgewertet, so dass eine weitere Differenzierung des Auflösungsvermögens beider Geräte nicht möglich war. Die Ergebnisse beider Geräte trugen klar zur Verbesserung des Gesamtergebnisses der Analyse im Vergleich zu den ansonsten isoliert vorliegenden Befunden jedes einzelnen Gerätes bei und erlaubten bei kombinierter Betrachtung etwaige Schwächen der Einzelgeräte zu relativieren. Nach initialer Skepsis bzgl. des parallelen Einsatz beider Geräte – Halbierung der Eluatprobe mit der möglichen Konsequenz zu geringer Stoffmengen, doppelte Kosten – hatte sich diese Vorgehen in Einzelfällen als lohnend herausgestellt, so dass sich der vergrößerte Arbeits- und Kostenaufwand mit einem meist relevanten Informationsgewinn auszahlte.

#### III.4.4.3.7 Die Flüssigkeitschromatographie des Karzinoms CCA 60

Im Vergleich zu CCA 49 (vgl. Abb. 70) und CCA 61 (vgl. Abb. 72) sowie der Referenzuntersuchung ohne addiertes Peptidgemisch (vgl. II.7.4, Abb. 40) zeigten sich bei der HPLC von CCA 60 deutliche Unterschiede. Während die bekannten, reproduzierbaren Artefakte der Chromatographie mit unspezifischen Signalen stets im Bereich von 16 - 20, 33 - 36, 48 - 49, 56, 59 und 62 - 65 Minuten nach Start der Analyse anzutreffen waren, traten diese charakteristischen Zacken bei der Untersuchung von CCA 60 verzögert auf. Es zeigte sich eine konstante Latenz von ca. 3 - 5 Minuten im Vergleich zur HPLC anderer Tumoren. Sonstige Änderungen, auch nur geringfügigen Ausmaßes, ließen sich nicht abgrenzen. Ein Grund hierfür könnten leichte Konzentrationsdifferenzen im Elutionsmittel sein. Bei verzögertem Auftretens der Eluate und einer Verschiebung der Lösungsmittelmischungskurve nach rechts muss von einem initial hydrophileren Ausgangsgemisch ausgegangen werden. Retrospektiv ließ sich diese Ursache weder verifizieren noch widerlegen.



**Abb. 71** zeigt die Flüssigkeitschromatographie des Karzinoms CCA 60. Allgemeine Hinweise zu den einzelnen dargestellten Fakten sowie den verwendeten Markierungen und Formatierungen können Abschnitt III.4.1.3.5 entnommen werden. Augenfällig ist das im Begleittext erläuterte, verspätete Auftreten der Artefaktsignale in Form hoher peaks.

#### III.4.4.3.8 Die identifizierten Peptidliganden des Karzinoms CCA 60

Frak- tion	Masse [Da]	Sequenz	Protein	AS- Position	SWISS- Prot.	HLA- Allel				
							1	2	3	4
34	982.6	S L P K K L A L L	HSPC023 <sup>216</sup>	72- 80	Q9UNZ5	A*02				
35	1167.6	N <u>Y</u> I <u>D</u> K V R F <u>L</u>	Vimentin <sup>217</sup>	116- 124	P08670	A*24				
36	1090.6	E <u>E</u> <u>I</u> A F L K K L	Vimentin <sup>218</sup>	228- 236	P08670	B*44				
36	1338.7	K <u>Y</u> I T Q G Q L L Q <u>E</u>	Long chain polyunsat. Fatty acid elongation enzyme <sup>219</sup>	100- 210	Q9NYP7	A*24				
36	1154.7	V <u>E</u> Y R I K I S F	Rho GDP dissociation inhibitor 1 <sup>220</sup>	108- 116	P52565	B*44				

<sup>216</sup> Weinzierl A.O. et al. 2008

<sup>217</sup> Krüger T. et al. 2004

<sup>218</sup> Krüger T. et al. 2005

<sup>219</sup> Krüger T. et al. 2005

<sup>220</sup> Lee N. et al. 1995

37	1072.7	V L P K L Y V K L	Ribosomal protein S26	63- 71	P02383	?
37	1133.5	T <u>Y</u> <u>G</u> <u>E</u> I F E <u>K</u> <u>E</u>	NADH-Dehydrogenase subunit B14.5 B <sup>221</sup>	107- 115	O95298	A*24
37	1289.6	D <u>E</u> Y I Y R H F F	Cell cycle progression 8 protein <sup>222</sup>	344- 351	O14712	B*44
			KIA A1254 protein <sup>223</sup>	680- 688	Q9ULG6	
38	1077.6	D <u>E</u> G R L <u>V</u> L E F	ACAT 1 or 2 <sup>224</sup>	163- 171	P35610	B*44
39	1280.7	D <u>Y</u> <u>L</u> K R <u>E</u> Y L Y	Matrilysin	37- 45	P09237	A*24
41	1194.6	F <u>Y</u> <u>L</u> E G G <u>E</u> S <u>K</u> <u>E</u>	Dual specificity phosphatase 6	130- 139	Q16828	A*24
42	1139.6	F <u>Y</u> <u>P</u> <u>P</u> K V E L <u>E</u>	Multifunctional protein ADE 2	121- 129	P22234	A*24
44	1090.6	D <u>E</u> I N F L A R L	Keratin 6	292- 300	P02538	B*44
44	1125.6	I <u>Y</u> T <u>K</u> I M D L I	KIA A0877	24- 32	O94954	A*24
45	1150.6	S <u>Y</u> I <u>E</u> H I F <u>E</u> I	Phosphoprotein enriched in astrocytes 15 <sup>225</sup>	61- 69	O00511	A*24
45	1097.5	D <u>E</u> F K I G E L F	DNA- dependent protein kinase cat. Subunit <sup>226</sup>	145- 153	P78527	B*44
46	1177.6	Y <u>Y</u> I F I P S <u>K</u> <u>E</u>	Hpq0256 protein	109- 117	Q9UI98	A*24
			Dead box protein	241- 249	Q9H4E3	
46	1211.6	L <u>Y</u> <u>P</u> Q F M F H <u>L</u>	Sec23A <sup>227</sup>	576- 584	Q15436	A*24
47	1095.7	Q <u>Y</u> V <u>P</u> V I I H L I	Elongation of very long chain fatty acids	228- 236	Q9BW60	A*24
48	1094.5	S <u>Y</u> <u>L</u> <u>P</u> L A H M <u>E</u>	Long- chain- fatty- acid- CoA ligase 6	318- 326	Q9UKU0	A*24
48	1253.7	D <u>E</u> I N F L R A L <u>Y</u>	Keratin 4 or 6	281- 290	P19013	B*44
49	1063.6	F <u>E</u> A <u>P</u> I K L V <u>E</u>	A novel protein <sup>228</sup>	175- 183	Q9H110	B*44

**Tab. 21** zeigt die Peptidliganden der MHC- Klasse I- Komplexe, die auf dem Karzinom CCA 60 identifiziert werden konnten. Allgemeine Hinweise zu den einzelnen dargestellten Fakten sowie den verwendeten Markierungen und Formatierungen können Abschnitt III.4.1.3.6 entnommen werden. Da die Peptide SLPKLLALL (Fraktion 34) und VLPKLYVKL (Fraktion 37) zwar zweifelsfrei auf CCA 60 identifiziert werden konnten, sich jedoch keinem der bekannten HLA-Motive eindeutig zuordnen ließen, wurde das korrelierende HLA- Allel mit einem ? versehen.

<sup>221</sup> Krüger T. et al. 2005

<sup>222</sup> Krüger T. et al. 2005

<sup>223</sup> Krüger T. et al. 2005

<sup>224</sup> Krüger T. et al. 2005

<sup>225</sup> Krüger T. et al. 2005

<sup>226</sup> Hickman H.D. et al. 2004

<sup>227</sup> Krüger T. et al. 2005

<sup>228</sup> Krüger T. et al. 2005

Die Einordnung der identifizierten Peptide in Bezug auf ihre Ursprungproteine und damit ihre Relevanz im Einsatz zur Peptidvakzinierung wird - wie eingehend beschrieben - abschließend im Kapitel IV erörtert werden. Trotzdem sollte im Rahmen dieser Ergebnispräsentation das Augenmerk in den folgenden Abschnitten auf einzelne Peptide gelenkt werden, die Besonderheiten z.B. hinsichtlich Struktur oder Aufbau aufweisen.

#### III.4.4.3.9 Das Peptid TYGEIFRKF aus Fraktion 37

Vor dem Hintergrund der Vielzahl detektierter Peptide auf CCA 60 soll hier ein Peptid besondere Beachtung finden, das den definierten Kriterien der Bindung des Liganden in der Tasche des HLA- Motivs in einem außerordentlichen Maße entspricht. Es handelt sich um das Peptid TYGEIFRKF aus Fraktion 37, das über HLA- A\*24 an die Zelle gebunden ist (vgl. Tab. 21). Tab.18 illustriert das bekannte Motiv mit Anker-, Hilfsanker- sowie bevorzugten AS.

So kommen die Peptidliganden den „Anforderungen“ der Bindungstasche im Hinblick auf ihren adaptierten Aufbau mit speziellen AS an vorgegebenen Positionen des Motivs in sehr unterschiedlichem Ausmaß nach. Zwar ist in den meisten Fällen mindestens eine der zumeist zwei Anker- AS im Aufbau des Peptides zu finden, das Vorhandensein weiterer spezifischer AS zur Optimierung der gegenseitigen Bindung MHC – Ligand schwankt jedoch von Peptid zu Peptid.

Vergleicht man hingegen dieses Peptid mit dem Motiv von HLA- A\*24, war zu erkennen, dass TYGEIFRKF aus 2 Anker- AS ( \_ **Y** \_ \_ \_ \_ \_ **E** ), zwei Hilfsankern ( \_ \_ \_ \_ **I F** \_ \_ \_ ) und drei bevorzugten AS ( \_ \_ **G E** \_ \_ \_ **K** \_ ) aufgebaut war.

Insgesamt folgten damit sieben der neun enthaltenen AS den uns bislang bekannten Kriterien für eine „optimale“ Bindung am entsprechenden Motiv, hier HLA- A\*24. Da eine derartig hohe Bindungsspezifität sowohl unter den Peptiden, die im Rahmen dieser Dissertation detektiert wurden, als auch unter den Peptiden der gesamten Datenbank eher eine Rarität darstellt, sei hierauf in besonderem Maße hingewiesen.

#### III.4.4.3.10 Identifizierte Peptide mit Überlänge

Im Gegensatz zur hohen Motivkongruenz des Peptids TYGEIFRKF wiesen mehrere Peptide von CCA 60 einen Aufbau auf, der den Prinzipien der HLA-spezifischen Ligandenbindung nicht oder nur teilweise folgte (vgl. Tab. 21). So fiel auf, dass Peptide aus den Fraktionen 41, 47 und 48 über eine, das Peptid aus Fraktion 36 sogar über zwei zusätzliche AS verfügten und damit aus zehn bzw. elf anstatt den üblichen neun AS bestanden.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, ist in diesen Fällen von einer teilweisen Faltung des Peptids auszugehen, um die Bindung an die korrelierenden Strukturen der MHC- Tasche zu ermöglichen. Die sonst übliche ausgestreckte Lage der Peptide in der Tasche musste dazu verändert werden. Durch die Faltung konnte eine vom Motiv abweichende, benachbart lokalisierte AS die Funktion der Anker- AS übernehmen und hierüber zur Stabilisierung des MHC-/ Peptid-Komplexes beitragen. Nicht zu vernachlässigen war daneben die Größe der restlichen, das Peptid formenden AS. So war das Peptid KYITQGQLLQF aus Fraktion 36 aufgrund einer großen Anzahl kleiner AS gut faltbar und ermöglichte die Adaptation in die Ligandentasche. Als Anker diente die AS Phenylalanin F am C- Terminus des Peptids, die anstatt in üblicher Ankerposition 9 an Position 11 des Peptids zu finden war.

Diese Fakten berücksichtigend erfolgte die Markierung der Anker- AS in Tab.21 nach ihrer Funktion und nicht strikt nach der üblichen Position im Ligandenmotiv gemäß der SYFPEITHI- Datenbank. Auch die Peptide FLEGGFSKF (Fraktion 41), QYVPVIIHLI (Fraktion 47) und DEINFLRALY (Fraktion 48) wichen in ähnlicher Weise vom üblichen Bindungsmuster ab und integrierten sich entsprechend in die Bindungstasche des MHC- Komplexes.

#### III.4.4.3.11 Peptide des Proteins Vimentin

Die Präsentation eines Proteins auf der Zelloberfläche erfolgt in Form derjenigen Peptidfragmente des Gesamtproteins, die am besten auf den verschiedenen MHC- Komplexen des jeweiligen Individuums gebunden werden können. Diese werden den Mendel'schen Regeln folgend kodominant exprimiert, so dass je zwei verschiedene Komplexe pro MHC- Antigen existieren (vgl. Kap. I).

In Tab. 21 werden mit NYIDKVRFL aus Fraktion 35 und EEIAFLKKL aus Fraktion 36 zwei Liganden dargestellt, die aus ein- und demselben Ursprungprotein, nämlich Vimentin, entstammen. Interessanterweise wurden beide Peptide auf unterschiedlichen MHC- Komplexen präsentiert (HLA -A\*24, -B\*44).

Somit scheint die Natur auch bei der Präsentation von MHC- Liganden eine Redundanz zu verfolgen und das Ligandespektrum breit zu fächern. Hierbei ist es gleichgültig, ob auf anderen MHC- Komplexen das gleiche Protein bereits nach extern präsentiert wird. Möglicherweise trägt auch eine verstärkte Expression von Vimentin zur Präsentation der Fragmente auf verschiedenen Komplexen bei.

#### III.4.4.3.12 Ursprungproteine der Peptide DEYIYRHFF und YYIFIPSKF

In der Peptidliste des CCA 60 (Tab. 21) wurden den Peptiden DEYIYRHFF (Fraktion 37) und YYIFIPSKF (Fraktion 46) statt eines einzelnen Ursprungproteins je zwei Proteine zugeordnet. Grund hierfür ist, dass gemäß der als Referenz herangezogenen Datenbank SWISS- Prot<sup>229</sup> das jeweilige Peptid in beiden dargestellten Proteinen enthalten ist. Welchem Protein das jeweilige Peptid tatsächlich entstammt, ist ohne weitergehende Informationen, z.B. anhand von Expressionsanalysen, nicht zu definieren und im Kontext dieser Analytik unklar.

### **III.4.4.4 Das Karzinom CCA 61**

#### III.4.4.4.1 Klinische Aspekte zum Patienten mit dem Karzinom CCA 61

CCA 61 wurde bei einem 85- jährigen Mann im Abstand von ca. 16 - 22 cm ab ano als schüsselförmiger, tubulopapillär strukturierter Tumor mit einer Größe von 6,5 x 6,0 cm detektiert. Trotz seiner Lokalisation am rektosigmoidalen Übergang wurde er in der weiteren Aufarbeitung den Kolonkarzinomen zugerechnet. Das Karzinom wies bereits bei Diagnosestellung eine Infiltration des perikolischen Fettgewebes auf. Trotz tumorzellfreier Lymphknoten waren bereits Lebermetastasen nachzuweisen (Tumorstadium: pT3, pN0, M1, G2).

Als Therapie wurde angesichts der fortgeschrittenen Metastasierung sowie multipler Vor- und Begleiterkrankungen lediglich eine Sigmaresektion als palliative Maßnahme ohne nachfolgende System- oder Lokaltherapien durchgeführt.

---

<sup>229</sup> [www.expasy.org/sprot](http://www.expasy.org/sprot)

#### III.4.4.4.2 Aufbereitung des Karzinoms CCA 61

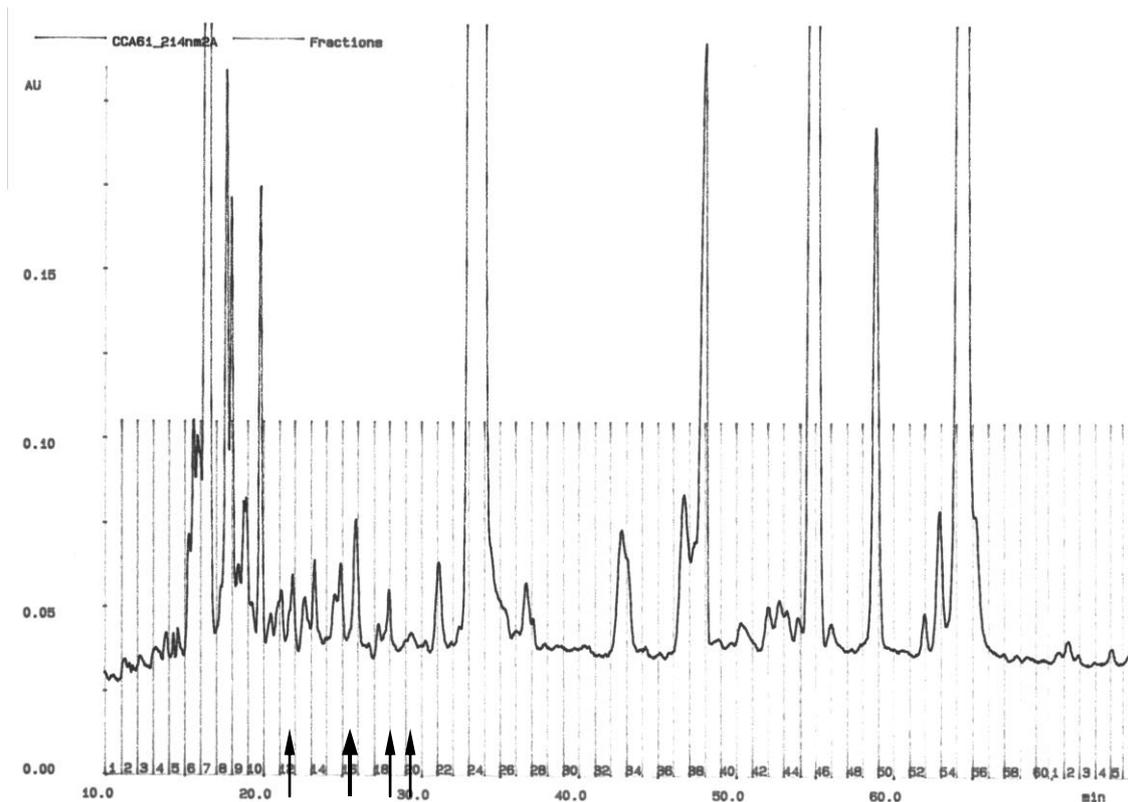
Als insgesamt zehnter Tumor wurde das Karzinom CCA 61 aufgearbeitet. Trotz einer vergleichsweise geringen Masse von 7,0 g wurde es als gelblich- oranges Lysat einer langen Aufschlusszeit von 150 min ausgesetzt. Im Rahmen der weiteren Aufarbeitung ergaben sich keine Besonderheiten, die HLA- Typisierung ist Tab.13 zu entnehmen. Bei geringer Relevanz wurde auf die Darstellung des Edman- Abbaus in Verbindung mit dem HLA- Motiv verzichtet.

#### III.4.4.4.3 Die Flüssigkeitschromatographie des Karzinoms CCA 61

Anhand dieser beispielhaften HPLC von CCA 61 soll besondere Aufmerksamkeit auf die durch die Peptide hervorgerufenen Veränderungen im Kurvenverlauf gelenkt und damit diese Untersuchung auch im Hinblick auf ihre Relevanz als Zwischenanalyse beleuchtet werden (vgl. IV.3.3.4). Nach Ausblenden der Artefaktsignale zeigte sich im Bereich der detektierten Peptide, jeweils durch Pfeile markiert, eine nur minimale Veränderung des Kurvenverlaufes mit kleinsten „Zäckchen“. Retrospektiv musste auf der Suche nach „peptidverdächtigen“ Eluatzen mehr auf kleine Zacken im Bereich der Grundlinie als auf riesige Ausschläge geachtet werden (vgl. III.4.1.3.5).

Sehr interessante Einblicke ermöglichte auch der Vergleich dieser Peptidseparierung mit anderen HPLC- Läufen. Während die fünf Peptide des CCA 61 allesamt im Bereich zwischen 20 und 30 Minuten und damit vor der Artefaktzacke bei 34 - 35 Minuten, eluiert wurden, zeigten sich im HPLC Lauf von CCA 60 (vgl. Abb. 71) in diesem Bereich keinerlei Peptide. Hier traten alle Peptide erst nach der entsprechenden Artefaktzacke auf. Bei MET 3 (vgl. Abb. 74) wurden die Peptide erst nach 38 - 39 Minuten eluiert.

Da die Peptide dieser Tumoren auf unterschiedlichen HLA- Allelen gebunden werden, ist von einer deutlich differenten Zusammensetzung v.a. im Hinblick auf ihre bindenden AS (Anker oder Hilfsanker) auszugehen, konsekutiv von einer veränderten Hydrophobizität. Nachdem die Lösungseigenschaften der Peptide jedoch direkt den Zeitpunkt ihrer Elution bedingen, lässt sich die beschriebene zeitliche Differenz ihres Auftretens schlussendlich auf die unterschiedlichen HLA- Motive zurückführen.



**Abb. 72** zeigt die Flüssigkeitschromatographie des Karzinoms CCA 61. Allgemeine Hinweise zu den einzelnen dargestellten Fakten sowie den verwendeten Markierungen und Formatierungen können Abschnitt III.4.1.3.5 entnommen werden.

#### III.4.4.4.4 Die identifizierten Peptidliganden des Karzinoms CCA 61

Frak- tion	Masse [Da]	Sequenz									Protein	AS- Position	SWISS- Prot.	HLA- Allel
		1	2	3	4	5	6	7	8	9				
12	903.5	G	<u>L</u>	A	T	D	V	Q	T	<u>V</u>	Proteasome subunit beta type 3 <sup>230</sup>	55-63	P49720	A* 02
16	927.5	A	I	V	D	K	V	P	S	<u>V</u>	Coatomer gamma subunit <sup>231</sup>	147-155	Q9Y678	A* 02
16	1050.5	N	<u>V</u>	I	R	D	A	V	<u>I</u>	<u>Y</u>	Histone H4 <sup>232</sup>	64-72	P02304	A* 03
19	1077.4	K	I	Q	A	F	D	D	I		Synovial sarcoma,(SSX 2, 3) breakpoint 2 or 3	20-28	Q16385	A* 02
20	1031.6	I	<u>L</u>	Q	A	H	L	H	S	<u>L</u>	Cadherin 17	2-10	Q12864	A* 02

**Tab. 22** zeigt die Peptidliganden der MHC- I- Komplexe, die auf dem Karzinom CCA 61 identifiziert werden konnten. Allgemeine Hinweise zu den einzelnen dargestellten Fakten sowie den verwendeten Markierungen und Formatierungen können Abschnitt III.4.1.3.6 entnommen werden. Die Markierung der motifspezifischen AS aus Fraktion 12, 16, 19 und 20 war aufgrund der unterschiedlichen Untergruppenmotive des HLA- A\*02- Allels nur eingeschränkt möglich.

<sup>230</sup> Krüger T. et al. 2005

<sup>231</sup> Weinschenk T. et al. 2002

<sup>232</sup> Stevanović S. et al. 1995

#### III.4.4.4.5 Identifizierte Peptide mit verkürzter Länge

Während die Analytik von CCA 60 Beispiele von MHC- I- Liganden mit einer Länge von zehn bzw. elf und damit mehr als den üblichen neun AS erbrachte (vgl. III.4.4.3.8), ist auch die Bindung kürzerer Proteinfragmente in den HLA-Bindungstaschen möglich. Mit KIQAFDDI in Fraktion 19 konnte auf CCA 61 ein Peptidligand detektiert werden, der aus lediglich acht AS aufgebaut war.

Die anderen HLA- Allele ausschließend, ist von einer Bindung von KIQAFDDI auf HLA- A\*02 auszugehen, wobei die neutrale AS Isoleucin I an Position 2 als Anker- AS fungieren muss. Inwieweit bei fehlender neunter AS Isoleucin in Position 8 als C- Terminus des Peptides die Funktion des zweiten Ankers erfüllen konnte, blieb unter anderem auch aufgrund der unbekanntes Allel- Subspezifizierung unklar.

### III.4.5 Karzinome des Rektums

#### III.4.5.1 Übersicht

Nr.	Interne Bezeichnung	Tumor- masse [g]	Tumor- grösse [cm]	Tumor- lysat [ml]	HLA- Typisierung der Tumoren			
					HLA-A*		HLA-B*	
1	RCA 1	5,0	5,7	50	?	?	?	?
2	RCA 2	4,7	4,0	75	?	?	?	?
3	RCA 3	10,6	?	80	?	?	?	?
4	RCA 6	8,8	7	?	3	-	7	-
5	RCA 6N	9,7	?	?	3	-	7	-
6	RCA 15	9,8	5,0 x 4,0	60	?	?	?	?
7	RCA 25	9,2	5,2 x 4,0	50	3	-	15	18

**Tab. 23** listet sämtliche untersuchte Karzinome des Rektums auf. Allgemeine Hinweise zu den einzelnen dargestellten Fakten sowie den verwendeten Markierungen und Formatierungen können Abschnitt III.4.1.3.1 entnommen werden. Wiederum lagen bei einigen Geweben keine Informationen zu Größe oder HLA- Typisierung vor (mit ? markiert). Bei Homozygotie der HLA- Allele wurde das Feld des korrelierenden Zweitallels mit – beschriftet (vgl. Tab. 10). Die 5. Probe (RCA 6N) bestand nicht aus Tumorgewebe, sondern aus unveränderter Rektumschleimhaut, die zur Korrelation mit dem ebenfalls analysierten Rektumkarzinomgewebe RCA 6 aufgearbeitet wurde.

### **III.4.5.2 Stand der Peptidanalyse der Karzinome des Rektums**

Analog den Magenkarzinomen ergaben sich auch bei den Analysen der Karzinome im Bereich des Rektums bislang keine verwertbaren Ergebnisse im Sinne von identifizierten Peptidliganden. Aus diesem Grund wurde nach dem in III.4.1.2 dargelegten Prinzip darauf verzichtet, die teils sehr vielversprechenden Ergebnisse der Edman- Sequenzierungen sowie der HPLC- Läufe hier näher zu beleuchten und stattdessen Platz für die eingehende Darstellung derjenigen Gewebe geschaffen, bei denen sich positive Resultate verzeichnen ließen.

Während die Analytik der drei Magenkarzinome abgeschlossen wurde, steht die abschließende, massenspektrometrische Analyse von einigen Rektumkarzinomen noch aus (vgl. III.4.1.1).

## **III.5 Identifikation von Peptidliganden auf** **Metastasen kolorektaler Karzinome**

### **III.5.1 Allgemeine Hinweise**

#### **III.5.1.1 Stand der Peptididentifizierung** **der Metastasen kolorektaler Karzinome**

Sämtliche Metastasen der kolorektalen Karzinome wurden inklusive der finalen Peptididentifikation am Massenspektrometer analysiert. Auf drei der sieben Gewebe konnten Liganden detektiert werden, die folgende Darstellung beschränkt sich auf diese Metastasen. Relevanz für eine Immuntherapie scheinen nur die Ergebnisse von MET 2 zu erlangen, die in IV.5.2.3 diskutiert werden.

#### **III.5.1.2 Erläuterungen zu Tabellen und Abbildungen**

Die Nomenklatur, Beschriftung und Symbolik der einzelnen Tabellen und Diagramme erfolgte analog der Darstellung bei den Karzinomen der Niere bzw. des Verdauungstraktes (vgl. III.4.1.3).

### III.5.2 Lebermetastasen kolorektaler Karzinome

#### III.5.2.1 Übersicht

Nr.	Interne Bezeichnung	Tumor-masse [g]	Tumor-grösse [cm]	Tumor-lysat [ml]	HLA- Typisierung der Tumoren			
					HLA-A*	HLA-B*		
1	MET 2	14,0	3,7	75	1	24(9)	8	27
2	MET 3	6,8	2,7 x 2,0	70	25(10)	26(10)	7	8
3	MET 4	10,2	3,0 x 3,0	90	2	26(10)	38(16)	60(4)
4	MET 5	52	8,2	240	3	29	57(17)	35
5	MET 6	2,3	?	55	?	?	?	?
6	MET 7	1,3	2	45	?	?	?	?

**Tab. 24** listet sämtliche untersuchten, in der Leber lokalisierten Metastasen mit Histologie eines kolorektalen Karzinomes auf. Allgemeine Hinweise zu den einzelnen dargestellten Fakten sowie den verwendeten Markierungen und Formatierungen können Abschnitt III.4.1.3.1 entnommen werden. Die fehlenden Informationen wie HLA- Typisierung oder Größe zu MET 6 bzw. MET 7 wurden mit ? markiert. MET 1 wird in III.5.3 dargestellt

#### III.5.2.2 Die Metastase MET 2

##### III.5.2.2.1 Klinische Aspekte zum Patienten mit der Metastase MET 2

Bei MET 2 handelte es sich um die sequentielle Lebermetastase eines Patienten mit kolorektalem Karzinom. Die Primärerkrankung wurde im Stadium T2, N0, M0, G2 mit einer tiefen anterioren Rektumresektion und Entfernung des Kolon transversum versorgt. Ein zwischenzeitlicher Anus praeter wurde im Rahmen einer Reoperation bei Anastomoseninsuffizienz sechs Monate nach dem Primäreingriff zurückverlagert. Informationen über eine adjuvante Behandlung liegen nicht vor. Aufgrund einer Rezidivsituation mit solitärer Metastase in Segment VIII der Leber wurde der Patient nach 766 Tage neuerlich operiert und hemihepatektomiert. Es zeigte sich ein grauweißlicher, zentral graugelblicher Tumor von 3,7 cm Durchmesser, der in der histologischen Aufarbeitung als tubuläres Adenokarzinom und somit als Fernmetastase identifiziert wurde.

##### III.5.2.2.2 Aufbereitung der Metastase MET 2

Die Aufarbeitung der bereits als 75 ml rotbraunes Tumorlysat tiefgefrorenen, primär 14 g schweren Metastase erfolgte ohne nennenswerte Probleme. Die Präzipitation erfolgte mit 5,3 mg W6/32 AK über eine resuspendierte Protein A-

Sepharose- Säule. Die positiven Ergebnisse bestätigten, dass auch die wiederholte Verwendung der Säule mit einer guten Bindung und adäquater Elution der MHC/AK- Komplexe einhergeht (vgl. IV.3.1.3).

### III.5.2.2.3 Die Edman- Sequenzanalyse der Metastase MET 2 vor Filtration

Während die Edman- Sequenzierung der Peptidelution von CCA 60 vor Filtration vergleichend über zwei unterschiedliche Analysatoren erfolgte, wurde bei MET 2 zwar nur ein Gerät eingesetzt, jedoch sequentiell zwei Eluate desselben Tumors analysiert (vgl. III.4.4.3.3). Hierzu wurde das Lysat mit enthaltenen AK/ MHC/ Peptid- Komplexen gemäß üblichem Vorgehen nach einer ersten Präzipitation nochmalig auf eine zweite Protein A- Sepharosesäule geladen. Die Ergebnisse beider Präzipitationen sind Tab. 25 und 26 zu entnehmen.

	Zyklus						
	1	2	3	4	5	6	7
A	57,90	48,90	55,10	67,00	72,90	72,50	82,80
D	144,60	39,50	41,10	41,00	44,00	50,80	47,10
E	173,50	60,70	63,70	45,40	49,60	129,30	65,50
F	27,20	83,10	42,60	40,10	50,50	47,50	50,10
G	50,70	47,90	49,20	43,60	42,70	55,10	52,70
H	21,10	17,50	30,30	17,70	18,10	18,40	22,00
I	20,00	139,10	22,00	20,40	20,20	21,70	26,60
K	31,00	26,10	32,60	74,90	45,30	44,90	46,40
L	44,20	62,10	117,50	234,10	110,70	81,70	85,10
M	8,10	8,90	11,80	178,70	23,50	13,00	12,50
N	73,30	25,00	24,90	26,90	30,40	40,10	41,00
P	53,80	58,40	66,70	69,60	69,80	88,60	101,80
Q	12,00	43,20	188,70	47,40	66,30	256,80	63,80
R	74,00	5,90	66,80	50,30	50,50	69,50	59,60
S	39,70	24,60	25,20	29,50	26,80	36,10	84,30
T	25,60	34,20	35,60	49,40	147,00	48,10	58,10
V	45,30	157,50	254,50	103,80	163,30	105,00	98,90
W	9,30	9,70	10,70	12,00	11,10	12,40	16,40
Y	55,10	55,40	54,10	59,50	59,60	67,30	72,80

**Tab. 25** zeigt die Sequenzierungsdaten des ersten Eluates von MET 2 vor Filtration durch das Hewlett- Packard- Gerät. Allgemeine Hinweise zu den einzelnen dargestellten Fakten sowie den verwendeten Markierungen und Formatierungen können Abschnitt III.4.1.3.2 entnommen werden. Sowohl in dieser als auch in der folgenden Tabelle der zweiten Elution waren leichte und schwere AK- Kette mit der Sequenz  $\text{DIVMTQS}$  bzw.  $\text{EVQLVER}$  in entsprechender Markierung gut abzugrenzen. Zusätzlich zeigten sich die  $\alpha$ - Kette sowie  $\beta$ 2- Mikroglobulin des MHC- I- Komplexes

Der Vergleich beider Datensätze zeigte unter Berücksichtigung methodikimmanenter Schwankung nur marginale Unterschiede. Es traten jeweils deutliche Signale beider AK- Ketten als auch Signale von schwerer Kette sowie  $\beta$ 2- Mikroglobulin des MHC- I- Komplexes in vergleichbarer Höhe auf. Ein Intensitätsabfall durch die vorangegangene Extraktion eines Teils der Proteinkomplexe konnte wider Erwarten in der zweiten Elution nicht beobachtet werden, vielmehr erschienen teilweise sogar deutlichere Signale als bei der ersten Präzipitation. Es konnte vor allem der in deutlichem Überschuss zugegebene AK W6/32 detektiert werden, die Signale der MHC- Komplexe waren zumeist gleich bleibend. Diese Ergebnisse implizieren, dass trotz suffizienter Immunpräzipitation an einer Protein A- Sepharosesäule das Restlysat weiterhin eine große Menge an AK enthält. Dies verwundert wenig, da der AK stets in deutlichem Überschuss

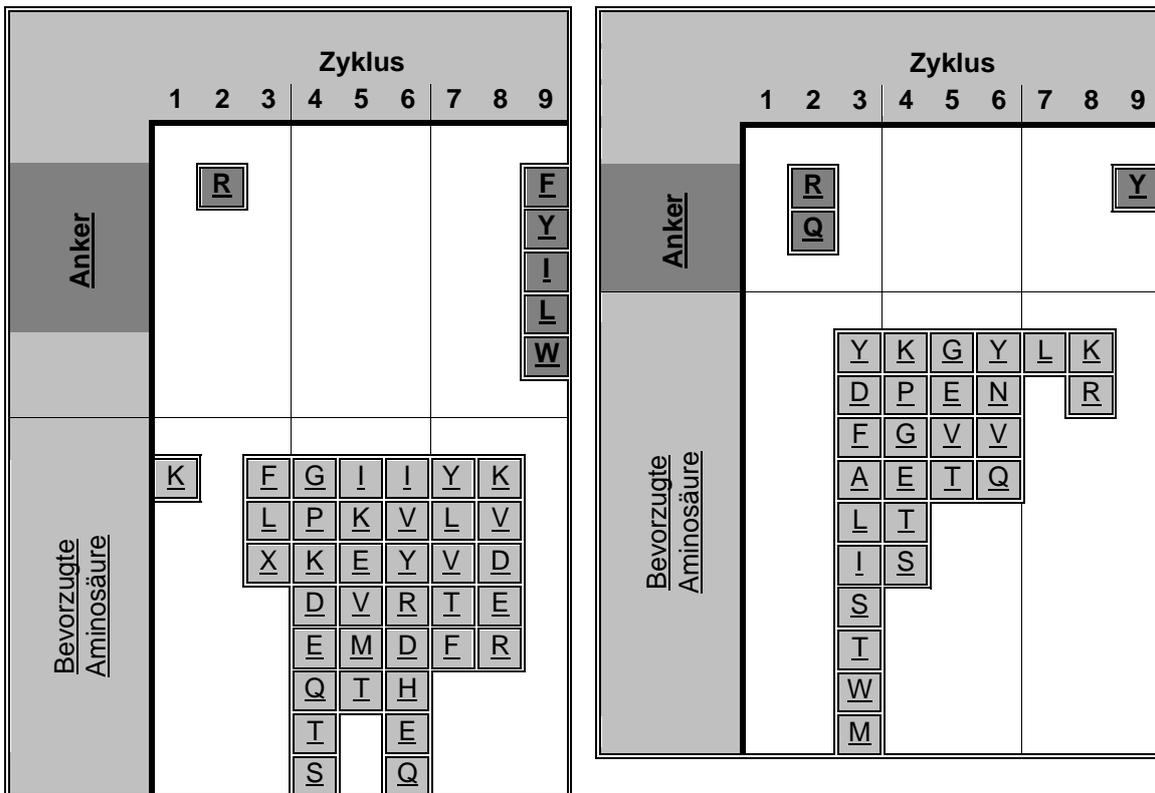
	Zyklus						
	1	2	3	4	5	6	7
A	41,90	37,70	48,90	50,70	57,60	73,10	80,80
D	216,50	34,20	35,60	31,40	36,60	56,20	44,00
E	230,60	80,30	81,30	40,00	39,60	181,80	58,70
F	14,10	101,40	28,40	28,80	70,20	62,30	54,50
G	54,80	34,40	41,40	35,80	41,60	63,50	51,50
H	7,90	28,20	30,80	13,60	14,40	16,50	15,30
I	16,30	217,20	19,70	15,20	0,00	23,70	28,50
K	33,70	27,00	45,40	128,50	76,90	91,20	81,50
L	16,30	54,70	88,50	312,20	111,10	83,70	79,70
M	5,30	7,90	12,90	318,10	33,10	16,60	13,10
N	117,90	18,30	23,10	24,40	29,10	78,50	57,30
P	60,60	46,50	55,70	56,00	72,80	92,80	133,20
Q	8,50	36,80	299,80	60,80	81,00	509,80	77,80
R	65,00	35,70	67,60	38,50	39,60	77,90	55,60
S	51,30	18,30	20,90	24,50	25,80	35,80	141,70
T	22,20	27,50	35,60	63,00	180,50	67,50	91,50
V	36,70	208,90	431,10	103,00	189,30	110,40	99,50
W	7,10	9,10	11,00	13,60	15,90	18,00	46,10
Y	55,70	43,40	41,40	41,60	53,00	64,20	74,00

**Tab. 26** zeigt die Sequenzierungsdaten von MET 2 vor Filtration durch das Hewlett- Packard- Gerätes nach nochmaliger Beladung einer Sepharosesäule und neuerlicher Präzipitation – als 2. Elution bezeichnet. Allgemeine Hinweise zu den einzelnen dargestellten Fakten sowie den verwendeten Markierungen und Formatierungen können Abschnitt III.4.1.3.2 entnommen werden

zugegeben wurde. Andererseits ließen sich jedoch ebenso signifikante Mengen an MHC- Komplex in Form von schwerer Kette und  $\beta$ 2- Mikroglobulin nachweisen, gemäß den Sequenzierungsdaten bei der zweiten Elution in kaum geringerer Menge als bei der Primärelution. Im Umkehrschluss wäre damit eine wiederholte, möglicherweise sogar drei-, vier- oder fünffache Immunpräzipitation des primären Tumorlysates zu erwägen, um sämtliche MHC- Komplexe und mit ihnen die gebundenen Peptidliganden zu asservieren. Auf diese Tatsache wird auch in Verbindung mit den Ergebnissen der Western Blots (vgl. III.2.4) zur MHC- Expression in Kapitel IV separat eingegangen werden.

III.5.2.2.4 HLA- Motive der Metastase MET 2

Tab.27 - 31 zeigen die HLA- Motive für die Allele von MET 2. Da für das subspezifizierte Allels A\*2409 kein eigenes Motiv existiert, wurde auf das der Obergruppe zurückgegriffen. Für das nicht subspezifizierte Allel B\*27 wurden die Untergruppenmotive, B\*2701 und B\*2702, dargestellt.



**Tab. 27 bzw. 28** von HLA- B\*2701<sup>233</sup> bzw. HLA- B\*2702<sup>234</sup>. Allgemeine Hinweise zu den Fakten sowie den Markierungen und Formatierungen können III.4.1.3.3 entnommen werden

<sup>233</sup> García F. et al. 1997

		Zyklus								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Bevorzugte Aminosäure	Anker			K		K				L
						R				

		Zyklus								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Bevzt AS	Anker									
	Hilfs-anker									

		Zyklus								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Bevorzugte Aminosäure	Anker									
	Hilfs-anker									

Tab. 29 zeigt das Motiv von HLA- B\*08<sup>235,236,237</sup> (links)

Tab. 30 zeigt das Motiv von HLA- A\*01<sup>238,239,240</sup> (rechts oben)

Tab. 31 zeigt das Motiv von HLA- A\*24 (rechts unten)

Allgemeine Hinweise zu den einzelnen dargestellten Fakten sowie den verwendeten Markierungen und Formatierungen der Tab. 29 - 31 können Abschnitt III.4.1.3.3 entnommen werden. Tab. 30 verwendet die Abkürzung Bevzt. AS für bevorzugte Aminosäuren analog der üblichen Darstellung

### III.5.2.2.5 Die Edman- Sequenzanalyse der Metastase MET 2 nach Filtration

Wie erwartet zeigten sich nach Entfernung von MHC- Komplexen und AK deutlich geringere Signalintensitäten, die auf die im Eluat enthaltenen Peptide zurückgeführt werden dürften. Erfreulicherweise war, abgesehen von bekannten Artefakten wie durch die AS Histidin H bedingt, nur wenig Hintergrundrauschen abzuleiten (vgl. III.4.4.3.6). In dieser Hinsicht bestach vor allem der Procise- Se-

<sup>234</sup> Röttschke O. et al. 1994  
<sup>235</sup> DiBrino M. et al. 1994  
<sup>236</sup> Malcherek G. et al. 1993  
<sup>237</sup> Sutton J. et al. 1993  
<sup>238</sup> Falk K. et al. 1994 b  
<sup>239</sup> Kubo R.T. et al. 1994  
<sup>240</sup> DiBrino M. et al. 1993

quenzer. Eine parallele Analyse der Probe mittels dem Hewlett- Packard- Gerät zeigte deutlich höhere Signale ohne kausalen Bezug, die deshalb als Hintergrundrauschen gewertet wurden, keine zusätzliche Information beinhalten und somit aus Platzgründen hier nicht präsentiert werden.

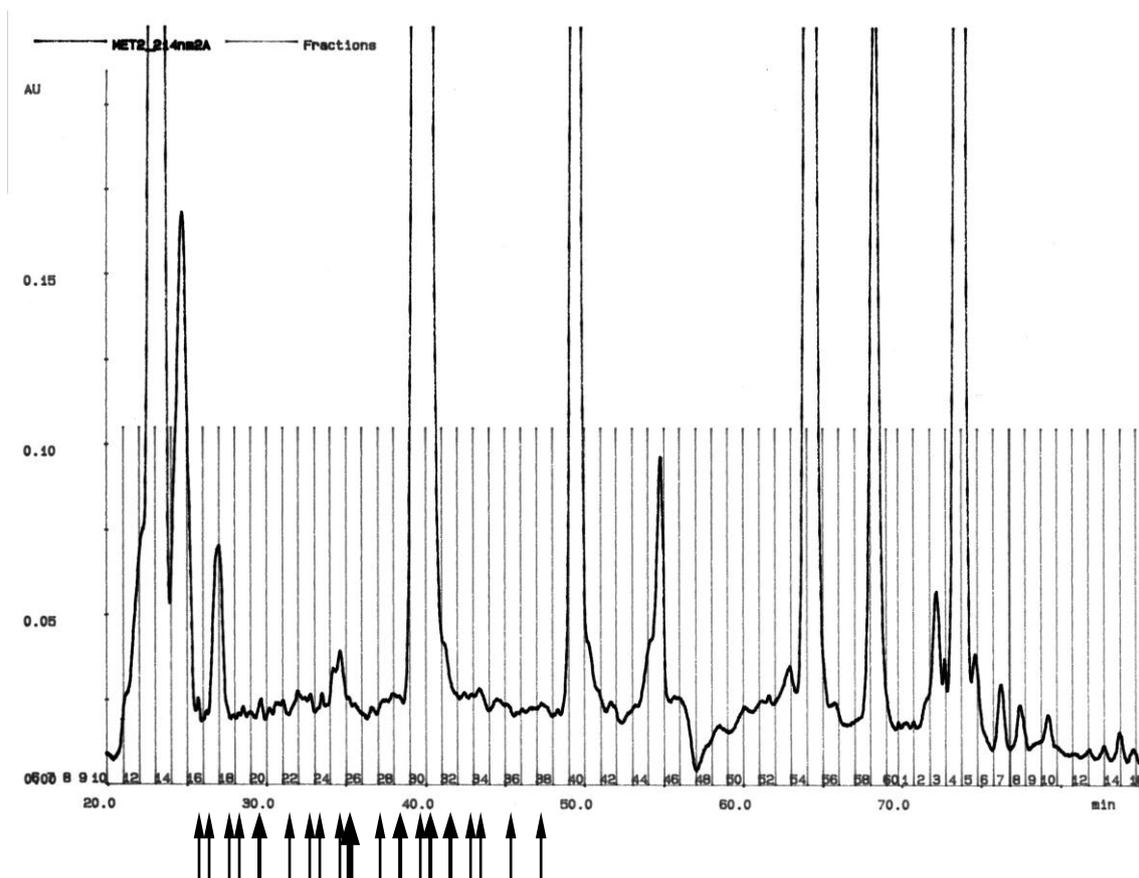
Trotz exakter Analytik spiegeln die gewonnenen Ergebnisse (vgl. Tab. 32) die Erwartungen nur wenig wider. An den Hilfsanker- bzw. Ankerpositionen der Motive schienen zwar bei einigen AS wie z.B. Serin S und Threonin T für A\*01 oder Tyrosin Y für A\*24 in Position 2 bzw. Arginin R für B\*08 in Position 5 und Phenylalanin F für A\*24 in Position 6 ein minimaler Signalanstieg detektabel zu sein. Eine klare Abgrenzung gegenüber unspezifischen Hintergrundsignalen wäre allerdings ohne exakte Kenntnis der entsprechenden AS nicht möglich. Diesen a priori ernüchternden Daten stehen die Ergebnisse der definitiv gefundenen Liganden gegenüber, die in den folgenden Kapiteln dargestellt werden.

	Zyklus						
	1	2	3	4	5	6	7
A	1,93	3,30	1,55	2,26	1,84	1,08	1,17
D	4,86	4,74	<b>3,15</b>	2,58	2,22	2,23	1,05
E	1,33	2,03	<b>1,58</b>	1,17	1,21	0,99	0,91
F	1,27	2,03	1,96	1,57	0,64	<b>1,28</b>	0,52
G	2,26	3,10	2,21	3,00	3,20	2,94	2,11
H	17,17	77,11	39,32	15,73	5,44	2,20	0,74
I	0,00	0,81	0,82	0,69	<b>0,64</b>	0,50	0,00
K	0,25	0,00	<b>0,00</b>	0,00	<b>0,00</b>	0,00	0,00
L	1,33	2,09	1,76	1,61	0,68	1,38	<b>1,12</b>
M	0,00	0,51	0,50	0,00	0,00	0,00	0,47
N	1,00	0,78	0,89	0,86	0,45	0,48	0,00
P	3,92	5,18	4,12	3,47	3,31	2,95	2,56
Q	0,00	<b>0,00</b>	0,00	0,33	0,00	0,88	0,37
R	3,99	<b>2,50</b>	25,00	2,36	<b>2,70</b>	1,65	3,08
S	2,34	<b>3,37</b>	3,00	2,90	2,32	2,31	2,05
T	2,06	<b>3,24</b>	2,06	1,51	1,34	1,48	0,92
V	2,43	3,53	3,06	1,31	<b>1,06</b>	1,70	1,69
W	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Y	1,50	<b>3,08</b>	2,82	2,34	1,74	0,65	1,24

**Tab. 32** zeigt die Sequenzierung des Eluates von MET 2 nach Filtration durch den Procise- Sequenzer. Allgemeine Hinweise zu den einzelnen dargestellten Fakten sowie den verwendeten Markierungen und Formatierungen können Abschnitt III.4.1.3.4 entnommen werden. Gemäß den in Tab.27 - 31 dargestellten Motiven von HLA -B\*08, -B\*2701, -B\*2702, sowie -A\*01 und -A\*24 wurden die AS an den Anker- und Hilfsanker- Positionen markiert. Der Übersichtlichkeit wegen wurde auf die Markierung der bevorzugten Aminosäuren verzichtet

Bei ansonsten gutem prädiktivem Potential (vgl. CCA 60) schien die Edman-Sequenzierung als präzise und sensitive Methode hier nur eine sehr vorbehaltliche Aussage über etwaige Peptidliganden treffen zu können. Inwieweit dies als Limitierung der Methode als Zwischenanalyse zum Tragen kommt, wird in Kap. IV diskutiert. Mögliche Gründe der verminderten Aussagekraft könnten in diesem Fall, neben einer geringeren Menge des jeweiligen Peptids, möglicherweise in einer nur begrenzten Überschneidung der Anker der einzelnen HLA-Motive und einer zusätzlich bestehenden großen Anzahl bevorzugter AS zu sehen sein. Aufgrund der differierenden Motive wäre so von einem verstärkten Nivellierungseffekt einzelner Signale und einem konsekutiv unspezifischeren Gesamtergebnis auszugehen.

### III.5.2.2.6 Die Flüssigkeitschromatographie der Metastase MET 2



**Abb. 73** zeigt die Flüssigkeitschromatographie der Lebermetastase MET 2. Allgemeine Hinweise zu den einzelnen dargestellten Fakten sowie den verwendeten Markierungen und Formatierungen können Abschnitt III.4.1.3.5 entnommen werden

Die Lebermetastase MET 2 lieferte von sämtlichen untersuchten Geweben mit insgesamt 26 Peptiden das breiteste Spektrum an identifizierten Liganden (vgl. Tab. 33). In der chromatographischen Trennung des Eluates traten die regelmäßig reproduzierten Artefaktssignale am augenfälligsten hervor, ansonsten zeigten sich keine spektakulären Befunde. Eine eindeutige Korrelation zwischen veränderter Extinktion und detektierten Peptiden einer jeweiligen Fraktion, wie z.B. in Abb. 72 für CCA 61 dargestellt, ließ sich nicht ableiten.

Interessanterweise war bei MET 2 das Spektrum der detektierten Liganden im Hinblick auf die jeweiligen Fraktionen deutlich weiter gefasst als bei anderen Karzinomen. Während Peptide bei CCA 60 nur zu späten Zeiten (Fraktion 34 - 49, vgl. III.4.4.3.7 bzw. III.4.4.3.8) oder bei CCA 61 nur zu sehr frühen Zeiten (Fraktion 12 - 20, vgl. III.4.4.4.3 bzw. III.4.4.4.4) zu finden waren, erstreckte sich das Detektionsintervall der Liganden bei MET 2 über einen weiten Bereich von Fraktion 16 bis 38. Obwohl die jeweiligen HLA- Allele hierfür verantwortlich sein dürften, zeigte sich zudem eine auffallend gleichmäßige Verteilung der detektierten Peptide auf sämtlichen HLA- Allele über die gesamte Breite der einzelnen Fraktionen (vgl. III.5.2.2.7). Dies ist insbesondere deshalb bemerkenswert, da gerade die Kongruenz der HLA- Motive im Hinblick auf die Löslichkeitseigenschaften der gebundenen Peptide in anderen Fällen als Ursache des engefassten Intervalls gesehen wurde, in dem die Liganden gefunden wurden (vgl. CCA 60, 61). Inwieweit diese Beobachtung den Hypothesen der vorangegangenen Kapitel widerspricht, wird im Rahmen der Diskussion erörtert.

#### III.5.2.2.7 Die identifizierten Peptidliganden der Metastase MET 2

Bei MET 2 konnten mit Abstand die meisten Peptide auf einem Tumorgewebe beschrieben werden. Die Einordnung der detektierten Peptide bzw. ihrer Ursprungsproteine in den Gesamtkontext der Dissertation erfolgt wie bei den bisher dargestellten Tumoren im Rahmen der Diskussion in Kap. IV.

Frak- tion	Masse [Da]	Sequenz										Protein	AS- Position	SWISS- Prot.	HLA- Allel
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10				
16	1138.5	T	<b>S</b>	<b>D</b>	Q	Q	R	Q	L	<b>Y</b>		Occludin	424- 432	Q16625	A*01
17	1110.5	V	<b>T</b>	<b>E</b>	I	D	Q	D	K	<b>Y</b>		Filamin 1	2380- 2388	P21333	A*01
18	985.6	G	<b>R</b>	I	<b>G</b>	<b>V</b>	I	T	N	R		Ribosomal protein S4 <sup>241</sup>	189- 197	P12750	B*27
19	1091.6	K	<b>Y</b>	I	S	K	P	E	N	<b>L</b>		FLJ12577	199- 207	Q9H9S4	A*24
20	965.5	N	<b>T</b>	<b>D</b>	S	P	L	R	<b>Y</b>		40S ribosomal protein SA	149- 156	P08865	A*01	
20	1121.6	V	<b>Y</b>	I	<b>E</b>	K	N	D	K	<b>L</b>		v-erb-b2 avian erythro- blastic leukemia viral oncogene homolog 3	147- 155	Q9BUD7	A*24
22	1017.6	P	<b>T</b>	<b>D</b>	<b>P</b>	K	V	V	V	<b>Y</b>		Absent in melanoma 1 protein	1129- 1137	Q9Y4K1	A*01
23	1120.5	A	<b>Y</b>	V	H	M	V	T	H	<b>E</b>		Testis enhanced gene transcript <sup>242</sup>	45- 53	P55061	A*24
24	1086.6	V	<b>Y</b>	S	H	V	I	<b>Q</b>	<b>K</b>	<b>L</b>		Serine Dehydratase	277- 285	P20132	A*24
25	1160.5	V	<b>Y</b>	I	S	E	H	E	H	<b>E</b>		Cleft lip and palate associated trans- membrane protein <sup>243</sup>	107- 115	Q9BSS5	A*24
26	1055.6	V	<b>Y</b>	<b>L</b>	<b>K</b>	H	P	V	S	<b>L</b>		Proteasom 26S subunit non-ATPase 8	131- 139		A*24
26	1089.6	I	<b>T</b>	<b>D</b>	S	A	<b>G</b>	H	I	L	<b>Y</b>	Transmembrane trafficking protein <sup>244</sup>	76- 85	P49755	A*01
26	1147.6	Y	<b>Q</b>	F	<b>I</b>	<b>G</b>	I	K	K	<b>Y</b>		Hypothetical protein MGC14697 <sup>245,246</sup>	10- 18		B*27
28	1011.6	V	A	V	G	R	A	L	Y	Y		DNA damage binding protein 1	510- 518	Q16531	?
29	1086.6	K	<b>Y</b>	<b>P</b>	<b>D</b>	R	V	P	V	<b>I</b>		GABA A receptor associated protein	24- 32	Q9BY60	A*24

<sup>241</sup> Luckey C.J. et al. 2001<sup>242</sup> Kubo R.T. et al. 1994<sup>243</sup> Krüger T. et al. 2005<sup>244</sup> Krüger T. et al. 2005<sup>245</sup> Krüger T. et al. 2005<sup>246</sup> Falk K. et al. 1993

29	1162.6	R <u>Y</u> <u>P</u> <u>D</u> S H Q L <u>E</u>	Ras-GAP SH 3 binding protein	326- 334	Q3UN86	A*24
30	1082.6	G <u>R</u> V F <u>I</u> <u>I</u> K S <u>Y</u>	High glucose-related protein 8 <sup>247,248</sup>	410- 418	Q9BUI5	B*27
30	1161.5	Y <u>T</u> <u>D</u> <u>P</u> E V F K <u>Y</u>	Prostaglandin synthetase	398- 406	Q16647	A*01
31	875.5	G <u>Y</u> <u>G</u> G G F G N <u>E</u>	Grancalcin	5- 13	M81637	A*24
31	1104.5	A <u>Y</u> V H M V T H <u>E</u>	Testis enhanced gene transcript <sup>249</sup>	45- 53	P55051	A*24
32	1078.6	T <u>Y</u> <u>L</u> <u>E</u> K A I <u>K</u> <u>I</u>	Ubiquitin caboxyl-terminal hydrolase 7	1092- 1100	Q93009	A*24
32	1289.6	D <u>T</u> <u>D</u> H <u>Y</u> F L R <u>Y</u>	CGI- 06 protein <sup>250</sup>	161- 169	QSY2Z5	A*01
33	1101.7	A I <u>D</u> Q L H L E <u>Y</u>	Alpha actinin 4 <sup>251</sup>	525- 533	O43707	A*01
34	1073.6	V <u>Y</u> <u>L</u> <u>P</u> N I <u>N</u> <u>K</u> <u>I</u>	KIA A0740	526- 534	O94844	A*24
36	1058.5	S <u>T</u> <u>D</u> H I P I L <u>Y</u>	GFAT1M <sup>252</sup>	218- 226	Q99MJ4	A*01
38	1079.6	G <u>T</u> <u>D</u> E L R L L <u>Y</u>	Hypothetical protein FLJ12525	107- 115	Q9H9V5	A*01

**Tab. 33** zeigt die Peptidliganden der MHC- I- Komplexe, die auf der Lebermetastase MET 2 eines kolorektalen Karzinoms detektiert werden konnten. Allgemeine Hinweise zu den einzelnen dargestellten Fakten sowie den verwendeten Markierungen und Formatierungen können Abschnitt III.4.1.3.6 entnommen werden. Von der üblichen Standardlänge von 9 AS abweichend wurden bei ITDSAGHILY aus 10 AS (Fraktion 26) bzw. NTDSPLRY aus 8 AS (Fraktion 20) die Markierung der einzelnen AS nach ihrer Funktion und nicht strikt nach ihrer Position gesetzt (vgl. III.4.4.3.10)

#### III.5.2.2.8 Das identifizierte Peptid TYLEKAIKI aus Fraktion 32

Analog einzelner Peptide des CCA 60 (vgl. III.4.4.3.9) wurde bei MET 2 mit dem TYLEKAIKI ein Peptid identifiziert, das durch eine Struktur auszeichnet, die sich optimal in die Bindungstasche HLA- A\*24 Allele einpasst. Neben beider Anker-AS erfolgte die Bindung über die drei bevorzugten AS an Position 3, 4, und 8.

<sup>247</sup> Krüger T. et al. 2005

<sup>248</sup> Lopez de Castro J.A. et al. 2004

<sup>249</sup> Kubo R.T. et al. 1994

<sup>250</sup> Krüger T. et al. 2005

<sup>251</sup> Krüger T. et al. 2005

<sup>252</sup> Kubo R.T. et al. 1994

### III.5.2.3 Die Metastase MET 3

#### III.5.2.3.1 Klinische Aspekte zum Patienten mit der Metastase MET 3

Auch bei MET 3 handelt es sich um eine Lebermetastase eines initial mäßig differenzierten Adenokarzinoms der rechten Kolonflexur, das im frühen Stadium pT1, pN0, M0, G2 primär operiert wurde. 243 Tage nach der Erstdiagnose traten bei dem 67-jährigen Patienten Fernmetastasen in der Leber auf. In einer atypischen Leberresektion zeigten sich mehrere graugelb- glasige, unscharf begrenzte Metastasen in den Segmenten VII, VIII und IVa. Histologisch imponierten diese bis 2,7 cm messenden Metastasen als stark verschleimende Adenokarzinome, sogenannte Gallertkarzinome. Parallel zur Metastasierung trat ein Anstieg des Tumormarkers CEA (vgl. I.5.3.1.3) von 2,4 auf 4,0 ng/ml auf.

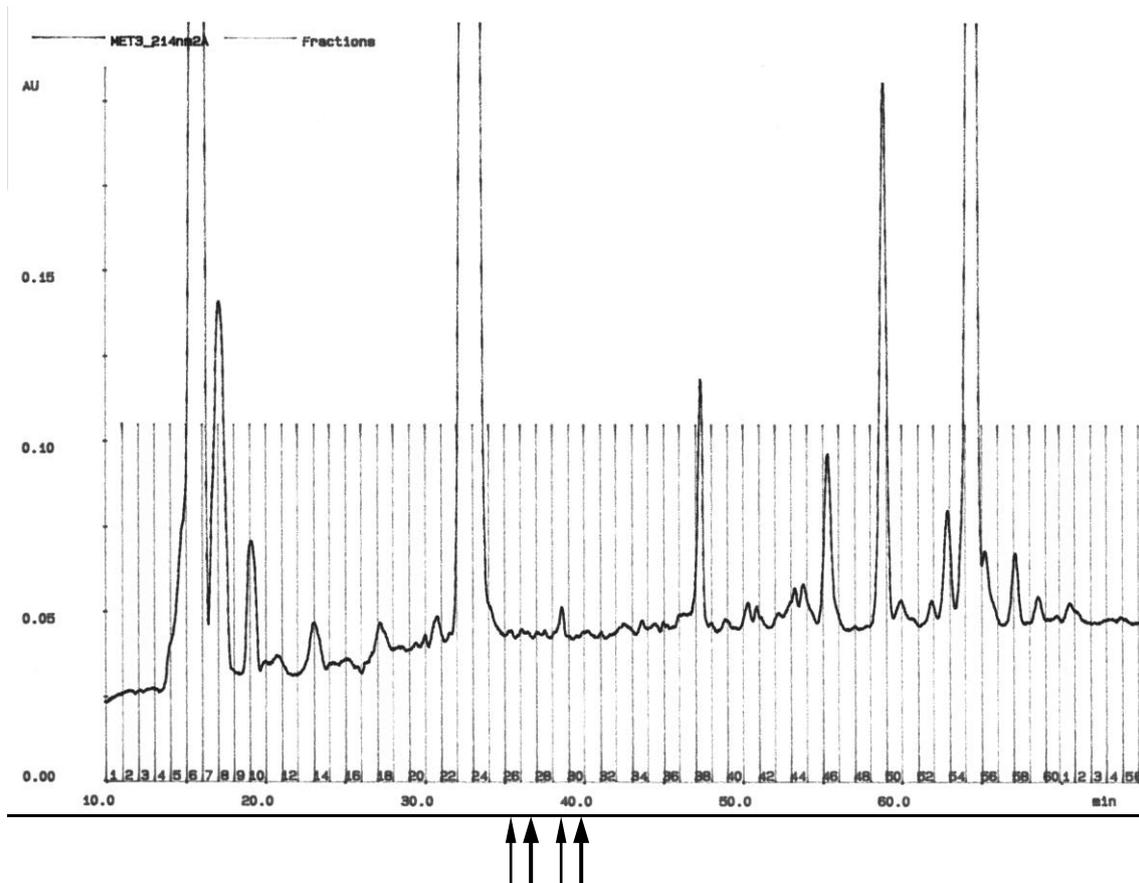
#### III.5.2.3.2 Aufbereitung der Metastase MET 3

Als insgesamt 19. Tumor erfolgte die Aufarbeitung dieses tiefgefrorenen Metastasengewebes. Nach der üblichen Homogenisierung ergab sich ein tief rotbraunes Lysat, das auf größere Mengen enthaltenen Hämoglobins schließen ließ und eine starke Durchblutung des Tumors nahelegte. Daneben schien auch eine bindegewebige Durchsetzung des Metastasengewebes möglich zu sein, zumal die notwendige Filtration relativ schwer verlief.

Die Edman- Sequenzierung erbrachte mit MET 2 vergleichbare Resultate, so dass auf deren Darstellung verzichtet werden konnte. Vor der Filtration waren deutliche Signale durch MHC und AK zu erkennen, nach der Filtration konnten bei insgesamt nur schwachen Signalen lediglich minimale Intensivierungen an den Stellen der bekannten Anker- AS festgestellt werden. Demzufolge wurde auf die gesonderte Darstellung der einzelnen HLA- Motive verzichtet, diese können der SYFPEITHI- Datenbank unter A\*25(10), A\*26(10), B\*07 entnommen werden. B\*08 wurde bereits in Tab.31 unter III.5.2.2.4 abgebildet. Allerdings beschränkten sich die gefundenen Peptide auf die Allele A\*26 und B\*07.

### III.5.2.3.3 Die Flüssigkeitschromatographie der Metastase MET 3

Auch die Flüssigkeitschromatographie der Metastase MET 3 zeigte Parallelen zur Analyse vorheriger Tumoren. In diesem Fall waren analog CCA 60 sämtliche Peptide in mittleren bis späten Phasen der Trennung, also von eher lipophilerem Charakter separiert und detektiert worden (vgl. III.4.4.3.7 bzw. III.5.2.2.6). Eine Abgrenzung eindeutiger Signale durch die Peptide gelang wiederum nicht.



**Abb. 74** zeigt die Flüssigkeitschromatographie der Lebermetastase MET 3. Allgemeine Hinweise zu den einzelnen dargestellten Fakten sowie den verwendeten Markierungen und Formatierungen können Abschnitt III.4.1.3.5 entnommen werden

III.5.2.3.4 Die identifizierten Peptidliganden der Metastase MET 3

Fraktion	Masse [Da]	Sequenz										Protein	AS-Position	SWISS-Prot.	HLA-Allel
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10				
26	1093.6	<u>E</u>	<u>V</u>	T	<u>E</u>	L	L	A	R	<u>Y</u>		DNA-directed RNA Polymerase II (23Kd)	155- 163	P19388	A*26
27	1062.6	F	<u>I</u>	V	D	Q	<u>I</u>	R	A	I		Elongation factor 2	4- 12	P13639	A*26 ?
27	1196.6	<u>E</u>	<u>V</u>	V	S	E	P	F	R	S	<u>F</u>	26S Proteasome regulatory subunit S2	581- 590	Q13200	A*26
29	1037.5	<u>D</u>	<u>V</u>	<u>I</u>	S	N	<u>I</u>	E	T	<u>E</u>		Transcription factor SOX-9	281- 289	P48436	A*26
30	1058.6	A	<u>P</u>	F	L	R	N	V	E	<u>L</u>		Similar to KIA A1007 protein	81- 89	Q9BVZ6	B* 07
30	1091.6	<u>E</u>	<u>V</u>	V	<u>E</u>	R	<u>V</u>	L	T	<u>E</u>		F-box protein Fbx22	27- 35	Q9UKC0	A*26

**Tab. 34** zeigt die Peptidliganden der MHC- I- Komplexe, die auf der Lebermetastase MET 3 eines kolorektalen Karzinoms ausgemacht werden konnten. Allgemeine Hinweise zu den einzelnen dargestellten Fakten, den verwendeten Markierungen sowie Formatierungen können Abschnitt III.4.1.3.6 entnommen werden. Das Peptid FTVDQIRAI der Fraktion 27 weist mit Threonin T lediglich eine potentielle Bindungsposition an das HLA- Allel A\*26 auf und wurde entsprechend als fraglicher Bindungspartner mit einem ? versehen. Andererseits wurde das Peptid definitiv auf diesem Gewebe identifiziert, eine Bindung an ein anderes HLA- Motiv ist bei komplett fehlenden Bindungsvalenzen damit umso unwahrscheinlich. Mit EVVSEPFRSF aus Fraktion 27 zeigte sich neuerlich ein überlanges Peptid aus 10 AS. Analog dem bisherigen Vorgehen wurden die Bindungs- AS nach Funktion und nicht strikt nach Position markiert

**III.5.2.4 Die Metastase MET 4**III.5.2.4.1 Klinische Aspekte zum Patienten mit der Metastase MET 4

Im Gegensatz zur sequentiellen Metastasierung von MET 2 und MET 3 mit einer Latenz von Erstdiagnose bis Fernmetastasierung von bis zu zwei Jahren (vgl. Abb. 54) bestand der Verdacht, dass MET 4 als lokal fortgeschrittenes Kolonkarzinom (pT3, pN0, G2) bereits bei Erstdiagnose in fernmetastasiertem Zustand vorlag pM1<sub>hepatisch?</sub>. Zusätzlich war der Patientenakte der geäußerte, allerdings histologisch nicht gesicherte Verdacht auf eine generalisierte Lymphangiosis carcinomatosa zu entnehmen. Damit ist der in Abb. 54 dargestellte minimale Zeitraum von Erstdiagnose bzw. Operation des Primarius bis zur erweiterten Hemihepatektomie des rechten Leberlappens als Therapie der dortigen Metastasierung von 41 Tagen eher auf den Zustand des Patienten bzw. Opera-

tionsstrategien zurückzuführen als auf eine tatsächliche sequentielle Metastasierung. Histologisch zeigte die 3,0 cm messende Metastase ein mittelgradig differenziertes Adenokarzinom G2, von dem 10,2 g als MET 4 analysiert wurden.

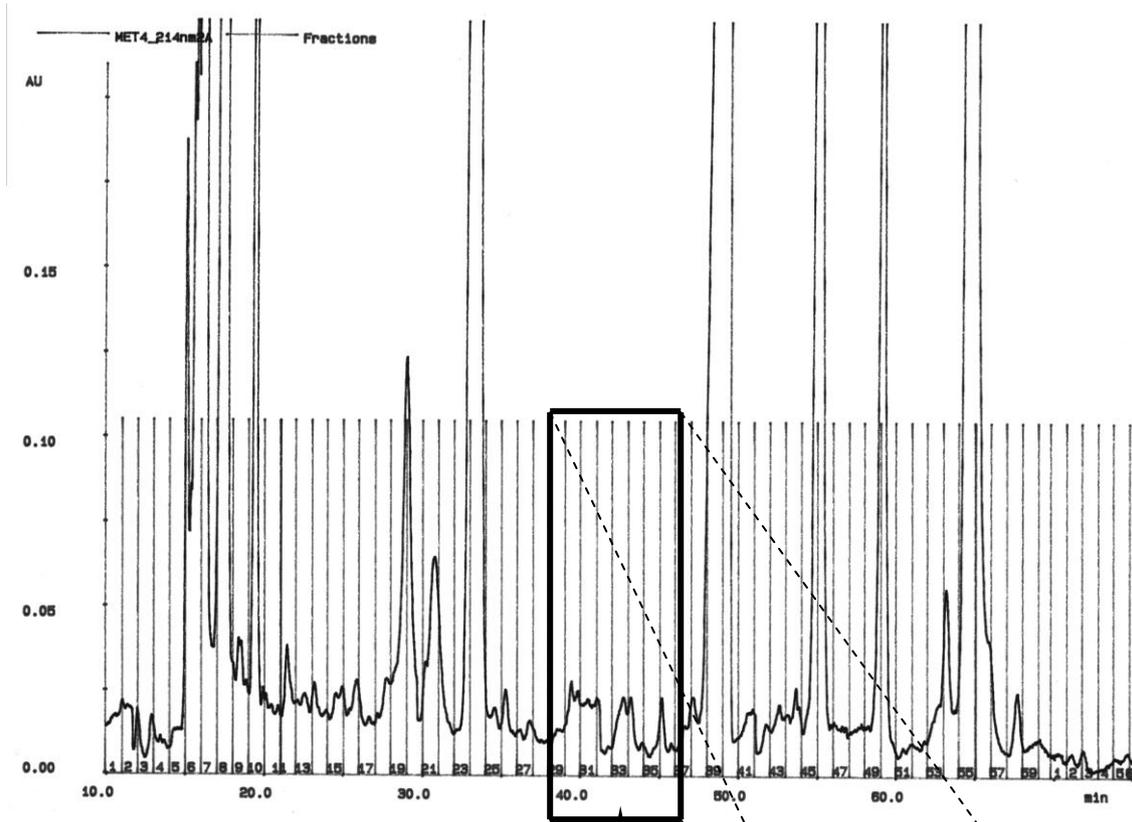
Leider musste sechs Monate nach primärer Leberoperation eine neuerliche hepatische Filia über eine perkutane Radiofrequenzablation therapeutisch angegangen werden. Aufgrund dieser Therapie konnte kein weiteres vitales Material asserviert werden. Über sonstige Therapie ist nicht bekannt.

#### III.5.2.4.2 Aufbereitung der Metastase MET 4

Bei der Aufbereitung des Tumors ergaben sich 90 ml dunkelrotes Lysat, vermutlich wiederum aufgrund hoher Hämoglobinbeimengung (vgl. MET 3). Bei HLA- A\*02- Positivität erfolgte eine zweimalige Präzipitation des Lysates, zuerst mit 5,7 mg AK BB7.2, danach mit 8,4mg AK W6/32. Es wird nochmals betont, dass auch bei diesen Präzipitationen die Protein A- Sepharose- Säulen reutilisiert wurden und, gemessen am Ergebnis, trotz wiederholter Anwendung keine Qualitätseinbußen erkennbar waren (vgl. IV.3.1.3).

#### III.5.2.4.3 Die Flüssigkeitschromatographie der Metastase MET 4

Im Unterschied zu oben dargestellten Tumoren zeigten sich in der chromatographischen Trennung der Peptidliganden für MET4 prägnante Signale zwischen den bekannten Artefakt- Peaks. Diese waren in Intensität und Häufigkeit sehr viel deutlicher als z.B. bei MET 3 (vgl. III.5.2.3.3, Abb. 74). Demgegenüber standen die ernüchternden Ergebnisse der darauf folgenden Sequenzanalyse am Massenspektrometer mit Nachweis von lediglich zwei Peptiden. Zurückkehrend zu den vormaligen Darstellungen und im Vorgriff auf Kapitel IV stellte sich die Frage nach dem prädiktiven Wert der HPLC um so mehr. Aus Vergleichsgründen wurde die HPLC von MET 4 trotz der Ergebnisse hier demonstriert.

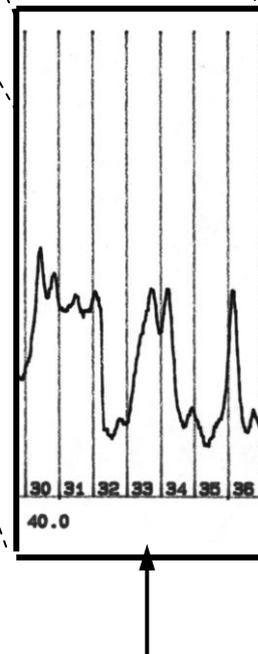


**Abb. 75:** Flüssigkeitschromatographie des 3. Eluates von MET 4 (Präzipitation mit dem AK W6/32). Allgemeine Hinweise zu den einzelnen dargestellten Fakten sowie den verwendeten Markierungen und Formatierungen können Abschnitt III.4.1.3.5 entnommen werden.

Auf die Darstellung der HPLC-Trennungen nach Präzipitation mit BB7.2 (Elution 1+2) wurde aus Platzgründen verzichtet, die erzielten Ergebnisse sind dieser Analytik jedoch äquivalent und bergen keinen zusätzlichen Informationsgewinn. Auffällig sind die prägnanten Signale zwischen den Artefaktzacken, für die sich im Folgenden jedoch kein Korrelat identifizieren ließ

**Abb. 76:** Detailausschnitt aus Abb. 75:

Da allein aus Fraktion 33 Peptide identifiziert werden konnten und sich hier Extinktionsveränderungen nachweisen ließen, wurde dieser Bereich nebenstehend vergrößert gezeigt. Ursachen der sonstigen Peaks ließen sich nicht definieren



#### III.5.2.4.4 Die identifizierten Peptidliganden der Metastase MET 4

Auf der Lebermetastase MET 4 konnten lediglich zwei Peptide in der Fraktion 33 nach der HPLC-Trennung entdeckt werden. Deshalb wurde auf die Darstellung der Edman-Sequenzierung sowie der HLA-Motive verzichtet.

Fraktion	Masse [Da]	Sequenz									Protein	AS-Position	SWISS-Prot.	HLA-Allel
		1	2	3	4	5	6	7	8	9				
33	942.5	S	E	S	P	I	V	V	V	L	Microsomal signal peptidase <sup>253,254,255</sup>	45- 53	P21378	B*40
33	1111.6	<u>E</u>	<u>L</u>	<u>I</u>	<u>E</u>	R	I	P	E	<u>L</u>	Transferrin receptor protein	575- 583	P02786	A*26

**Tab. 35** zeigt die Peptidliganden der MHC- I- Komplexe, die auf der Lebermetastase MET 4 eines kolorektalen Karzinoms identifiziert werden konnten. Allgemeine Hinweise zu den einzelnen dargestellten Fakten, den verwendeten Markierungen sowie Formatierungen können Abschnitt III.4.1.3.6 entnommen werden. Aufgrund des bislang fehlenden Motivs des Allels HLA-B\*60(04) konnte keine Markierung von Anker-, Hilfsanker- oder bevorzugten AS erfolgen

### III.5.2.5 MET 5

Wie Tab. 24 unter III.5.2.1 zu entnehmen, lieferte die Aufarbeitung der Lebermetastase MET 5 keinerlei Liganden, so dass auf eine ausführliche Darstellung des Tumors, der Aufarbeitung und der Zwischenergebnisse verzichtet wurde.

### III.5.3 Nierenmetastasen kolorektaler Karzinome

Nr.	Interne Bezeichnung	Tumor-masse [g]	Tumor-grösse [cm]	Tumor-lysat [ml]	HLA- Typisierung der Tumoren			
					HLA-A*		HLA-B*	
1	MET 1	6,8	6	7,5	?	?	?	?

**Tab. 36** zeigt die Nierenmetastase eines kolorektalen Karzinomes. Allgemeine Hinweise zu den einzelnen dargestellten Fakten sowie den verwendeten Markierungen und Formatierungen können Abschnitt III.4.1.3.1 entnommen werden.

Die HLA- Typisierung der Metastase war unbekannt und wurde deshalb mit ? markiert

Da sich auch aus der Analyse der einzelnen renalen Metastasen eines kolorektalen Karzinoms nach Edman- Sequenzierung, Chromatographie sowie abschließender Massenspektrometrie keine verwertbaren Peptidliganden auffinden ließen, wurde auf die eingehende Darstellung ebenfalls verzichtet.

<sup>253</sup> Krüger T. et al. 2005

<sup>254</sup> Hillen N. et al. 2008

<sup>255</sup> Falk K. et al. 1995 b

## IV. Diskussion

### IV.1 Hintergründe und Zielsetzungen der Dissertation

**„Bisher mussten wir uns gegen die Natur behaupten.**

**Von nun an müssen wir uns gegen unsere eigene Natur behaupten.“**

Den Bogen zu diesen einleitenden Worten von Dennis Gabor spannend, werden im Folgenden die Untersuchungen, Methoden und Ergebnisse dieser Dissertation im Kontext von Entstehung, Entwicklung, Persistenz und Progredienz, aber auch Therapie neoplastischer Erkrankungen beleuchtet. Die gewonnenen Erkenntnisse werden dabei in das aktuelle Behandlungskonzept von Nierenzell- und kolorektalen Karzinomen eingebettet, das aus jahrzehntelanger Erfahrung und durch unermüdliche Forschung erstellt wurde.

Anfangs wurde lokal mit Skalpell oder Strahlung bzw. systemisch mit destruirenden „Giften“ über Jahrzehnte hinweg gegen Tumorerkrankungen vorgegangen. Obwohl sich hierdurch schrittweise Therapieerfolge verzeichnen ließen, standen und stehen Ärzte auch heute noch tagtäglich vor Patienten, deren „Natur“ überhand genommen hat, die von Malignomen „überriesen und verschlungen“ werden und innerhalb kurzer Zeit versterben.

Mit dem Wissen, die aggressivsten Formen maligner hämatologischer Erkrankungen wie z.B. Hochrisikoleukämien nur durch eine allogene Stammzelltransplantation und damit den Transfer des gesamten Immunsystems heilen zu können, stellt sich nicht nur bei diesen Entitäten die Frage, ob die Mechanismen des Körpers nicht effektiver genutzt werden müssten. Diese Gedanken geben den Weg von einer ungezielten Gewebedestruktion mit Skalpell, Bestrahlung und Chemotherapie hin zu einer gezielten, spezifischen Eradikation proliferierender Strukturen vor.

Damit allerdings das eigene Immunsystem als „Therapeutikum“ zum Einsatz gebracht werden kann, muss das Wissen einerseits über das humane Immun-

system selbst, andererseits über tumoröse Erkrankungen sowie vor allem über die gegenseitige, komplexe Interaktion stetig gemehrt werden.

In der vorliegenden Arbeit habe ich mich auf die Charakterisierung nativen Nierenzell- und Kolonkarzinomgewebes konzentriert, um hierüber eine Verbesserung bestehender Behandlungsmethoden zu erreichen. Mit der Identifikation von MHC- I- assoziierten Peptiden und ihren Ursprungsproteinen bestand das Ziel darin, bekannte sowie neue tumorassoziierte Antigene als Strukturäquivalente zu beschreiben, die eine Differenzierung zwischen Tumor und Organparenchym erlauben (vgl. Kap. I). Hierauf aufbauend soll das Immunsystem stimuliert, vor allem jedoch spezifisch moduliert werden, um dessen Potenz gezielt gegen diese differierenden Strukturen und damit den Tumor zu richten, ihn zu kontrollieren, einzudämmen und zurückzudrängen. Dieser immunologische Therapieansatz nutzt die immanenten Mechanismen des humanen Immunsystems zur gezielten Destruktion maligner Gewebe aus.

Neben diesem Hauptziel – der Detektion unbekannter tumorassoziiierter Antigene – strebte ich durch Strukturierung und Standardisierung eine Verbesserung der bislang bestehenden Methodik an, um über eine exaktere, effizientere und schnellere Identifizierung der Peptidliganden künftig eine individuelle Tumoranalyse und damit eine individuelle Immuntherapie jedes einzelnen Patienten zu ermöglichen.

Um sowohl die Ligandenidentifikation als auch die Methodenstandardisierung optimal gestalten zu können, wurden sämtliche Untersuchungen auf vorangeschalteten Analysen der Tumoren und damit eine genauere Charakterisierung des Ausgangsmaterials basiert. Hiervon ausgehend werden nachfolgend die in Kapitel III dargestellten Ergebnisse einzeln beleuchtet und der erwähnte Weg hin zu einer effektiveren Immuntherapie aufgezeigt (vgl. IV.6).

## IV.2 Die analysierten Tumoren

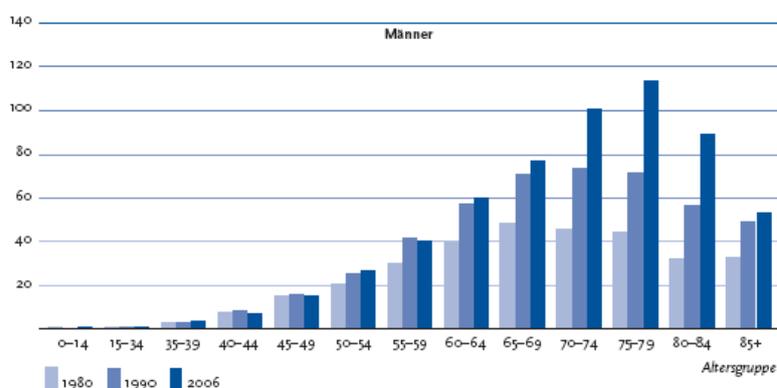
### IV.2.1 Allgemeine Charakteristika der analysierten Tumoren

Durch die große Anzahl von über 60 analysierten Tumoren konnten nach Entität getrennte Kohorten geformt und daraus Informationen gewonnen werden, die über eine Betrachtung nur einzelner Gewebe hinausging. Den repräsentativen Charakter der jeweiligen Kohorte beweist folgende Gegenüberstellung mit grossen Kollektiven<sup>256</sup>.

#### IV.2.1.1 Die analysierten Nierenzellkarzinome

Die Statistiken des Robert Koch Institutes aus dem Jahr 2006 zeigen für das Nierenzellkarzinom in Deutschland eine jährliche Neuerkrankungsrate von 10.050 Fällen bei Männern und 6.440 Fällen bei Frauen, damit ein Verhältnis von 5 : 3 zu Ungunsten der Männer. Unser Kollektiv ergab bei 12 Geweben, die von 7 Männern und 5 Frauen stammten, ein vergleichbares Verhältnis (vgl. Abb. 49).

Auch die altersspezifische Inzidenz unserer kleinen Kohorte korrelierte ordentlich mit den Daten des Robert Koch Instituts (vgl. Abb. 52, 77). Die Inzidenz stieg mit dem 50. Lebensjahr signifikant an und sank ab dem 71. Lebensjahr. Im gesamtdeutschen Kollektiv hingegen lässt sich der Anstieg zwar geringer,



jedoch in jüngerem Alter nachweisen, während der Inzidenzrückgang erst über dem 80. Lebensjahr eintritt. Die entstehenden Diskrepanzen lassen sich durch eine geringere Operations-

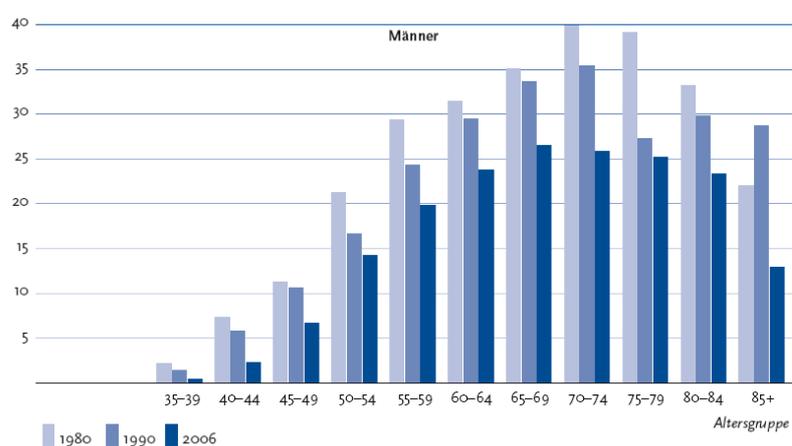
**Abb. 77:** Altersspezifische Erkrankungsrate am Nierenzellkarzinom in Deutschland, beispielhaft für Männer in den Jahren 1980, 1990, 2006

<sup>256</sup> www.rki.de

frequenz älterer Patienten, einhergehend mit einer Unterrepräsentation der Gewebe zwischen dem 70. und 80. Lebensjahr, erklären. Beim Nierenzellkarzinom wird dieser Bias-Effekt dadurch aggraviert, dass durch seltenere, lokale Komplikationen als beispielsweise beim Kolonkarzinom weniger palliative chirurgische Eingriffe nötig sind und dadurch seltener Gewebe asserviert werden kann.

#### IV.2.1.2 Die analysierten intestinalen Karzinome

Ähnlich repräsentativ zeigte sich die Analyse der intestinalen Karzinome. Während in Deutschland Männer und Frauen mit je 32.000 - 37.000 Erstdiagnosen eines kolorektalen Karzinoms pro Jahr gleich häufig erkranken, zeigte auch unsere Kohorte eine identische Verteilung auf beide Geschlechter (vgl. Abb. 50).



**Abb. 78:** Altersspezifische Erkrankungsrate am kolorektalen Karzinom in Deutschland, beispielhaft für Männer in den Jahren 1980, 1990, 2006

Verglichen mit dem Nierenzellkarzinom lag das Inzidenzalter etwas höher (vgl. Abb. 77), ein scheinbarer Inzidenzrückgang trat im Alter von über 80 Jahren ein (vgl. Abb. 53). Hierfür war wiederum die geringere Operationsfrequenz

ursächlich, so dass ältere Patienten in unseren Kollektiven unterrepräsentiert waren. Die übrigen Daten korrelieren allerdings gut mit denen des Robert Koch Institutes.

### **IV.2.1.3 Die analysierten Metastasen kolorektaler Karzinome**

Daten zu Rezidivintervallen als Zeitraum von Erstdiagnose des unmetastasierten Primärtumors bis zum Vorliegen von Fernmetastasen existierten nur in Form vergleichender Therapiestudien und können deshalb für die fünf analysierte Metastasen nicht sinnvoller Weise herangezogen werden.

Im Vorgriff auf die Ligandenidentifikation sei an dieser Stelle auf bemerkenswerte Einzelaspekte bzgl. der Metastasen hingewiesen. Während bei den jüngeren Patienten (MET 5, MET 1) die Metastasierung erst nach 1340 bzw. 1399 Tagen einsetzte, wurden bei den älteren Patienten (MET 2, MET 3, MET 4) deutlich kürzere Metastasierungsintervalle beobachtet (vgl. III.1.2.5, Abb.54). Bei allen drei Tumoren mit frühzeitig einsetzender Metastasierung gelang die Detektion von Peptiden, bei den beiden anderen nicht. Dies erstaunt, da eine effizientere Kontrolle der Grunderkrankung eigentlich eine gesteigerte Peptidpräsentation eine intensiviertere T- Zell- Aktivierung erwarten ließ. Damit reicht ein unifokaler Ansatz zur Analyse und zum Verständnis der Ligandenpräsentation nicht aus, sondern impliziert eine Komplexität des Gesamtprozesses, der sich wie ein Puzzle aus vielen Einzelaspekten zusammensetzt.

### **IV.2.1.4 Relevanz allgemeiner Tumorcharakteristika für die Immuntherapie**

Demzufolge ist auch die allgemeine Charakterisierung von Tumorgewebe als ein Puzzleteil zu sehen, das gemeinsam mit vielen weiteren Faktoren den Gesamtkomplex der Tumorerkrankung bildet. Doch erst durch Integration vieler Faktoren lassen sich sinnvolle Rückschlüsse aus vorangegangenen Analysen ziehen und Parallelen zu ähnlichen Situationen herstellen, Prognosen für zukünftige Fälle treffen und hierauf eine Behandlung gründen. In diesem Punkt unterscheidet sich die Bearbeitung menschlichen Tumorgewebes signifikant von oft utilisierten Tumorzelllinien, da der „Komplex Mensch“ in die Überlegungen miteinfließt und sich die Analytik, vor allem jedoch die Therapie, von einer Uniformität zu einer Individualisierung wandelt. Ziel ist, möglichst viele Puzzleteile des Menschen im Sinne von einzelnen Befunden zusammen mit den bestehenden Erfahrungen zu einer integrativen Tumoranalyse zu verknüpfen und ein adaptiertes Therapiekonzept unter Einsatz von Peptidliganden zu schaffen.

## IV.2.2 Spezielle Charakteristika der analysierten Tumoren

Als weitere Puzzleteile wurde der allgemeinen die spezielle Charakterisierung der Tumoren angeschlossen. Der Vergleich der HLA- Klassifikation der Patienten mit untersuchten Bevölkerungskollektiven<sup>257,258</sup> bestätigte neuerlich die Repräsentativität verfügbaren Patientenkollektivs (vgl. III.2.6, Abb.66 - 69). Demzufolge waren die in der kaukasischen Bevölkerung prädominierenden Antigene wie HLA- A\*01, A\*02, A\*03, A\*24, B\*07, B\*08, B\*35 sowie B\*44 auch in dieser Kohorte vorwiegend anzutreffen.

Antigen	Weißer	Mongolide	Afrikaner
A1	14.2	1.0	8.1
A2	28.9	28.1	17.5
A3	13.2	1.5	6.7
A11	6.3	11.7	1.9
A23	1.4	0.1	8.0
A24	10.3	31.4	4.8
A25	2.4	0	0
A26	3.2	7.2	4.5
A28	4.7	2.1	9.9
A29	2.9	0.4	4.9
A30	3.5	2.3	11.0
A31	2.9	5.2	1.6
A32	3.9	0.4	2.3
A33	1.4	6.0	3.9
A34	0.1	0.3	5.1
A36	0.1	0.1	3.2
A43	0	0	1.3
A66	0.2	0.5	0.3
AX	0.4	1.7	5.0
B7	11.5	4.7	12.1
B8	9.6	0.2	5.5
B13	2.9	3.8	1.6
B18	5.5	0.3	4.2
B27	3.4	1.6	1.9
B35	10.5	10.2	7.1
B37	1.6	0.6	1.3
B38	2.5	0.7	1.6
B39	2.0	0.4	0
B41	0.9	0.1	2.3
B42	0.2	0.5	5.8
B44	12.3	6.0	7.7
B45	0.4	0.1	2.3
B46	0.1	3.6	0
B47	0.2	0.4	0
B48	0	1.6	0
B49	1.8	0.3	2.3
B50	1.1	0.3	0.6
B51	6.2	7.8	1.9
B52	2.0	7.3	0.6
B53	0.5	0.3	6.7
B54	0.1	6.7	0
B55	1.6	2.1	0
B56	1.1	1.5	0.3
B57	2.9	0.7	2.9
B58	1.8	1.9	10.7
B59	0	1.2	0
B60	3.8	6.5	2.3
B61	2.1	11.7	1.5
B62	6.1	9.6	2.6
B63	0.7	0	1.9
B64	1.1	0	1.3
B65	2.6	0.2	1.6
B67	0	0.1	0
B71	0.1	0.4	0.8
B72	0.3	0.5	7.1
B73	0.1	0.2	0
BX	4	5.9	1.5

**Abb. 79** zeigt die relative Häufigkeitsverteilung der einzelnen HLA –A\*- und –B\*- Antigene in Prozent [%] für die ethnischen Gruppen Weiße, Mongolide und Afrikaner. Mit ↗ sind die jeweils vier häufigsten A\*- und B\*- Allele markiert. (nach Kiefel V.: HLA und Transplantation)

<sup>257</sup> Kiefel V. 2005

<sup>258</sup> www.allelefreqencies.net

### **IV.2.3 Eingeschränkte Datenverfügbarkeit**

Während wiederholt die Bedeutung der integrativen Tumoranalyse betont wurde, muss einschränkend auf das Problem der retrospektiven Datenerhebung hingewiesen werden. Von den unter III.1 - III.2 dargestellten Befunden abgesehen, konnten zu den bearbeiteten Tumoren nur rudimentäre Zusatzinformationen gewonnen werden. Ursächlich waren bürokratische Prozesse wie die Führung verschiedener Patientenakten oder die fehlende Zentralisierung des elektronischen Datenflusses, aber auch patientenbezogene Probleme wie dezentrale Vor- und Nachbehandlungen in verschiedenen Praxen oder Kliniken ohne suffizienten Informationsaustausch. Entsprechend fehlten Daten zum präoperativen Krankheitsverlauf und der bisherigen Therapie, aber auch zu grundlegenden Tumorcharakteristika wie z.B. dem Metastasierungszustand (vgl. Abb. 57, 61). Noch schwieriger gestaltete sich die Akquirierung postoperativer Daten wie z.B. von adjuvanten Therapien, dem Auftreten von Metastasen oder dem postoperativen Überleben. Gerade diese Fakten können jedoch nach systematischer Aufarbeitung weitere Erkenntnisse liefern und in Korrelation zu den gefundenen Liganden Rückschlüsse zulassen.

### **IV.3 Optimierung der Ligandenidentifikation**

Während die direkte Ligandenidentifikation von Zellkulturlysaten bereits etabliert worden war, machte der Einsatz nativen Tumorgewebes eine Adaptation der Aufarbeitung nötig, um den unterschiedlichen Bedingungen des Ausgangsmaterials gerecht zu werden. Vor dem Hintergrund der bislang relativ ineffizienten Identifikation mit Auffinden lediglich eines geringen Bruchteiles aller Peptidliganden, war neben der Anpassung vor allem eine Effizienzsteigerung anzustreben. Ausgehend von der Methodik für Tumorzelllysate wurde eine Aufspaltung des Gesamtprozesses in Einzelschritte vorgenommen und diese separat analysiert und standardisiert. Die hierdurch erreichte Optimierung jedes einzelnen Prozesses erstreckte sich konsequent auf die Gesamtanalyse.

Im Folgenden ist dargestellt wie durch die Verbesserung der eingesetzten Materialien (vgl. IV.3.1), die an das Ausgangsgewebe adaptierte Aufarbeitung (vgl. IV.3.2), die Rationalisierung von Abläufen, das Integrieren von Reinigungsschritten, die parallele Bearbeitung, aber auch durch wiederholte Interimsanalysen (vgl. IV.3.3) eine Effizienzsteigerung der gesamten Methodik erreicht wurde.

Während mit reinem Tumorgewebe auf bislang unbekanntes Untersuchungsmaterial zurückgegriffen wurde und primär alle durch die klinischen Abteilungen zur Verfügung gestellten Gewebe asserviert wurden (vgl. III.1.2), stellte sich bald die Frage nach Unterschieden des Ausgangsmaterials. Sollten sich einfach zu bestimmende Kriterien definieren lassen, die Aussagen über die Effektivität der Ligandenidentifikation bei verschiedenen Tumorgeweben zuließen, würde dies zu einer Rationalisierung sowie signifikanten Kostenreduktion beitragen. Diese als selektionierte Tumoranalyse bezeichneten Überlegungen sind Kap. IV.3.4 zu entnehmen.

Zudem bestand ein zentraler Ansatz in der ständigen Reflexion der einzelnen Ergebnisse, um Limitierungen oder Störungen rasch festzustellen, mögliche Ursachen zu definieren und zu beheben (vgl. IV.3.5) und damit eine weitere Verbesserung des Gesamtergebnisses zu erzielen.

### **IV.3.1 Optimierung der Antikörper**

#### **IV.3.1.1 Generelle Affinitätskontrolle mittels Durchflusszytometrie**

Die Qualität der eingesetzten AK war als einer *der* zentralen Komponenten im komplexen Gesamtprozess (vgl. Abb. 27) anzusehen, da ihre Affinität die Bindung der MHC- I- Komplexe und damit die absolute Menge eluierter Moleküle direkt beeinflusste. Aus diesem Grund wurde von einer stichprobenhaften zu einer routinemäßigen, generellen Qualitätskontrolle der mAK durch Bindungsassays mittels Durchflusszytometrie (vgl. II.5.3) übergegangen. Nicht selten zeigten sich, trotz identischen Ursprungs und Spezifität, AK- Chargen mit signifikanten Affinitätsdifferenzen, so dass wiederholt Chargen mit niedriger Affinität ausselektiert werden mussten. Diese Tatsache rechtfertigte den deutlich

höheren zeitlichen und finanziellen Aufwand, da in einigen Fällen erfolglose Präzipitationen umgangen und unnötige Folgekosten verhindert werden konnten.

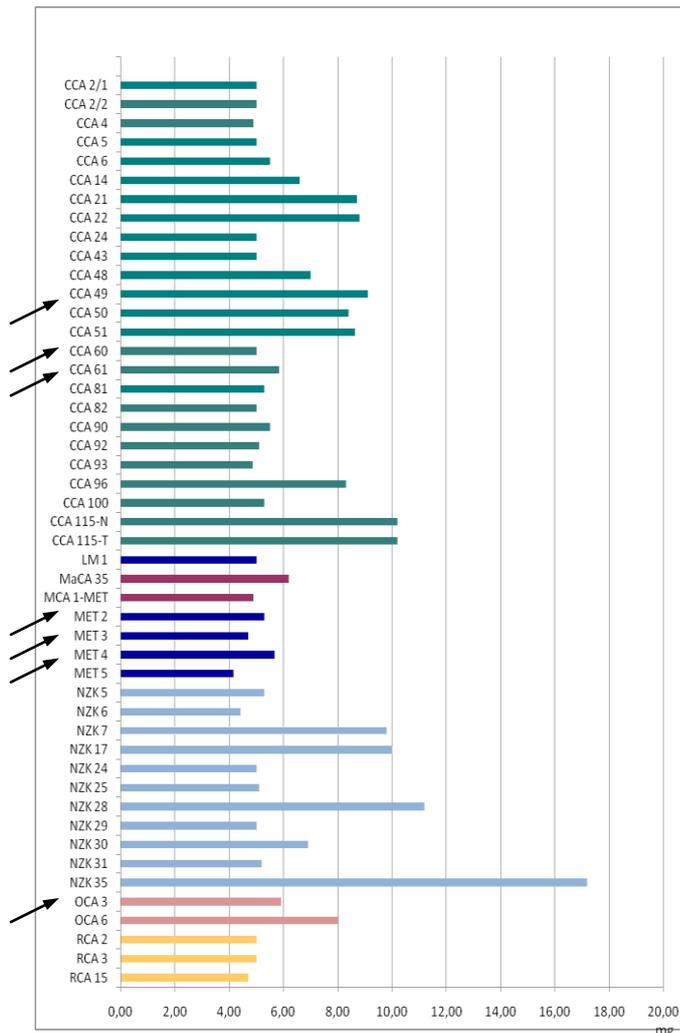
#### **IV.3.1.2 Chargenkombination**

Trotz dadurch gesicherter Affinität der einzelnen AK- Chargen hat sich die Kombination verschiedener anstatt des Einsatzes einer solitären Charge zur Immunpräzipitation als vorteilhaft herausgestellt. Durch die parallele Verwendung unterschiedlicher Chargen konnten Qualitätseinschränkungen einzelner AK nivelliert, ein kompletter Bindungsverlust verhindert und die Gesamtpräzipitation verbessert werden.

#### **IV.3.1.3 Optimierung der Antikörpermenge**

Basierend auf der gesicherten Bindungsaffinität stellte sich die Frage nach der optimalen AK- Menge, um einen unnötigen AK- Überschuss zu minimieren. Primär wurde auf die in Voruntersuchungen etablierte Absolutmenge von 5 mg zurückgegriffen. Dabei wurden für HLA- A\*02<sup>-</sup> Tumoren nur 5 mg des „universal-spezifischen“ AK W6/32 (vgl. II.4.1) benutzt, während bei HLA- A\*02<sup>+</sup> Tumoren initial mit 5 mg BB7.2-, gefolgt von 5 mg W6/32- AK und damit einer Gesamtmenge von 10 mg präzipitiert wurde.

Retrospektiv ließ sich die Frage nach der notwendigen Menge an AK anhand Abb. 80 zumindest teilweise beantworten. Über die üblichen 5 mg hinaus wurden bei großen Tumoren oder einem sequenziellen Einsatz AK bis zu einer Gesamtmenge von 17 mg AK verwendet. Da bei den markierten Tumoren 5 oder allenfalls 6 mg AK zu einer effektiven Ligandendetektion führten und unter Einsatz größerer Mengen keine gesteigerte Effizienz zu beobachten war, konnte das bisherige Vorgehen mit Absolutmengen von 5 mg, unabhängig der AK-Klasse, anhand der hier beobachteten Fälle als völlig ausreichend bestätigt werden. Diese Einschätzung wurde durch den teilweise eingesetzten Western Blot (vgl. III.2.4) und die Edman- Sequenzierung vor Zentrifugation (vgl. III.4.4.3.3, III.5.2.2.3) untermauert, nach denen der AK im Vergleich zur extrahierten MHC- Menge im vielfachen Überschuss vorlag.



Zusammenfassend sind damit 5 mg eines suffizient bindenden AK für die Immunpräzipitation solider Tumorgewebe ausreichend. Vielmehr ist aus Kostengründen eine weitere Reduktion der AK-Menge zu erwägen. Diesbezüglich existieren bislang jedoch noch keine Daten. In künftigen Analysen könnte unter prospektiven Bedingungen und engmaschigem Monitoring allerdings eine schrittweise Reduktion der AK-Menge erwogen werden, um hierüber eine Kostensenkung der Analytik, vor allem für den geplanten, routinemäßigen Einsatz, zu erzielen.

**Abb. 80** zeigt die AK-Mengen, die für die einzelnen Tumoren eingesetzt wurden. Die Menge verschiedener Chargen der AK BB7.2 und W6/32 wurden hierzu addiert und ihre Gesamtmenge in mg auf der Abszisse aufgetragen. Die Ordinate zeigt die einzelnen Tumoren, sortiert nach Entität und interner Nomenklatur, unabhängig der eingesetzten AK-Menge. Die farbliche Zuordnung entspricht der allgemeinen Analyse der Tumoren analog III. Mit  sind zudem Tumoren markiert, aus denen sich Peptide identifizieren ließen (vgl. III.3 - III.5).

### IV.3.2 Optimierung der Tumoraufbereitung

#### **IV.3.2.1 Aufbereitung gefrorener Lysate und Tumorgewebe**

Während das Tumorgewebe üblicherweise im Operationssaal selbst asserviert und eingefroren wurde (vgl. II.3.1, II.3.2), konnte zusätzlich auf einzelne solide Tumoren in Form vormalig erstellter Einzellzellsuspensionen bzw. nativer Primärgewebe zurückgegriffen werden, die bei -80°C über Monate konserviert worden waren. Da eine vergleichbare Lagerung von Zellkulturpräparaten normalerweise nicht erfolgt, stellte sich die Frage nach dem Einfluss dieser Kon-

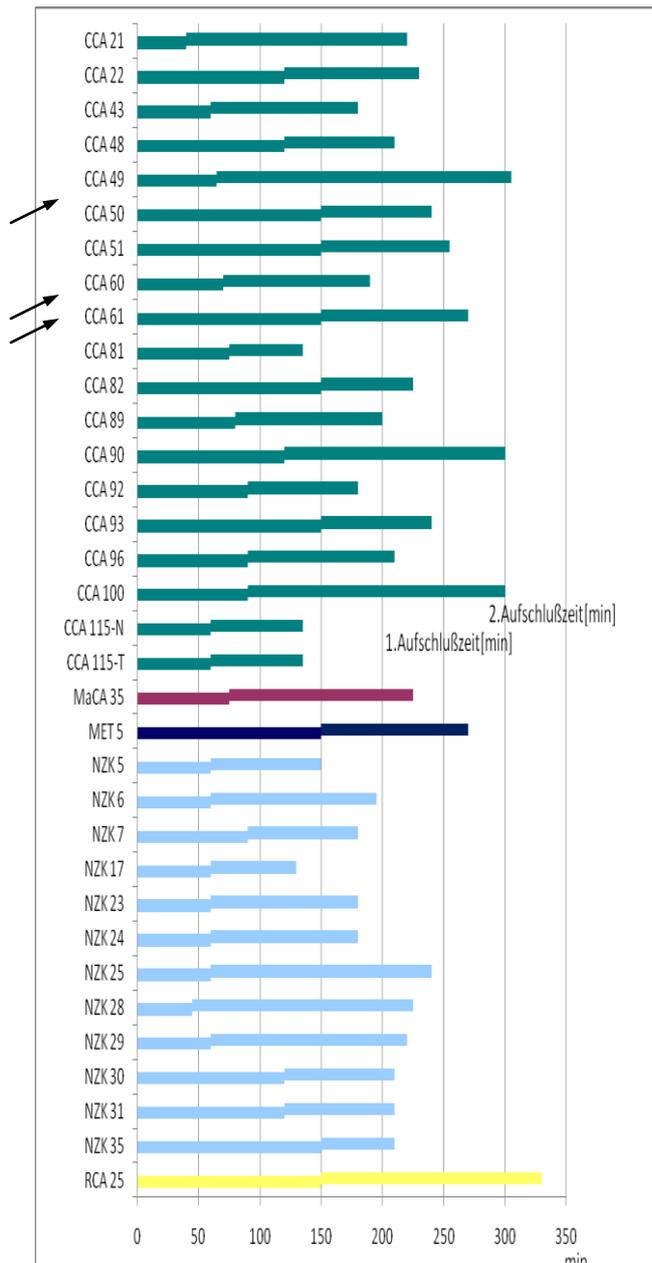
servierung. Erfreulicherweise konnten sowohl aus über 12 Monate lang eingefrorenem, solidem Gewebe (z.B. OCA 3, vgl. III.4.2.2) als auch aus asservierten Einzellzelllysaten (z.B. MET 2, vgl. III.5.2.2) Peptide identifiziert werden. Hinweise auf eine Reduktion der „Ausbeute“ ergaben sich nicht, können jedoch aufgrund der geringen Probenanzahl bzw. durch das Fehlen von Vergleichsproben nicht definitiv ausgeschlossen werden.

#### **IV.3.2.2 Solides Tumorgewebe versus Zellkultur**

Während zur Tumoraufbereitung größtenteils auf die Erfahrung bei Zellkulturlysaten zurückgegriffen werden konnte, bedurfte die Verwendung solider Gewebe eines adaptierten Konzeptes, vor allem im Hinblick auf die primäre Bearbeitung. Durch die vollkommen differente Grundsubstanz – Einzelzellen in Suspension mit identischem Ursprung, Aufbau und physikalischem Verhalten versus Tumoren unterschiedlichster Entitäten aus Resten unveränderten Organparenchyms bzw. -mesenchyms in Kombination mit verschiedenen de- oder entdifferenzierten Tumoranteilen – stellte es sich als schwierig, teilweise gar als kontraproduktiv heraus, die Aufarbeitung nach dem bekannten Vorgehen zu verfolgen. Entsprechend wurde durch die schrittweise Analyse vieler verschiedener Tumoren ein neues, adaptiertes Konzept der Aufarbeitung entwickelt. Dabei galt es, die komplexe Struktur der Tumoren bestmöglich aufzuschließen und die freigesetzten Zellen möglichst vollständig zu lysieren, um ein der Zellkultur äquivalentes Lysat zu schaffen.

#### **IV.3.2.3 Physikalisch- chemische Aufbereitung**

Aufgrund der komplexen dreidimensionalen Struktur der soliden Tumoren wurde deshalb die physikalisch- chemische Aufarbeitung (vgl. II.5.4.2) im Vergleich zu Zellsuspensionen von vornherein intensiviert. Während Suspensionen vor und nach Homogenisierung über je 60 Minuten mit CHAPS lysiert werden (vgl. II.5.4.2), orientierte sich die Dauer der chemischen Lyse solider Gewebe an der physikalischen Aufarbeitung unter Zugrundelegung des makroskopischen Fragmentierungsgrades sowie Kraftaufwandes und Dauer des Douncens. In Folge wurden längere Aufschlusszeiten eingehalten. Abb. 81 zeigt die kumulative



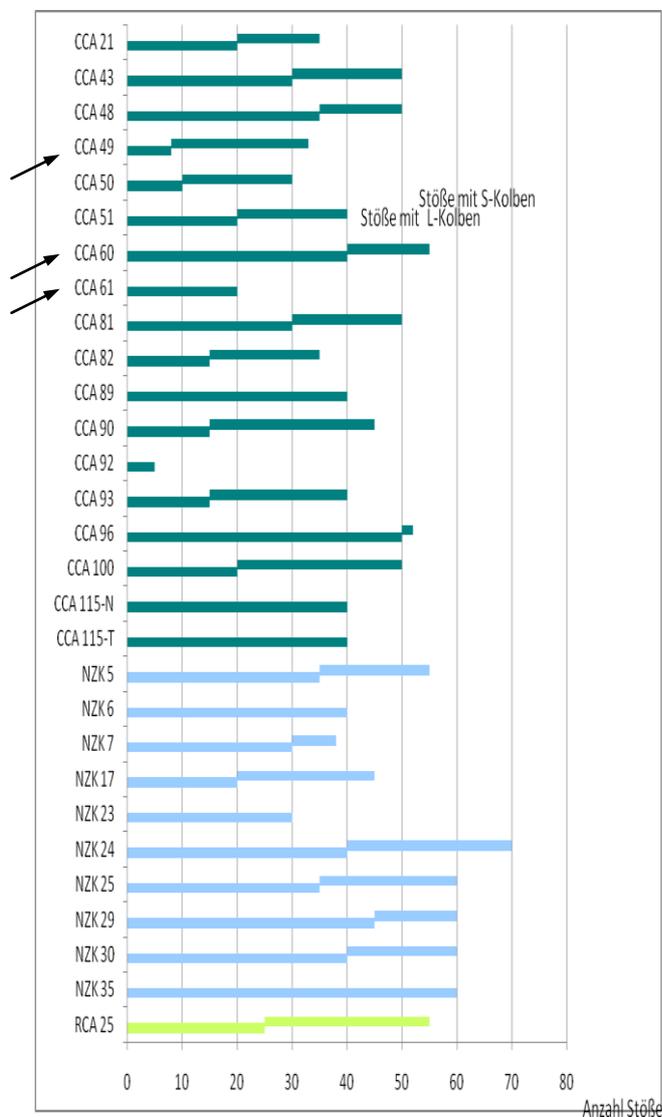
**Abb. 81** zeigt die Dauer der chemischen Tumorzelllyse in Minuten für die meisten bearbeiteten Tumoren. Neben der Tumorbezeichnung ist die Lysezeit als Balken in der karzinomspezifischen Farbkodierung gezeigt (vgl. Abb. 47). Der Querbalken setzt sich aus zwei versetzten Teilen zusammen, wobei der linke die Lysedauer vor (1. Aufschlußzeit), der rechte nach der Dounce-Homogenisierung darstellt (2. Aufschlußzeit). Zusammen entspricht die Balkenlänge der Gesamtdauer des Prozesses. Die Abszisse gibt die Zeit in Minuten an. Die Pfeile markieren CCA 49, 60 und 61 als Tumoren mit erfolgreicher Ligandendetektion.

Lysedauer für die einzelnen Tumoren, getrennt nach der Periode vor und nach der Homogenisierung.

Neben der chemisch vermittelten Lyse wurde vor allem die physikalische Zellfragmentierung durch das Douncen als zentraler, mechanischer Aufschlussprozess intensiviert. Es zeigten sich massive Unterschiede von Tumor zu Tumor, so dass eine Prädiktion im Hinblick auf Intensität, Kraftaufwand oder notwendiger Dauer des Dounce-Prozesses anhand von Tumorgöße, -entität, -farbe oder -lokalisierung, zu keinem Zeitpunkt möglich war. Abb. 82 fasst die Daten der physikalischen Tumorzelllyse zusammen, unterteilt anhand der eingesetzten Dounce-Stöße des L- bzw. S- Pistills. Unabhängig der Gesamtzahl der applizierten Stöße belief sich die mechanische Aufschlusszeit auf mindestens 60 Minuten.

Zusammenfassend bedarf die Aufarbeitung solider Tumoren im Vergleich zu Zellkulturlysaten einer intensivierten physikalisch-chemischen Lyse. Orientiert an erfolgreichen Analysen war eine

chemische Aufschlusszeit vor Homogenisation von 60 Minuten ausreichend, während die anschließende, physikalische Lyse auf mindestens die doppelte Zeit entscheidend verlängert wurde. Allerdings ließen sich durch die extremen



Unterschiede der mechanischen Fragmentierung keine konkreten Angaben zu Dauer oder Anzahl der Pistill- Stöße definieren. Zunehmende Erfahrung bei der manuellen Homogenisierung hatte auf die erzielten Ergebnisse keinen Einfluss, retrospektiv erbrachten sowohl anfängliche als auch final durchgeführte Präzipitationen verwertbare Daten.

**Abb. 82** zeigt die Dauer der physikalischen Tumorzelllyse in Minuten für die meisten bearbeiteten Tumoren. Neben der Tumorbezeichnung ist die Homogenisierungszeit als Balken in der karzinom-spezifischen Farbkodierung gezeigt (vgl. Abb. 47) Der Querbalken setzt sich aus zwei versetzten Teilen zusammen, wobei der linke die Dauer des Douncens mit dem L- Pistill (Stöße mit L- Kolben), der rechte die Dauer mit dem S- Pistill (Stöße mit S-Kolben) darstellt. Zusammen entspricht die Balkenlänge der Gesamtdauer des Prozesses. Die Abszisse gibt die Zeit in Minuten an. Die Pfeile markieren CCA 49, 60 und 61 als Tumoren mit detektierten Peptidliganden.

### IV.3.3 Optimierung der Methodik

Neben der Qualitätssicherung der eingesetzten Materialien (vgl. IV.3.1) und der Adaptation der Tumoraufbereitung (vgl. IV.3.2) bestand die Herausforderung darin, durch eine Verbesserung der eingesetzten Methoden eine zusätzliche Effizienzsteigerung der Ligandenidentifikation zu erzielen.

### **IV.3.3.1 Reutilisation der Protein A- Sepharose**

Während die gemäß Hersteller garantierte, wiederholte Verwendung der Protein A- Sepharose primär kritisch beäugt wurde, zeigte sich die wiederholte Immunpräzipitation sowohl für hergestellte AK (vgl. II.5.1.5) als auch für sämtliche Tumorproben (vgl. II.5.4.3) unproblematisch. Nachgewiesen werden konnte die Reutilisation beispielsweise durch die Ergebnisse von MET 2 (vgl. III.5.2.2) oder MET 4 (vgl. III.5.2.4), deren Präzipitation über vormals ein- bzw. dreimalig verwendete Protein A- Sepharose erfolgte. Auch nach fünfmaliger Verwendung konnte keine verminderte Bindungskapazität objektiviert werden. Der direkte Vergleich von neuer mit reutilisierter Protein A- Sepharose bei der Aufreinigung des AK BB7.2 bestätigte die identische Effektivität. Zusammenfassend war damit die Wiederverwendbarkeit der Protein A- Sepharose eindeutig nachgewiesen und wurde nicht zuletzt aus Kostengründen strikt beibehalten.

### **IV.3.3.2 Optimierung durch wiederholte Elution**

Durch eine einmalige Immunpräzipitation ließen sich die addierten AK nie komplett aus dem Tumorlysat extrahieren. Zwar konnte mittels Edman- Sequenzierung ein signifikanter Abfall der AK- und MHC- Komplexe bestätigt werden, allerdings lagen im Lysat beide Moleküle noch in signifikanter Menge vor. Auch die Semiquantifizierung des Western Blots bestätigte z.B. für NZK 35 (vgl. II.6.2) eine Reduktion, jedoch keine komplette Elimination dieser Moleküle. Folglich wurde der ersten eine neuerliche, zweite Immunpräzipitation des gleichen Tumorlysats angeschlossen und die gewonnenen Eluate im Rahmen der HPLC fusioniert (vgl. II.7.3). Die Effektivität dieses Ansatzes konnte u.a. bei MET 2 mit der größten Anzahl extrahierter Peptidliganden bestätigt werden, aber auch im Western Blot durch die neuerliche Reduktion von AK und MHC im Lysat. Die Angst, durch eine ineffiziente Zweitpräzipitation nach Fusion beider Proben eine relevante Verdünnung oder massive Verschmutzung durch Verdopplung der Störfaktoren zu provozieren, ließ sich anhand der erzielten Ergebnisse entkräften. Stattdessen trug dieses Vorgehen zu einer Steigerung der Diversität MHC- I- gebundener Peptide bei. Negative Einflüsse oder systemische Probleme durch diese Repräzipitation wurden in keinem Fall beobachtet,

so dass diese Technik bei künftigen Analysen, vor allem bei größeren Tumoren, zwingend zu erwägen ist.

Leider erfolgte die Befundauswertung erst nach Abschluss der kompletten Tumoraufarbeitung, so dass dieses Vorgehen bislang noch nicht stringent verfolgt wurde. In Zukunft sollten jedoch prospektive Untersuchungen der sequentiellen Immunpräzipitation unter Bestimmung der residuellen AK- und MHC- Menge oder die Bestimmung einer optimalen Präzipitationsabfolge durchgeführt werden. Dadurch könnte geklärt werden, ob beispielsweise eine Zweitpräzipitation auch bei hocheffektiver Primärpräzipitation und kleinen Tumormengen Vorteile bietet.

Nichts desto trotz scheint in Zusammenschau der bislang dargestellten sowie im Vorgriff auf die folgenden Ansätze die Repräzipitation als simple Maßnahme ein bedeutendes Optimierungspotential zu bergen.

#### **IV.3.3.3 Optimierung durch parallele Edman- Sequenzierung**

Unter anderem bei CCA 60 (vgl. III.4.4.3) wurde der parallele Einsatz differenter Edman- Sequenzanalytoren, konkret eines Hewlett Packard- und eines Procise- Gerätes, zur Aufarbeitung einer einzigen Probe evaluiert. Das Ziel war, neben der Detektion systematischer Fehler, Stärken und Schwächen der einzelnen Geräte zu definieren, um vor diesem Hintergrund die erhobenen Ergebnisse besser einordnen zu können.

Beispielsweise zeigte die Analyse der zyklischen AS Histidin H am Procise-Sequencer stets irregulär hohe Signale, während das HP- Gerät in gleicher Situation ein differentes, reliables Ergebnis lieferte. Generell ergab die parallele Betrachtung der Einzelergebnisse zwar vergleichbare Daten, die erhobenen Absolutwerte beider Geräte differierten jedoch deutlich. Initiale Bedenken, Einbußen durch halbierte Eluatmengen durch Verteilung auf zwei Analytoren in Kauf nehmen zu müssen, bestätigten sich erfreulicherweise nicht. Vielmehr ließ sich durch dieses Vorgehen eine genauere Beschreibung der Tumorproben erreichen, die Detektion artefizieller Signale vereinfachen und summa summarum eine exaktere Einordnung der erhobenen Befunde treffen.

#### **IV.3.3.4 Prädiktion und Relevanz von Zwischenanalysen**

Während die Effizienz der Ligandenidentifikation durch Optimierung der eingesetzten Materialien, der Tumoraufbereitung und der Methodik gesteigert wurde, wurden die einzelnen analytischen Arbeitsschritte in ihrem prädiktiven Wert beleuchtet. Vor dem Hintergrund des diffizilen Gesamtprozesses (vgl. Abb. 27) wurde angestrebt, durch einfache, ergänzende oder im Aufarbeitungsprozess bereits integrierte Analysen, positive oder negative Prädiktoren zu definieren, die verlässliche Prognosen in Bezug auf die Detektion von Peptidliganden zulassen würden. Denkbare Konsequenzen aus reliablen Zwischenanalysen reichen dabei von einer veränderten, ggf. intensivierten, über eine aufgesplittete bis hin zur komplett beendeten Aufarbeitung des jeweiligen Gewebes. Hierdurch könnten Ergebnisse optimiert oder gar erst erzielt werden. Zudem ließen sich z.B. durch eine vorzeitige Beendigung ineffizienter Präzipitationen menschliche und finanzielle Ressourcen einsparen.

##### IV.3.3.4.1 Prädiktion und Relevanz der Edman- Sequenzierung

Aus diesem Blickwinkel wurde die Edman- Sequenzierung auf ihr prädiktives Potential evaluiert. In den meisten Fällen wurden verlässliche Daten erhoben, vereinzelt konnten in Proben mit bestätigten Signalen der Sequenzierung jedoch keine Liganden detektiert werden. Zudem konnten bei Eluaten ohne verwertbare Sequenzierungsdaten vereinzelt Peptide beschrieben werden. Exemplarisch sei MET 2 herausgegriffen, bei der trotz unspektakulärer Sequenzierungsdaten einer Vielzahl an Liganden nachgewiesen werden konnten. Dies schränkt sowohl das positive prädiktive Potential – vorhandene Edman- Signale machen eine Ligandenidentifikation wahrscheinlich – als auch das negative prädiktive Potential – fehlende Edman- Signale bestätigen sicher, dass in der Probe keine Liganden vorhanden sind – der Untersuchung erheblich ein.

Welche Relevanz konnte damit dieser Untersuchung überhaupt beigemessen werden? Am ehesten scheint ein sequenzieller, ergebnisorientierter Ansatz dieser Analytik gerecht zu werden und beispielsweise folgendes Vorgehen zu implizieren: Bei gegenbestätigtem, negativem Befund zweier Sequenzer ohne Hinweis auf enthaltene Peptide würde das Lysat noch vor Komplettierung der

weiteren Analytik verworfen werden. Bei einmalig positivem Ergebnis, unabhängig durch welchen Analysator, würde die Probe der weiteren Aufarbeitung bis hin zur Massenspektrometrie zugeführt werden. Hierdurch ließen sich an größeren Kollektiven ausreichend Daten generieren, um für die Zukunft eine definitive Relevanzeinschätzung dieser Untersuchung als Zwischenanalyse treffen zu können. Bislang wurden einzelne Tumoren in dieser Form analysiert.

#### IV.3.3.4.2 Prädiktion und Relevanz der Flüssigkeitschromatographie

Äquivalente Interpretationsschwierigkeiten ergaben sich auch aus den Befunden der Flüssigkeitschromatographie. Hierbei wurde versucht, die Extinktion als quantifizierbaren Messwert in Korrelation zur erzielten Ligandenidentifikation in der jeweiligen Eluatprobe zu setzen. Leider konnte kein Zusammenhang zwischen den Messwerten und Peptidelution herausgearbeitet werden, so dass anhand der Extinktion der einzelnen Fraktionen *keine* prospektiven Aussagen hinsichtlich möglicher enthaltener Liganden getroffen werden können. Dies umfasst sowohl positive als auch negative prädiktive Informationen, wie die Beispiele von MET 2, 3 und 4 demonstrieren. Während sich einerseits trotz unspezifischer HPLC viele Liganden beschreiben ließen, erbrachten andererseits Chromatographien mit signifikanten Signalen nur wenige Peptide. Folglich musste die Flüssigkeitschromatographie als reiner Aufarbeitungsprozess gewertet werden und konnte nicht zur Zwischenanalyse herangezogen werden. Ursächlich ist vor allem die geringe Peptidstoffmenge mit einer Unterschreitung des Auflösungsvermögens der Methodik.

#### IV.3.3.4.3 Prädiktion und Relevanz des Western Blots

Der Western Blot bot durch seine reproduzierbare Aussagekraft, hohe Reliabilität und der Möglichkeit einer Semiquantifizierung der MHC- Komplex- Menge zwar entscheidende Vorteile, diesen stand neben dem zusätzlichen finanziellen vor allem ein hoher Arbeitszeitaufwand gegenüber. Zudem war der Western Blot nicht direkt in den Aufarbeitungsprozess der Tumoren integriert, sondern generierte auf einem parallelen Weg Analyseweg seine Informationen (vgl. Abb. 27), so dass er als Zwischenanalyse schlecht einzusetzen war.

#### IV.3.3.4.4 Prädiktion und Relevanz der Zwischenanalysen – Zusammenfassung

Summa summarum bietet damit die Edman- Sequenzierung, vor allem als kombinierter Ansatz mit zwei differenten Geräten, das höchste prädiktive Potential aller Zwischenanalysen. Die generierten Daten waren quantifizier- und reproduzierbar und korrelierten in oben beschriebener Weise mit den Ergebnissen der Ligandenidentifikation (vgl. IV.3.3.4). Basierend auf den Erfahrungen mit MET 2 (vgl. III.5.2.2) sollte bei der Interpretation der Ergebnisse allerdings die entsprechende HLA- Klassifikation des Tumors in Betracht gezogen werden. Zeigen die Ligandenmotive der jeweiligen HLA- Allele deutliche Differenzen in ihren Anker- AS, kann möglicherweise die Aussagekraft der Sequenzierung durch einen Nivellierungseffekt eingeschränkt sein. Der Western Blot kann unter erhöhtem Zeit- und Kostenaufwand parallel zur Analyse ergänzt werden, erreicht in seiner Aussagekraft jedoch nicht das Signifikanzniveau der Edman- Sequenzierung. Die Flüssigkeitschromatographie ist als Zwischenanalyse ungeeignet.

#### **IV.3.4 Selektionierte Tumoranalyse**

Nachdem die beschriebenen Vorgehensweisen der vorangestellten Kapitel zur Optimierung der eingesetzten Materialien und ablaufenden Prozesse beitrugen, wurde darüber hinaus versucht, simple Kriterien zu definieren, nach denen aus der Gesamtheit aller asservierten Tumoren die Gewebe ausgewählt werden konnten, für die eine Peptididentifikation wahrscheinlich war.

##### **IV.3.4.1 Tumorspezifische Prädiktoren**

Um entsprechende Differenzierungskriterien zu definieren, wurde entweder auf simpel zu ergänzende oder in der Aufarbeitung der Gewebe bereits integrierte Prozesse zurückgegriffen. Diese sind im Folgenden dargestellt. Auf aufwendige Zusatzuntersuchungen wurde bewusst verzichtet. Neben einer positiven Prädiktion von Tumoren mit mutmaßlich vielen Peptiden wurde auch eine negative Prädiktion angestrebt, um Gewebe mit geringer Wahrscheinlichkeit für detektable Liganden auszuwählen.

#### IV.3.4.1.1 Makroskopische Beurteilung und Tumorentität

Trotz exakter makroskopischer Deskription der asservierten Gewebe mit Beurteilung von Wachstumsmuster, Infiltration und Ausbreitung konnte weder primär noch retrospektiv eine Verbindung zwischen sichtbaren Tumoreigenschaften und der Ligandenidentifikation hergestellt werden. Eine Korrelation mit sonstigen Parametern wie Tumorgroße, -stadium o.ä. misslang ebenfalls.

Bemerkenswerterweise ließen sich auf drei von sechs Metastasen kolorektaler Karzinome Liganden identifizieren, dies entsprach einer relativen Häufigkeit von 50%. Demgegenüber lag die Identifikationsrate bei Ösophagus-, Magen- oder kolorektalen Karzinomen deutlich niedriger. Obwohl eine Fernmetastasierung durch suffizientere escape- Mechanismen und verminderter Kontrolle durch das Immunsystem eher eine Reduktion der Ligandenpräsentation erwarten ließ, bestand bei Metastasengewebe eine erhöhte Detektionswahrscheinlichkeit.

#### IV.3.4.1.2 Tumormasse und MHC- Präsentation

Bekanntermaßen erlauben zu leichte Tumoren aufgrund der Detektionssensitivität der Methodik keine suffiziente Ligandenidentifikation. Dass jedoch die Aufarbeitung großer, schwerer Tumoren keine große Ausbeute, sondern ebenfalls frustrane Ergebnisse lieferte, verwirrte und enttäuschte initial sehr. So wurde bei sämtlichen Tumor über 14 g Masse kein einziges Peptid gefunden, der leichteste Tumor mit nachgewiesenen Liganden (OCA 3, vgl. III.4.2.2) wog dagegen lediglich 6,6 g. Das angenommene Selektionskriterium Tumormasse – „je größer, desto besser“ – entpuppte sich als komplett verschoben bzw. falsch. Ursächlich waren wiederum erfolgreiche tumor escape- Mechanismen<sup>259</sup> mit u.a. signifikanter Minimierung der auf der Tumoroberfläche präsentierten MHC-Komplexe.

Aus den gewonnenen Erfahrungen dieser Dissertation formte sich die Hypothese, dass Gewebe von mindestens 5 g, jedoch maximal 15 g Nativmasse für eine Aufarbeitung am Erfolg versprechendsten ist. Allerdings sind diese Angaben als Richt- und nicht als Absolutwerte für gastrointestinale Karzinome, weniger für Nierenzellkarzinome zu sehen (vgl. Tab. 9 bzw. 10, 12, 13, 24, 36). Dem

---

<sup>259</sup> Hannahan D. et al. 2000

Prinzip einer selektionierten Tumoranalyse folgend, ist bei Tumoren, die zwischen 5 und 15 g wiegen, die primäre Analyse möglich, während bei leichteren oder schwereren Tumoren die Bestimmung der präsentierten MHC- Menge voran geschaltet werden sollte.

#### IV.3.4.1.3 Beurteilung der Tumornekrose

Die Progression von Karzinomen verläuft zumeist rasch und führt dadurch zu einem unkoordinierten Aufbau des Tumors (vgl. Abb.14, 15). Die begleitende, jedoch oft unzureichende Proliferation der Gefäße führt zur Imbalance der Blutversorgung und zum partiellen Gewebeuntergang, der Tumornekrose. Diese Nekroseareale können makroskopisch nur schwer oder überhaupt nicht abgegrenzt werden. Da durch die Vorgaben der Pathologie mit Entnahme vornehmlich zentraler Tumoranteile (vgl. Abb. 27) von einer häufigen Asservierung größerer Mengen avitalen Tumormaterials auszugehen war, resultierte hieraus ein relevanter Limitierungsfaktor. Diesem Rechnung tragend, könnte sich die histopathologische Aufarbeitung neben der TNM- Klassifikation auch auf eine Bestimmung des Nekrosegrad der Karzinome erstrecken, um hierüber zur Selektion der Gewebe beizutragen. Dieses Konzept wurde allerdings erst retrospektiv erarbeitet und bislang nicht verfolgt, impliziert jedoch bei einfacher Verfügbarkeit einen signifikanten Informationsgewinn und sollte in künftigen Untersuchungen berücksichtigt werden.

#### **IV.3.4.2 Prädiktion anhand klinischer Faktoren**

Neben Eigenschaften der Tumorgewebe sollten auch klinische Aspekte der Patienten in ihrer prädiktiven Potenz zur selektiven Tumoranalyse evaluiert werden. Möglicherweise lassen auch klinische und laborchemische Fakten, Informationen durch bildgebende Verfahren zusammen mit dem Wissen um Krankheitsverlauf, bisherige Therapie und paraneoplastische Effekte Rückschlüsse auf die Aggressivität oder Immunogenität der Erkrankung zu. Ohne auf irrelevante Details einzugehen, gestaltete sich eine entsprechende Korrelation äußerst schwierig. Ursächlich war die bereits beschriebene, limitierte Datenverfügbarkeit. Folglich konnten trotz intensiver Evaluation bislang keine signifikan-

ten Korrelationen herausgearbeitet werden und demzufolge klinische Faktoren nicht gewinnbringend in die Überlegungen der selektionierten Tumoranalyse einbezogen werden. Für künftige Projekte sollte dies allerdings unter prospektivem Ansatz verfolgt werden.

### **IV.3.5 Limitierung der Peptidausbeute**

#### **IV.3.5.1 Allgemeine Aspekte zur Limitierung der Peptidausbeute**

In den vorangegangenen Kapiteln wurde ausführlich auf die Überlegungen eingegangen, über eine Verbesserung von Materialien und Methoden, durch Standardisierung und Automatisierung die Effizienz der Ligandenidentifikation zu steigern. Während hierzu die einzelnen Analysen sukzessive optimiert wurden, sollen im Folgenden Ursachen der limitierten Peptidausbeute evaluiert werden. Hierauf aufbauend sowie in Kombination mit den dargestellten Verbesserungsansätzen sollte in Zukunft eine weitere Optimierung der Ligandenidentifikation möglich sein.

Führt man sich vor Augen, dass mit maximal 65 identifizierten Peptiden (vgl. MET 2, III.5.2.2.7) weniger als 1% des Ligandoms eines Tumors, das üblicherweise rund 10.000 Moleküle umfasst<sup>260</sup>, detektiert wurde und zudem aus lediglich 7 von 65 Geweben Peptide nachzuweisen waren, stellt sich unausweichlich die Frage nach dem Sinn der gesamten Methodik. Allerdings bieten konkurrierende Verfahren keine größere Effektivität und liefern zudem lediglich ein hypothetisches anstatt des tatsächlichen Ligandoms (vgl. I.6).

#### **IV.3.5.2 Limitierung der Peptidausbeute durch Tumoreigenschaften**

Auf die eingangs dargestellte Tumorgenese zurückkommend (vgl. Kap. I), gründet ein Malignom auf physiologischem Organparenchym und verändert sich, beispielsweise der Adenom- Karzinom- Sequenz folgend, Schritt für Schritt zum Tumor. Das betreffende Organ setzt sich neben dem „Ursprungparenchym“ aus verschiedensten Strukturen wie z.B. Binde-, Muskel-, Gefäß- und Nervengewebe sowie aus anderem, differentem Parenchymgewebe zusammen. Diese

---

<sup>260</sup> Stevanović S. et al, 1999

Gewebsdiversivität potenziert sich durch die genetische Instabilität, massive Proliferation und variierende Entdifferenzierung sich vermehrender Tumorzellen, aggraviert sich durch die begleitende Proliferation nicht tumoröser Gewebe wie z.B. von Gefäßen und mündet in einem Konglomerat verschiedenster Zellen, das schließlich als „der Tumor“ im OP entnommen wird. Als ein Ausdruck dieser Vielfalt reicht die Farbpalette des generierten Tumorsates von milchigem Weiß bis zu klarem Tiefrot. Entsprechend relativiert sich das Ziel, aus dem Tumorgewebe die spezifischen Liganden der *einen* Tumorzelle zu extrahieren. Folglich äußert sich auch die Inkongruenz, Unberechenbarkeit und Einzigartigkeit der Tumorerkrankung jedes einzelnen Menschen in der unterschiedlichen und schwer prädiktablen Aufarbeitung der Gewebe.

Zusammenfassend zeigt sich, dass – so paradox es klingen mag – die Variantenvielfalt des Tumorgewebes selbst einer der zentralen Faktoren ist, der zur Limitierung der Peptididentifikation beiträgt. Ein Ausweg aus diesem Dilemma scheint schwierig. Da die Resignation anhand des diffizilen Ausgangsmaterials jedoch einer Kapitulation in der Karzinomtherapie gleichkommen würde, wurde in einer schrittweisen Analyse und Verbesserung der Aufarbeitung der Diversität des Gewebes Rechnung getragen. Zudem muss auch künftig eine weitere „Optimierung“ des Ausgangsmaterials angestrebt werden. Diese könnte beispielsweise in verbesserten Diagnostik- und Vorsorgemaßnahmen zur Früherkennung bestehen, um Tumoren in ausdifferenzierteren Stadien als homogeneres Gewebe zu detektieren. Basierend auf diesen Überlegungen musste deshalb trotz der Vielfalt analysierter Tumoren das verfügbare Tumormaterial als suboptimal bewertet werden, so dass sich daraus zumindest teilweise die Limitierung der Peptidligandenidentifikation erklären lässt.

#### **IV.3.5.3 Limitierung der Peptidausbeute durch die Methodik**

Während die meisten Verfahren der Tumoraufarbeitung in Handhabung und Durchführung als einfach und schnell erlernbar einzustufen waren, trug gerade diese Simplizität in Kombination mit der Vielzahl an Einzelschritten (vgl. II.1) zur Limitierung bei. Studien bestätigen, dass eine Abfolge vieler kleiner, für sich genommen unkomplizierter Tätigkeiten durch deren Kombination schlussendlich

doch zu einer erhöhten Fehlerquote führt. Zudem summierten bzw. potenzierten sich Einbußen durch Totraumvolumina, Verluste bei Extraktionen, Instabilitäten eingesetzter Reagenzien und Substanzen etc. zu einem Gesamtverlust von bis zu 75%, bezogen auf die initialen Peptidmenge<sup>261</sup>. Konsekutiv hatte ein singuläres Problem Auswirkungen auf den gesamten Prozess (vgl. IV.3.5.4). Aggraviert wurde die Situation durch das Problem der bislang fehlenden Zwischenanalysen, die den Erfolg bzw. Misserfolg der bisherigen Prozesse hätten nachweisen und damit Material und Zeit einsparen können. Daneben waren systematische Einschränkungen als prozessimmanente Probleme keiner Optimierung zugänglich (vgl. IV.3.3), so dass selbst die sehr sensitiven Verfahren wie z.B. die Massenspektrometrie an ihre Nachweisgrenzen stießen. Ein relevanter Einfluss des Lerneffektes bei den manuellen Tätigkeiten konnte hingegen ausgeschlossen werden.

#### **IV.3.5.4 Limitierung der Peptidausbeute durch multiple Störfaktoren**

Neben tumorspezifischen und methodikimmanenten kamen weitere Faktoren zum Tragen, die zwar weniger präzise zu definieren waren, aber in gleicher Weise zu einer Begrenzung der Peptidausbeute beitrugen.

Trotz sterilisierter Behältnisse und hochgereinigter Reagenzien traten regelmäßig signifikante Verunreinigungen der Tumorproben auf. Beispielhaft sei hier das Material der Eppendorfgefäße einer bestimmten Charge erwähnt. Dieses löste sich bei einliegendem Lysat aus dem Gewebeverbund der Gefäßwand, ging in die Lösung über und war dort in Konzentrationen nachzuweisen, die die anderen Inhaltsstoffe um Potenzen überstieg, so dass keinerlei verwertbare Befunde erhoben werden konnten. Da aus Effektivitätsgründen kombinierte Analysen mehrerer Tumoren durchgeführt wurden, erlangten selbst kleine Probleme rasch gravierende Ausmaße. Hinzu traten unzählige unerwartete Faktoren wie Gerätewartung oder -defekt, begrenzte Verfügbarkeit von Reagenzien oder Materialien, Materialumstellungen, usw. Eine dezidierte Erläuterung einzelner Details würde allerdings diesen Rahmen sprengen und keinen Informationsgewinn für kommende Analysen hervorbringen, so dass darauf verzichtet wurde.

---

<sup>261</sup> Schirle M. et al. 2001

Summa summarum führten sämtliche Faktoren zu einer mitunter signifikanten Steigerung des Hintergrundrauschens und einer Reduktion verwertbarer Informationen. Fraglos wurde mit den unter IV.3.1 – IV.3.4. beschriebenen Prozess- und Materialoptimierungen sowie durch penibles Arbeiten vielfältigste Anstrengungen unternommen, diese Probleme zu minimieren. Realistischerweise werden unbeeinflussbare Faktoren allerdings auch in Zukunft zu einer entscheidenden Begrenzung der Peptidausbeute beitragen.

#### **IV.4 Identifizierte Peptidliganden** **zur HLA- Motivverfeinerung**

Auf der Basis verbesserter Materialien und Methoden (vgl. IV.3) wurde als nächstes Ziel die Verifizierung und Verfeinerung bekannter HLA- Motive verschiedener Allele in Angriff genommen (vgl. I.10.2.3).

Die Untersuchungen basierten auf vielfältigen Vorversuchen und -kenntnissen, deren Exzerpt die SYFPEITHI- Datenbank mit ihren HLA- Motiven bildet. Durch Integration neuer, unbekannter MHC- I- gebundener Peptide werden diese Motive kontinuierlich verifiziert, verfeinert und erweitert. Während die Peptide aus den immortalisierten und damit artifiziell veränderten Zellen der Zellkulturen zwar geeignet sind, eine primäre Motivcharakterisierung vorzunehmen, können sie nicht als natürliche Liganden der jeweiligen Allele angesehen werden. Die entscheidende Verifizierung einer hypothetischen Motivstruktur gelingt deshalb nur unter Einsatz „natürlichen“, nativen, humanen Gewebes. Gestützt wird dieses Vorgehen durch etliche Korrekturen vorbeschriebener Motive, die sich aus sequentiell beschriebenen Liganden humanen Parenchyms ergaben<sup>262</sup>. Vor diesem Hintergrund fügte sich die Ligandenidentifikation bestens in den Prozess der Motivverifizierung ein.

Während prinzipiell sämtliche neu erfassten Liganden nach deren Veröffentlichung in die Datenbank integriert werden, wurde mit dieser Dissertation speziell

---

<sup>262</sup> [www.syfpeithi.de](http://www.syfpeithi.de)

die Verfeinerung der Motive HLA-A\*01, A\*24, A\*26 und B\*44 verfolgt. Obwohl diese Allele in der kaukasischen Bevölkerung häufig anzutreffen sind, waren nur einzelne der hier entdeckten Peptide bislang als Liganden menschlicher Gewebe bekannt (vgl. III.4.4.3.8, III.5.2.2.7, III.5.2.3.4). Ein weiterer Teil der Peptide war zwar vormals als Liganden beschrieben, jedoch noch nie auf Primär- oder Metastasengewebe von Kolonkarzinomen nachgewiesen worden. Unabhängig ihrer Relevanz im Bezug auf eine Vakzinierung listet Tab. 37 alle Peptide auf, die erstmalig auf humanem Gewebe identifiziert wurden. Tab. 38 zeigt alle Peptide, die zwar auf anderem humanen Gewebe vorbeschrieben, nun aber erstmals auf Kolokarzinom- oder dessen Metastasengewebe gefunden wurden. Tab. 39 zeigt die 3 Peptide, die als Liganden auf anderen HLA- Allelen bekannt waren und nun auf differenter Motiven präsentiert wurden.

**Tab. 37** zeigt eine Auflistung aller identifizierten Peptide, die bislang noch nie als Liganden auf den entsprechenden Allelen beschrieben wurden und damit durch diese Dissertation damit erstmalig detektiert wurden. Die letzte Spalte gibt das korrelierende Ursprungsgewebe mit der internen Nomenklatur an. Die Peptide sind wie üblich in der Einzelbuchstaben-Schreibweise als Sequenz der AS aufgeführt

Sequenz										Allel	Tumornomenklatur
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
T	S	D	Q	Q	R	Q	L	Y		A* 01	MET 2
V	T	E	I	D	Q	D	K	Y		A* 01	MET 2
N	T	D	S	P	L	R	Y			A* 01	MET 2
P	T	D	P	K	V	V	V	Y		A* 01	MET 2
Y	T	D	P	E	V	F	K	Y		A* 01	MET 2
G	T	D	E	L	R	L	L	Y		A* 01	MET 2
L	V	I	E	N	V	A	S	L		A* 02	CCA 49
K	I	Q	A	F	D	D	I			A* 02	CCA 61
I	L	Q	A	H	L	H	S	L		A* 02	CCA 61
D	Y	L	K	R	F	Y	L	Y		A* 24	CCA 60
F	Y	L	E	G	G	F	S	K	F	A* 24	CCA 60
I	Y	T	K	I	M	D	L	I		A* 24	CCA 60
Y	Y	I	F	I	P	S	K	F		A* 24	CCA 60
Q	Y	V	P	V	I	I	H	L	I	A* 24	CCA 60
S	Y	L	P	L	A	H	M	F		A* 24	CCA 60
K	Y	I	S	K	P	E	N	L		A* 24	MET 2
V	Y	I	E	K	N	D	K	L		A* 24	MET 2
V	Y	S	H	V	I	Q	K	L		A* 24	MET 2
V	Y	L	K	H	P	V	S	L		A* 24	MET 2
K	Y	P	D	R	V	P	V	I		A* 24	MET 2
R	Y	P	D	S	H	Q	L	F		A* 24	MET 2
G	Y	G	G	G	F	G	N	F		A* 24	MET 2
T	Y	L	E	K	A	I	K	I		A* 24	MET 2
V	Y	L	P	N	I	N	K	I		A* 24	MET 2
E	V	T	E	L	L	A	R	Y		A* 26	MET 3
F	T	V	D	Q	I	R	A	I		A* 26	MET 3
E	V	V	S	E	P	F	R	S	F	A* 26	MET 3
D	V	I	S	N	I	E	T	F		A* 26	MET 3
E	V	V	E	R	V	L	T	F		A* 26	MET 3
E	L	I	E	R	I	P	E	L		A* 26	MET 4
A	P	F	L	R	N	V	E	L		B* 07	MET 3
V	E	Y	R	I	K	I	S	F		B* 44	CCA 60
D	E	I	N	F	L	A	R	L		B* 44	CCA 60
D	E	I	N	F	L	R	A	L	Y	B* 44	CCA 60
D	A	Y	S	F	S	R	K	I		B* 51	CCA 49
D	P	F	A	F	I	H	K	I		B* 51	CCA 49
S	L	P	K	K	L	A	L	L		?	CCA 60
V	A	V	G	R	A	L	Y	Y		?	MET 2

Selbst die lange Ligandenliste des prädominierenden Allels A\*02 konnte durch einige, bislang unbekannte Liganden ergänzt werden. In Bezug auf die erwähnten HLA- Motive, die durch viele bekannte Liganden in zahlreichen Voruntersuchungen über Jahre hinweg definiert wurden, ergaben sich durch Integration der neuen Peptide *keine* Änderungen der vorbeschriebenen Feinstruktur.

Trotzdem muss die fortwährende Bestätigung der einzelnen Strukturen durch eine steigende Zahl an Liganden als essentielles Qualitätsmerkmal einer kontinuierlichen Optimierung und Erweiterung der

Datenbank SYFPEITHI angesehen werden, zu der diese Dissertation beitrug<sup>263</sup>. Durch die Integration der neu nachgewiesenen Liganden sind nun auch Peptide in der Datenbank vorhanden, die von Metastasen und damit von Gewebe stammten, das bislang nur in geringer Anzahl in SYFPEITHI repräsentiert worden war.

Sequenz										Allel	Tumor-nomen-klatur	Bisheriges Ursprungs-gewebe
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
I	T	D	S	A	G	H	I	L	Y	A* 01	MET 2	Niere
D	T	D	H	Y	F	L	R	Y	A* 01	MET 2	Niere	
A	I	D	Q	L	H	L	E	Y	A* 01	MET 2	Niere	
S	T	D	H	I	P	I	L	Y	A* 01	MET 2	?	
G	L	A	T	D	V	Q	T	V	A* 02	CCA 61	Niere	
A	I	V	D	K	V	P	S	V	A* 02	CCA 61	Niere	
N	V	I	R	D	A	V	T	Y	A* 02	CCA 61	Niere	
N	Y	I	D	K	V	R	F	L	A* 24	CCA 60	Niere	
T	Y	G	E	I	F	E	K	F	A* 24	CCA 60	Niere	
S	Y	I	E	H	I	F	E	I	A* 24	CCA 60	Niere	
L	Y	P	Q	F	M	F	H	L	A* 24	CCA 60	Niere	
A	Y	V	H	M	V	T	H	F	A* 24	MET 2	?	
V	Y	I	S	E	H	E	H	F	A* 24	MET 2	Niere	
A	Y	V	H	M	V	T	H	F	A* 24	MET 2	?	
G	R	I	G	V	I	T	N	R	B* 27	MET 2	?	
Y	Q	F	T	G	I	K	K	Y	B* 27	MET 2	Niere	
G	R	V	F	I	I	K	S	Y	B* 27	MET 2	Niere	
E	E	I	A	F	L	K	K	L	B* 44	CCA 60	Niere	
D	E	Y	I	Y	R	H	F	F	B* 44	CCA 60	Niere	
D	E	G	R	L	V	L	E	F	B* 44	CCA 60	Niere	

**Tab. 38** zeigt eine Auflistung aller identifizierten Peptide, die zwar als Liganden auf den entsprechenden Allelen vorbeschrieben worden waren, allerdings auf differentem humanem Gewebe. Zumeist waren sie auf Nierenzellkarzinomen detektiert worden und zeigten sich nun auf kolorektalen Karzinomen oder deren Metastasen. In Einzelfällen war das Ursprungsgewebe unbekannt.

<sup>263</sup> Stevanović S. et al. 2003

Sequenz										Allel	Tumor-nomen-klatur	Bisheriges Allel
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
D	E	F	K	I	G	E	L	F		B* 44	CCA 60	B* 18
F	E	A	P	I	K	L	V	F		B* 44	CCA 60	B* 18
V	L	P	K	L	Y	V	K	L		?	CCA 60	HLA- G

**Tab. 39** listet drei Peptide auf, die auf B\* 44 bzw. einem unbekanntem Motiv des CCA 60 gefunden wurden. Alle drei Peptide sind als Liganden vorbeschrieben, jedoch bislang lediglich auf differenten Motiven wie z.B. HLA- B\*18 oder dem HLA- G- Komplex detektiert worden.

## IV.5 Identifizierte Peptiliganden und ihre Relevanz als Zielstrukturen einer Vakzinierungstherapie

### IV.5.1 Differenzierung und Relevanz von Peptidliganden

Wiederholt wurde auf die Beschreibung immuntherapierelevanter Peptidliganden als Hauptziel dieser Dissertation hingewiesen. Nachdem im Ergebnisteil sämtliche Peptidliganden aufgelistet wurden, soll nachfolgend ihre Potenz im Hinblick auf eine Vakzinierungstherapie beleuchtet werden.

Die Relevanz der einzelnen Peptide als immunmodulatorisches Agens ergibt sich aus ihren Eigenschaften, als Fragmente tumorassoziierter Antigene auf oberflächlichen MHC- I- Molekülen präsentiert zu werden, eine T- Zell- Antwort zu generieren und hierüber das Immunsystem spezifisch zu stimulieren. „Normale“ Peptide als Fragmente ubiquitär vorhandener Proteine besitzen hingegen keine Tumorassoziation und kein Aktivierungspotential hinsichtlich des Immunsystems.

Charakteristika tumorassoziierter Proteine wie z.B. ihre Überexpression im Tumor spiegeln Kriterien für die Auswahl von Vakzinierungspeptiden wieder, die „relevante“ von der Vielzahl sonstiger intrazellulärer Proteine abzugrenzen vermögen (vgl. I.5.3). Diese sehr strikten, für eine erfolgreiche Karzinomtherapie jedoch unabdingbaren Auswahlkriterien führen dazu, dass die Suche nach „exklusiven Tumorpeptiden“ bislang nur sehr wenige verwertbare Zielliganden hervorgebracht hat.

Umso intensiver wurde dieses Ziel mit der vorliegenden Dissertation verfolgt. Hervorgehoben werden muss, dass im Unterschied zur Zellkultur durch die exklusive Verwendung reinen Tumorgewebes sämtliche Peptide a priori als Karzinomliganden und damit potentielle Zielstruktur angesehen werden konnten.

#### **IV.5.2 Darstellung relevanter Peptidliganden**

Basierend auf diesen Überlegungen wurden alle detektierten Peptide unter Einbezug der SWISS-Prot-Datenbank<sup>264</sup>, deren Querverweise sowie der übrigen verfügbaren Literatur auf ihre Tumorassoziation hin überprüft und hinsichtlich ihre immunogene Potenz evaluiert. Eine Auswahl der als relevant erachteten Peptidliganden wird im Folgenden dargestellt.

Im Einzelnen wird Bezug auf die reguläre Funktion der Ursprungsproteine genommen, gefolgt von pathophysiologischen Reaktionsmustern bis hin zu Einflüssen auf Tumorproliferation, -progression und -persistenz. Während ein Teil dieser Proteine bereits in kolorektalen Karzinomen nachgewiesen und als tumorassoziiert bzw. mit karzinogenem Potential klassifiziert wurde, war für andere Peptide bzw. deren Ursprungsproteine eine Korrelation zu malignen Erkrankungen anderer Entität beschrieben oder zumindest eine Assoziation zu Malignomen postuliert worden. Analog den Peptidlisten aus Kapitel III werden die Peptide in der üblichen Einbuchstabenabkürzung der AS zitiert. Die Charakteristika der Ursprungsproteine wie z.B. ihre zelluläre Funktion, ihre Länge in AS und ihr Molekulargewicht in Da werden zur besseren Übersichtlichkeit in einem rechtsbündigen Kästchen separat dargestellt. Der begleitende Text beschreibt gemäß obiger Erläuterung die maligne Assoziation des Proteins bzw. dessen Wirkungsweise im Tumor. Die Reihenfolge der Ergebnispräsentation orientiert sich an der Abfolge der Darstellung in Kap. III und nicht an der klinischen oder therapeutischen Relevanz.

---

<sup>264</sup> [www.expasy.org/sprot](http://www.expasy.org/sprot)

### IV.5.2.1 Peptidliganden des Kolonkarzinoms CCA 49

Die komplette Liste aller Liganden des Karzinom CCA 49 findet sich in Tab. 14 unter III.4.4.2.4.

#### IV.5.2.1.1 Fraktion 27: **SLAGGIIGV**

##### Heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein K

Das heterogene nukleäre Ribonukleoprotein K ist eines der zentralen Proteine, das über die Bindung an Poly(C)- Sequenzen cysteinreicher prä- mRNA ent-

<u>Funktion:</u>	Nukleäres Bindungsprotein
<u>Länge:</u>	463 AS
<u>MG:</u>	50976 Da

scheidenden Einfluss auf den Metabolismus der heterogenen nukleären Ribonukleinsäure (hnRNA) hat<sup>265</sup>. Welche Rolle das Protein, das in den vier Splicevarianten hnRNP-K A, B, C, D vorkommt, im Zellzyklus spielt, kann bislang nicht definitiv beurteilt werden<sup>266</sup>.

1999 wies Baber nach, dass hnRNP-K als Transkriptionsfaktor für das c-myc Gen anzusehen ist und durch Regulation dieses, für Zellwachstum und -differenzierung wichtigen Protoonkogens, direkten Einfluss auf die Entstehung kolorektaler Karzinome haben kann<sup>267</sup>.

Im Jahr 2002 wurde hnRNP-K im Rahmen groß angelegter Expressiondatenbanken auch auf Mammakarzinomen als überexprimiert beschrieben<sup>268</sup>.

#### IV.5.2.1.2 Fraktion 37: **DPFAFIHKI**

##### Retinoblastombindungsprotein 2 / -Homolog 1

Bereits der Name dieses Proteins impliziert zumindest die Tumorassoziation, wenn nicht gar -spezifität .

<u>Funktion:</u>	unbekannt
<u>Länge:</u>	1580 AS
<u>MG:</u>	179669 Da

Allerdings ist bislang nicht bekannt, welche Funktion

oder onkogene Relevanz dem Retinoblastombindungsprotein 2 tatsächlich zukommt. Da eine mögliche Korrelation zur Tumorgenese allerdings nicht von der Hand zu weisen ist, soll RBBP2H1 hier Erwähnung finden.

<sup>265</sup> Matunis M.J. et al. 1992

<sup>266</sup> Dejgaard K. et al. 1994

<sup>267</sup> Baber J.L. et al. 1999

<sup>268</sup> Harris R.A. et al. 2002

### IV.5.2.2 Peptidliganden des Kolonkarzinoms CCA 60

Die komplette Liste der Liganden des Karzinom CCA 60 findet sich in Tab. 21 unter III.4.4.3.8.

#### IV.5.2.2.1 Fraktion 34: **SLPKKLALL**

##### Leydigzelltumor- Protein- Homolog (10 kDa)

Die Funktion dieses auch als HPSC023 bezeichneten Proteins ist bislang unbekannt.

<u>Funktion:</u>	unbekannt
<u>Länge:</u>	99 AS
<u>MG:</u>	10577 Da

Seine Struktur führt allerdings zur der Annahme, dass es eine Rolle in der Entwicklung von Hyperkalzämien im Rahmen maligner Erkrankungen spielen könnte.

#### IV.5.2.2.2 Fraktion 35: **NYIDKVRFL**, Fraktion 36: **EEIAFLKKL**

##### Vimentin

Vimentin als Intermediärfilament der Klasse III wird in verschiedensten, nicht- epithelialen Geweben, v.a. in Zellen mesenchymalen Ursprungs wie z.B. in Fibro-

<u>Funktion:</u>	Intermediär- filament III
<u>Länge:</u>	465 AS
<u>MG:</u>	53520 Da

blasten, aber auch in T- und B- Lymphozyten exprimiert. Während der Zellteilung findet eine intensivierete Phosphorylierung und Reorganisation der Filamente des Homopolymers statt<sup>269</sup>. Eine gesteigerte Expression des cytoplasmatischen Vimentins mit erhöhten mRNA- Konzentrationen lässt sich durch Serum oder PDGF erreichen, während EGF, Insulin oder thrombozytenarmes Plasma zur verminderten Expression des Zytoskelettproteins führen<sup>270</sup>.

Der onkogene Einfluß des Intermediärfilamentes wurde erstmals 1989 beim Mammakarzinom beschrieben, nachdem sich in unterschiedlich transformierten Tumorzelllinien differente Expressionslevel des Vimentins nachgewiesen liesen. Zudem konnte eine Korrelation der Expression mit einer gesteigerten Tumorzelltransformation verifiziert werden<sup>271</sup>. Neben Mammakarzinomen weisen auch Osteosarkomzelllinien cDNA- Klone menschlichen Vimentins auf<sup>272</sup>.

<sup>269</sup> Perreau J. et al 1988

<sup>270</sup> Ferrari S. et al. 1986

<sup>271</sup> Sommers C.L. et al. 1989

<sup>272</sup> Gupta A.K. et al. 1990

IV.5.2.2.3 Fraktion 37: **TYGEIFEKF**NADH- Ubiquinon Oxidoreduktase Untereinheit

Das an der inneren Mitochondrienmembran lokalisierte Enzym NADH- Ubiquinon Oxidoreduktase sorgt in der Atmungskette für den Elektronentransfer von NADH auf elektrophile Akzeptoren wie z.B. Ubiquinon.

<u>Funktion:</u>	Enzymuntereinheit der Atmungskette
<u>Länge:</u>	119 AS
<u>MG:</u>	14187 Da

Das hier gefundene Peptid entstammt der B14.5B Untereinheit, die zusammen mit weiteren 40 Untereinheiten den vollständig charakterisierten Komplex I der Atmungskette bildet<sup>273</sup>.

Die onkogene Potenz dieses Enzym, vor allem im Hinblick auf kolorektale Karzinome, wurde bislang nur ungenügend charakterisiert. Allerdings berichtete J.W. Kim 2001 an die EMBL/ DDBJ- Datenbanken von einer mutierten Variante mit Valin an Position 46 unter dem Titel „Identification of a new oncogene in human cancer“, so dass die Oxidoreduktase einen nicht zu unterschätzenden Einfluss auf die Entwicklung von Karzinomen haben könnte. Mit Spannung darf die weitere Charakterisierung dieses Enzyms in Zukunft erwartet werden.

IV.5.2.2.4 Fraktion 37: **DEYIYRHFF**Zellzyklusprotein CPR8

CPR8 bzw. cell cycle progression restoration 8 sorgt als Zellzyklusprotein für die Integration der Wachstumsprozesse sowie für die notwendigen Grundfunktionen und -bedürfnisse der Zelle. Hierzu nimmt es

<u>Funktion:</u>	Protein der Zellzyklusregulation
<u>Länge:</u>	375 AS
<u>MG:</u>	44320 Da

Einfluss auf die zentralen Regulationsmoleküle des Zellzyklus wie Cycline, cyclinabhängige Kinasen (cyclin depending kinases bzw. CDK) oder deren Inhibitoren. Zellzyklusregulationsproteine wie CPR8 blockieren spezifisch den Zyklusstop in der G1- Phase der Zelle und weisen ähnliche Fähigkeiten wie Chaperone, Transkriptions- oder Translationsfaktoren, RNA- bindende Proteine, aber auch Cycline oder Tumorsuppressor- bindende Proteine auf<sup>274</sup>. Vor diesem Hintergrund ist ein Einfluss des CPR8 auf die Tumorgenese als möglich einzustufen, die Literatur liefert bislang jedoch noch keine entsprechenden Beweise.

<sup>273</sup> Loeffen J.L.C.M. et al. 1998

<sup>274</sup> Edwards M.C. et al. 1997

IV.5.2.2.5 Fraktion 39: **DEGRLVLEF**Matrin*IV.5.2.2.5.1 Physiologische Aufgaben von Matrin*

Matrin bzw. Matrilysin gehört der Großfamilie der **Ma-**trix- **Metallo**proteinasen (MMP) an, die mindestens 13 unterschiedliche Enzyme umfasst und für den Abbau verschiedener Kollagenfasern zuständig ist. Matrilysin

<u>Funktion:</u>	Matrix-Metalloproteinase
<u>Länge:</u>	267 AS
<u>MG:</u>	29677 Da

als MMP- 7 spaltet dabei Faserkollagen Typ I und III, Kollagen Typ IV und V sowie Fibronectin. Außerdem trennt es mit Hilfe von Kalzium oder Zink die B-Kette des Insulins bei AS 14/15 bzw. 16/17. Zudem beeinflusst Matrin den Abbau von Zelladhäsionsproteinen, Mediatoren der Apoptose und Wachstumsfaktoren<sup>275</sup>. Der genomische Aufbau von Matrilysin weicht in der Promotorregion auf Exon 6 stark von dem anderer MMPs ab. Analog zu Stromelysin der Ratte, weist MMP- 7 Elemente wie TATA, AP-1 und PEA3 auf, die durch EGF und Tumorpromotoren beeinflusst werden können<sup>276</sup>.

*IV.5.2.2.5.2 Matrin in der Entwicklung kolorektaler Karzinome*

Bereits 1988 wurde cDNA von Stromelysinen, zu denen neben MMP- 3 und -10 auch MMP- 7 gehört, in menschlichen Tumoren gefunden und ihnen fortan eine entscheidende Rolle in der Tumorgenese zugeschrieben<sup>277</sup>. Auch im Überstand der Rektumkarzinomzelllinie CaR-1 konnte Matrin nachgewiesen werden<sup>278</sup>. Aktuelle Theorien zum Einfluss von Matrin auf Genese und Progression kolorektaler Karzinome beschreiben folgende Mechanismen: Die häufig detektierte Mutation im APC- Tumorsuppressorgen (**A**denomatöse **P**olyposis **C**oli bzw. FAP, familiäre **a**denomatöse **P**olyposis, vgl. I.8.1.3) führt zu einem Funktionsverlust des codierten FAP- Proteins, das als Adhäsionsprotein Wechselwirkungen zu  $\alpha$ - und  $\beta$ - Catenin aufweist. Hieraus resultiert die Anhäufung von  $\beta$ - Catenin<sup>279,280</sup>, einem der Hauptkoproteine in der Genese kolorektaler Karzinome, das gemeinsam mit dem DNA- bindenden Protein TCF- 4 als Aktivator der Transkrip-

<sup>275</sup> Leeman M.F. et al. 2003

<sup>276</sup> Gaire M. et al. 1994

<sup>277</sup> Muller D. et al. 1988

<sup>278</sup> Miyazaki K. et al. 1990

<sup>279</sup> Ichikawa Y. et al. 2006

<sup>280</sup> Wong N.A. et al. 2002

tion fungiert. In Verbindung mit PEA3- Proteinen, einer Unterfamilie von Ets-Transkriptionsfaktoren, führt  $\beta$ - Catenin zur gesteigerten Transkription<sup>281</sup>, alleine hat  $\beta$ - Catenin hingegen keinen Effekt<sup>282</sup>. Zielgene sind neben Matrin<sup>283</sup> z.B. auch c-myc und cyclin D1 (vgl. I.5, I.8.1.5), die zu einer autonomen Proliferation kolorektaler Tumoren führen können.

Matrin ist in über 80% aller kolorektalen Karzinome des Menschen überexprimiert und als Promotor des frühen Tumorwachstums bekannt. Zudem wird dessen Einfluss auf das lokale Fortschreiten von Karzinomen vermutet, diese Assoziation ist für andere Metalloproteinasen bekannt<sup>284</sup>. Darüber hinaus scheint Matrin die Metastasierung kolorektaler Karzinome zu begünstigen<sup>285,286</sup>. Diese Theorie wurde auch durch den Nachweis hoher Produktionsraten an MMP- 7 in Lebermetastasen kolorektaler Karzinome gestützt<sup>287</sup>. Über seine Interaktion mit dem FAS/ FAS- Liganden- System scheint Matrin die Resistenzentwicklung gegenüber Oxaliplatin, das zur Behandlung des Kolonkarzinoms eingesetzt wird, zu vermitteln<sup>288</sup> und zudem die FAS- vermittelte Apoptose zu beeinflussen<sup>289</sup>.

#### *IV.5.2.2.5.3 Matrin in der Entwicklung anderer humaner Neoplasien*

In Adenokarzinomen des Pankreas korreliert die Matrinexpression mit der Tumorgroße, -ausdehnung und Lymphknotenmetastasierung sowie der K- ras- Mutationsrate (vgl. I.8.1.5)<sup>290</sup>. Auch in Ösophaguskarzinomen wird Matrin signifikant stärker exprimiert als in Normalgewebe und kann anhand des Expressionsniveaus als unabhängiger Prognosefaktor herangezogen werden<sup>291</sup>. Erhöhte Matrix- Metalloproteinasen im Urin wurden bei Nierenzellkarzinomen als Screeningparameter definiert<sup>292</sup>, zudem korreliert das Expressionslevel von Matrin mit der Graduierung dieser Tumoren<sup>293</sup>. Beim multiplen Myelom führt

---

<sup>281</sup> Lynch C.C. et al. 2004

<sup>282</sup> Crawford H.C. et al. 2001

<sup>283</sup> Brabletz T. et al. 1999

<sup>284</sup> Maurel J. et al. 2007

<sup>285</sup> Leeman M.F. et al. 2003

<sup>286</sup> Kurokawa S. et al. 2005

<sup>287</sup> Zeng Z.S. et al. 2002

<sup>288</sup> Almendro V. et al. 2009

<sup>289</sup> Wang W.S. et al. 2006

<sup>290</sup> Fukushima H. et al. 2001

<sup>291</sup> Yamashita K. Et al. 2000

<sup>292</sup> Sherief M.H. et al. 2003

<sup>293</sup> Sumi et al. 2003

Matrin unabhängig seiner eigenen, proteolytischen Aktivität über Konversion der Matrix- Metalloproteinase- 2 zur Osteodestruktion und Tumorausbreitung<sup>294</sup>. Zusammenfassend ist Matrin damit ein in vielen humanen Neoplasien exprimiertes Tumor- assoziiertes Antigen, dessen Detektion durch zytotoxische Lymphozyten bereits nachgewiesen werden konnte<sup>295</sup>.

#### *IV.5.2.2.5.4 Matrin bei nicht- malignen Veränderungen des Menschen*

Aber auch nicht- maligne Zellen zeigen bei Entzündungsprozessen – beispielsweise Mesangiumzellen bei akuten Glomerulonephritiden – eine verstärkte Expression von Matrix- Metalloproteinasen wie z.B. Matrilysin<sup>296</sup>. Die Inhibition der Proteinaseaktivität von MMP- 7 lässt sich neben der Hemmung des gebundenen Cofaktors Zinks durch eine Komplexbildung mit Hydroxamaten, Carboxylaten oder Sulfodiimininen erreichen<sup>297</sup>. Ob auch über einen Vakzinierungsansatz eine antiproliferative Wirkung hervorgerufen werden kann, ist unbekannt. Bereits 2004 wurde erwogen, Metalloproteinasen pharmakologisch zu alterieren und dadurch einen antitumorösen Effekt zu erzielen<sup>298</sup>.

#### IV.5.2.2.6 Fraktion 41: **FYLEGGFSKF**

##### Mitogen- aktivierte Protein- Kinase Phosphatase 3

Gemäß seiner Bezeichnung katalysiert das Enzym MKP- 3 durch die Abspaltung von an Tyrosin gebundene Phosphatresten die Inaktivierung von MAP-

<u>Funktion:</u>	Phosphatase
<u>Länge:</u>	381AS
<u>MG:</u>	42333 Da

Kinasen (**Mitogen- aktivierte Proteinkinasen**). Das Enzym gehört zu den nicht-rezeptorartigen Protein/Tyrosin- Phosphatasen mit doppelter Spezifität. Durch alternatives Splicing können zwei Isoformen des zytoplasmatischen Proteins hergestellt werden. Welchen Einfluss MKP- 3 als dualspezifische Phosphatase 6 anhand seiner Kodierung auf 12q21 auf die Entstehung von Pankreaskarzinomen hat, kann bislang nicht definitiv beurteilt werden<sup>299</sup>.

<sup>294</sup> Barillé S. et al. 1999

<sup>295</sup> Yokoyama Y. et al. 2008

<sup>296</sup> Marti H.P. et al. 1992

<sup>297</sup> Browner M.F. et al. 1995

<sup>298</sup> Wielockx B. et al 2004

<sup>299</sup> Furukawa T. et al. 1998

IV.5.2.2.7 Fraktion 42: **FYPPKVELF**Multifunktionales Protein ADE2

Als eines der drei multifunktionellen Proteine der Purinbiosynthese vereinigt ADE2 die Aktivität der Enzyme AIR- Carboxylase und SAICAR- Synthetase in

<u>Funktion:</u>	Purin- Biosynthese
<u>Länge:</u>	425 AS
<u>MG:</u>	47079 Da

einem Molekül. Beide Enzyme des AIRC- Gens auf Chromosom 4 katalysieren Schritt 6 und 7 in der Herstellung der Purinbasen. Der N- Terminus des Proteins entspricht der SAICAR- Synthetase, der unter Energieaufwand L- Aspartat an (S)-2-[5-Amino-1-(5-phospho-D-ribosyl)imidazol-4-carboxamido]succinat bindet. Den vorangestellten Prozess katalysiert am C- terminalen Ende die AIR- Carboxylase, die freies CO<sub>2</sub> mit 5-Amino-1-(5-phospho-D-ribosyl)imidazol verbindet.

Bislang unveröffentlichte Daten von W.V. Bienvenut, A. Potts und Kollegen aus dem Jahre 2004 weisen ADE2 in Geweben humaner B- Zell- Lymphome nach. Welches Potential ADE2 als Faktor in der Pathogenese maligner Tumoren beigemessen werden muss, ist allerdings bislang unklar.

IV.5.2.2.8 Fraktion 44: **DEINFLARL**Cytokeratin 6A

Keratine gehören zu einer Großfamilie von über 30 Proteinen, die sich zu Cytoskelett- Filamenten zusammenlagern und als Intermediärfilamente bezeichnet

<u>Funktion:</u>	Protein des Cytoskelettes
<u>Länge:</u>	563 AS
<u>MG:</u>	59914 Da

werden (vgl. Vimentin, IV.4.2.2.2). Zu den Typ II Keratin gehören neben Cytokeratin 6A (CK 6A) die Keratin 1 bis 8 mit einer Masse von 56 - 70 kDa. Sie unterscheiden sich von den sauren, etwas kleineren Keratinen 9 bis 20 (MG: 40 - 55 kDa) vom Typ I. Jeweils ein Molekül jeden Typs lagert sich zu einem heterodimeren Filament zusammen, im Fall von CK 6A beispielsweise Keratin 6 und 17. CK 6A ist in Ösophagus, Mundschleimhaut, Zungenpapillen und den äußeren Scheiden der Haarfollikel zu finden.

Defekte des Cytokeratin 6A führen zur Panchyonychia congenita bzw. dem Jadassohn- Lewandowsky- Syndrom, einer autosomal- dominant vererbten Verhornungsstörung. Hier treten palmoplantare und follikuläre Hyperkeratosen,

Onychogryposis, Hyperhidrosen und Blasenbildungen, fleckige Hautpigmentierungen und eine orale Leukoplakie auf<sup>300</sup>. Die orale Leukoplakie wiederum ist als obligate Präkanzerose in die Prozesse der Tumorgenese direkt involviert.

#### IV.5.2.2.9 Fraktion 45: DEFKIGELF

##### DNA- abhängige Proteinkinase

Die zur Familie der Phosphatidylinositol 3/4- Kinasen gehörende katalytische Untereinheit der DNA- abhängigen Proteinkinase (DNA-PK<sub>cs</sub>) ist als Serin-

<u>Funktion:</u>	Proteinkinase
<u>Länge:</u>	4128 AS
<u>MG:</u>	469089 Da

bzw. Threonin- Kinase an der Reparatur doppelsträngiger DNA- Brüche, der V(D)J- Rekombination (vgl. Kap. I) und der Modulation der Transkription beteiligt. Zur ATP- abhängigen Proteinphosphorylierung muss die Kinase an DNA gebunden sein, wobei die Regulation über die Interaktion mit KIP (**k**inase **i**nter- **a**cting **p**rotein), einem Calcium bindenden Protein, erfolgt<sup>301</sup>. Die DNA-PK<sub>cs</sub> selbst liegt in zwei Splicevarianten vor und besteht als Heterodimer aus den Untereinheiten KU70 und KU80.

Fallen die Reparaturprozesse der Kinase z.B. beim Defekt des kodierenden Gens aus, resultiert das Bild eines schweren Immundefektes, des sogenannten SCID (**s**evere **c**ombined **i**mmunodeficiency)<sup>302,303</sup>. Neben ihrer engen Beziehung zu den PI3/4- Kinasen zeigt DNA-PK<sub>cs</sub> auch Ähnlichkeit zum Produkt des Gens der Ataxia teleangiectatica (Louis- Barr- Syndrom), das sich durch genetische Instabilität und karzinogene Prädisposition auszeichnet<sup>304</sup> und damit die Entwicklung zur malignen Transformation vorgibt.

#### IV.5.2.2.10 Fraktion 46: YYIFIPSKF

##### Hq0256 Protein/ DEAD Box Protein

Während die Herkunft der meisten detektierten MHC- I- gebundenen Peptide einem einzigen Ursprungprotein eindeutig zuzuordnen war, konnten für einzelne Peptide, wie für YYIFIPSKF, mehrere potentielle Quellen definiert werden.

<sup>300</sup> Bowden P.E. et al. 1995

<sup>301</sup> Wu X., Lieber M.R. 1997

<sup>302</sup> Siple J.D. et al. 1995

<sup>303</sup> Poltoratsky V.P. et al. 1995

<sup>304</sup> Hartley K.O. et al. 1995

Konkret konnte das Peptid sowohl aus dem Hqp0256 als auch aus dem Dead Box Protein entstammen.

Leider existieren weder für das Hqp0256 Protein aus der Familie der Dead Box- Helikasen noch für das E4-Dead Box Protein (E4-DBP) suffiziente Informationen zu deren physiologischer Funktion. Allerdings ergaben sich erste Hinweise, dass E4-DBP als RNA-

**Hqp0256 Protein:**

Funktion: unbekannt

Länge: 274 AS

MG: 31181 Da

**DEAD Box Protein:**

Funktion: unbekannt

Länge: 455AS

MG: 50635 Da

Helikase das E1AE4 Protein des humanen Papillomavirus Typ 16 (HPV16) über den C- Terminus bindet und hierüber auf die Entstehung von Zervixkarzinomen begünstigen<sup>305</sup>. Ein direkter Einfluss auf das kolorektale Karzinom hingegen ist in der Literatur bislang nicht beschrieben.

#### IV.5.2.2.11 Fraktion 48: **SYLPLAHMF**

##### Synthetase 6 langkettiger Acyl- CoA

Fettsäuren werden zur Synthese bzw. Elongation, aber auch zum Abbau über die  $\beta$ - Oxidation in eine aktive, an Coenzym A gekoppelte Form überführt. Mit Magnesium als Cofaktor sorgt LACS 6 (long-chain

Funktion: Synthese und  
Abbau von  
Fettsäuren

Länge: 697 AS

MG: 77680 Da

acyl-CoA synthetase 6) als ATP- abhängiges Enzym für die Bindung des Coenzyms. Folglich spielen LACS 6 bzw. LACS 5 eine essentielle Rolle im Fettsäuremetabolismus des Gehirns und in Vorläuferzellen des Blutes, v.a. der roten Reihe. In niedrigen Konzentrationen kommt die Synthetase in fetalen Blutzellen, hämatopoetischen Stammzellen und frühen Vorläufern der Erythrozyten vor, in Retikulozyten dagegen sind große Mengen von LACS 6 zu finden<sup>306</sup>. Durch alternatives Splicen entstehen zwei Isoformen des Enzyms.

Eine Translokation t(5;12)(q31;p13) des kodierenden Gens ACS2 führt zu malignen, hämatologischen Systemerkrankungen wie myelodysplastischen Syndromen oder akuten myeloischen Leukämien<sup>307</sup>. Im Gegensatz zu hämatologischen Neoplasien ist der Einfluss von LACS 6 auf die Entwicklung solider Tumoren bislang noch weitestgehend unklar.

<sup>305</sup> Doorbar J. et al. 2000

<sup>306</sup> Malhotra K.T. et al. 1999

<sup>307</sup> Yagasaki F. et al. 1999

IV.5.2.2.12 Fraktion 48: **DEINFLRALY**Cytokeratin 4

Wie Cytokeratin 6A (vgl. IV.5.2.2.8) gehört auch Cytokeratin 4 (CK4) zur Klasse der basischen Typ II- Keratine und bildet als Heterotetramer mit dem Typ I-

<u>Funktion:</u>	Protein des Cytoskelettes
<u>Länge:</u>	534 AS
<u>MG:</u>	57295 Da

Keratin 13 Intermediärfilamente. Mit K4A1, K4A2 und K4B sind drei unterschiedliche Allele des auf Chromosom 12 kodierten Cytokeratin 4 bekannt<sup>308</sup>.

Wie CK6A ist CK4 in verschiedensten epithelialen Geweben in variierender Expression zu finden<sup>309</sup>. Welche Bedeutung CK4 in der Karzinogenese von Plattenepithelkarzinomen zukommt, ist noch nicht abschließend geklärt.

**IV.5.2.3 Peptidliganden der Kolonkarzinommetastase MET 2**

Die komplette Liste der Liganden der Kolonkarzinommetastase MET 2 findet sich in Tab.33 unter III.5.2.2.7

IV.5.2.3.1 Fraktion 22: **PTDPKVVVY**Absent in Melanoma 1 Protein

Dieses große Protein der  $\beta\gamma$ - Crystallin Superfamilie umfasst 6 längs angeordnete  $\beta\gamma$ - Crystallin- Domänen, gefolgt von einer Ricin B Lektin- Domäne mit insgesamt 1723 AS. Der Aufbau ähnelt Filamin oder Aktin- bindenden Proteinen.

<u>Funktion:</u>	Suppressorprotein maligner Melanome
<u>Länge:</u>	1723 AS
<u>MG:</u>	188646 Da

Gemäß M.E. Ray et al., die das Protein aus Lebergewebe isolieren konnten, besteht die Aufgabe von AIM1 in der Suppression maligner Melanome durch Interaktion mit Proteinen des Zytoskeletts<sup>310</sup>. Welche Relevanz AIM1 als Suppressor anderer Malignome hat, ist bislang unklar.

<sup>308</sup> Wanner R. et al. 1993

<sup>309</sup> Leube R.E. et al. 1988

<sup>310</sup> Ray M.E. et al. 1997

IV.5.2.3.2 Fraktion 23: **AYVHMVTHF***Bax Inhibitor- 1/ Testis enhanced gene transcript*

Das vornehmlich im Hoden angereicherte Protein Bax Inhibitor- 1 (BI- 1), das deshalb auch als „Testis enhanced gene transcript“ bezeichnet wird, führt über eine Interaktion mit den Protoonkogenen Bcl- 2 und Bcl- XL zur Suppression der Apoptose<sup>311</sup>. Der Aufbau mit einem nuclear-targeting Motiv legt den Wirkort von BI- 1 im Zellkern nahe<sup>312</sup>, während mehrere transmembranäre Domänen für die Lokalisation in räumlicher Nähe zu den assoziierten Proteinen der Bcl- 2 Familie in intrazellulären Membranen sprechen. Bei Überexpression kann BI- 1 die Apoptose effektiv unterdrücken und als Ausgangspunkt proliferativer Prozesse wirken<sup>313</sup>. Folglich soll Bax Inhibitor- 1 zur verminderten Expression von Bax und konsekutiv zu einer schlechteren Prognose bei Malignomen wie Seminomen, Blasenkarzinomen, der chronisch lymphatischen Leukämie oder Kolonkarzinomen führen. Andererseits kann Bax Inhibitor- 1 über eine Interaktion mit Bcl- 2 direkt zur Tumorentstehung beitragen, da Bcl- 2 selbst über die Suppression von p53- bedingten Apoptosevorgängen zur Karzinogenese in Mamma-, Blasen- und Bronchialkarzinomen, aber auch in Kolon- und Nierenzellkarzinomen führt. So scheint Bax vornehmlich Einfluss auf die Tumorinduktion, weniger auf die Tumorprogression zu nehmen<sup>314</sup>.

<u>Funktion:</u>	Suppressorprotein der Apoptose
<u>Länge:</u>	237 AS
<u>MG:</u>	26473 Da

IV.5.2.3.3 Fraktion 28: **VAVGRALYY***„DNA damage“ bindendes Protein 1*

Ultraviolettes Licht ist als physikalisches Kanzerogen hochmutagen und führt an der DNA zur charakteristischen Dimerisierung benachbarter Pyrimidinbasen. An diesen Stellen bindet „DNA damage“ bindendes Protein 1 (UV- DDB 1), entfernt ein 10 - 20 Basen langes Oligonucleotid und ersetzt anhand des komplementären Einzelstranges die Lücke durch Ligaseaktivität im Sinne einer Nucleotidexzisionsreparatur. UV- DDB 1 ist auf Chromosom

<u>Funktion:</u>	DNA- Reparatonsprotein
<u>Länge:</u>	1140 AS
<u>MG:</u>	126967 Da

<sup>311</sup> Hayward R.L. et al. 2003

<sup>312</sup> Walter L. et al. 1995

<sup>313</sup> Xu Q., Reed J.C. 1998

<sup>314</sup> Redondo M. et al. 2003

11 kodiert und setzt sich als Multienzymkomplex aus der p127- und der 48 kDa schweren DDB2- Untereinheit zusammen<sup>315</sup>.

Die Bedeutung dieses Systems lässt sich anhand folgenschwerer Erkrankung bei Defekten der Reparaturmechanismen abschätzen. Als hereditäre Erkrankung des Menschen führt Xeroderma pigmentosa bei den betroffenen Patienten zu einer extremen Sonnenempfindlichkeit der Haut und erhöht das Hauttumorrisiko signifikant<sup>316</sup>. Zudem wurde beobachtet, dass UV- DDB 1 mit dem X- Protein des Hepatitis B- Virus interagiert und neben der Reparatur der teils doppelsträngigen Virus- DNA zu veränderten zellulären Transkriptionsprozessen beitragen kann. Möglicherweise muss UV- DDB 1 damit als ein Cofaktor bei der Hepatitis- assoziierten Tumorentstehung angesehen werden<sup>317</sup>.

#### **IV.5.2.4 Peptidliganden der übrigen Tumoren**

Für die übrigen detektierten, hier jedoch nicht diskutierten Peptide bzw. deren Ursprungproteine von CCA 49, CCA 60 und MET 2 bzw. von OCA 3, CCA 61, MET 3 und MET 4 (vgl. III.4.2, III.4.4, III.5) konnte die Literaturrecherche keine Korrelationen zu proliferierenden Erkrankungen oder eindeutige Nachweise einer malignen Potenz liefern. Aufgrund der fehlenden Relevanz in Bezug auf eine Vakzinierungstherapie wurde deshalb auf ihre nähere Deskription verzichtet. Zudem lagen bei einigen Proteinen ungenügende Differenzierungskriterien (vgl. IV.5.1) vor, so dass auch deshalb der potentielle Einsatz als Vakzine als unrealistisch eingestuft werden musste.

#### **IV.5.3 Beurteilung der dargestellten Peptidliganden**

Alle unter IV.5.2 dargestellten Peptide bzw. ihre Ursprungproteine weisen eine Korrelation zu malignen Erkrankungen auf. Bei einem Teil wird ein direkter Einfluss auf die Genese kolorektaler Karzinome beschrieben, für die meisten detektierten Proteine ist bislang jedoch keine direkte Assoziation zu intestinalen Tumoren bekannt. Trotzdem ist bei letzteren zumindest eine unspezifische Ver-

---

<sup>315</sup> Dualan R. et al. 1995

<sup>316</sup> Cleaver J.E. 1969

<sup>317</sup> Lee T.H. et al. 1995

bindung zu verändertem Gewebe, ein Einfluss auf maligne Zelltransformationen oder gar ein konkreter Zusammenhang zu malignen Erkrankungen anderer Entitäten gegeben. Da Tumoren unterschiedlicher Entitäten neben karzinomspezifischen oft ähnliche bzw. kongruente Pathogenitätsmechanismen zugrunde liegen, wurden in die obige Auflistung der „relevanten Peptide“ auch Proteine integriert, die auf den ersten Blick unspektakulär und ohne Bezug zum kolorektalen Karzinom erscheinen. Die Erfahrung rät jedoch, die Liste irrelevanter Nichtigkeiten nicht aus den Augen zu verlieren, da sich nicht selten aus einer unbedeutenden Kleinigkeit der zentrale Aspekt einer Tumorerkrankung entpuppt.

Summa summarum haben sich unter allen identifizierten, drei Peptide bzw. Proteine herauskristallisiert, die möglicherweise diese zentrale Stellung in der Karzinogenese einnehmen. Konkret handelt es sich um das **heterogene nukleäre Ribonukleoprotein K**, **Matrin** und **Bax Inhibitor- 1**. Über eine unspezifische karzinogene Assoziation hinausgehend werden sowohl das heterogene nukleäre Ribonukleoprotein K als auch die Matrix- Metalloproteinase Matrin in Kolonkarzinomen oder äquivalenten Zellkulturen exprimiert (vgl. IV.5.2.1.1, IV.5.2.2.5). Zudem sind beide Proteine als onkogene Faktoren in die Tumorgenese direkt involviert. Darüber hinaus konnte Matrin im Rahmen dieser Dissertation erstmalig als MHC- I- präsentiertes Peptid auf Kolonkarzinomgewebe detektiert werden. Diese enge Korrelation zum Kolonkarzinom wird in der Literatur auch für Bax Inhibitor- 1 diskutiert (vgl. IV.5.2.3.2), zumal dessen onkogene Potenz durch Suppression der physiologischen Apoptose fraglos existiert. Dass Bax Inhibitor- 1 im Rahmen dieser Arbeit auf der Metastase eines kolorektalen Karzinoms nachgewiesen werden konnte, untermauert diese Hypothese.

Basierend auf dieser auch von der Literatur geteilten Einschätzung der direkten Tumorassoziation, muss für hnRNP K, Matrin und BI- 1 als etwaige Zielstrukturen einer Vakzinierung zudem die differente Proteinexpression – Überexpression im Tumor und verminderte bzw. fehlende Expression im Parenchym – gegeben sein. Leider wurde bei allen drei Karzinomen neben dem Tumor kein korrelierendes Parenchymgewebe asserviert, so dass diese Untersuchungen in direktem Vergleich nicht erfolgen konnten. Zieht man allerdings Expressionsdaten der Literatur heran, wird bestätigt, dass alle drei Peptide bzw. Proteine in

unverändertem Kolonparenchym nicht oder allenfalls minimal exprimiert werden. Konsekutiv konnte nach ergänzender Verifikation von MatrIn als weitverbreitetes Tumorantigen auch seine immunogene Wirkung anhand der effektiven T- Zell- Stimulation nachgewiesen werden<sup>318</sup>. Sollte sich diese Aktivierung auch für die anderen Antigene bestätigen lassen – diese Untersuchungen sind geplant –, könnten alle drei Peptide als geeignete Liganden angesehen und als Zielstrukturen einer Vakzinierung definiert werden.

#### **IV.5.4 Relevanz des Ursprungsgewebes**

Abschließend stellte sich die Frage, ob – und falls ja, welchen – Einfluss das Ursprungsgewebe auf die Ligandenpräsentation und damit eine Vakzinierungsbehandlung hat. Im Hinblick auf die drei „relevanten“ Proteine waren zwei der drei Peptide aus dem Primarius der Erkrankung, dem kolorektalen Karzinom selbst, identifiziert worden. Demgegenüber wurde Bax Inhibitor- 1 in der Lebermetastase eines kolorektalen Karzinoms gefunden.

Ein Problem bei der Verwendung von Peptiden aus Metastasengewebe könnte das Ligandrom darstellen, das im Verlauf der Entwicklung vom Primarius bis hin zur Metastase - im Fall von MET 2 immerhin 755 Tage - möglicherweise differiert (vgl. Abb. 54). Diese Befürchtung konnte partiell durch Untersuchungen aus dem Jahr 2009 entkräftet werden, die sowohl auf primärem Tumor- als auch auf Metastasengewebe das gleiche HLA- Ligandenprofil nachzuweisen vermochten<sup>319</sup>. Nichtsdestotrotz muss als Zielstruktur einer Vakzinierung das Gewebe maßgeblich sein, das die höchste proliferative Aktivität aufweist, von dem die größte Bedrohung für den Patienten ausgeht und das am immogensten wirken kann. Unter dieser Sichtweise sollte es sich bei Erkrankungen im metastasierten Stadium zumeist um das Metastasengewebe selbst handeln. Vielleicht kristallisieren sich nämlich erst durch die zeitliche Latenz bis zur Metastasierung die Proteine heraus, die die zentrale Rolle in der Progression der Erkrankung spielen, so dass der Einsatz von Peptiden aus Metastasengewebe dem „Stich ins Herz“ des Tumors gleichkommen würde.

---

<sup>318</sup> Yokoyama Y. et al. 2008

<sup>319</sup> Stickel J.S. et al. 2009

## **IV.6 Ergebnisse der Dissertation im Hinblick auf eine effektivere Immuntherapie**

Eingangs wurden die Ziele dieser Dissertation als allgemeine und spezielle Charakterisierung der Karzinomen (vgl. I.10.2.1), methodische Optimierung der Identifikation von Peptidliganden (vgl. I.10.2.2), Verfeinerung bekannter HLA-Motive (vgl. I.10.2.3) und Detektion neuer, unbekannter Liganden (vgl. I.10.2.4) auf Ösophagus-, Magen-, kolorektalen und Nierenzellkarzinomen definiert. Alle Einzelziele sind unter der Vorstellung zusammenzufassen, durch eine effizientere Ligandenidentifikation Differenzierungscharakteristika von Tumoren zu beschreiben, um hierüber das Immunsystem zu einer gezielten, antitumorösen Immunantwort zu stimulieren. Diese Form der Immunmodulation wird aufgrund der sequentiellen Applikation des Agens als Vakzinierungstherapie bezeichnet.

Nach Darstellung der Ergebnisse (vgl. Kap. III) und Einbettung derer in den Zusammenhang von Methodenoptimierung und Motivverfeinerung soll nun der Bogen zu den einleitenden Worten gespannt, das Wissen um die neuen Liganden in Bezug zur bisherigen Immuntherapie gesetzt und die sich eröffnenden, verbesserten Behandlungsoptionen ausgelotet werden. Die Arbeit beschreitet damit einen Weg von der Asservierung und Analyse nativen Tumorgewebes über die Charakterisierung tumorspezifischer Strukturen bis hin zu deren Evaluation und Integration als neue Therapieansätze.

### **IV.6.1 Basis der Vakzinierungstherapie**

Vorab muss der Stand der bisherigen Vakzinierungstherapie kurz skizziert werden, um das hinzugewonnene Wissen hierzu in Bezug setzen zu können (vgl. I.7.4, I.9.12.2).

Da die Vakzinierung auf eine effektive Antwort des Immunsystems abzielt, entwickelten sich erste Therapiestrategien beim sehr immunogenen Melanom. Zum Einsatz kamen Tumorlysate<sup>320,321</sup>, einfache RNA<sup>322</sup> und DNA<sup>323,324</sup>, Pepti-

---

<sup>320</sup> Wallack M.K. et al. 1995

<sup>321</sup> Repmann R. et al. 2003

de<sup>325,326,327</sup>, Proteine oder mit Antigenen beladene, dendritische Zellen<sup>328,329,330,331</sup>, um eine spezifische, antitumoröse Reaktion des menschlichen Immunsystems hervorzurufen. Die Resultate waren je nach Methodik, aber selbst bei identischem Ansatz sehr different und reichten von einer kompletten Ineffektivität über eine nachweisbare Immunreaktion in vitro sowie in vivo bis hin zur manifesten Tumorregression.

Auf den teils hoffnungsvollen Ansätzen aufbauend, wurden diese Therapieformen zur Behandlung anderer Malignome adaptiert. Hierunter befanden sich solide Tumoren wie Ovarial-<sup>332</sup>, Mamma-<sup>333</sup>, Schilddrüsen-<sup>334</sup> und Prostatakarzinome<sup>335,336,337</sup>, aber auch hämatologische Neoplasien wie Non-Hodgkin-Lymphome<sup>338,339,340</sup>. Wiederum ergaben sich sehr unterschiedliche Ergebnisse, so dass die Vakzinierung auch bei Nierenzell- und kolorektalen Karzinomen eingesetzt wurde.

## **IV.6.2 Bisherige Vakzinierungstherapie**

### **IV.6.2.1 Vakzinierungstherapie des Nierenzellkarzinoms**

Da für das Nierenzellkarzinom nur wenige systemtherapeutische Optionen existieren, wurden immunologischen Behandlungsansätze bereits frühzeitig intensiv verfolgt (vgl. I.9.12). Eine gute Zusammenfassung der dabei eingesetzten Prinzipien liefert Gouttefangeas et al.<sup>341</sup>. An der Universität Tübingen konnten in

---

<sup>322</sup> Nair S. et al. 2007

<sup>323</sup> Wolchok J.D. et al. 2007

<sup>324</sup> Yamano T. et al. 2006

<sup>325</sup> Parmiani G. et al. 2002

<sup>326</sup> Paschen A. et al. 2005

<sup>327</sup> Schmidt W. et al. 1997

<sup>328</sup> Nestle F.O. et al. 1998

<sup>329</sup> Thurner B. et al. 1999

<sup>330</sup> Lesimple T. et al. 2006

<sup>331</sup> Nencioni A. et al. 2008

<sup>332</sup> Pinzon-Charry A. et al. 2006

<sup>333</sup> Brossart P. et al. 2000

<sup>334</sup> Schott M. et al. 2001

<sup>335</sup> Murphy G.P. et al. 1999

<sup>336</sup> Ragde H. et al. 2004

<sup>337</sup> Feyerabend S. et al. 2009

<sup>338</sup> Reichard V.L. et al. 2004

<sup>339</sup> Hsu F.J. et al. 1996

<sup>340</sup> Morisaki T. et al. 2003

<sup>341</sup> Gouttefangeas C. et al. 2007

mehreren Studien unter Verwendung dendritischer Zellen<sup>342</sup>, RNA<sup>343</sup> oder Peptiden die Generierung spezifischer T- Lymphozyten in vivo beobachtet werden<sup>344</sup>. Darüber hinaus zeigte sich teilweise ein klinisches Ansprechen mit Tumorstabilisierung und -remission<sup>345</sup>, das der zur damaligen Zeit eingesetzten Standardbehandlung mit Interferonen<sup>346</sup>, auch in Kombination mit ergänzenden Agenzien<sup>347,348</sup>, zumindest äquivalent war und weit weniger Nebenwirkungen beobachten ließ. Auch anderer Arbeitsgruppen konnten durch den Einsatz von Tumorlysaten vergleichbare Therapieerfolge verzeichnen<sup>349,350</sup>.

#### IV.6.2.2 Vakzinierungstherapie des kolorektalen Karzinoms

Daten zur Vakzinierung beim kolorektalen Karzinom waren in der Literatur anfänglich dünn gesät. Dies gründete im Vergleich zum Nierenzellkarzinom u.a. auf einem besseren Ansprechen auf konventionelle Behandlungen wie z.B. auf Chemotherapeutika (vgl. I.8.1.11). Allerdings wurde das bei anderen Karzinomen gewonnene Wissen im weiteren Verlauf auf die Behandlung des kolorektalen Karzinoms transferiert, so dass heutzutage auch für diese Entität Erfahrungen vorliegen. Zum Einsatz kamen RNA<sup>351</sup>, DNA und Tumorzelllysaten<sup>352</sup>, daneben einzelne Peptide<sup>353</sup>, teils synthetisch hergestellt<sup>354</sup>, teils direkt isoliert, von einem<sup>355</sup> oder mehreren tumorassoziierten Antigenen abgeleitet, identisch oder individualisiert<sup>356</sup>, als einzelne Moleküle appliziert oder auf dendritische Zellen geladen<sup>357</sup>, als Monotherapie oder mit anderen Therapieansätzen kombiniert<sup>358</sup> – beim Kolonkarzinom wurden viele immunologische Behandlungsan-

---

<sup>342</sup> Brossart P. et al. 2001

<sup>343</sup> Grünebach F. et al. 2005

<sup>344</sup> Grünebach F. et al. 2008

<sup>345</sup> Wierecky J. et al. 2006

<sup>346</sup> Coppin C. et al. 2005

<sup>347</sup> Yang J.C. et al. 2003

<sup>348</sup> Atzpodien J. et al. 2004

<sup>349</sup> Höttl L. et al. 2002

<sup>350</sup> Jocham et al. 2004

<sup>351</sup> Nencioni A. et al. 2003

<sup>352</sup> Tamir A. et al. 2007

<sup>353</sup> Goydos J.S. et al. 1996

<sup>354</sup> Speetjens F.M. et al. 2009

<sup>355</sup> Tsuruma T. et al. 2004

<sup>356</sup> Sato Y. et al. 2007

<sup>357</sup> Liu K.J. et al. 2004

<sup>358</sup> Weihrauch M.R. et al. 2005

sätze verfolgt<sup>359</sup>. Diese summierten sich bereits 2003 auf mehr als 1000<sup>360</sup> – viele weitere folgten. Wie bei anderen Entitäten konnte auch beim Kolonkarzinom ein sehr differentes Ansprechen beobachtet werden, gemessen an klinischen<sup>361</sup> oder laborchemischen Parametern<sup>362</sup>.

### **IV.6.3 Aktuelle Vakzinierungstherapie –**

#### **Optimierung durch erzielte Erkenntnisse**

In Kooperation des Immunologischen Instituts<sup>363</sup> mit den klinischen Abteilungen an der Universität Tübingen, speziell der Medizinischen Klinik II (Ärztlicher Direktor Prof. Dr. med. L. Kanz) und der Urologischen Klinik (Ärztlicher Direktor Prof. Dr. med. A. Stenzl), werden Vakzinierungsstrategien unter Einsatz von RNA (gegen die tumorassoziierte Antigene MUC1, CEA, Her-2/neu, Telomerase, Survivin und MAGE-1), vor allem jedoch von einzelnen oder multiplen Peptiden bei verschiedenen Tumorentitäten verfolgt. Hierbei konnten beachtliche Erfolge bis hin zur Stabilisierung oder gar partiellen Regression der Karzinome verzeichnet werden (vgl. IV.6.2, Abb. 83, 84). Momentan werden peptidbasierte Immuntherapien für Patienten mit Nierenzell- oder kolorektalen Karzinomen durchgeführt.

Werden die in dieser Dissertation detektierten Liganden vor diesem Hintergrund neuerlich beleuchtet, treten wiederum die drei „Favoritenpeptide“ – heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein K, Matrin und Bax Inhibitor- 1 – hervor. Sie erfüllen mit ihrem Expressionsmuster als tumorassoziierte Antigene die Grundvoraussetzung und konnten teilweise bereits ihr immunogenes Potential in der Stimulationsfähigkeit von cytotoxischen T- Zellen nachweisen<sup>364</sup>. Sollte sich auch bei hnRNP- K und BI- 1 eine gezielte T- Zell- Aktivierung bestätigen lassen, ist die Integration dieser Peptide in das Repertoire der Vakzinierungspeptide möglich. Künftige Vakzinierungen, z.B. im Rahmen neu aufgelegter Phase I/II- Studien, könnten auf diese größere Peptidvielfalt zurückgreifen und Patienten eine spe-

---

<sup>359</sup> Tsuruma T. et al. 2005

<sup>360</sup> Ridgway D. 2003

<sup>361</sup> Lesterhuis W.J. et al. 2006

<sup>362</sup> Nagorsen D. et al. 2006

<sup>363</sup> www.cms.elchtools.de

<sup>364</sup> Yokoyama Y. et al. 2008

zifischere und auf die individuellen Voraussetzungen zugeschnittenerer Behandlung offerieren. Zudem kann durch die größere Vielfalt der Peptide und ihren variableren Einsatz einer Resistenzentwicklung effektiver entgegengewirkt werden. Ein weiterer Vorteil aller 3 „Favoriten“ ist in der Bindung auf den häufig exprimierten Allelen HLA- A\*02 und -A\*24 und damit der Möglichkeit einer engen Einbindung in die Therapie zu sehen (vgl. Abb. 79).



**Abb. 83/ Abb. 84** demonstrieren die Regression der pulmonalen Metastase eines Nierenzellkarzinoms unter Vakzinierungstherapie. Zwei Computertomographien, vor (links) und nach (rechts) sechsmonatiger Vakzinierung, zeigen anhand je eines beispielhaften Querschnittsbildes auf thorakaler Höhe die singuläre, pulmonale Metastase im linken Oberlappen als weiße, runde Struktur (Markierung mit ). Beide Bilder vergleichend zeigt sich eine signifikante Regredienz von über 50% der Ausgangsgröße im Sinne einer partiellen Remission.

Abgesehen von der eigentlichen Rationalisierung mit den „neuen“ Peptiden darf die erzielte, nicht weniger wichtige Optimierung der Tumoraufarbeitung zur schnelleren und effizienteren Ligandenidentifikation nicht vernachlässigt werden. Hierüber sollte für künftige Patienten eine zügigere Analytik möglich sein, um bestenfalls noch vor Einleitung einer Vakzinierung das individuelle Ligandenprofil des Patienten zu erstellen. Auf diese Weise kann in Zukunft eine auf den einzelnen Patienten zugeschnittene Behandlung mit einer spezifischen Stimulation seines Immunsystems realisiert werden.

Summa summarum gliedern sich die gewonnenen Ergebnisse dieser Dissertation bestens in die bestehenden Strukturen und Konzepte der Vakzinierungstherapie ein und tragen zu einer Spezifizierung, aber auch größeren Variabilität bis hin zur Individualisierung der Behandlung bei.

### **IV.6.5 Perspektive der Vakzinierungstherapie**

Damit ist die Richtung vorgegeben, weg von einer ungerichteten, chemischen oder radiogenen Destruktion von Tumor-, aber auch gesundem, unverändertem Organgewebe hin zu einer zunehmend individualisierten Therapie, dem Prinzip der Vakzinierung folgend. Eine Therapie, die gezielt das Immunsystem als äußerst effektiven Mechanismus jedes einzelnen Menschen einsetzt, um genau die Strukturen zu eliminieren, die sich nicht an die Integrität des humanen Organismus halten.

Auf das bisherige sowie neu gewonnene Wissen aufbauend, könnten künftige Projekte beim Nierenzellkarzinom z.B. in einer Kombination der neu etablierten Antiangiogenesetherapie (Sinitinib<sup>365</sup>, Sorafenib<sup>366</sup>, Bevacizumab<sup>367</sup>, Temsirolimus) mit der Immuntherapie bestehen. Beim Kolonkarzinom hingegen könnte die aktuelle Standardbehandlung aus einer Immunpolychemotherapie im palliativen, aber auch adjuvanten oder neoadjuvanten Setting durch eine Vakzinierung ergänzt werden. Unabhängig davon, welche Konzepte in Zukunft gewählt werden – die Immuntherapie bietet die Möglichkeit einer gezielten und spezifischen Behandlung tumoröser Erkrankungen – ob als Monosubstanz oder in Kombination. Mit diesem Rüstzeug ist der Mensch gewappnet für seinen Kampf, denn:

**„Bisher mussten wir uns gegen die Natur behaupten.**

**Von nun an müssen wir uns gegen unsere eigene Natur behaupten.“**

**Dennis Gabor (1900- 1979)**

ungar.- brit. Physiker,  
Nobelpreisträger 1971

---

<sup>365</sup> Motzer R.J. et al. 2007

<sup>366</sup> Escudier B.J. et al. 2007 a

<sup>367</sup> Escudier B.J. et al. 2007 b

## **IV.7 Schlussfolgerung der Dissertation**

Damit fügt sich diese Dissertation in die Bestrebungen einer stetigen Behandlungsoptimierung von Nierenzell- und kolorektalen Karzinomen ein.

Nach eigenständiger Asservierung sämtlicher verfügbarer Tumorgewebe in Zusammenarbeit mit den chirurgischen und urologischen Kollegen, wurde mit einer allgemeinen sowie speziellen Charakterisierung jedes einzelnen Tumorgewebes der Grundstock für die weitere, detaillierte Ligandenanalyse als Primärziel der Dissertation gelegt. Diese umfasste mit Tumorgröße, -gewicht, -lokalisierung, HLA-Typisierung, Patientenalter und -geschlecht sowohl gewebe- als auch patientenspezifische Eigenschaften. Der epidemiologische Vergleich der erhobenen Daten bestätigte die Repräsentativität der erfassten Kohorte aus 65 Tumoren für die mitteleuropäische Population.

Von der Bearbeitung homogener Zellkulturlysate ausgehend wurden sämtliche Prozesse – wie beispielsweise Fragmentierung, physikalische und chemische Lyse, Inkubation, Extraktion, Präzipitation oder Zentrifugation – die solides Tumorgewebe in ein Eluat MHC-I-gebundener Peptide überführte, separat evaluiert und optimiert. Zudem konnten durch Verwendung qualitätsgeprüfter oder die eigenhändige Selektion bester Materialien die Effizienz der Methoden signifikant gesteigert werden. Darüber hinaus wurde das prädiktive Potential integrierter und addierter Analysen erfasst und in Kombination mit tumorspezifischen Selektionskriterien ein individuelles Aufarbeitungskonzept erarbeitet. Dadurch ist künftig eine schnellere, effizientere sowie kosten- und zeitreduzierte Analyse solider Tumoren möglich und eröffnet neue Möglichkeiten einer zeitnahen Vakzinierung auf Basis der individuell präsentierten MHC-I-Liganden.

Siebzig dieser Peptide konnten im Rahmen der Dissertation aus insgesamt 65 Geweben von Nierenzell-, Ösophagus-, Magen und kolorektalen Karzinomen als auch aus ihren Leber- und Nierenmetastasen isoliert werden. Neben bekannten befanden sich hierunter Liganden, die sich entweder bislang nur auf unterschiedlichen HLA-Motiven gebunden oder auf dem entsprechenden Ursprungsgewebe noch nie zuvor fanden. Zudem wurden vielfältige Peptide nachgewiesen, die als neue, völlig unbekannte und – unabhängig des Tumormaterials –

erstmalig beschriebene MHC- I- Liganden gelten müssen. Da sich ihre Präsentation auf viele verschiedene HLA- Motive erstreckte, war die Verifizierung der korrelierenden HLA- Motive sowie die Integration der Peptide in die SYFPEITHI- Datenbank möglich. Während eine Motivkorrektur nicht notwendig wurde, erweiterten diese Peptide, vor allem aufgrund des tumorösen Ursprungs, das Repertoire der in der Datenbank aufgelisteten Liganden erheblich. Die Evaluation bislang unbekannter Peptide führte schließlich zum zentralen Ziel der Dissertation mit der Definierung neuer Vakzinierungspeptide. Drei dieser Peptide erfüllten mit ihrer physiologischen bzw. pathophysiologischen Wirkungsweise, dem Einfluss auf die Tumorgenese, -persistenz und -progression sowie durch ihre anhand der Daten der Literatur belegte differente Gewebeexpression die notwendigen Voraussetzungen. Folglich können die neu beschriebenen Peptide der Tumor- assoziierten Antigene heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein K, Matrin und Bax Inhibitor- 1 als hoffnungsvolle Kandidaten künftiger Vakzinierungskonzepte angesehen werden. Nachdem zusätzliche Bedingungen wie die suffiziente T- Zell- Stimulation bereits teilweise belegt werden konnten, eröffnen die Resultate Optionen einer variableren und damit resistenzmindernden, wirkungsvolleren, zielgerichteteren Behandlung tumoröser Erkrankungen. Diese wird durch die schnellere und effizientere Ligan- denidentifikation – wie oben beschrieben – zudem individualisiert. Summa summarum können die Erkenntnisse aus dieser Dissertation als erfolgreich und gewinnbringend eingestuft werden und als weiterer Schritt zur Etablie- rung einer effektiven Behandlung tumoröser Erkrankungen gelten, die auf der Stimulation und Modulation des körpereigenen Immunsystems gründet.

## V. Zusammenfassung

Nierenzell- und kolorektale Karzinome zählen zu den führenden Malignomentitäten der westlichen Welt und stellen bei schlechter Therapierbarkeit und hoher Mortalität für den einzelnen Menschen eine ernsthafte Bedrohung, für die Gesellschaft eine relevante Belastung durch Ausfall an Arbeitskraft und steigende Kosten dar. Für beide Tumoren wurde mit der Vakzinierungstherapie ein neuer Behandlungsansatz durch Utilisation des eigenen Immunsystems verfolgt. Die vorliegende Arbeit baut auf diesem Prinzip auf.

Nach Asservierung und allgemeiner bzw. spezieller Charakterisierung von über 50 nativen Tumorgeweben dieser Entitäten wurden über eine Säureextraktion nach Immunpräzipitation MHC- I- präsentierte Liganden der Tumorzelloberfläche isoliert und – mit Hilfe der jeweiligen HLA- Motive – massenspektrometrisch ihre Sequenz bestimmt. Insgesamt konnten 70 Liganden auf verschiedenen Tumorgeweben detektiert werden. Während ein Teil als vorbeschrieben bestätigt werden konnte, ließen sich andere, bekannte Peptide erstmalig auf diesen Entitäten nachweisen. Das Gros dieser Peptide war jedoch noch nie zuvor als HLA-Ligand identifiziert worden und konnte damit erstmalig beschrieben werden. Drei dieser bislang unbekannt Peptide entstammen Proteinen, die als Tumorassoziierte Antigene anzusehen sind und nach verifizierter T- Zell- Stimulation zur gezielten, tumorspezifischen Stimulation des Immunsystems beitragen können. Konkret handelt es sich dabei um Peptide aus dem heterogenen nukleären Ribonukleoprotein K, dem Bax Inhibitor- 1 sowie Matrin. Alle drei Peptide können folglich in Vakzinierungskonzepte integriert werden und als neue Zielstrukturen der Therapie gelten. Zudem führte eine Effizienzsteigerung der separat analysierten, optimierten und an das Gewebe adaptierten Tumoraufarbeitung zur schrittweisen Individualisierung der Behandlung.

Damit kann die vorliegende Dissertation anhand der gewonnenen Erkenntnisse die bestehende Immuntherapie von Nierenzell- und kolorektalen Karzinomen optimieren und dazu beitragen, die Behandlung künftig individualisierter, effizienter und für ein größeres Patientenkollektiv verfügbar zu machen.

## VI. Literaturverzeichnis

### VI.1 Original- und Übersichtsarbeiten:

Aarnio M., Mecklin J.P., Aaltonen L.A. Nyström-Lahti M., Järvinen H.J.:  
**Life-time risk of different cancers in hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) syndrome,**  
 Int J Cancer. 1995; 64(6): 430-433

Abe R., Hodes R.J.:  
**MIs determinants recognized by T cells,**  
 J Immunogenet. 1988; 15(1-3): 11-19

Alexander J.P., Kudoh S., Melsop K.A., Hamilton T.A., Edinger M.G., Tubbs R.R., Sica D., Tuason L., Klein E., Budowski R.M. et al.:  
**T- cells infiltrating renal cell carcinoma display a poor proliferative response even though they can produce interleukin 2 and express interleukin 2 receptors,**  
 Cancer Res. 1993; 53(6): 1380-1387

Almendro V., Ametller E., Garcia-Recio S., Collazo O., Casas I., Augé J.M., Maurel J., Gascón P.:  
**The role of MMP7 and its cross-talk with the FAS/FASL system during the acquisition of chemoresistance to oxaliplatin,**  
 PLoS ONE 2009; 4(3): e4728

Alwine J.C., Kemp D.J., Parker B.A., Reiser J., Renart J., Stark G.R., Wahl G.M.:  
**Detection of specific RNAs or specific fragments of DNA by fractionation in gels and transfer to diazobenzoyloxymethyl paper,**  
 Methods Enzymol. 1979; 68: 220-242

André T., Boni C., Mounedji-Boudiaf L., Navarro M., Tabernero J., Hickish T., Topham C., Zaninelli M., Clingan P., Bridgewater J., Tabah-Fisch I., de Gramont A.; Multicenter International Study of Oxaliplatin/ 5-Fluorouracil/ Leucovorin in the Adjuvant Treatment of Colon Cancer (MOSAIC) Investigators:  
**Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer,**  
 N Engl J Med. 2004; 350(23): 2343-2351

Atkins M.B., Hidalgo M., Stadler W.M., Logan T.F., Dutcher J.P., Hudes G.R., Park Y., Liou S.H., Marshall B., Boni J.P., Dukart G., Sherman M.L.:  
**Randomized phase II study of multiple dose levels of CCI-779, a novel mammalian target of rapamycin kinase inhibitor, in patients with advanced refractory renal cell carcinoma,**  
 J Clin Oncol. 2004; 22(5): 909-918

Atzpodien J., Kirchner H., Jonas U., Bergmann L., Schott H., Heynemann H., Fornara P., Loening S.A., Roigas J., Müller S.C., Bodenstein H., Pomer S., Metzner B., Rebmann U., Oberneder R., Siebels M., Wandert T., Puchberger T., Reitz M.; Prospectively Randomized Trial of the German Cooperative Renal Carcinoma Chemoimmunotherapy Group (DGCIN):

**Interleukin-2- and interferon alfa-2a-based immunochemotherapy in advanced renal cell carcinoma: a Prospectively Randomized Trial of the German Cooperative Renal Carcinoma Chemoimmunotherapy Group (DGCIN),**

J Clin Oncol. 2004; 22(7): 1188-1194

Baber J.L., Libutti D., Levens D., Tjandra N.:

**High precision solution structure of the C-terminal KH domain of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K, a c-myc transcription factor,**

J Mol Biol. 1999; 289(4): 949-962

Barillé S., Bataille R., Rapp M.J., Harousseau J.L., Amiot M. :

**Production of metalloproteinase-7 (matrilysin) by human myeloma cells and its potential involvement in metalloproteinase-2 activation,**

J Immunol. 1999; 163(10): 5723-5728

Barnstable C.J., Bodmer W.F., Brown G., Galfre G., Milstein C., Williams A.F., Ziegler A.:

**Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens- new tools for genetic analysis,**

Cell. 1978; 14(1): 9-20

Barouch D., Friede T., Stevanović S., Tussey L., Smith K., Rowland-Jones S., Braud V., McMichael A., Rammensee H.-G.:

**HLA-A2 subtypes are functionally distinct in peptide binding and presentation,**

J Exp Med. 1995; 182(6): 1847-1856

Bevan M.J.:

**Antigen presentation to cytotoxic T lymphocytes in vivo,**

J Exp Med. 1995; 182(3): 639-641

Bian H., Hammer J.:

**Discovery of promiscuous HLA-II-restricted T cell epitopes with TEPITOPE,**

Methods. 2004; 34(4): 468-475

Bjorkman P.J., Saper M.A., Samraoui B., Bennett W.S., Strominger J.L., Wiley D.C.:

**Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2,**

Nature. 1987; 329(6139): 506-512

Bocchia M., Korontsvit T., Xu Q., Mackinnon S., Yang S.Y., Sette A., Scheinberg D.A.:  
**Specific human cellular immunity to bcr-abl oncogene-derived peptides,**  
 Blood. 1996; 87(9): 3587-3592

Boon T., van der Bruggen P.:  
**Human tumor antigens recognized by T lymphocytes,**  
 J Exp Med. 1996; 183(3): 725-729

Bos J.L.:  
**Ras oncogenes in human cancer: a review,**  
 Cancer Res. 1989; 49(17): 4682-4689  
 Erratum in Cancer Res. 1990; 50(4): 1352

Boss C.N., Grünebach F., Brauer K., Häntschel M., Mirakaj V., Weinschenk T., Stevanovic S., Rammensee H.-G., Brossart P.:  
**Identification and characterization of T-cell epitopes deduced from RGS5, a novel broadly expressed tumor antigen,**  
 Clin Cancer Res. 2007; 13(11): 3347-3355

Bowden P.E., Haley J.L., Kansky A., Rothnagel J.A., Jones D.O., Turner R.J.:  
**Mutation of a type II keratin gene (K6a) in pachyonychia congenita,**  
 Nat Genet. 1995; 10(3): 363-365

Brabletz T., Jung A., Dag S., Hlubek F., Kirchner T.:  
**Beta-catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer,**  
 Am J Pathol. 1999; 155(4): 1033-1038

Brändle D., Brasseur F., Weynants P., Boon T., van den Eynde B.:  
**A mutated HLA-A2 molecule recognized by autologous cytotoxic T lymphocytes on a human renal cell carcinoma,**  
 J Exp Med. 1996; 183(6): 2501-2508

Brasanac D., Müller C.A., Müller G.A., Hadzi-Dzokic J., Markovic-Lipkovski J.:  
**HLA class I antigens expression in renal cell carcinoma: histopathological and clinical correlation,**  
 J Exp Clin Cancer Res. 1999; 18(4): 505-510

Bravi F., Bosetti C., Scotti L., Talamini R., Montella M., Ramazzotti V., Negri E., Franceschi S., La Vecchia C.:  
**Food groups and renal cell carcinoma: A case-control study from Italy,**  
 Int J Cancer 2007; 120(3): 681-685  
 Brossart P., Wirths S., Stuhler G., Reichardt V.L., Kanz L., Brugger W.:  
**Induction of cytotoxic T-lymphocyte responses in vivo after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells,**  
 Blood 2000; 96(9): 3102-3108

Brossart P., Wirths S., Brugger W., Kanz L.:

**Dendritic cells in cancer vaccines,**  
Exp Hematol. 2001; 29(11): 1247-1255

Browner M.F., Smith W.W., Castelhana A.L.:

**Matrilysin-inhibitor complexes: common themes among metalloproteases,**  
Biochemistry. 1995; 34(20): 6602-6610

Brusic V., Rudy G., Harrison L.C.:

**MHCPEP, a database of MHC-binding peptides: update 1997,**  
Nucleic Acids Res. 1998; 26(1): 368-371

Burnette W.N.:

**"Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A,**  
Anal Biochem. 1981; 112(2): 195-203

Butterfield L.H., Koh A., Meng W., Vollmer C.M., Ribas A., Dissette V., Lee E., Glaspy J.A., McBride W.H., Economou J.S.:

**Generation of human T-cell responses to an HLA-A2.1-restricted peptide epitope derived from alpha-fetoprotein,**  
Cancer Res. 1999; 59(13): 3134-3142

Casiano C.A., Martin S.J., Green D.R., Tan E.M.:

**Selective cleavage of nuclear autoantigens during CD95 (Fas/APO-1)-mediated T cell apoptosis,**  
J Exp Med. 1996; 184(2): 765-770

Castellone M.D., Teramoto H., Williams B.O., Druey K.M., Gutkind J.S.:

**Prostaglandin E2 promotes colon cancer cell growth through a Gs-axin-beta-catenin signaling axis,**  
Science. 2005; 310(5753): 1504-1510

Chambers K.J., Morgan B.P.:

**Colorectal cancer and hemocult,**  
Aust N Z J Surg. 1980; 50(5): 464-467

Chan A.T., Giovannucci E.L., Schernhammer E.S., Colditz G.A., Hunter D.J., Willett W.C., Fuchs C.S.:

**A prospective study of aspirin use and the risk for colorectal adenoma,**  
Ann Intern Med. 2004; 140(3): 157-166

Cleaver J.E.:

**Xeroderma pigmentosum: a human disease in which an initial stage of DNA repair is defective,**  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1969; 63(2): 428-435

Cochrane G., Akhtar R., Aldebert P., Althorpe N., Baldwin A., Bates K., Bhattacharyya S., Bonfield J., Bower L., Browne P., Castro M., Cox T., Demiralp F., Eberhardt R., Faruque N., Hoad G., Jang M., Kulikova T., Labarga A., Leinonen R., Leonard S., Lin Q., Lopez R., Lorenc D., McWilliam H., Mukherjee G., Nardone F., Plaister S., Robinson S., Sobhany S., Vaughan R., Wu D., Zhu W., Apweiler R., Hubbard T., Birney E.:  
**Priorities for nucleotide trace, sequence and annotation data capture at the Ensembl Trace Archive and the EMBL Nucleotide Sequence Database,**  
 Nucleic Acids Res. 2008; 36(Databases issue): D5-12

Cohen A.J., Li F.P., Berg S., Marchetto D.J., Tsai S., Jacobs S.C., Brown R.S.:  
**Hereditary renal-cell carcinoma associated with a chromosomal translocation,**  
 N Engl J Med. 1979; 301(11): 592-595

Collins E.J., Garboczi D.N., Karpusas M.N., Wiley D.C.:  
**The three-dimensional structure of a class I major histocompatibility complex molecule missing the alpha 3 domain of the heavy chain,**  
 Proc Natl Acad Sci U S A. 1995; 92(4): 1218-1221

Coppin C., Porzsolt F., Kumpf J., Coldman A., Wilt T.:  
**Immunotherapy for advanced renal cell cancer,**  
 Cochrane Database Syst Rev. 2000; (3): CD001425  
 Update in Cochrane Database Syst Rev. 2005; (1): CD001425

Coppin C., Le L., Porzsolt F., Wilt T.:  
**Targeted therapy for advanced renal cell carcinoma,**  
 Cochrane Database Syst Rev. 2008; (2): CD006017

Crawford H.C., Fingleton B., Gustavson M.D., Kurpios N., Wagenaar R.A., Hassell J.A., Matrisian L.M.:  
**The PEA3 subfamily of Ets transcription factors synergizes with beta-catenin-LEF-1 to activate matrilysin transcription in intestinal tumors,**  
 Mol Cell Biol. 2001; 21(4): 1370-1383

Czerkinsky C., Andersson G., Ekre H.P., Nilsson L.A., Klareskog L., Ouchterlony O.:  
**Reverse ELISPOT assay for clonal analysis of cytokine production. I. Enumeration of gamma-interferon-secreting cells,**  
 J Immunol Methods. 1988; 110(1): 29-36

Dausset J.:  
**The major histocompatibility complex in man,**  
 Science. 1981; 213(4515): 1469-1474

De Gramont A., Figer A., Seymour M., Homerin M., Hmissi A., Cassidy J., Boni C., Cortes-Funes H., Cervantes A., Freyer G., Freyer G., Papamichael D., Le Bail N., Louvet C., Hendler D., de Braud F., Wilson C., Morvan F., Bonetti A.:  
**Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer,**

J Clin Oncol. 2000; 18(16): 2938-2947

Dejgaard K., Leffers H., Rasmussen H.H., Madsen P., Kruse T.A., Gesser B., Nielsen H., Celis J.E.:

**Identification, molecular cloning, expression and chromosome mapping of a family of transformation upregulated hnRNP-K proteins derived by alternative splicing,**

J Mol Biol. 1994; 236(1): 33-48

De Plaen E., Lurquin C., Lethé B., van der Bruggen P., Brichard V., Renauld J.C., Coulie P., Van Pel A., Boon T. :

**Identification of genes coding for tumor antigens recognized by cytolytic T lymphocytes,**

Methods. 1997; 12(2): 125-142

De Smet C., Lurquin C., Lethe B., Martelange V., Boon T.:

**DNA methylation is the primary silencing mechanism for a set of germ line- and tumor-specific genes with a CpG-rich promoter,**

Mol Cell Biol. 1999; 19(11): 7327-7335

DiBrino M., Tsuchida T., Turner R.V., Parker K.C., Coligan J.E., Biddison W.E.:  
**HLA-A1 and HLA-A3 T cell epitopes derived from influenza virus proteins predicted from peptide binding motifs,**

J Immunol. 1993; 151(11): 5930-5935

DiBrino M., Parker K.C., Shiloach J., Turner R.V., Tsuchida T., Garfield M., Biddison W.E., Coligan J.E.:

**Endogenous peptides with distinct amino acid anchor residue motifs bind to HLA-A1 and HLA-B8,**

J Immunol. 1994; 152(2): 620-631

DiBrino M., Parker K.C., Margulies D.H., Shiloach J., Turner R.V., Biddison W.E., Coligan J.E.:

**Identification of the peptide binding motif for HLA-B44, one of the most common HLA-B alleles in the Caucasian population,**

Biochemistry. 1995; 34(32): 10130-10138

Dick T.P., Stevanović S., Keilholz W., Ruppert T., Koszinowski U., Schild H., Rammensee H.-G.:

**The making of the dominant MHC class I ligand SYFPEITHI**

Eur J Immunol. 1998; 28(8): 2478-2486

Diehl M., Münz C., Keilholz W., Stevanović S., Holmes N., Loke Y.W., Rammensee H.-G.:  
**Nonclassical HLA-G molecules are classical peptide presenters,**  
Curr Biol. 1996; 6(3): 305-314

Dimopoulos M.A., Logothetis C.J., Markowitz A., Sella A., Amato R., Ro J.:  
**Collecting duct carcinoma of the kidney**  
Br J Urol. 1993; 71(4): 388-391

Disis M.L., Calenoff E., McLaughlin G., Murphy A.E., Chen W., Groner B., Jeschke M., Lydon N., McGlynn E., Livingston R.B., et al.:  
**Existent T-cell and antibody immunity to Her-2/neu protein in patients with breast cancer,**  
Cancer Res. 1994; 54(1): 16-20

Doorbar J., Elston R.C., Napthine S., Raj K., Medcalf E., Jackson D., Coleman N., Griffin H.M., Masterson P., Stacey S., Mengistu Y., Dunlop J.:  
**The E1E4 protein of human papillomavirus type 16 associates with a putative RNA helicase through sequences in its C terminus,**  
J Virol 2000; 74(21): 10081-10095

Dualan R., Brody T., Keeney S., Nichols A.F., Admon A., Linn S.:  
**Chromosomal localization and cDNA cloning of the genes (DDB1 and DDB2) for the p127 and p48 subunits of a human damage-specific DNA binding protein,**  
Genomics. 1995; 29(1): 62-69

Dubé C., Rostom A., Lewin G., Tsertsvadze A., Barrowman N., Code C., Sampson M., Moher D.; U.S. Preventive Services Task Force:  
**The use of aspirin for primary prevention of colorectal cancer: a systematic review prepared for the U.S. Preventive Services Task Force,**  
Ann Intern Med. 2007; 146(5): 365-375

Duensing S., van den Berg-de Ruitter E., Störkel S., Kirchner H., Hänninen E.L., Buer J., Poliwoda H., Atzpodien J.:  
**Cytogenetic studies in renal cell carcinoma patients receiving low-dose recombinant interleukin-2-based immunotherapy,**  
Tumour Biol. 1996; 17(1): 27-33

Dulbecco R., Vogt M.:  
**Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses,**  
J Exp Med. 1954; 99(2): 167-182

Edman P.:  
**A method for determination of amino acid sequence in peptides,**  
Arch Biochem. 1949; 22(3): 475

Edwards M.C., Liegeois N., Horecka J., DePinho R.A., Sprague G.F. Jr., Tyers M., Elledge S.J.:

**Human CPR (cell cycle progression restoration) genes impart a Far-phenotype on yeast cells,**

Genetics. 1997; 147(3): 1063-1076

Escudier B., Eisen T., Stadler W.M., Szczylik C., Oudard S., Siebels M., Negrier S., Chevreau C., Solska E., Desai A.A., Rolland F., Demkow T., Hutson T.E., Gore M., Freeman S., Schwartz B., Shan M., Simantov R., Bukowski R.M.; TARGET Study Group:

**Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma,**

N Engl J Med. 2007 a; 356(2): 125-134

Erratum in: N Engl J Med. 2007; 357(2): 203

Escudier B., Pluzanska A., Koralewski P., Ravaud A., Bracarda S., Szczylik C., Chevreau C., Filippek M., Melichar B., Bajetta E., Gorbunova V., Bay J.O., Bodrogi I., Jagiello-Gruszfeld A., Moore N.; AVOREN Trial investigators:

**Bevacizumab plus interferin alfa-2a for treatment of metastatic renal cell carcinoma: a randomised, double-blind phase III trial,**

Lancet. 2007 b; 370(9605): 2103-2111

Falk K., Rötzschke O., Stevanović S., Jung G., Rammensee H.-G.:

**Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules,**

Nature. 1991; 351(6324): 290-296

Falk K., Rötzschke O., Grahovac B., Schendel D., Stevanović S., Gnau V., Jung G., Strominger J.L., Rammensee H.-G.:

**Allele-specific peptide ligand motifs of HLA-C molecules,**

Proc Natl Acad Sci U S A. 1993; 90(24): 12005-12009

Falk K., Rötzschke O., Stevanović S., Jung G., Rammensee H.-G.:

**Pool sequencing of natural HLA-DR, DQ, and DP ligands reveals detailed peptide motifs, constraints of processing, and general rules,**

Immunogenetics. 1994 a; 39(4): 230-242

Falk K., Rötzschke O., Takiguchi M., Grahovac B., Gnau V., Stevanović S., Jung G., Rammensee H.-G.:

**Peptide motifs of HLA-A1, -A11, -A31, and -A33 molecules,**

Immunogenetics. 1994 b; 40(3): 238-241

Falk K., Rötzschke O., Takiguchi M., Gnau V., Stevanović S., Jung G., Rammensee H.-G.:

**Peptide motifs of HLA-B51, -B52 and -B78 molecules, and implications for Behçet's disease,**

Int Immunol. 1995 a; 7(2): 223-228

Falk K., Röttschke O., Takiguchi M., Gnau V., Stevanović S., Jung G., Rammensee H.-G.:

**Peptide motifs of HLA-B58, B60, B61, and B62 molecules,**  
Immunogenetics. 1995 b; 41(2-3): 165-168

Ferrari S., Battini R., Kaczmarek L., Rittling S., Calabretta B., de Riel J.K., Philiponis V., Wei J.F., Baserga R.:

**Coding sequence and growth regulation of the human vimentin gene,**  
Mol. Cell. Biol. 1986; 6(11): 3614-3620

Feyerabend S., Stevanović S., Gouttefangeas C., Wernet D., Hennenlotter J., Bedke J., Dietz K., Pascolo S., Kuczyk M., Rammensee H.-G., Stenzl A.:

**Novel multi-peptide vaccination in HLA-A2+ hormone sensitive patients with biochemical relapse of prostate cancer,**  
Prostate. 2009 ; 69(9): 917-927

Fong L., Hou Y., Rivas A., Benike C., Yuen A., Fisher G.A., Davis M.M., Engleman E.G. ::

**Altered peptide ligand vaccination with Flt3 ligand expanded dendritic cells for tumor immunotherapy**  
Proc Natl Acad Sci U S A. 2001; 98(15): 8809-8814

Fukushima H., Yamamoto H., Itoh F., Nakamura H., Min Y., Horiuchi S., Iku S., Sasaki S., Imai K.:

**Association of matrilysin mRNA expression with K-ras mutations and progression in pancreatic ductal adenocarcinomas**  
Carcinogenesis. 2001; 22(7): 1049-1052

Furukawa T., Yatsuoka T., Youssef E.M., Abe T., Yokoyama T., Fukushima S., Soeda E., Hoshi M., Hayashi Y., Sunamura M., Kobari M., Horii A.:

**Genomic analysis of DUSP6, a dual specificity MAP kinase phosphatase, in pancreatic cancer,**  
Cytogenet Cell Genet. 1998; 82(3-4): 156-159

Gaire M., Magbanua Z., McDonnell S., McNeil L., Lovett D.H., Matrisian L.M.:

**Structure and expression of the human gene for the matrix metalloproteinase matrilysin,**  
J Biol Chem. 1994; 269(3): 2032-2040

Garboczi D.N., Ghosh P., Utz U., Fan Q.R., Biddison W.E., Wiley D.C.:

**Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2,**  
Nature. 1996; 384(6605): 134-141

García F., Galocha B., Villadangos J.A., Lamas J.R., Albar J.P., Marina A., Lópaz de Castro J.A.:  
**HLA-B27 (B\*2701) specificity for peptides lacking Arg2 is determined by polymorphism outside the B pocket,**  
 Tissue Antigens. 1997; 49(6): 580-587

Gardner E.J.:  
**A genetic and clinical study of intestinal polyposis, a predisposing factor for carcinoma of the colon and rectum,**  
 Am J Hum Genet. 1951; 3(2): 167-176

Garrett T.P., Saper M.A., Bjorkman P.J., Strominger L.J., Wiley D.C.:  
**Specificity pockets for the side chains of peptide antigens in HLA-Aw68**  
 Nature. 1989; 342(6250): 692-696

Gaudin C., Kremer F., Angevin E., Scott V., Triebel F.:  
**A hsp70-2 mutation recognized by CTL on a human renal cell carcinoma,**  
 J Immunol. 1999; 162(3): 1730-1738

Godley P.A., Ataga K.I.:  
**Renal cell carcinoma,**  
 Curr Opin Oncol. 2000; 12(3): 260-264

Gold P., Freedman S.O.:  
**Demonstration of tumor-specific antigens in human colonic carcinomata by immunological tolerance and absorption techniques,**  
 J Exp Med. 1965; 121: 439-462

Gouttefangeas C., Stenzl A., Stevanović S., Rammensee H.-G.:  
**Immunotherapy of renal cell carcinoma,**  
 Cancer Immunol Immunother. 2007; 56(1): 117-128

Goydos J.S., Elder E., Whiteside T.L., Finn O.J., Lotze M.T.:  
**A phase I trial of a synthetic mucin peptide vaccine. Induction of specific immune reactivity in patients with adenocarcinoma,**  
 J Surg Res. 1996; 63(1): 298-304

Grabmaier K., Vissers J.L., De Weijert M.C., Oosterwijk-Wakka J.C., Van Bokhoven A., Brakenhoff R.H., Noessner E., Mulders P.A., Merckx G., Figdor C.G., Adema G.J., Oosterwijk E.:  
**Molecular cloning and immunogenicity of renal cell carcinoma-associated antigen G250,**  
 Int J Cancer. 2000; 85(6): 865-870

Grawitz P.:  
**Die so genannten Lipome der Niere,**  
 Arch Path Anat. 1883; 93(1): 39-63

Greenlee R.T., Murray T., Bolden S., Wingo P.A.:

**Cancer statistics, 2000,**

CA Cancer J Clin. 2000; 50(1): 7-33

Grodstein F., Martinez M.E., Platz E.A., Giovannucci E., Colditz G.A., Kautzky

M., Fuchs C., Stampfer M.J.:

**Postmenopausal hormone use and risk for colorectal cancer and adenoma,**

Ann Intern Med. 1998; 128(9): 705-712

Grodstein F., Newcomb P.A., Stampfer M.J.:

**Postmenopausal hormone therapy and the risk of colorectal cancer: a review and meta-analysis,**

Am J Med. 1999; 106: 574-582

Groettrup M., Ruppert T., Kuehn L., Seeger M., Standera S., Koszinowski U., Kloetzel P.M.:

**The interferon- gamma- inducible 11 S regulator (PA28) and the LMP2/ LMP7 subunits govern the peptide production by the 20 S proteasome in vitro,**

J Biol Chem. 1995; 270(40): 23808-23815

Groll M., Ditzel L., Löwe J., Stock D., Bochtler M., Bartunik H.D., Huber R.:

**Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4Å resolution,**

Nature. 1997; 386(6624): 463-471

Grünebach F., Müller M.R., Brossart P.:

**RNA transfection of dendritic cells,**

Methods Mol Med. 2005; 109: 47-54

Grünebach F., Erndt S., Häntschel M., Heine A., Brossart P.:

**Generation of antigen-specific CTL responses using RGS1 mRNA transfected dendritic cells,**

Cancer Immunol Immunother. 2008; 57(10): 1483-1491

Gupta A.K., Aubin J.E., Waye M.M.:

**Isolation of a human vimentin cDNA with a long 3'-noncoding region from a human osteosarcoma cell line (MG-63),**

Gene. 1990; 86(2): 303-304

Hadeler K.P., Kuttler C., Nussbaum A.K.:

**Cleaving proteins for the immune system,**

Math Biosci. 2004; 188: 63-79

Hanahan D., Weinberg R.A.:

**The hallmarks of cancer,**

Cell. 2000; 100(1): 57-70

Harris R.A., Yang A., Stein R.C., Lucy K., Brusten L., Herath A., Parekh R., Waterfield M.D., O'Hare M.J., Neville M.A., Page M.J., Zvelebil M.J.:  
**Cluster analysis of an extensive human breast cancer cell line protein expression map database,**  
Proteomics. 2002; 2(2): 212-223

Hartley K.O., Gell D., Smith G.C., Zhang H., Divecha N., Connelly M.A., Admon A., Lees-Miller S.P., Anderson C.W., Jackson S.P.:  
**DNA-dependent protein kinase catalytic subunit: a relative of phosphatidylinositol 3-kinase and the ataxia telangiectasia gene product,**  
Cell. 1995; 82(5): 849-856

Hayward R.L., Macpherson J.S., Cummings J., Monia B.P., Smyth J.F., Jodrell D.I.:  
**Antisense Bcl-xl down-regulation switches the response to topoisomerase I inhibition from senescence to apoptosis in colorectal cancer cells, enhancing global cytotoxicity,**  
Clin Cancer Res. 2003; 9(7): 2856-2865

Hellsten S., Johnsen J., Berge T., Linell F.:  
**Clinically unrecognized renal cell carcinoma. Diagnostic and pathological aspects,**  
Eur Urol. 1990; 18 (Suppl.2): 2-3

Herr W., Wölfel T., Heike M., Meyer zum Büschenfelde K.H., Knuth A.:  
**Frequency analysis of tumor-reactive cytotoxic T lymphocytes in peripheral blood of a melanoma patient vaccinated with autologous tumor cells,**  
Cancer Immunol Immunother. 1994; 39(2): 93-99

Hickman H.D., Luis A.D., Buchli R., Few S.R., Sathiamurthy M., VanGundy R.S., Giberson C.F., Hildebrand W.H.:  
**Toward a definition of self: proteomic evaluation of the class I peptide repertoire,**  
J Immunol. 2004; 172(5): 2944-2952

Hillen N., Mester G., Lemmel C., Weinzierl A.O., Müller M., Wernet D., Hennenlotter J., Stenzl A., Rammensee H.-G., Stevanović S.:  
**Essential differences in ligand presentation and T cell epitope recognition among HLA molecules of the HLA-B44 supertype,**  
Eur J Immunol. 2008; 38(11): 2993-3003

Hofmockel G., Riess S., Bassukas I.D., Dämmrich J.:  
**Epidermal growth factor family and renal cell carcinoma: expression and prognostic impact,**  
Eur Urol. 1997; 31(4): 478-484

Hörtl L., Zelle-Rieser C., Gander H., Papesh C., Ramoner R., Bartsch G., Rogatsch H., Barsoum A.L., Coggin J.H.Jr, Thurnher M. :  
**Immunotherapy of metastatic renal cell carcinoma with tumor lysate-pulsed autologous dendritic cells,**  
Clin Cancer Res. 2002; 8(11): 3369-3376

Hsu F.J., Benike C., Fagnoni F., Liles T.M., Czerwinski D., Taidi B., Engleman E.G., Levy R.:  
**Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells,**  
Nat Med. 1996; 2(1): 52-58

Hurwitz H., Fehrenbacher L., Novotny W., Cartwright T., Hainsworth J., Heim W., Berlin J., Baron A., Griffing S., Holmgren E., Ferrara N., Fyfe G., Rogers B., Ross R., Kabbinavar F.:  
**Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer,**  
N Engl J Med. 2004; 350(23): 2335-2342

Ichikawa Y., Ishikawa T., Momiyama N., Kamiyama M., Sakurada H., Matsuyama R., Hasegawa S., Chishima T., Hamaguchi Y., Fujii S., Saito S., Kubota K., Hasegawa S., Ike H., Oki S., Shimada H.:  
**Matrilysin (MMP-7) degrades VE-cadherin and accelerates accumulation of beta-catenin in the nucleus of human umbilical vein endothelial cells,**  
Oncol Rep. 2006; 15(2): 311-315

Jocham D., Richter A., Hoffmann L., Iwig K., Fahlenkamp D., Zakrzewski G., Schmitt E., Dannenberg T., Lehmacher W., von Wietersheim J., Doehn C.:  
**Adjuvant autologous renal tumour cell vaccine and risk of tumour progression in patients with renal-cell carcinoma after radical nephrectomy: phase III, randomised controlled trial,**  
Lancet. 2004; 363(9409): 594-599

Jones E.Y.:  
**MHC class I and class II structures,**  
Curr Opin Immunol. 1997; 9(1): 75-79

Jonker D.J., O'Callaghan C.J., Karapetis C.S., Zalcborg J.R., Tu D., Au H.J., Berry S.R., Krahn M., Price T., Simes R.J., Tebbutt N.C., van Hazel G., Wierzbicki R., Langer C., Moore M.J.:  
**Cetuximab for the treatment of colorectal cancer,**  
N Engl J Med. 2007; 357(20): 2040-2048

Kawagoe N., Shintaku I., Yutani S., Etoh H., Matuoka K., Noda S., Itoh K.:  
**Expression of the SART3 tumor rejection antigen in renal cell carcinoma,**  
J Urol. 2000; 164(6): 2090-2095

Kessler J.H., Beekman N.J., Bres-Vloemans S.A., Verdijk P., van Veelen P.A., Kloosterman-Joosten A.M., Vissers D.C., ten Bosch G.J., Kester M.G., Sijts A., Wouter Drijfhout J., Ossendorp F., Offringa R., Melief C.J.:

**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. 2001; 193(1): 73-88

Khan A.R., Baker B.M., Ghosh P., Biddison W.E., Wiley D.C.:

**The structure and stability of an HLA-A\*0201/octameric tax peptide complex with an empty conserved peptide-N-terminal binding site,**  
J Immunol. 2000; 164(12): 6398-6405

Kim W.Y., Kaelin W.G.:

**Role of VHL gene mutation in human cancer,**  
J Clin Oncol. 2004; 22(24): 4991-5004

King L.B., Ashwell J.D.:

**Signaling for death of lymphoid cells,**  
Curr Opin Immunol. 1993; 5(3): 368-373

Kinouchi T., Saiki S., Meguro N., Maeda O., Kuroda M., Usami M., Kotake T.:

**Impact of tumor size on the clinical outcomes of patients with Robson state I renal cell carcinoma,**  
Cancer. 1999; 85(3): 689-695

Köhler G., Milstein C.:

**Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity,**  
Nature. 1975; 256(5517): 495-497

Kovacs G., Akhtar M., Beckwith B.J., Bugert P., Cooper C.S., Delahunt B., Eble J.N., Fleming S., Ljungberg B., Medeiros L.J., Moch H., Reuter V.E., Ritz E., Roos G., Schmidt D., Srigley J.R., Störkel S., van den Berg E., Zbar B.:

**The Heidelberg classification of renal cell tumours,**  
J Pathol. 1997; 183(2): 131-133

Krangel M.S., Band H., Hata S., McLean J., Brenner M.B.:

**Structurally divergent human T cell receptor gamma proteins encoded by distinct C gamma genes,**  
Science. 1987; 237(4810): 64-67

Krüger T., Schoor O., Lemmel C., Kraemer B., Reichle C., Dengjel J., Weinschenk T., Müller M., Hennenlotter J., Stenzl A., Rammensee H.-G., Stevanović S.:

**Lessons to be learned from primary renal cell carcinomas: novel tumor antigens and HLA ligands for Immunotherapy,**  
Cancer Immunol Immunother. 2005; 54(9): 826-836

Kubo R.T., Sette A., Grey H.M., Appella E., Sakaguchi K., Zhu N.Z., Arnott D., Sherman N., Shabanowitz J., Michel H.:

**Definition of specific peptide motifs for four major HLA-A alleles,**  
 J Immunol. 1994; 152(8): 3913-3924

Kuckelkorn U., Frentzel S., Kraft R., Kostka S., Groettrup M., Kloetzel P.M.:  
**Incorporation of major histocompatibility complex--encoded subunits LMP2 and LMP7 changes the quality of the 20S proteasome polypeptide processing products independent of interferon-gamma,**  
 Eur J Immunol. 1995; 25(9): 2605- 2611

Kurokawa S., Arimura Y., Yamamoto H., Adachi Y., Endo T., Sato T., Suga T., Hosokawa M., Shinomura Y., Imai K.:  
**Tumour matrilysin expression predicts metastatic potential of stage I (pT1) colon and rectal cancers,**  
 Gut . 2005; 54(12): 1751-1758

Kuttler C., Nussbaum A.K., Dick T.P., Rammensee H.-G., Schild H., Haderler K.P.:  
**An algorithm for the prediction of proteasomal cleavages,**  
 J Mol Biol. 2000; 298(3): 417-429

Laemmli U.K.:  
**Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4,**  
 Nature. 1970; 227(5259): 680-685

Lang H., Jacqmin D.:  
**Prognostic factors in renal cell carcinoma,**  
 EAU Update Series. 2003; 1(4): 215-219

Latif F., Tory K., Gnarra J., Yao M., Duh F.M., Orcutt M.L., Stackhouse T., Kuzmin I., Modi W., Geil L., Schmidt L., Zhou F., Li H., Wei M.H., Chen F., Glenn G., Choyke P., Walther M.M., Weng Y., Duan D.R., Dean M., Glavac D., Richards F.M., Crossey P.A., Ferguson-Smith M.A., Le Paslier D., Chumakov I., Cohen D., Chinault A.C., Maher E.R., Linehan W.M., Zbar B., Lerman M.I.:  
**Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene,**  
 Science. 1993; 260(5112): 1317-1320

Lecker S.H., Goldberg A.L., Mitch W.E.:  
**Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states,**  
 J Am Soc Nephrol. 2006; 17(7): 1807-1819

Lee N., Malacko A.R., Ishitani A., Chen M.C., Bajorath J., Marquardt H., Geraghty D.E.:  
**The membrane-bound and soluble forms of HLA-G bind identical sets of endogenous peptides but differ with respect to TAP association,**  
 Immunity. 1995; 3(5): 591-600

Lee T.H., Elledge S.J., Butel J.S.:  
**Hepatitis B virus X protein interacts with a probable cellular DNA repair protein,**  
 J Virol. 1995; 69(2): 1107-1114

Leeman M.F., Curran S., Murray G.I.:  
**New insights into the roles of matrix metalloproteinases in colorectal cancer development and progression,**  
 J Pathol. 2003; 201(4): 528-534

Lesimple T., Neidhard E.M., Vignard V., Lefeuvre C., Adamski H., Labarrière N., Carsin A., Monnier D., Collet B., Clapisson G., Birebent B., Philip I., Toujas L., Chokri M., Quillien V.:  
**Immunologic and clinical effects of injecting mature peptide-loaded dendritic cells by intralymphatic and intranodal routes in metastatic melanoma patients,**  
 Clin Cancer Res. 2006; 12(24): 7380-7388

Lesterhuis W.J., de Vries I.J., Schuurhuis D.H., Boullart A.C., Jacobs J.F., de Boer A.J., Scharenborg N.M., Brouwer H.M., van de Rakt M.W., Figdor C.G., Ruers T.J., Adema G.J., Punt C.J.:  
**Vaccination of colorectal cancer patients with CEA-loaded dendritic cells: antigen-specific T cell responses in DTH skin tests,**  
 Ann Oncol. 2006; 17(6): 974-980

Leube R.E., Bader B.L., Bosch F.X., Zimbelmann R., Achtstaetter T., Franke W.W.:  
**Molecular characterization and expression of the stratification-related cytokeratins 4 and 15,**  
 J Cell Biol. 1988; 106(4): 1249-1261

Li K., Adibzadeh M., Halder T., Kalbacher H., Heinzl S., Müller C., Zeuthen J., Pawelec G.:  
**Tumour-specific MHC-class-II-restricted responses after in vitro sensitization to synthetic peptides corresponding to gp100 and Annexin II eluted from melanoma cells,**  
 Cancer Immunol Immunother. 1998; 47(1): 32-38

Licht M.R., Novick A.C.:  
**Nephron sparing surgery for renal cell carcinoma,**  
 J Urol. 1993; 149(1): 1-7

Liu K.J., Wang C.C., Chen L.T., Cheng A.L., Lin D.T., Wu Y.C., Yu W.L., Hung Y.M., Yang H.Y., Juang S.H., Whang-Peng J.:

**Generation of carcinoembryonic antigen (CEA)-specific T-cell responses in HLA-A\*0201 and HLA-A\*2402 late-stage colorectal cancer patients after vaccination with dendritic cells loaded with CEA peptides,**

Clin Cancer Res. 2004; 10(8): 2645-2651

Ljungberg B., Alamdari F.I., Stenling R., Roos G.:

**Prognostic significance of the Heidelberg classification of renal cell carcinoma,**

Eur Urol. 1999; 36(6): 565-569

Loeffen J.L., Triepels R.H., van den Heuvel L.P., Schuelke M., Buskens C.A., Smeets R.J., Trijbels J.M., Smeitink J.A.:

**cDNA of eight nuclear encoded subunits of NADH:ubiquinone oxidoreductase: human complex I cDNA characterization completed,**

Biochem Biophys Res Commun. 1998; 253(2): 415-422

Lopez de Castro J.A., Alvarez I., Marcilla M., Paradela A., Ramos M., Sesma L., Vázquez M.:

**HLA-B27: a registry of constitutive peptide ligands,**

Tissue Antigens. 2004; 63(5): 424-445

Luckey C.J., Marto J.A., Partridge M., Hall E., White F.M., Lippolis J.D., Shabanowitz J., Hunt D.F., Engelhard V.H.:

**Differences in the expression of human class I MHC alleles and their associated peptides in the presence of proteasome inhibitors,**

J Immunol. 2001; 167(3): 1212-1221

Lupetti R., Pisarra P., Verrecchia A., Farina C., Nicolini G., Anichini A., Bordignon C., Sensi M., Parmiani G., Traversari C.:

**Translation of a retained intron in tyrosinase-related protein (TRP) 2 mRNA generates a new cytotoxic T lymphocyte (CTL)-defined and shared human melanoma antigen not expressed in normal cells of the melanocytic lineage,**

J Exp Med. 1998; 188(6): 1005-1016

Lynch C.C., Crawford H.C., Matrisian L.M., McDonnell S.:

**Epidermal growth factor upregulates matrix metalloproteinase-7 expression through activation of PEA3 transcription factors,**

Int J Oncol. 2004; 24(6): 1565-1572

Maeurer M.J., Storkus W.J., Kirkwood J.M., Lotze M.T.:

**New treatment options for patients with melanoma: review of melanoma-derived T-cell epitope-based peptide vaccines,**

Melanoma Res. 1996; 6(1): 11-24

Maier R., Falk K., Röttschke O., Maier B., Gnau V., Stevanović S., Jung G., Rammensee H.-G., Meyerhans A.:  
**Peptide motifs of HLA-A3, -A24, and -B7 molecules as determined by pool sequencing,**  
 Immunogenetics. 1994; 40(4): 306-308

Malcherek G., Falk K., Röttschke O., Rammensee H.-G., Stevanović S., Gnau V., Jung G., Melms A.:  
**Natural peptide ligand motifs of two HLA molecules associated with myasthenia gravis,**  
 Int Immunol. 1993; 5(10): 1229-1237

Malhotra K.T., Malhotra K., Lubin B.H., Kuypers F.A.:  
**Identification and molecular characterization of acyl-CoA synthetase in human erythrocytes and erythroid precursors,**  
 Biochem J. 1999; 344 Pt 1: 135-143

Marsh S.G., Albert E.D., Bodmer W.F., Bontrop R.E., Dupont B., Erlich H.A., Geraghty D.E., Hansen J.A., Hurley C.K., Mach B., Mayr W.R., Parham P., Petersdorf E.W., Sasazuki T., Schreuder G.M., Strominger J.L., Svejgaard A., Terasaki P.I., Trowsdale J.:  
**Nomenclature for Factors of the HLA System, 2004,**  
 Hum Immunol. 2005; 66(5): 571-636  
 Tissue Antigens. 2005; 65(4): 301-369  
 Int J Immunogenet. 2005; 32(2): 107-159

Marti H.P., McNeil L., Thomas G., Davies M., Lovett D.H.:  
**Molecular characterization of a low-molecular-mass matrix metalloproteinase secreted by glomerular mesangial cells as PUMP-1,**  
 Biochem J. 1992; 285(Pt 3): 899-905

Mason A.Y.:  
**Malignant tumours of the rectum. Part II: local excision,**  
 Clin Gastroenterol. 1975; 4(3): 582-593

Maurel J., Nadal C., Garcia-Albeniz X., Gallego R., Carcereny E., Almendro V., Mármol M., Gallardo E., Maria Augé J., Longarón R., Martínez-Fernandez A., Molina R., Castells A., Gascón P.:  
**Serum matrix metalloproteinase 7 levels identifies poor prognosis advanced colorectal cancer patients,**  
 Int J Cancer. 2007; 121(5): 1066-1071

Matunis M.J., Michael W.M., Dreyfuss G.:  
**Characterization and primary structure of the poly(C)-binding heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complex K protein,**  
 Mol Cell Biol. 1992; 12(1): 164-171

McCredie M., Stewart J.H.:

**Risk factors for kidney cancer in New South Wales-- I. Cigarette smoking,**  
Eur J Cancer. 1992; 28A(12): 2050-2054

Medeiros L.J., Jones E.C., Aizawa S., Aldape H.C., Cheville J.C., Goldstein  
N.S., Lubensky I.A., Ro J., Shanks J., Pacelli A., Jung S.H.:

**Grading of renal cell carcinoma: Workgroup No. 2. Union Internationale  
Contre le Cancer and the American Joint Committee on Cancer (AJCC),**  
Cancer. 1997; 80(5): 990-991

Meltzer S.J., Ahnen D.J., Battifora H., Yokota J., Cline M.J.:

**Protooncogene abnormalities in colon cancers and adenomatous polyps,**  
Gastroenterology. 1987; 92(5 Pt 1): 1174-1180

Ménétrier-Caux C., Bain C., Favrot M.C., Duc A., Blay J.Y.:

**Renal cell carcinoma induces interleukin 10 and prostaglandin E2  
production by monocytes,**  
Br J Cancer 1999; 79(1): 119-130

Miyazaki K., Hattori Y., Umenishi F., Yasumitsu H., Umeda M.:

**Purification and characterization of extracellular matrix-degrading  
metallopro- teinase, matrin (pump-1), secreted from human rectal  
carcinoma cell line,**  
Cancer Res. 1990; 50(24): 7758-7764

Moore G.E., Murphy G.P., Papermaster B.W., Amiraian K., Kenny G.M., Moore  
R.H.:

**Purified Roswell Park cultured antilymphocytic globulin RPMI-CALG:  
preparation and clinical trial,**  
J Surg Oncol. 1969 ; 1(2): 153-166

Morgan W.R., Zincke H.:

**Progression and survival after renal-conserving surgery for renal cell  
carcinoma: experience in 104 patients and extended followup,**  
J Urol. 1990; 144(4): 852-857

Morisaki T., Matsumoto K., Onishi H., Kuroki H., Baba E., Tasaki A., Kubo M.,  
Nakamura M., Inaba S., Yamaguchi K., Tanaka M., Katano M.:

**Dendritic cell-based combined immunotherapy with autologous tumor-  
pulsed dendritic cell vaccine and activated T cells for cancer patients:  
rationale, current progress, and perspectives,**  
Hum Cell. 2003; 16(4): 175-182

Morris H.R., Paxton T., Panico M., McDowell R., Dell A.:

**A novel geometry mass spectrometer, the Q-TOF, for low-  
femtomole/attomole-range biopolymer sequencing,**  
J Protein Chem. 1997; 16(5): 469-479

Motzer R.J., Mazumdar M., Bacik J., Berg W., Amsterdam A., Ferrara J.:  
**Survival and prognostic stratification of 670 patients with advanced renal cell carcinoma,**

J Clin Oncol. 1999; 17(8): 2530-2540

Motzer R.J., Hutson T.E., Tomczak P., Michaelson M.D., Bukowski R.M., Rixe O., Oudard S., Negrier S., Szczylik C., Kim S.T., Chen I., Bycott P.W., Baum C.M., Figlin R.A.:

**Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma,**

N Engl J Med. 2007; 356(2): 115-124

Motzer R.J., Escudier B., Oudard S., Hutson T.E., Porta C., Bracarda S., Grünwald V., Thompson J.A., Figlin R.A., Hollaender N., Urbanowitz G., Berg W.J., Kay A., Lebwohl D., Ravaud A.; RECORD-1 Study Group.:

**Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial,**

Lancet. 2008; 372(9637): 449-456

Motzer R.J., Hutson T.E., Tomczak P., Michaelson M.D., Bukowski R.M., Oudard S., Negrier S., Szczylik C., Pili R., Bjarnason G.A., Garcia-del-Muro X., Sosman J.A., Solska E., Wilding G., Thompson J.A., Kim S.T., Chen I., Huang X., Figlin R.A.:

**Overall survival and updated results for sunitinib compared with interferon alfa in patients with metastatic renal cell carcinoma,**

J Clin Oncol. 2009; 27(22): 3584-3690

Muller D., Quantin B., Gesnel M.C., Millon-Collard R., Abecassis J., Breathnach R.:

**The collagenase gene family in humans consists of at least four members,**

Biochem J. 1988; 253(1): 187-192

Mungall A.J., Palmer S.A., Sims S.K., Edwards C.A., Ashurst J.L., Wilming L., Jones M.C., Horton R., Hunt S.E., Scott C.E., Gilbert J.G., Clamp M.E., Bethel G., Milne S., Ainscough R., Almeida J.P., Ambrose K.D., Andrews T.D., Ashwell R.I., Babbage A.K., Bagguley C.L., Bailey J., Banerjee R., Barker D.J., Barlow K.F., Bates K., Beare D.M., Beasley H., Beasley O., Bird C.P., Blakey S., Bray-Allen S., Brook J., Brown A.J., Brown J.Y., Burford D.C., Burrill W., Burton J., Carder C., Carter N.P., Chapman J.C., Clark S.Y., Clark G., Clee C.M., Clegg S., Copley V., Collier R.E., Collins J.E., Colman L.K., Corby N.R., Coville G.J., Culley K.M., Dhimi P., Davies J., Dunn M., Earthrowl M.E., Ellington A.E., Evans K.A., Faulkner L., Francis M.D., Frankish A., Frankland J., French L., Garner P., Garnett J., Ghorri M.J., Gilby L.M., Gillson C.J., Glithero R.J., Grafham D.V., Grant M., Gribble S., Griffiths C., Griffiths M., Hall R., Halls K.S., Hammond S., Harley J.L., Hart E.A., Heath P.D., Heathcote R., Holmes S.J., Howden P.J., Howe K.L., Howell G.R., Huckle E., Humphray S.J., Humphries M.D., Hunt A.R., Johnson C.M., Joy A.A., Kay M., Keenan S.J., Kimberley A.M., King A., Laird G.K., Langford C., Lawlor S., Leongamornlert D.A., Leversha M., Lloyd C.R., Lloyd D.M., Loveland J.E., Lovell J., Martin S., Mashreghi-

Mohammadi M., Maslen G.L., Matthews L., McCann O.T., McLaren S.J., McLay K., McMurray A., Moore M.J., Mullikin J.C., Niblett D., Nickerson T., Novik K.L., Oliver K., Overton-Larty E.K., Parker A., Patel R., Pearce A.V., Peck A.I., Phillimore B., Phillips S., Plumb R.W., Porter K.M., Ramsey Y., Ranby S.A., Rice C.M., Ross M.T., Searle S.M., Sehra H.K., Sheridan E., Skuce C.D., Smith S., Smith M., Spraggon L., Squares S.L., Steward C.A., Sycamore N., Tamlyn-Hall G., Tester J., Theaker A.J., Thomas D.W., Thorpe A., Tracey A., Tromans A., Tubby B., Wall M., Wallis J.M., West A.P., White S.S., Whitehead S.L., Whittaker H., Wild A., Willey D.J., Wilmer T.E., Wood J.M., Wray P.W., Wyatt J.C., Young L., Younger R.M., Bentley D.R., Coulson A., Durbin R., Hubbard T., Sulston J.E., Dunham I., Rogers J., Beck S.:

**The DNA sequence and analysis of human chromosome 6,**  
Nature. 2003; 425(6960): 805-811

Muraro R., Wunderlich D., Thor A., Lundy J., Noguchi P., Cunningham R., Schlom J.:

**Definition by monoclonal antibodies of a repertoire of epitopes on carcinoembryonic antigen differentially expressed in human colon carcinomas versus normal adult tissues,**  
Cancer Res. 1985; 45(11 Pt 2): 5769-5780

Murphy G.P., Tjoa B.A., Simmons S.J., Ragde H., Rogers M., Elgamal A., Kenny G.M., Troychak M.J., Salgaller M.L., Boynton A.L.:

**Phase II prostate cancer vaccine trial: report of a study involving 37 patients with disease recurrence following primary treatment,**  
Prostate. 1999; 39(1): 54-59

Nagorsen D., Thiel E.:

**Clinical and immunologic responses to active specific cancer vaccines in human colorectal cancer,**  
Clin Cancer Res. 2006; 12(10): 3064-3069

Nagorsen D., Thiel E.:

**HLA typing demands for peptide-based anti-cancer vaccine,**  
Cancer Immunol Immunother. 2008; 57(12): 1903-1910

Nair S., Boczkowski D., Fassnacht M., Pisetsky D., Gilboa E.:

**Vaccination against the forkhead family transcription factor Foxp3 enhances tumor immunity,**  
Cancer Res. 2007; 67(1):371-380

Nencioni A., Müller M.R., Grünebach F., Garuti A., Mingari M.C., Patrone F., Ballestrero A., Brossart P.:

**Dendritic cells transfected with tumor RNA for the induction of antitumor CTL in colorectal cancer,**  
Cancer Gene Ther. 2003; 10(3): 209-214

Nencioni A., Grünebach F., Schmidt S.M., Müller M.R., Boy D., Patrone F., Ballestrero A., Brossart P.:

**The use of dendritic cells in cancer immunotherapy,**  
 Crit Rev Oncol Hematol. 2008; 65(3): 191-199

Nestle F.O., Alijagic S., Gilliet M., Sun Y., Grabbe S., Dummer R., Burg G., Schadendorf D.:

**Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells,**  
 Nat Med. 1998; 4(3): 328-332

Neumann E., Engelsberg A., Decker J., Störkel S., Jaeger E., Huber C., Seliger B.:

**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. 1998; 58(18): 4090-4095

Nussbaum A.K., Kuttler C., Haderl K.P., Rammensee H.-G., Schild H.:

**PAProC: a prediction algorithm for proteasomal cleavages available on the WWW,**  
 Immunogenetics. 2001; 53(2): 87-94

O'Brien S.G., Guilhot F., Larson R.A., Gathmann I., Baccarani M., Cervantes F., Cornelissen J.J., Fischer T., Hochhaus A., Hughes T., Lechner K., Nielsen J.L., Rousselot P., Reiffers J., Saglio G., Shepherd J., Simonsson B., Gratwohl A., Goldman J.M., Kantarjian H., Taylor K., Verhoef G., Bolton A.E., Capdeville R., Druker B.J.; IRIS Investigators:

**Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukaemia,**  
 N Engl J Med. 2003; 348(11): 994-1004

O'Neill H.C. :

**Heterogeneity among H-2Kk antigens. Differential expression on lymphoid cells,**  
 Transplantation. 1984; 38(2): 182-188

Ortmann B., Androlewicz M.J., Cresswell P.:

**MHC class I/ beta 2- microglobulin complexes associate with TAP transporters before peptide binding,**  
 Nature. 1994; 368(6474): 864-867

Pardoll D.M., Kruisbeek A.M., Fowlkes B.J., Coligan J.E., Schwartz R.H.:

**The unfolding story of T cell receptor gamma,**  
 FASEB J. 1987; 1(2): 103-109

Parham P., Brodsky F.M.:

**Partial purification and some properties of BB7.2. A cytotoxic monoclonal antibody with specificity for HLA-A2 and a variant of HLA- A28,**

Hum Immunol. 1981; 3(4): 277-299

Parmiani G., Castelli C., Dalerba P., Mortarini R., Rivoltini L., Marincola F.M., Anichini A.:

**Cancer immunotherapy with peptide-based vaccines: what have we achieved? Where are we going?,**

J Natl Cancer Inst. 2002; 94(11): 805-818

Paschen A., Jing W., Drexler I., Klemm M., Song M., Müller-Berghaus J., Nguyen X.D., Osen W., Stevanović S., Sutter G., Schadendorf D.:

**Melanoma patients respond to a new HLA-A\*01-presented antigenic ligand derived from a multi-epitope region of melanoma antigen TRP-2,**

Int J Cancer. 2005; 116(6): 944-948

Pawelec G., Max H., Halder T., Bruserud O., Merl A., Da Silva P., Kalbacher H.:

**BCR/ABL leukemia oncogene fusion peptides selectively bind to certain HLA-DR alleles and can be recognized by T cells found at low frequency in the repertoire of normal donors,**

Blood. 1996; 88(6): 2118-2124

Perreau J., Lilienbaum A., Vasseur M., Paulin D.:

**Nucleotide sequence of the human vimentin gene and regulation of its transcription in tissues and cultured cells,**

Gene. 1988; 62(1): 7-16

Piccart-Gebhart M.J., Procter M., Leyland-Jones B., Goldhirsch A., Untch M., Smith I., Gianni L., Baselga J., Bell R., Jackisch C., Cameron D., Dowsett M., Barrios C.H., Steger G., Huang C.S., Andersson M., Inbar M., Lichinitser M., Láng I., Nitz U., Iwata H., Thomssen C., Lohrisch C., Suter T.M., Rüschoff J., Suto T., Greatorex V., Ward C., Straehle C., McFadden E., Dolci M.S., Gelber R.D., Herceptin Adjuvant (HERA) Trial Study Team:

**Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer,**

N Engl J Med. 2005; 353(16): 1659-1672

Pieper R., Christian R.E., Gonzales M.I., Nishimura M.I., Gupta G., Settlage R.E., Shabanowitz J., Rosenberg S.A., Hunt D.F., Topalian S.L.:

**Biochemical identification of a mutated human melanoma antigen recognized by CD4(+) T cells,**

J Exp Med. 1999; 189(5): 757-766

Pinzon-Charry A., Schmidt C., López J.A.:

**Dendritic cell immunotherapy for breast cancer,**

Expert Opin Biol Ther. 2006; 6(6): 591-604

- Poltoratsky V.P., Shi X., York J.D., Lieber M.R., Carter T.H.:  
**Human DNA-activated protein kinase (DNA-PK) is homologous to phosphatidylinositol kinases,**  
 J Immunol. 1995; 155(10): 4529-4533
- Pomer S., Staehler G.:  
**Traditional and future criteria for progression in renal cell carcinoma. Molecular biology and clinical aspects,**  
 Urologe. 1996; 35(3): 254-262
- Quesada J.R., Swanson D.A., Trindade A., Gutterman J.U.:  
**Renal cell carcinoma: antitumor effects of leukocyte interferon,**  
 Cancer Res. 1983; 43(2): 940-947
- Quesada J.R., Rios A., Swanson D., Trown P., Gutterman J.U.:  
**Antitumor activity of recombinant-derived interferon alpha in metastatic renal cell carcinoma,**  
 J Clin Oncol. 1985; 3(11): 1522-1528
- Ragde H., Cavanagh W.A., Tjoa B.A.:  
**Dendritic cell based vaccines: progress in immunotherapy studies for prostate cancer,**  
 J Urol. 2004; 172(6 Pt 2): 2532-2538
- Rammensee H.-G., Falk K., Rötzschke O.:  
**Peptides naturally presented by MHC class I molecules,**  
 Annu Rev Immunol. 1993; 11: 213-244
- Rammensee H.-G., Friede T., Stevanović S.:  
**MHC ligands and peptide motifs: first listing,**  
 Immunogenetics. 1995; 41(4): 178-228
- Rammensee H.-G., Bachmann J., Emmerich N.P., Bachor O.A., Stevanović S.:  
**SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs,**  
 Immunogenetics. 1999; 50(3-4): 213-219
- Rammensee H.-G., Weinschenk T., Gouttefangeas C., Stevanović S.:  
**Towards patient-specific tumor antigen selection for vaccination,**  
 Immunol Rev. 2002; 188: 164-176
- Ray M.E., Wistow G., Su Y.A., Meltzer P.S., Trent J.M.:  
**AIM1, a novel non-lens member of the betagamma-crystallin superfamily, is associated with the control of tumorigenicity in human malignant melanoma,**  
 Proc Natl Acad Sci U S A. 1997; 94(7): 3229-3234

Redondo M., Garcia J., Rodrigo I., Villar E., González C., Morell M.:  
**Expression of bax and p53 proteins in the tumorigenesis and progression of breast carcinomas,**  
 Tumour Biol. 2003; 24(1): 23-31

Reichardt V.L., Brossart P.:  
**DC-based immunotherapy of B-cell malignancies,**  
 Cytotherapy. 2004; 6(1): 62-67

Renkvist N., Castelli C., Robbins P.F., Parmiani G.:  
**A listing of human tumor antigens recognized by T cells,**  
 Cancer Immunol Immunother. 2001; 50(1): 3-15

Repmann R., Goldschmidt A., Richter A.:  
**Adjuvant therapy of renal cell carcinoma patients with an autologous tumor cell lysate vaccine: a 5-year follow-up analysis**  
 Anticancer Res. 2003; 23(2A): 969-974

Ridgway D.:  
**The first 1000 dendritic cell vaccinees**  
 Cancer Invest . 2003; 21(6): 873-886

Robbins P.F., El-Gamil M., Li Y.F., Kawakami Y., Loftus D., Appella E., Rosenberg S.A.:  
**A mutated beta-catenin gene encodes a melanoma-specific antigen recognized by tumor infiltrating lymphocytes,**  
 J Exp Med. 1996; 183(3): 1185-1192

Robinson J., Malik A., Parham P., Bodmer J.G., Marsh S.G.:  
**IMGT/HLA database-- a sequence database for the human major histocompatibility complex,**  
 Tissue Antigens. 2000; 55(3): 280-287

Robinson J., Waller M.J., Parham P., de Groot N., Bontrop R., Kennedy L.J., Stoehr P., Marsh S.G.:  
**IMGT/HLA and IMGT/MHC: sequence databases for the study of the major histocompatibility complex,**  
 Nucleic Acids Res. 2003; 31(1): 311-314

Robson C.J.:  
**Radical nephrectomy for renal cell carcinoma,**  
 J Urol. 1963; 89: 37-42

Robson C.J., Churchill B.M., Anderson W.:  
**The results of radical nephrectomy for renal cell carcinoma,**  
 J Urol. 1969; 101(3): 297-301

- Rock K.L., Gramm C., Rothstein L., Clark K., Stein R., Dick L., Hwang D., Goldberg A.L.:  
**Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules,**  
 Cell. 1994; 78(5): 761-771
- Rodrigues N.R., Rowan A., Smith M.E., Kerr I.B., Bodmer W.F., Gannon J.V., Lane D.P.:  
**P53 mutations in colorectal cancer,**  
 Proc Natl Acad Sci U S A. 1990; 87(19): 7555-7559
- Rosenberg S.A., Lotze M.T., Muul L.M., Leitman S., Chang A.E., Ettinghausen S.E., Matory Y.L., Skibber J.M., Shiloni E., Vetto J.T. et al.:  
**Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer,**  
 N Eng J Med. 1985; 313(23): 1485-1492
- Rötzschke O., Falk K., Stevanović S., Gnau V., Jung G., Rammensee H.-G.:  
**Dominant aromatic/aliphatic C-terminal anchor in HLA-B\*2702 and B\*2705 peptide motifs,**  
 Immunogenetics. 1994; 39(1): 74-77
- Sahin U., Türeci O., Pfreundschuh M.:  
**Serological identification of human tumor antigens,**  
 Curr Opin Immunol. 1997; 9(5): 709-716
- Sato Y., Fujiwara T., Mine T., Shomura H., Homma S., Maeda Y., Tokunaga N., Ikeda Y., Ishihara Y., Yamada A., Tanaka N., Itoh K., Harada M., Todo S.:  
**Immunological evaluation of personalized peptide vaccination in combination with a 5-fluorouracil derivative (TS-1) for advanced gastric or colorectal carcinoma patients,**  
 Cancer Sci. 2007; 98(7): 1113-1119
- Schag K., Schmidt S.M., Müller M.R., Weinschenk T., Appel S., Weck M.M., Grünebach F., Stevanović S., Rammensee H.-G., Brossart P.:  
**Identification of C-met oncogene as a broadly expressed tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T-lymphocytes,**  
 Clin Cancer Res. 2004; 10(11): 3658-3666
- Schirle M., Keilholz W., Weber B., Gouttefangeas C., Dumrese T., Becker H.D., Stevanović S., Rammensee H.-G.:  
**Identification of tumor-associated MHC class I ligands by a novel T cell-independent approach,**  
 Eur J Immunol. 2000; 30(8): 2216-2225

Schirle M., Weinschenk T., Stevanović S.:  
**Combining computer algorithms with experimental approaches permits the rapid and accurate identification of T cell epitopes from defined antigens,**  
 J Immunol Methods. 2001; 257(1-2): 1-16

Schlack P., Kumpf W.:  
**Über eine neue Methode zur Ermittlung der Konstitution von Peptiden,**  
 Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 1926; 154: 125-170

Schmidt S.M.\*, Häntschel M.\*, Weimer K.J., Heine A., Müller M.R., Stevanović S., Rammensee H.-G., Kanz L., Holderried T.A.W., Pascolo S., Brossart P.:  
 (\*equally contributed)  
**Intradermal vaccinations with RNA coding for Tumor Associated Antigens in RCC patients,**  
 Eingereicht

Schmidt W., Buschle M., Zauner W., Kirlappos H., Mechtler K., Trska B., Birnstiel M.L.:  
**Cell-free tumor antigen peptide-based cancer vaccines,**  
 Proc Natl Acad Sci U S A. 1997; 94(7): 3262-3267

Schmiegel W., Pox C., Reinacher-Schick A., Adler G., Fleig W., Fölsch U.R., Frühmorgen P., Graeven U., Hohenberger W., Holstege A., Junginger T., Kopp I., Kühlbacher T., Porschen R., Propping P., Riemann J.-F., Rödel C., Sauer R., Sauerbruch T., Schmitt W., Schmoll H.-J., Zeitz M., Selbmann H.-K.:  
**S3-Leitlinie „Kolorektales Karzinom“**  
**Ergebnisse evidenzbasierter Konsensuskonferenzen am 6./7. Februar 2004 und am 8./9. Juni 2007,**  
 Z Gastroenterol 2008; 46: 1-73  
**Amendment zur S3- Leitlinie KRK, Themenkomplex IV – Die adjuvante Therapie des älteren Patienten,**  
 Dtsch Ärztebl Int. 2009; 106(51-52): 843-848

Schott M., Seissler J., Lettmann M., Fouxon V., Scherbaum W.A., Feldkamp J.:  
**Immunotherapy for medullary thyroid carcinoma by dendritic cell vaccination,**  
 J Clin Endocrinol Metab. 2001; 86(10): 4965-4969

Schreuder G.M., Hurley C.K., Marsh S.G., Lau M., Fernandez-Vina M., Noreen H.J., Setterholm M., Maiers M.; World Marrow Donor Associations Quality Assurance and IT Working Groups; WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA system; 13th International Histocompatibility Workshop Serology Component; Internat. Cell Exchange, UCLA; US Nat. Marrow Donor Program:  
**The HLA Dictionary 2004: a summary of HLA-A, -B, -C, -DRB1/3/4/5 and -DQB1 alleles and their association with serologically defined HLA-A, -B, -C, -DR and -DQ antigens,**  
 Tissue Antigens. 2005a; 65(1): 1-55

Schreuder G.M., Hurley C.K., Marsh S.G., Lau M., Fernandez-Vina M.A., Noreen H.J., Setterholm M., Maiers M.:  
**HLA dictionary 2004: summary of HLA-A, -B, -C, -DRB1/3/4/5, -DQB1 alleles and their association with serologically defined HLA-A, -B, -C, -DR, and -DQ antigens,**

Hum Immunol . 2005b; 66(2): 170-210

Int J Immunogenet. 2005c; 32(1): 19-69

Schuler M.M., Nastke M.D., Stevanović S.:

**SYFPEITHI: database for searching and T-cell epitope prediction,**

Methods Mol Biol. 2007; 409: 75-93

Schultz E.S., Chapiro J., Lurquin C., Claverol S., Burlet-Schiltz O., Warnier G., Russo V., Morel S., Lévy F., Boon T., Van den Eynde B.J., van der Bruggen P.:  
**The production of a new MAGE-3 peptide presented to cytolytic T lymphocytes by HLA-B40 requires the immunoproteasome,**

J Exp Med. 2002; 195(4): 391-399

Seliger B., Höhne A., Knuth A., Bernhard H., Ehring B., Tampé R., Huber C.:  
**Reduced membrane major histocompatibility complex class I density and stability in a subset of human renal cell carcinomas with low TAP and LMP expression,**

Clin Cancer Res. 1996; 2(8): 1427-1433

Seliger B., Rongcun Y., Atkins D., Hammers S., Huber C., Störkel S., Kiessling R.:

**HER2/neu is expressed in human renal cell carcinoma at heterogenous levels independently of tumor grading and staging and can be recognized by HLA-A2.1- restricted T lymphocytes,**

Int J Cancer. 2000; 87(3): 349-359

Sherief M.H., Low S.H., Miura M., Kudo N., Novick A.C., Weimbs T.:

**Matrix metalloproteinase activity in urine of patients with renal cell carcinoma leads to degradation of extracellular matrix proteins: possible use as a screening assay,**

J Urol. 2003; 169(4): 1530-1534

Shimazui T., Binguier P.P., van Berkel H., Ruijter E., Akaza H., Debruyne F.M., Oosterwijk E., Schalken J.A.:

**Decreased expression of alpha-catenin is associated with poor prognosis of patients with localized renal cell carcinoma,**

Int J Cancer. 1997; 74(5): 523-528

Sipley J.D., Menninger J.C., Hartley K.O., Ward D.C., Jackson S.P., Anderson C.W.:

**Gene for the catalytic subunit of the human DNA-activated protein kinase maps to the site of the XRCC7 gene on chromosome 8,**

Proc Natl Acad Sci U S A. 1995; 92(16): 7515-7519

Sinha R., Peters U., Cross A.J., Kulldorff M., Weissfeld J.L., Pinsky P.F., Rothman N., Hayes R.B.:  
**Meat, meat cooking methods and preservation, and risk for colorectal adenoma,**  
Cancer Res. 2005; 65(17): 8034-8041

Skinner D.G., Colvin R.B., Vermillion C.D., Pfister R.C., Leadbetter W.F.:  
**Diagnosis and management of renal cell carcinoma. A clinical and pathologic study of 309 cases,**  
Cancer. 1971; 28(5): 1165-1177

Slattery M.L., Boucher K.M., Caan B.J., Potter J.D., Ma K.N.:  
**Eating patterns and risk of colon cancer,**  
Am J Epidemiol. 1998; 148(1): 4-16

Smith I., Procter M., Gelber R.D., Guillaume S., Feyereislova A., Dowsett M., Goldhirsch A., Untch M., Mariani G., Baselga J., Kaufmann M., Cameron D., Bell R., Bergh J., Coleman R., Wardley A., Harbeck N., Lopez R.I., Mallmann P., Gelmon K., Wilcken N., Wist E., Sánchez Rovira P., Piccart-Gebhart M.J.; HERA study team:  
**2-year follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER-2-positive breast cancer: a randomised controlled trial,**  
Lancet. 2007; 369(9555): 29-36

Sommers C.L., Walker-Jones D., Heckford S.E., Worland P., Valverius E., Clark R., McCormick F., Stampfer M., Abularach S., Gelmann E.P.:  
**Vimentin rather than keratin expression in some hormone-independent breast cancer cell lines and in oncogene-transformed mammary epithelial cells,**  
Cancer Res. 1989; 49(15): 4258-4263

Souques M., Zummer K.:  
**The Hemocult II test: results of 16 years of screening tests at the Tumor Prevention Service of the City of Paris,**  
Presse Med. 2000; 29(18): 983-986

Sosman J.A., Unger J.M., Liu P.Y., Flaherty L.E., Park M.S., Kempf R.A., Thompson J.A., Terasaki P.I., Sondak V.K ; Southwest Oncology Group:  
**Adjuvant immunotherapy of resected, intermediate-thickness, node-negative melanoma with an allogeneic tumor vaccine: impact of HLA class I antigen expression on outcome,**  
J Clin Oncol. 2002 ; 20(8): 2067-2075

Southern E.M.:  
**Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis,**  
J Mol Biol. 1975; 98(3): 503-517

Speetjens F.M., Kuppen P.J., Welters M.J., Essahsah F., Voet van den Brink A.M., Lantrua M.G., Valentijn A.R., Oostendorp J., Fathors L.M., Nijman H.W., Drijfhout J.W., van de Velde C.J., Melief C.J., van der Burg S.H.:

**Induction of p53-specific immunity by a p53 synthetic long peptide vaccine in patients treated for metastatic colorectal cancer,**

Clin Cancer Res. 2009; 15(3): 1086-1095

Spigelman A.D., Williams C.B., Talbot I.C., Domizio P., Philips R.K.:

**Upper gastrointestinal cancer in patients with familial adenomatous polyposis,**

Lancet. 1989; 2(8666): 783-785

Steinman R.M.:

**The dendritic cell system and its role in immunogenicity,**

Annu Rev Immunol. 1991; 9: 271-296

Stevanović S., Pomer S., Rammensee H.-G.:

**Oberflächenantigene im Nierenzellkarzinom - Präsentation von MHC I-gebundenen Selbstpeptiden,**

Akt Urol. Sonderheft. 1995; (26): 45-46

Stevanović S., Schild H.:

**Quantitative aspects of T cell activation-- peptide generation and editing by MHC class I molecules,**

Semin Immunol. 1999; 11(6): 375-384

Stevanović S., Lemmel C., Häntschel M., Eberle U.:

**Generating data for databases -- the peptide repertoire of HLA molecules,**

Novartis Found Symp. 2003; 254: 143-155, discussion 155-164, 216-222, 250-252

Stickel J.S., Weinzierl A.O., Hillen N., Drews O., Schuler M.M., Hennenlotter J., Wernet D., Müller C.A., Stenzl A., Stenzl A., Rammensee H.-G., Stevanović S.:

**HLA ligand profiles of primary renal cell carcinoma maintained in metastases,**

Cancer Immunol Immunother. 2009; 58(9): 1407-1417

Störkel S., van den Berg E.:

**Morphological classification of renal cancer,**

World J Urol. 1995; 13(3): 153-158

Störkel S., Eble J.N., Adlakha K., Amin M., Blute M.L., Bostwick D.G., Darson M., Delahunt B., Iczkowski K.:

**Classification of renal cell carcinoma: Workgroup No.1. Union Internationale Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC),**

Cancer. 1997; 80(5): 987-989

Stuhler G., Walden P.:

**Recruitment of helper T cells for induction of tumour rejection by cytolytic T lymphocytes,**

Cancer Immunol Immunother. 1994; 39(5): 342-345

Suh W.K., Cohen-Doyle M.F., Fruh K., Wang K., Peterson P.A., Williams D.B.:  
**Interaction of MHC class I molecules with the transporter associated with antigen processing,**

Science. 1994; 264(5163): 1322-1326

Sumi T., Nakatani T., Yoshida H., Hyun Y., Yasui T., Matsumoto Y., Nakagawa E., Sugimura K., Kawashima H., Ishiko O.:

**Expression of matrix metalloproteinases 7 and 2 in human renal cell carcinoma,**

Oncol Rep. 2003; 10(3): 567-570

Sutton J., Rowland-Jones S., Rosenberg W., Nixon D., Gotch F., Gao X.M., Murray N., Spoonas A., Driscoll P., Smith M., Willis A., McMichael A.:

**A sequence pattern for peptides presented to cytotoxic T lymphocytes by HLA B8 revealed by analysis of epitopes and eluted peptides,**

Eur J Immunol. 1993; 23(2): 447-453

Syrjänen K., Hjelt L.:

**Grading of human renal adenocarcinoma,**

Scand J Urol Nephrol. 1978; 12(1): 49-55

Tamir A., Basagila E., Kagahzian A., Jiao L., Jensen S., Nicholls J., Tate P., Stamp G., Farzaneh F., Harrison P., Stauss H., George A.J., Habib N., Lechler R.I., Lombardi G.:

**Induction of tumor-specific T-cell responses by vaccination with tumor lysate-loaded dendritic cells in colorectal cancer patients with carcinoembryonic-antigen positive tumors,**

Cancer Immunol Immunother. 2007; 56(12): 2003-2016

Thoenes W., Störkel S., Rumpelt H.J.:

**Histopathology and classification of renal cell tumors (adenomas, oncocytomas and carcinomas). The basic cytological and histopathological elements and their use for diagnostics,**

Pathol Res Pract. 1986; 181(2): 125-143

Turner B., Haendle I., Röder C., Dieckmann D., Keikavoussi P., Jonuleit H., Bender A., Maczek C., Schreiner D., von den Driesch P., Bröcker E.B., Steinman R.M., Enk A., Kämpgen E., Schuler G.:

**Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma,**

J Exp Med. 1999; 190(11): 1669-1678

- Topalian S.L., Rivoltini L., Mancini M., Markus N.R., Robbins P.F., Kawakami Y., Rosenberg S.A.:  
**Human CD4+ T cells specifically recognize a shared melanoma-associated antigen encoded by the tyrosinase gene,**  
 Proc Natl Acad Sci U S A. 1994; 91(20): 9461-9465
- Topalian S.L., Gonzales M.I., Parkhurst M., Li Y.F., Southwood S. Sette A., Rosenberg S.A., Robbins P.F.:  
**Melanoma-specific CD4+ T cells recognize nonmutated HLA-DR-restricted tyrosinase epitopes,**  
 J Exp Med. 1996; 183(5): 1965-1971
- Toribara N.W., Sleisenger M.H.:  
**Screening for colorectal cancer,**  
 N Engl J Med. 1995; 332(13): 861-867
- Traversari C., van der Bruggen P., Luescher IF., Lurquin C., Chomez P., Van Pel A., De Plaen E., Amar-Costesec A., Boon T.:  
**A nonapeptide encoded by human gene MAGE-1 is recognized on HLA-A1 by cytolytic T lymphocytes directed against tumor antigen MZ2-E,**  
 J Exp Med. 1992; 176(5): 1453 -1457
- Tsuruma T., Hata F., Torigoe T., Furuhashi T., Idenoue S., Kurotaki T., Yamamoto M., Yagihashi A., Ohmura T., Yamaguchi K., Katsuramaki T., Yasoshima T., Sasaki K., Mizushima Y., Minamida H., Kimura H., Akiyama M., Hirohashi Y., Asanuma H., Tamura Y., Shimozawa K., Sato N., Hirata K.:  
**Phase I clinical study of anti-apoptosis protein, survivin-derived peptide vaccine therapy for patients with advanced or recurrent colorectal cancer,**  
 Transl Med. 2004; 2(1):19
- Tsuruma T., Hata F., Furuhashi T., Ohmura T., Katsuramaki T., Yamaguchi K., Kimura Y., Torigoe T., Sato N., Hirata K.:  
**Peptide-based vaccination for colorectal cancer,**  
 Expert Opin Biol Ther. 2005; 5(6): 799-807
- Udono H., Srivastava P.K.:  
**Heat shock protein 70-associated peptides elicit specific cancer immunity,**  
 J Exp Med. 1993; 178(4): 1391-1396
- Valassiadou K.E., Stefanaki K., Tzardi M., Datseris G., Georgoulas V., Melissas J., Tsiftsis D.D., Delides G., Kanavaros P.:  
**Immunohistochemical expression of p53, bcl-2, mdm2 and waf1/p21 proteins in colorectal adenocarcinomas,**  
 Anticancer Res. 1997; 17(4A): 2571-2576

Van der Bruggen P., Traversari C., Chomez P., Lurquin C., De Plaen E., Van den Eynde B., Knuth A., Boon T.:

**A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma,**

Science. 1991; 254(5038): 1643-1647

Republished in: J Immunol. 2007; 178(5): 2617-2621

Villanueva M.S., Fischer P., Feen K., Pamer E.G.:

**Efficiency of MHC class I antigen processing: a quantitative analysis,**

Immunity. 1994; 1(6): 479-489

Vissers J.L., De Vries I.J., Schreurs M.W., Engelen L.P., Oosterwijk E., Figdor C.G., Adema G.J.:

**The renal cell carcinoma-associated antigen G-250 encodes a human leukocyte antigen (HLA)-A2.1-restricted epitope recognized by cytotoxic T lymphocytes,**

Cancer Res. 1999; 59(21): 5554-5559

Vogelstein B., Fearon E.R., Hamilton S.R., Kern S.E., Preisinger A.C., Leppert M., Nakamura Y., White R., Smits A.M., Bos J.L.:

**Genetic alterations during colorectal-tumor development,**

N Engl J Med. 1988; 319(9): 525-532

Von Behring E., Kitasato S.:

**Ueber das Zustandekommen der Diphtherie- Immunität und der Tetanus-Immunität bei Thieren,**

Deutsche Medizinische Wochenschrift 49 (1890)

**The mechanism of diphtheria immunity and tetanus immunity in animals. 1890,**

Mol Immunol. 1991; 28(12): 1317, 1319-1320

Voss R.H., Lotz C., Cellary A., Theobald M.:

**Targeting p53, mdm2, and CD19: vaccination and immunologic strategies,**

Bone Marrow Transplant. 2000; 25 Suppl 2: S43-45

Wallack M.K., Sivanandham M., Balch C.M., Urist M.M., Bland K.I., Murray D., Robinson W.A., Flaherty L.E., Richards J.M., Bartolucci A.A. et al.:

**A phase III randomized, double-blind multiinstitutional trial of vaccinia melanoma oncolysate-active specific immunotherapy for patients with stage II melanoma,**

Cancer. 1995; 75(1): 34-42

Walter L., Marynen P., Szpirer J., Levan G., Günther E.:

**Identification of a novel conserved human gene, TEGT,**

Genomics. 1995; 28(2): 301-304

- Wang B., Sharma A., Maile R., Saad M., Collins E.J., Frelinger J.A.:  
**Peptidic termini play a significant role in TCR recognition,**  
J Immunol. 2002; 169(6): 3137-3145
- Wang W.S., Chen P.M., Wang H.S., Liang W.Y., Su Y.:  
**Matrix metalloproteinase-7 increases resistance to Fas-mediated apoptosis and is a poor prognostic factor of patients with colorectal carcinoma,**  
Carcinogenesis. 2006; 27(5): 1113-1120
- Wanner R., Förster H.H., Tilmans I., Mischke D.:  
**Allelic variations of human keratins K4 and K5 provide polymorphic markers within the type II keratin gene cluster on chromosome 12,**  
J Invest Dermatol. 1993; 100(6): 735-741
- Weihrauch M.R., Ansén S., Jurkiewicz E., Geisen C., Xia Z., Anderson K.S., Gracien E., Schmidt M., Wittig B., Diehl V., Wolf J., Bohlen H., Nadler L.M.:  
**Phase III combined chemoimmunotherapy with carcinoembryonic antigen-derived HLA-A2-restricted CAP-1 peptide and irinotecan, 5-fluorouracil, and leucovorin in patients with primary metastatic colorectal cancer,**  
Clin Cancer Res. 2005; 11(16): 5993-6001
- Weinschenk T., Gouttefangeas C., Schirle M., Obermayr F., Walter S., Schoor O., Kurek R., Loeser W., Bichler K.H., Wernet D., Stevanović S., Rammensee H.-G.:  
**Integrated functional genomics approach for the design of patient-individual antitumor vaccines,**  
Cancer Res. 2002; 62(20): 5818-5827
- Weinzierl A.O., Rudolf D., Hillen N., Tenzer S., van Endert P., Schild H., Rammensee H.-G., Stevanović S.:  
**Features of TAP-independent MHC class I ligands revealed by quantitative mass spectrometry,**  
Eur J Immunol. 2008; 38(6): 1503-1510
- Wielockx B., Libert C., Wilson C.:  
**Matrilysin (matrix metalloproteinase-7): a new promising drug target in cancer and inflammation?**  
Cytokine Growth Factor Rev. 2004; 15(2-3): 111-115
- Wierecky J., Müller M.R., Wirths S., Halder-Oehler E., Dörfel D., Schmidt S.M., Häntschel M., Brugger W., Schröder S., Horger M.S., Kanz L., Brossart P.:  
**Immunologic and clinical responses after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells in metastatic renal cancer patients,**  
Cancer Res. 2006; 66(11): 5910-5918

Williams S.T., Beart R.W.Jr.:  
**Staging of colorectal cancer,**  
 Semin Surg Oncol. 1992; 8(2): 89-93

Wolchok J.D., Yuan J., Houghton A.N., Gallardo H.F., Rasalan T.S., Wang J.,  
 Zhang Y., Ranganathan R., Chapman P.B., Krown S.E., Livingston P.O.,  
 Heywood M., Riviere I., Panageas K.S., Terzulli S.L., Perales M.A.:  
**Safety and immunogenicity of tyrosinase DNA vaccines in patients with  
 melanoma,**  
 Mol Ther. 2007; 15(11): 2044-2050

Wölfel T., Hauer M., Schneider J., Serrano M., Wölfel C., Klehmann-Hieb E., De  
 Plaen E., Hankeln T., Meyer zum Büschenfelde K.H., Beach D.:  
**A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes  
 in a human melanoma,**  
 Science. 1995; 269(5228): 1281-1284

Wong N.A., Pignatelli M.:  
**Beta-catenin-- a linchpin in colorectal carcinogenesis?**  
 Am J Pathol. 2002; 160(2): 389-401

Wu X., Lieber M.R.:  
**Interaction between DNA-dependent protein kinase and a novel protein,  
 KIP,**  
 Mutat Res. 1997; 385(1): 13-20

Xu Q., Reed J.C.:  
**Bax inhibitor-1, a mammalian apoptosis suppressor identified by  
 functional screening in yeast,**  
 Mol Cell. 1998; 1(3): 337-346

Yagasaki F., Jinnai I., Yoshida S., Yokoyama Y., Matsuda A., Kusumoto S.,  
 Kobayashi H., Terasaki H., Ohyashiki K., Asou N., Murohashi I., Bessho M.,  
 Hirashima K.:  
**Fusion of TEL/ETV6 to a novel ACS2 in myelodysplastic syndrome and  
 acute myelogenous leukemia with t(5;12)(q31;p13),**  
 Genes Chromosomes Cancer. 1999; 26(3): 192-202

Yamano T., Kaneda Y., Huang S., Hiramatsu S.H., Hoon D.S.:  
**Enhancement of immunity by a DNA melanoma vaccine against TRP2 with  
 CCL21 as an adjuvant,**  
 Mol Ther. 2006; 13(1): 194-202

Yamashita K., Mori M., Shiraishi T., Shibuta K., Sugimachi K.:  
**Clinical significance of matrix metalloproteinase-7 expression in  
 esophageal carcinoma,**  
 Clin Cancer Res. 2000; 6(3): 1169-1174

Yang J.C., Sherry R.M., Steinberg S.M., Topalian S.L., Schwartzentruber D.J., Hwu P., Seipp C.A., Rogers-Freezer L., Morton K.E., White D.E., Liewehr D.J., Merino M.J., Rosenberg S.A.:

**Randomized study of high-dose and low-dose interleukin-2 in patients with metastatic renal cancer,**

J Clin Oncol. 2003; 21(16): 3127-3132

Yokoyama Y., Grünebach F., Schmidt S.M., Heine A., Häntschel M., Stevanović S., Rammensee H.-G., Brossart P.:

**Matrilysin (MMP-7) is a novel broadly expressed tumor antigen recognized by antigen-specific T cells,**

Clin Cancer Res. 2008; 14(17): 5503-5511

Yoshino S., Kato M., Okada K.:

**Evaluation of the prognostic significance of microvessel count and tumor size in renal cell carcinoma,**

Int J Urol. 1998; 5(2): 119-123

Zeng Z.S., Shu W.P., Cohen A.M., Guillem J.G.:

**Matrix metalloproteinase-7 expression in colorectal cancer liver metastases: evidence for involvement of MMP-7 activation in human cancer metastases,**

Clin Cancer Res. 2002; 8(1): 144-148

Zola H., Swart B., Boumsell L., Mason D.Y.; IUIS/WHO Subcommittee:

**Human Leucocyte Differentiation Antigen nomenclature: update on CD nomenclature. Report of IUIS/WHO Subcommittee,**

J Immunol Methods. 2003; 275(1-2): 1-8

## **VI.2 Originalarbeiten des Autors:**

Im Folgenden sind die Originalarbeiten zusammengefasst, an denen der Autor dieser Dissertation mitgewirkt hat:

Boss C.N., Grünebach F., Brauer K., Häntschel M., Mirakaj V., Weinschenk T., Stevanovic S., Rammensee H.-G., Brossart P.:

**Identification and characterization of T-cell epitopes deduced from RGS5, a novel broadly expressed tumor antigen,**

Clin Cancer Res. 2007; 13(11): 3347-3355

Grünebach F., Erndt S., Häntschel M., Heine A., Brossart P.:

**Generation of antigen-specific CTL responses using RGS1 mRNA transfected dendritic cells,**

Cancer Immunol Immunother. 2008; 57(10): 1483-1491

Schmidt S.M.\*, **Häntschel M.\***, Weimer K.J., Heine A., Müller M.R., Stevanović S., Rammensee H.-G., Kanz L., Holderried T.A.W., Pascolo S., Brossart P.:  
(\*equally contributed)

**Intradermal vaccinations with RNA coding for Tumor Associated Antigens in RCC patients,**

Eingereicht

Stevanović S., Lemmel C., **Häntschel M.**, Eberle U.:

**Generating data for databases -- the peptide repertoire of HLA molecules,**  
Novartis Found Symp. 2003; 254: 143-155, discussion 155-164, 216-222, 250-252

Wierecky J., Müller M.R., Wirths S., Halder-Oehler E., Dörfel D., Schmidt S.M., **Häntschel M.**, Brugger W., Schröder S., Horger M.S., Kanz L., Brossart P.:

**Immunologic and clinical responses after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells in metastatic renal cancer patients,**

Cancer Res. 2006; 66(11): 5910-5918

Yokoyama Y., Grünebach F., Schmidt S.M., Heine A., **Häntschel M.**, Stevanović S., Rammensee H.-G., Brossart P.:

**Matrilysin (MMP-7) is a novel broadly expressed tumor antigen recognized by antigen-specific T cells,**

Clin Cancer Res. 2008; 14(17): 5503-5511

### **VI.3 Lehrbücher/ Lexika/ Manuale:**

Greene F.L., Page D.L., Fleming I.D.:

**AJCC Cancer Staging Manual,**

Springer Verlag, 6. Auflage (2002), aktualisiert in 7. Auflage (2009)

Geißler M., Graeven U.:

**Das kolorektale Karzinom. Evidenzbasierte Leitlinien,**

Thieme Verlag, 1. Auflage (2005)

Hahn H., Falke D., Kaufmann S.H.E., Ullmann U.:

**Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie,**

Springer Verlag, 3. Auflage (1999), aktualisiert in 5. Auflage (2004)

Kayser F.H., Bienz K.A., Eckert J., Zinkernagel R.M.:

**Grundlagen der Immunologie, in: Medizinische Mikrobiologie. Verstehen – Lernen – Nachschlagen,**

Thieme Verlag, 9. Auflage (1998), aktualisiert in 11. Auflage (2005)

Kiefel V.:

**HLA und Transplantation,**

Manuskript (2005)

[www.vkiefel.de/hla.pdf](http://www.vkiefel.de/hla.pdf)

Liedl B.:

**Manual Urogenitale Tumoren des Tumorzentrum München,**

W. Zuckschwerdt Verlag, 3. Auflage (2003), aktualisiert in 4. Auflage (2008)

Löffler G., Petrides P.E.:

**Biochemie und Pathobiochemie,**

Springer Verlag, 6. Auflage (1998), aktualisiert in 8. Auflage (2006)

Mason D.:

**Leucocyte Typing Volume VII,**

Oxford University Press Verlag (2002)

Mayr W.R., Schwarz D.W.M.:

**Das HLA- System, in: Transfusionsmedizin. Grundlagen – Therapie - Methodik,**

Springer Verlag, 2. Auflage (1996)

Pschyrembel W.:

**Pschyrembel Klinisches Wörterbuch,**

Gruyter Verlag, 257. Auflage (1994), aktualisiert in 262. Auflage (2010)

Rammensee H.-G., Bachmann J., Stevanovic S.:

**MHC Ligands and Peptide Motifs,**

Chapman & Hall Verlag, 1. Auflage (1998)

Roessner A., Pfeifer U., Müller-Hermelink H.K.:

**Allgemeine Pathologie und Grundlagen der Speziellen Pathologie,**

Urban & Fischer Verlag, 11. Auflage (2008)

Schirle M.:

**Identifizierung krankheitsassoziierter MHC- Liganden durch massenspektrometrische Verfahren,**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften, Selbstverlag, Universitätsbibliothek Tübingen (2001)

Sendler A.:

**Manual Gastrointestinale Tumoren des Tumorzentrum München,**

W. Zuckschwerdt Verlag, 7. Auflage (2006), aktualisiert in 8. Auflage (2010)

Sobin L.H., Wittekind C.:

**TNM- Classification of Malignant Tumours (UICC),**

Wiley J. & Sons Verlag, 6. Auflage (2002)

Treiber U.:

**Manual Urogenitale Tumoren des Tumorzentrum München,**  
W. Zuckschwerdt Verlag, 4. Auflage (2008)

Wittekind C., Meyer H.-J.:

**TNM: Klassifikation maligner Tumoren**  
Wiley-VCH Verlag, 7. Auflage (2010)

## **VI.4 Referenzen im Internet:**

[www.algonomics.com/index.php](http://www.algonomics.com/index.php)

[www.alleleffrequencies.net](http://www.alleleffrequencies.net)

[www.anthonynolan.org](http://www.anthonynolan.org)

[www.biotechnologycenter.org/hio](http://www.biotechnologycenter.org/hio)

[www.cms.elchtools.de](http://www.cms.elchtools.de)

[www.destatis.de](http://www.destatis.de)

[www.dgvs.de](http://www.dgvs.de)

[www.dimdi.de](http://www.dimdi.de)

[www.ebi.ac.uk/embl](http://www.ebi.ac.uk/embl)

[www.ebi.ac.uk/imgt/hla](http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla)

[www.expasy.org/sprot](http://www.expasy.org/sprot)

[www.hcdm.org](http://www.hcdm.org)

[www.imtech.res.in/raghava/propred](http://www.imtech.res.in/raghava/propred)

[www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

[www.nobelprize.org](http://www.nobelprize.org)

[www.paproc.de](http://www.paproc.de)

[www.rki.de](http://www.rki.de)

[www.syfpeithi.de](http://www.syfpeithi.de)

[www.tumorzentrum-muenchen.de/aerztebereich/manuale.html](http://www.tumorzentrum-muenchen.de/aerztebereich/manuale.html)

[www.wikipedia.de](http://www.wikipedia.de)

## VII. Danksagung

Mein primärer Dank ist an Herrn Professor Dr. Hans- Georg Rammensee gerichtet, der mir die Möglichkeit offerierte, in der Abteilung für Immunologie die Arbeiten zur vorliegenden Dissertation durchzuführen. Ich bedanke mich, die exzellenten Voraussetzungen an räumlicher und materieller Ausstattung des Labors nutzen zu dürfen, gepaart mit dem wissenschaftlichen Know- How, das mir von vielen Seiten zugetragen wurde. Daneben darf allerdings nicht das menschliche, verständnisvolle Entgegenkommen vergessen werden, das ich bei jedem persönlichen Kontakt empfunden habe und weiterhin empfinde. Ich bin glücklich über aktuelle gemeinsame Projekte und freue mich auf zukünftige.

An zweiter Stelle darf ich Herrn Professor Dr. Stefan Stevanović danken – für den ersten Kontakt mit der Immunologie und die Anregungen zu diesem Projekt, für die gelebte Faszination am Peptid, für die familiäre Atmosphäre, die trotz Hektik und Stress nie fehlte, für die Freiheiten einer eigenständigen Zeitplanung, Organisation und Durchführung der Versuche, kombiniert mit der Gewissheit, bei sämtlichen Problemen und Fragen eine Antwort zu erhalten, für die individuell erübrigte Zeit und Geduld, für Erläuterungen und Erklärungen, und für die schönste Vorlesung meines Studiums.

Des Weiteren darf ich Dr. Toni Weinschenk und Dr. Claudia Lemmel meinen Dank aussprechen, die mir die komplexe Analytik am Q- ToF abgenommen haben und auf deren Auswertungen und Ergebnisse ich stets mit Spannung gewartet habe, jedoch auch für die schöne Stimmung in der Arbeitsgruppe, u.a. beim gemeinsamen Mittagessen.

Dr. Florian Obermayr hat sich in den ersten Labortagen meiner angenommen und mich durch das scheinbare Chaos der Immunologie geleitet. Er hat für mich Kontakte mit allen wichtigen Personen geknüpft, mir Räumlichkeiten, Materialien und Utensilien gezeigt, und mir schließlich in stoischer Ruhe alle Abläufe

und Prozesse in theoretischer als auch praktischer Form nahe gebracht. Dafür möchte ich ihm danken.

Ich danke Dr. Jörn Dengjel, an den ich sämtliche praktischen Fragen richten konnte und der mir immer einen Tipp oder Kniff verraten hat.

Dr. Shamala Devi hat die Zeit in der Immunologie mit internationalem Flair bereichert, von der Kleidung über Gespräche bis hin zum malaiischen Essen, das ich bei Festen in Tübingen und sogar während eines kurzen Treffens in Kuala Lumpur genießen durfte.

Patricia Hrstic ist als gute Seele der Arbeitsgruppe bekannt. Ihr danke ich ganz besonders für die Unterstützung bei kleinen oder auch großen technischen Problemen und Fragen in ihrer gewohnt netten, unkomplizierten Art, aber auch für die ständige und prompte Hilfe in sämtlichen Lebenslagen, die über das übliche und selbst das erwartete Maß bei weitem hinausging.

Melanie Kraft ließ mich in das Gebiet der Edman- Sequenzierung einblicken und sorgte mit ihrer Musik für den richtigen Ton bei der Arbeit. Danke für die Analysen und die Faszination für Red Hot Chilli Peppers.

Die Unterstützung von Beate Pömmerl, Claudia Falkenburger und Franziska Löwenstein ist meinerseits schwer fassbar, da sie sich um die Vielfalt der unsäglichen Kleinigkeiten kümmerten, ohne die der Betrieb in null Komma nichts zum Erliegen kommen würde. Vielen Dank dafür.

Bei Lynne Yakes und Gerhard Hörr bedanke ich mich für die Hilfe bei sämtlichen Formalitäten, die so schwer zu überblicken und doch so wichtig sind, aber auch für ganz normale, nette Gespräche.

Frau Professor Dr. D. Wernet gilt der Dank für die vielen HLA- Typisierungen der asservierten Tumoren.

Darüber hinaus möchte ich mich bei den Kooperationspartnern der klinischen Abteilungen bedanken, stellvertretend für alle Kontaktpersonen bei Herrn Professor Dr. A. Königsrainer bzw. Herrn Professor Dr. Dr. h.c. H.-D. Becker aus der Allgemeinchirurgie sowie bei Herrn Professor Dr. A. Stenzl bzw. Herrn Professor Dr. K.-H. Bichler aus der Urologie.

Dr. Thomas Kratt und Dr. Jörg Hennenlotter waren als Ansprechpartner stets Vorort und erleichterten die Übernahme und Asservierung des Tumorgewebes.

Zudem möchte ich bei allen nicht namentlich erwähnten Mitarbeitern und Helfern während meiner Zeit in der Immunologie danken. Die Liste der Personen ist lang, genau wie die der geknüpften Kontakte, der interessanten Gespräche u.a. in Pausen und Wartezeiten bei Kaffee oder Keksen, der gewonnenen Freunde, die mit ihrem Optimismus auch negative Ergebnisse besser verkraften ließen. Ich habe das Arbeiten stets als angenehm empfunden – dies lag an der schönen Atmosphäre und dem unkomplizierten Umgang miteinander.

Meiner Schwester Eva danke ich für die Rücksichtnahme während des gesamten Studiums, speziell in den langen Phasen des Lernens, aber auch für den Spaß und das Lachen daheim und auf den gemeinsamen Fahrten nach Tübingen.

Größter Dank geht an meine Eltern. Von jeher haben Sie ihre eigenen Interessen hinter die ihrer Kinder gestellt, uns die Möglichkeiten zu unserem beruflichen Werdegang eröffnet und den Weg dorthin geebnet. Eva und ich sind uns dies täglich bewusst – wir wissen, auf was unser Leben gründet.

Und auch wenn es oft nicht absehbar war, dies sind nahezu die letzten Worte vor Komplettierung dieser Arbeit.

Der abschließende Dank gebührt Rahel – dieser ist in Worten jedoch nicht zu fassen.

## VIII. Lebenslauf

Name: Häntschel  
 Vorname: Maik  
 Geburtsdatum: 26. Oktober 1976  
 Geburtsort: Nürtingen  
 Familienstand: ledig  
 Staatsangehörigkeit: deutsch

### Schulbildung:

08/ 1983 - 07/ 1987 Grundschole Neckartailfingen  
 08/ 1987 - 07/ 1996 Gymnasium Neckartenzlingen  
 07/ 1996 Allgemeine Hochschulreife

### Zivildienst:

08/ 1996 - 08/ 1997 Pflegestation für Allgemeinpädiatrie,  
 Filderklinik, Filderstadt- Bonlanden

### Studium:

10/ 1997 - 05/ 2004 Studium der Humanmedizin an der Eberhard Karls  
 Universität in Tübingen  
 08.09.1999 Ärztliche Vorprüfung  
 29.08.2000 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
 09/ 2001 Famulatur Anästhesie, Royal Prince Alfred Hospital,  
 University of Sydney, Australien  
 08/ 2002 Famulatur Notfallmedizin, Singapore General  
 Hospital, Singapur  
 04.04.2003 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
 04/ 2003 – 03/ 2004 Praktisches Jahr am Klinikum Stuttgart sowie am  
 Spital Zimmerberg, Wädenswil, Schweiz  
 06.05.2004 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

**Beruflicher Werdegang:**

Seit 10.01.2005                      Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Medizinischen  
Klinik II (Hämatologie, Onkologie, Rheumatologie,  
Immunologie, Pulmologie) der Universität Tübingen

Veröffentlichungen mit Beteiligung des Autors sind dem Literaturverzeichnis  
unter VI.2 zu entnehmen.