

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

**Isolierung und Charakterisierung tumorassoziierter MHC-  
Klasse-I- und Klasse-II-Peptide aus soliden Nierenzell- und  
Cholangiozellulären Karzinomen**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Gitsios Gitsioudis  
aus  
Böblingen**

**2011**

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

**Isolierung und Charakterisierung tumorassoziierter MHC-  
Klasse-I- und Klasse-II-Peptide aus soliden Nierenzell- und  
Cholangiozellulären Karzinomen**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Gitsios Gitsioudis  
aus  
Böblingen**

**2011**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichtstatter: Professor Dr. S. Stevanović

2. Berichtstatter: Professor Dr. R. Salih

Meiner Familie Anna, Maria, Dimitrios  
Meinen Eltern Maria und Dimitrios



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Prinzipien der Karzinogenese .....	2
1.2	Immunsystem und Tumor .....	4
1.2.1	Immunstimulation / Tumorpromotion .....	6
1.2.2	Immunosurveillance .....	8
1.2.3	Tumor-assoziierte Antigene (TAAs) .....	16
1.2.3.1	Differenzierungsantigene .....	16
1.2.3.2	Überexprimierte Antigene .....	16
1.2.3.3	<i>Cancer Testis</i> -Antigene .....	17
1.2.3.4	Mutationsantigene .....	17
1.2.3.5	Onkovirale Antigene .....	17
1.2.3.6	Identifizierung tumorassoziierter Antigene .....	17
1.2.3.6.1	SEREX .....	18
1.2.3.6.2	Peptidelution .....	18
1.2.3.6.3	Library-Ansatz .....	18
1.2.3.6.4	Reverse immunology .....	18
1.3	Immuntherapien bei Tumorerkrankungen .....	19
1.3.1	Nicht-zelluläre (humorale) Immuntherapien .....	19
1.3.2	Zelluläre Immuntherapien .....	20
1.3.3	Adoptiver Transfer .....	20
1.3.4	Vakzinierung .....	21
1.4	Nierenzellkarzinom (RCC) .....	23
1.4.1	Äthiologie und Pathogenese .....	23
1.4.2	Stadieneinteilung .....	24
1.4.3	Therapie .....	24
1.4.3.1	Konventionelle Therapie .....	25
1.4.3.2	Immuntherapie .....	27
1.5	Cholangiozelluläres Karzinom (CCC) .....	27
1.6	Zielsetzung dieser Arbeit .....	28
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>29</b>
2.1	Affinitätschromatographie .....	29
2.1.1	Vorversuche .....	30
2.1.1.1	Reinigung monoklonaler Antikörper über Protein A-Sepharose-Säulen .	30

---

2.1.1.2	Herstellung der AK-CNBr-Sepharose-Säulen.....	31
2.1.1.3	PEG-Gruppenauswaschung der Zentricon-Ultrafilter.....	32
2.1.2	Gewebeaufschluss.....	33
2.1.3	Präzipitation der MHC-Moleküle an der Sepharose-Säule.....	34
2.2	MHC-Quantifizierung.....	35
2.2.1	WESTERN-Blot (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese).....	35
2.2.2	Edman-Sequenzierung.....	38
2.3	Massenspektrometrie.....	40
2.3.1	Theorie der Massenspektrometrie.....	40
2.3.1.1	Auswertung von MS-Spektren.....	43
2.4	MHC-II-Immunhistochemie.....	45
2.5	RCC-Primärzellsuspensionen/-kulturen.....	45
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>47</b>
3.1	Identifizierung und Charakterisierung der Peptide von potentiell tumorassoziierten Antigenen.....	48
3.1.1	Verwendete Tumorgewebe.....	49
3.1.2	Quantifizierung der MHC-Moleküle.....	52
3.1.2.1	Photometrische Proteinbestimmung.....	52
3.1.2.2	Edman-Abbau.....	53
3.1.2.3	Western-Blotting / Immuno-Blot.....	54
3.1.3	Identifizierte MHC Klasse-I-Liganden im Nierenzellkarzinom.....	55
3.2	MHC Klasse-II-Liganden im Nierenzellkarzinomgewebe.....	58
3.2.1	Verteilung der MHC Klasse-II-Liganden im RCC.....	58
3.2.2	Identifizierte MHC-Klasse-II-Peptide im RCC.....	64
3.3	Cholangiozelluläres Karzinom.....	67
3.4	Primärzellkulturen aus Nierenzellkarzinomgewebe.....	69
3.5	Peptidcocktails für Impfpatienten.....	70
3.5.1	Impfcocktail für RCC135.....	70
3.5.2	Impfcocktail für RCC182.....	70
3.5.3	Impfcocktail für CCC2.....	71
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>72</b>
4.1	Diskussion der Peptidstudien.....	73
4.1.1	Präsentierte MHC-I-Peptide.....	73
4.1.1.1	RCC135-Peptidstudie.....	74

4.1.1.2	RCC143-Peptidstudie .....	78
4.1.2	Präsentierte MHC-II-Peptide .....	78
4.1.2.1	RCC157-Peptidstudie .....	78
4.1.2.2	RCC180-Peptidstudie .....	79
4.1.2.3	RCC211-Peptidstudie .....	80
4.1.3	Diskussion der CCC2-Peptidstudie .....	82
4.2	Diskussion ausgewählter Methoden .....	83
4.2.1	Massenspektrometrische Untersuchung mechanisch aufgeschlossener Gewebeproben .....	83
4.2.2	Diskussion der Primärzellsuspensionen .....	84
4.3	Schlussfolgerungen für die Peptid-basierte Vakzinierungstherapie für das RCC .....	85
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>87</b>
<b>6</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>89</b>
<b>7</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>90</b>
<b>8</b>	<b>Literatur</b> .....	<b>91</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf</b> .....	<b>114</b>
<b>10</b>	<b>Eigenständigkeitserklärung</b> .....	<b>115</b>







## 1 Einleitung

Nach den Herz- und Kreislauferkrankungen stellen die Krebserkrankungen die zweithäufigsten Todesursachen in den entwickelten Industrieländern.

Die *Trias* bestehend aus operativer Tumorentfernung, Chemotherapie und Bestrahlung bilden bis heute die Grundlage für die Behandlung von Krebspatienten. Allerdings vollzieht sich in den vergangenen 30 Jahren ein enormer Wandel in der Krebstherapie. Durch die fortwährend stattfindende intensive Krebsforschung wird die Bedeutung des Immunsystems für die Entstehung und die Bekämpfung von Krebserkrankungen immer deutlicher.

Die ersten Ansätze für die Verwendung des Immunsystems zur Krebsbehandlung gehen auf William Coley und Paul Ehrlich (1909) zurück. 1893 injizierte Coley nicht-operablen Tumoren Bakterien der Gattung *Streptococcus pyogenes* und konnte anschließend einen Rückgang der Tumormasse feststellen. Paul Ehrlich postulierte 1909 erstmals die Theorie, dass Tumore durch das körpereigene Immunsystem kontrolliert werden könnten. Die ersten durchbrechenden Ergebnisse für die Tumorimmuntherapie kamen aus dem Zeitraum 1988-1991 durch Identifizierung der ersten Tumor-Abstoßungs-Antigene (*tumor rejection antigens*) [1-3]. Diese Untersuchungen erfolgten für das humane Melanom. Neben dem Melanom sind heute eine Reihe weiterer sogenannter *immunogener* Tumore bekannt. Insbesondere für das kolorektale Karzinom, das metastasierte Melanom, die myeloische Leukämie, das Multiple Myelom, das myelodysplastische Syndrom und das folliculäre Lymphom existieren verschiedene (prä-) klinische Studien mit Peptid-basierten Vakzinierungsprotokollen mit und ohne zusätzlicher Gabe von Interleukin-2 (IL-2) [4-8].

Vor allem in den 1970er Jahren wurde eine Reihe von Arbeiten publiziert, welche die tumorigene Wirkung der Tumorentzündung in den Vordergrund stellten. Durch eine Reihe von Möglichkeiten ist es demnach Tumoren möglich, sich einerseits der körpereigenen Immunantwort zu entziehen (*tumor escape*-Phänomen). Andererseits erleichtern oder unterstützen viele von Immunzellen sezernierte Mediatoren u.a. die Angiogenese, das Tumorwachstum und die Metastasierung.

Dem gegenüber stehen klinische als auch experimentelle Beobachtungen, welche die Bedeutung des Immunsystems für die Behandlung von Tumoren deutlich machen. Von entscheidender Bedeutung ist dabei die Fähigkeit des körpereigenen Immunsystems zur Unterscheidung von körpereigenen und körperfremden Antigenen. In diesem Zusammenhang spielen die in den 1990er Jahren erstmalig identifizierten Tu-

mor-assoziierte Antigene (TAA, *tumor associated antigens*) eine herausragende Rolle, da sie die Induktion einer spezifischen TAA-gerichteten Immunantwort erlauben. Mit dem Nierenzellkarzinom (RCC, *renal cell carcinoma*) als Schwerpunkt erfolgte im Rahmen dieser Arbeit die systematische Untersuchung von Peptiden aus soliden Tumorgeweben.

## 1.1 Prinzipien der Karzinogenese

Definitionsgemäß versteht man unter

### *Karzinom*

ein in erster Linie autonomes, überschießendes und progressives Verhalten entarteter körpereigener Zellen mit Fortsetzung des malignen Zellverhaltens auch ohne auslösenden Stimulus. Dabei erfolgt weder eine funktionelle noch eine strukturelle Eingliederung in das sie umgebende nicht-entartete Gewebe, und unter

### *Karzinogenese*

den Transformationsprozess einer normalen körpereigenen Zelle in eine maligne entartete Zelle [9].

Die Karzinogenese durchläuft im Allgemeinen vier Stadien: (1) Initiationsstadium, (2) Promotionsstadium, (3) maligne Transformation und (4) Tumorprogression [9].

Grundsätzlich ist Krebs eine genetische Erkrankung [10]. Am Anfang einer jeden Zellentartung (*Initiationsstadium*) steht eine Veränderung der DNA-Struktur (Desoxyribonucleinsäure, *Deoxyribonucleic acid*). Diese kann sowohl durch externe – durch sogenannten Karzinogene (z.B. Photonen, Benzol, MCA-(Methylcholanthren), u.a.) – oder auch durch interne Einflüsse – beispielweise durch Störung der DNA-Reperaturmechanismen u.a. - entstehen. Wesentlich für diese initiale DNA-Störung sind vor allem zwei Gen-Klassen, die Protoonkogene und die Tumorsuppressorgene. Sie beeinflussen durch ihren Aktivitätszustand im Wesentlichen die Signaltransduktion, die Zelldifferenzierung und den Zellzyklus.

*Protoonkogene* kommen physiologischerweise in allen normalen kernhaltigen Zellen vor und kodieren im Wesentlichen für Proteine der Signaltransduktionsketten (z.B. Ras), Wachstumsfaktoren (z.B. Tyrosinkinase-rezeptoren), zyklinabhängige Kinasen und nukleäre Transkriptionsfaktoren (z.B. Jun, Myc, Fos). Durch Punktmutationen, Amplifikation und Dysregulation – auch aufgrund epigenetischer Phänomene wie z.B.

die DNA-Methylierung - können sich aus den Protoonkogenen die sogenannten *Oncogene* bilden, welche schließlich zu einer Zellentartung führen können. Für die Ausbildung eines vollständig malignen Zell-Phänotyps ist die Anhäufung von ca. 5-10 Mutationen nötig [11].

*Tumorsuppressorgene* unterdrücken im Allgemeinen eine unkontrollierte Zellproliferation. Man unterscheidet dabei zwei Gruppen der Tumorsuppressorgene:

Die sogenannten *gatekeeper*-Gene können durch Zellarretierung oder Apoptoseeinleitung eine unkontrollierte Zellteilung verhindern. Wichtige Vertreter dieser Gene sind beispielsweise p53 (bei Sarcomen, Brust- und Hirntumoren), Retinoblastoma-Gen RB1 (bei Retinoblastom, Osteosarcomen) und von-Hippel Lindau-Gen VHL ((klarzelliges) Nierenzellkarzinom (RCC), Hämangiome) ([12]).

Die *caretaker*-Gene hingegen kodieren wichtige Proteine für die DNA-Reparatur, so dass es im Falle einer Genmutation aus dieser Gruppe zu einer Zunahme der DNA-Instabilität kommen kann.

Für eine wirksame Störung der Zellteilung ist im Allgemeinen eine Veränderung beider Allele der jeweiligen Tumorsuppressorgene notwendig.

Je nach Dignität des Tumors lassen sich gutartige und bösartige Tumore unterscheiden. Beide Tumorgruppen besitzen die Eigenschaften aus obiger Definition. Gutartige Tumore zeigen ein lokal meist langsam fortschreitendes Wachstum ohne zu metastasieren. Demhingegen zeigen maligne Tumore ein invasiv destruierendes Wachstumsverhalten, können sowohl hämatogen als auch lymphogen metastasieren und führen unbehandelt zum Tod. Zusätzlich können noch die sogenannten semimalignen Tumoren unterschieden werden, welche ein lokal ähnliches Verhalten wie die malignen Tumore aufweisen, jedoch keine Metastasen absiedeln.

Bösartige Tumorzellen können durch die folgenden Merkmale von gesunden Körperzellen unterschieden werden: viele Mitosen, vermehrt Apoptosen, eine verstärkte Zell- und Kernpolymorphie, verstärkte Kernhyperchromasie und eine erhöhte Kern-Plasma-Relation.

## 1.2 Immunsystem und Tumor

Das Immunsystem des Menschen besteht aus speziellen Organen des lymphatischen Systems, zellulären und nicht-zellulären Bestandteilen, und dient der Bekämpfung von eingedrungenen Pathogenen.

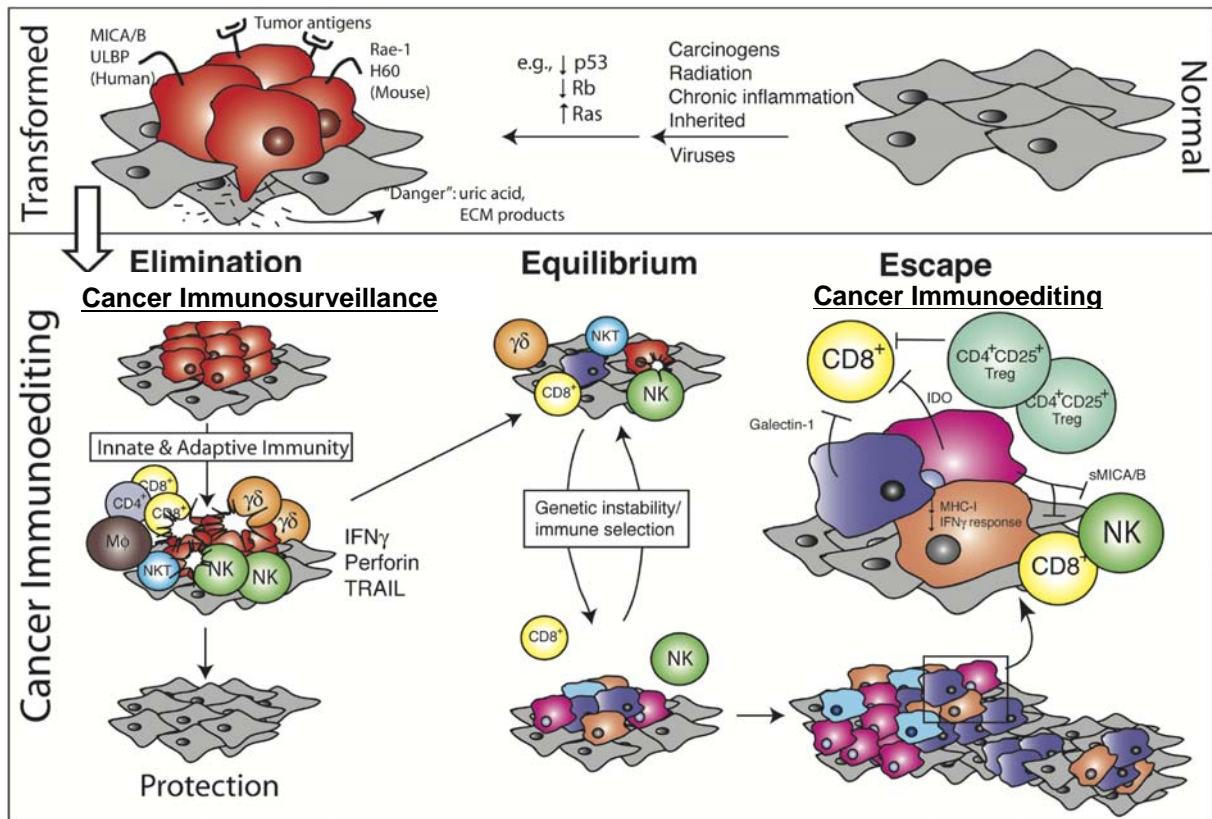
Man unterscheidet ein angeborenes oder nicht-adaptives (*innate immune system*) und ein adaptives (*adaptive immune system*) Immunsystem. Das angeborene Immunsystem dient zur unspezifischen Bekämpfung von Pathogenen. Hierbei spielen phagozytierende Zellen wie die Makrophagen und die neutrophilen Zellen eine entscheidende Rolle. Diese Zellen können durch spezielle Rezeptoren – beispielsweise den Makrophagen-Mannoserezeptor, den Scavenger-Rezeptor und CD14<sup>1</sup> – zwischen körpereigenen und pathogenen Oberflächenmolekülen unterscheiden. Die zweite Säule der angeborenen Immunität stellt das Komplementsystem dar, welches über spezielle Komplementrezeptoren durch Makrophagen und Monozyten aktiviert werden kann. Darüber hinaus können auch pathogene Desoxyribonucleinsäuren (DNA) über spezielle Sensor-Rezeptoren wie zum Beispiel transmembrane Toll-like Rezeptoren (TLRs), zytosolische Rezeptoren und durch die so genannten high-mobility group box (HMGB)-Proteine [13] zu einer Aktivierung des angeborenen Immunsystems führen.

Die Bekämpfung eines Pathogens durch Erkennung eines jeweils spezifischen Antigens wird durch das adaptive Immunsystem gewährleistet. Einerseits sind hier die professionellen antigenpräsentierenden Zellen (Dendritische Zellen, Makrophagen und B-Zellen) von besonderer Bedeutung. Diese Zellen besitzen co-stimulatorische Moleküle und präsentieren anderen Immunzellen Antigenfragmente auf MHC-I- oder MHC-II-Molekülen. Andererseits kommt es durch die antigengetriggerte Umwandlung von naiven T-Zellen zu den T-Effektorzellen (Cytotoxische CD8-T-Zellen, CD4-T-Helferzellen ( $T_H1, T_H2$ )) mit konsekutiver Differenzierung und Proliferation zur sogenannten *primären Immunreaktion*. Durch Aktivierung von B-Zellen können schließlich Antikörper gebildet und in den Körperkreislauf ausgeschüttet werden, welche durch die Antigen-Antikörper-Reaktion zu einer Vielzahl weiterer Reaktionen führen.

Heute besteht Einigkeit darüber, dass eine Tumorerkrankung auf praktisch allen Ebenen dieses komplexe Zusammenspiel des Immunsystems Einfluss nehmen kann.

---

<sup>1</sup> CD14 kommt hauptsächlich auf Monozyten und Makrophagen vor und kann bakterielles Lipopolysaccharid (LPS) erkennen



**Abbildung 1** Die drei Phasen des Immunediting während der Bildung autologer Neoplasien, modifiziert nach Schreiber et al. [14]: (a) Eliminationsphase, (b) Equilibriumsphase und (c) Escape-Phase

Sowohl in experimentellen als auch klinischen Daten konnte die Bedeutung des Immunsystems bei Tumorerkrankungen gezeigt werden. Allerdings konnte hierbei zunehmend die *duale Rolle* des Immunsystems bei Tumorerkrankungen - aufgrund der beiden sich konträr gegenüberstehenden Theorien der "*Immunosurveillance*" und der "*Immunostimulation*" - deutlich gemacht werden [15]. Demnach entscheidet der Aktivitätszustand des Immunsystems über eine tumorprotektive oder eine tumorunterstützende Wirkung. Trotz intensiver Forschung ist es bis heute nicht möglich, eine adäquate Abbildung dieses Aktivitätszustands durchzuführen. Schreiber et al. [14] schlugen zur Beschreibung der dualen Rolle des Immunsystems den Begriff "*immunoediting*" vor. Das Modell des *immunoediting* beinhaltet ein dreistufiges System, welches in Abbildung 1 schematisch dargestellt ist. Demnach werden zu Beginn maligne entartete Zellen durch das angeborene und das adaptive Immunsystem erkannt und weitestgehend erfolgreich eliminiert (*immunosurveillance*, Eliminationsphase). Durch zunehmenden Selektionsdruck (*survival of the fittest*) können sich vereinzelte mutierte Zellen der Erkennung durch das Immunsystem entziehen, so dass sich ein Gleichgewicht zwischen Tumorelimination und Tumorentstehung (Gleichgewichts-

phase, *Equilibrium state*) [16] ausbildet. Schließlich kommt es zu einer kritischen Ansammlung von malignen Zellen, welche sich der Erkennung durch das körpereigene Immunsystem entziehen (*immune escape*, Escape-Phase), und somit eine Tumorförderung bilden können.

Im Folgenden werden die zwei sich konträr gegenüberstehenden Theorien der "*Immunostimulation*" und die "*Immunosurveillance*" vorgestellt:

### **1.2.1 Immunstimulation / Tumorpromotion**

Die Theorie der Immunstimulation besagt, dass das Immunsystem eine fördernde Wirkung auf das Tumorstadium spontaner Tumore und die inflammatorische Mikroumgebung des Tumors positive Einflüsse auf die neoplastische Initiation, das Tumorstadiumüberleben und die Metastasierung haben [16, 17].

1972 erfolgte eine ausführliche Formulierung der Theorie zur Immunstimulation durch Prehn et al. [18]. Demzufolge würde eine durch einen autologen Tumor hervorgerufene milde Immunantwort zu einer Wachstumsstimulation der Neoplasie führen. In zahlreichen Studien am Mausmodell mit bestrahlten thymektomierten Mäusen und T-Zelldefizienten Nacktmäusen konnte nach einer teilweiser Wiederherstellung des Immunsystems durch Injektion geringer Mengen an Lymphozyten Hinweise gewonnen werden, welche die Theorie der Immunstimulation zu bestätigen scheinen [19, 20]. Darüber hinaus wurden Tumoren von Wissenschaftlern als chronische nicht-heilende Wunden beschrieben [21].

In den vergangenen Jahren konnte durch intensive Erforschung der Rolle des Immunsystems bei Tumorerkrankungen erkannt werden, dass in der Tat unter bestimmten Voraussetzungen ein protumoröser Stimulus durch das Immunsystem bezweckt werden kann. Im komplexen immunologischen Zusammenspiel spielen dabei sowohl Zellen des nicht-adaptiven und des adaptiven Immunsystems als auch Entzündungsmediatoren auf unterschiedlichen Ebenen eine Rolle. Im Folgenden werden einzelne Immunsystemkomponenten mit protumoröser Wirkung präsentiert.

#### *Immunstimulation und Dendritische Zellen*

Im Bereich der nicht-adaptiven Immunantwort spielen spezifische Subpopulationen der Dendritischen Zellen (DCs) eine für die Immunstimulation wichtige Rolle. Neben einer Aktivierung des Immunsystems können DCs die Immunantwort auch dämpfen. DCs können die Immunantwort dämpfen. Partial differenzierte DCs können nach



Phagozytose eines Antigens die Induktion einer Immuntoleranz oder auch von regulatorischen T-Zellen (Treg) hervorrufen [22-24]. Tumorassoziierte plasmazytoide DCs und vaskuläre DCs (**CD11c<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>**) können durch Inhibierung der Immunantwort und durch Förderung der Angiogenese einen positiven Einfluss auf das Tumorwachstum haben [25, 26]. Myeloide Indolamin-2,3-Dioxygenase-positive IDO<sup>+</sup> DCs könnten IDO ausschütten, wodurch der oxidative Katabolismus von Tryptophan (Trp) katalysiert wird. Da Trp als essentielle Aminosäure für die T-Zelldifferenzierung und –proliferation wichtig ist, kann es über eine vermehrte IDO-Ausschüttung zu einer Abschwächung der T-Zell-Antwort kommen [27, 28].

### *Immunstimulation und Zytokine*

Das Mikromilieu und die tumorabhängige lokale und systemische Inflamationsreaktion hängen entscheidend vom Verteilungsmuster der Zytokine ab, welche sowohl vom Tumor selbst, aber auch durch Immun- und auch Bindegewebszellen sezerniert werden können. Die wichtigsten Zytokine mit karzinomfördernder Wirkung sind IL-1 [29] und das TNF- $\alpha$  [30]. Insbesondere das TNF- $\alpha$  kann durch eine Vielzahl von Einflüssen einen karzinomfördernden Effekt mit sich bringen. Beispielsweise besitzt TNF- $\alpha$  eine inhibitorische Wirkung auf DNA-Reperaturmechanismen [31] und fördert die Angiogenese in Tumoren [32]. Hauptproduzenten des TNF- $\alpha$  stellen die aktivierten Makrophagen dar. Einerseits kann durch TNF- $\alpha$  in den Tumorzellen eine Apoptose ausgelöst werden, jedoch sind Tumorzellen häufig dagegen resistent [33]. Andererseits kann durch TNF- $\alpha$  selbst ein Überlebensimpuls in Tumorzellen induziert werden [34]. Neben den karzinomfördernden Zytokinen können auch die immunsupprimierenden Zytokine wie zum Beispiel IL-10, TGF- $\beta$  [35, 36] unterschieden werden. Über den Mechanismus der Immunstimulation wurde auch für FasL [32, 37] und VEGF (*vascular endothelial growth factor*) [38, 39] eine immunsupprimierende Wirkung beschrieben.

### *Immunstimulation und T-Zellen*

T-Zellen und insbesondere die CD8<sup>+</sup> T-Zellen sind die wichtigsten Effektorzellen für eine immunologische Tumorreaktion. Eine Reihe von Umständen kann jedoch (a) die Erkennung von Tumorzellen durch CD8<sup>+</sup> T-Effektorzellen (*tumor escape*) oder (b) gar die Funktion der CD8<sup>+</sup> T-Effektorzellen selbst beeinträchtigen.

Einen Mechanismus für den *tumor escape* stellt die hohe Mutationsrate in Tumoren dar, wodurch Antigene von CD8<sup>+</sup> T-Zellen nicht mehr erkannt werden können. Zu-

sätzlich kann es zu Herunterregulation der MHC-I-Expression in den Tumorzellen kommen, so dass quantitativ ebenfalls keine ausreichende Antigenpräsentation stattfinden kann [40]. Ein wesentlicher Bestandteil der pathophysiologischen Vorstellung der Metastasenentstehung besteht ebenfalls darin, dass Tumorzellen im Kern von Tumoren nicht von den T-Effektorzellen erkannt werden können, so dass es in der Folge zu einer hämatogenen oder lymphatischen Streuung dieser Zellen kommen kann [41-43]. Kommt es anschließend zu einem Fortschreiten des Tumorleidens, so ist wieder eine ausreichende Präsentation von tumorassoziierten Antigenen (TAAs, siehe unten) möglich, mit damit einhergehender Immunantwort [44], welche dann allerdings in der Regel nicht mehr ausreicht, um eine vollständige Metastasenrejektion zu erzielen.

Kommt es im Tumor zu einem Kontakt einer naiven T-Zelle mit einer in ihrer Funktion gestörten APC, so kann es zur Bildung einer sogenannten regulatorischen T-Zelle  $T_{reg}$  kommen. Diese  $T_{reg}$ -Zellen sind in der Lage cytotoxische  $CD8^+$  T-Effektorzellen (CTLs) zu supprimieren [45]. Darüber hinaus können  $T_{reg}$ -Zellen auf fast allen Ebenen des Immunsystems eine supprimierende Wirkung entfalten. Meist handelt es sich bei den  $T_{reg}$ -Zellen um  $CD25^+CD4^+$  T-Zellen. Man weiß heute, dass neben funktionsgestörten APCs auch eine Reihe von Zytokinen wie beispielsweise TGF- $\beta$  und IL-10 die Bildung von  $T_{reg}$ -Zellen unterstützen können [46-48]. Neben den  $T_{reg}$ -Zellen können die CTLs zusätzlich über inhibitorische Rezeptoren wie CTLA-4 in ihrer Funktion beeinträchtigt werden. Durch eine unvollständige Aktivierung von CTLs durch funktionsgestörte DCs oder unter dem Einfluss von Zytokinen kann es zur Induktion einer T-Zelltoleranz kommen [49].

### **1.2.2 Immunosurveillance**

Die Theorie der *Immunosurveillance* (auch Tumorüberwachung) beschreibt die Fähigkeit des Immunsystems (krankhaft) entfremdete Körperzellen zu erkennen und diese durch Effektor-Immunzellen zu eliminieren.

Die Vorstellung, dass das Immunsystem ein überschießendes Auftreten von Karzinomen unterdrücken kann, geht auf Paul Ehrlich (1909) zurück [50].

Die Erstbeschreibung der "Immunosurveillance-Theorie" erfolgte durch Sir F. McFarlane Burnet (Nobelpreis für Physiologie oder Medizin 1960) und Lewis Thomas. Burnet postulierte im Jahre 1957, dass es mit zunehmendem Alter zu einer Akkumulati-

on von zellulären genetischen Defekten kommt, welche in der Summe zur Ausbildung einer Malignomerkrankung führen können. Die Wächterfunktion des Immunsystems liege darin, derart genetisch veränderte Zellen zu erkennen und anschließend durch Immunzellen zu beseitigen [51-53]. L. Thomas postulierte, dass höhere komplexe Organismen über Abwehrmechanismen verfügen müssten, sich vor neoplastischen Erkrankungen selbst zu schützen ähnlich derer bei der homologen Abstoßung [54].

Demnach müsste es unter Immunsuppression häufiger und leichter zur Krebsentstehung kommen. In den hierzu durchgeführten Experimenten mit thymektomierten Mäusen ergab sich sowohl in den Studien mit chemisch induzierten Tumoren (z.B. Sarkominduktion durch Methylcholanthren, MCA) [55-57] als auch in den Studien mit Spontanentstehung [55, 58, 59] von Tumoren *kein* klares Bild. Uneinheitliche Ergebnisse ergaben sich darüber hinaus auch in Studien mit medikamentöser Immunsuppression [55]. Insbesondere in Versuchen mit athymischen Nacktmäusen konnte kein Vorteil von immunkompetenten Mäusen im Vergleich zu den genetisch athymischen Mäusen nach MCP-Injektion gesehen werden [60-62]. Bei genauerer Betrachtung konnten im weiteren Verlauf bei den von Stutmen et al. in den 1979er verwendeten athymischen Nacktmäusen funktionell aktive T-Zellen identifiziert werden [63, 64]. In Studien mit bestrahlten thymektomierten Mäusen [19] und T-Zell-defizienten Nacktmäusen [20] konnte gezeigt werden, dass eine „schwache Immunantwort“ sich vorteilhaft zugunsten eines Tumorstadiums auswirkte. Somit könnte eine eben solche „schwache Immunantwort“ in den verwendeten Mausmodellen zu teilweise tumorfördernden Effekten geführt haben. Darüber hinaus muss berücksichtigt werden, dass Mäuse einen zweiten Thymus besitzen.

Aus klinischen Langzeitverläufen ist jedoch seit Jahren bekannt, dass Patienten mit einer Langzeitimmunsuppression – wie beispielsweise nach Organtransplantationen – eine etwa *fünffach* erhöhte Inzidenz für maligne Tumorerkrankungen gegenüber der Normalbevölkerung haben [65, 66]. Neuere Mausstudien ergaben, dass Störungen in zentralen immunologischen Faktoren - wie beispielsweise IFN- $\gamma$  [67-71] oder Perforin [70-74] - zu einer größeren Anfälligkeit sowohl gegenüber chemisch induzierbaren als auch spontanen Tumoren führten [74]. Dunn et al. konnte zudem zeigen, dass das Konzept der Immunosurveillance sich nicht nur auf Mausmodelle beschränken lässt, sondern auch eine Gültigkeit im humanen Organismus besitzt [75, 76]. Neuere Daten von Schreiber et al. (200-2008) belegen die *Immunosurveillance*.

Der erste Schritt im Rahmen der Tumorerkennung und –bekämpfung durch das Immunsystem wird durch das nicht-adaptive Immunsystem gewährleistet. Wie aus Abbildung 1 zu erkennen ist spielen insbesondere NKT-Zellen, natürliche Killerzellen (NK-Zellen), Makrophagen, Granulozyten und die  $\gamma\delta$ -T-Zellen eine besondere Rolle. Auf der einen Seite können diese Zellen nach Aktivierung eine direktere Zerstörung von Malignomzellen erzielen. Andererseits sind die aktivierten Immunzellen zur Ausschüttung verschiedener Zytokine fähig, wodurch weitere Immunzellen aktiviert werden, welche ebenfalls zur Elimination von Tumorzellen beitragen können. Darüber hinaus können ebenfalls das Tumorwachstum und die –angiogenese inhibiert werden. Insgesamt ist die nicht-adaptive Immunreaktion essentiell für eine adäquate adaptive Immunantwort.

Im Folgenden erfolgt eine detaillierte Vorstellung der Komponenten des nicht-adaptiven Immunsystems bei Tumorerkrankungen.

*Natürliche Killerzellen (NK-Zellen)* zählen zu den Effektorzellen der primären Immunantwort. Praktisch allen NK-Zellen gemeinsam ist das Fehlen des CD3-Oberflächenrezeptors. Darüber hinaus lassen sich die NK-Zellen durch die Anzahl ihrer CD16, CD56 und NKp46 Oberflächenmoleküle in zwei Gruppen einteilen [77-79]: (1) die zytotoxischen NK-Zellen mit einer niedrigen Dichte an CD56 und NKp46, und einer hohen Dichte an CD16 ( $CD56^{dim}CD16^{bright}$ ) und (2) zytokinproduzierenden NK-Zellen mit einer hohen Dichte an CD56 und NKp46, und einer geringen Dichte an CD16 ( $CD56^{bright}CD16^{dim}$ ). Darüber hinaus ist mithilfe des MHC-I-Expressionsstatus von NK-Zellen, eine Einteilung in zwei Gruppen möglich: (1) NK-Zellen mit normaler MHC-I-Expression und (2) NK-Zellen mit einer verminderten MHC-I-Expression infolge Virusinfektion oder Tumortransformation [80].

Unter Stress stehende Tumorzellen exprimieren auf ihrer Zelloberfläche MICA-, MICB-Proteine und ULBPs, welche vom aktivierenden NKG2D-Rezeptor der NK-Zellen erkannt und in der Folge eine Zerstörung der Tumorzellen eingeleitet werden kann [81-84]. Neben den NKG2D-Rezeptoren haben auch die Rezeptoren NKp46, NKp30, NKp44 eine aktivierende Wirkung auf NK-Zellen. Von Tumoren sezernierte Zytokine wie beispielsweise IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IL-2, IL-12 und IL-15, und auch das endothelwirksame NO (Stickstoffmonoxid) tragen ebenfalls zur NK-Aktivierung bei.

Nach Aktivierung der NK-Zellen im Tumor können diese sowohl zu einer Apoptoseinduktion als auch zu einer Lyse der Tumorzellen führen [85]. Darüber hinaus kann

neben einer direkten Tumorzellzerstörung eine Hemmung der tumorassoziierten Angiogenese und weitere Stimulation der adaptiven Immunantwort durch Sekretion von IFN- $\gamma$  erzielt werden [86, 87]. Auch die Interaktion zwischen NK-Zellen mit anderen Immunzellen wie beispielsweise den DCs (dendritischen Zellen) kann einerseits ebenfalls zu einer NK-Aktivierung beitragen. Zusätzlich ist allerdings auch eine effizientere DC-Differenzierung durch aktivierte NK-Zellen möglich, so dass in der Summe eine bessere Tumorbekämpfung durch zusätzliche Aktivierung zytotoxischer T-Zellen (siehe unten) erreicht werden kann [88, 89].

Eine Inhibierung der NK-Zellen kann vor allem über die *killer immunoglobulin-like receptors* (KIRs) erfolgen, welche sich an die MHC-I-Moleküle der Zielzellen binden [90].

*Dendritische Zellen (DCs)* sind die wichtigsten Vertreter der professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APCs), zu denen auch die B-Zellen und die Makrophagen ( $M\Phi$ ) zählen. Insgesamt stellen die DCs eine heterogene Gruppe dar, welche in zwei Gruppen eingeteilt werden kann: (1) myeloide DCs und (2) plasmazytoide DCs [91]. Im unreifen Zustand befinden sie sich in der Peripherie, wo sie auf einen Antigenkontakt warten. Kommt es schließlich zu einem DC-Antigen-Kontakt, so sind die DCs darauf spezialisiert, dieses Antigen (a) zu phagozytieren und (b) zu prozessieren. Durch Internalisierung des Antigens werden die DCs aktiviert. Zusätzlich können die DCs auch über ihre Toll-like-Rezeptoren (TLR) aktiviert werden, welche an verschiedene konservierte Antigenmotive binden können.

Nach DC-Aktivierung und Antigenprozessierung reifen die bislang naiven DCs zu APCs heran und verändern unter anderem das exprimierte Chemokinprofil, die kostimulatorischen Moleküle und auch die Anzahl der MHC-Moleküle. Anschließend erfolgt eine Migration in die lymphatischen Organe zur Präsentation der Antigenfragmente (Peptide) an antigenspezifische T-Zellen, wodurch eine adaptive Immunreaktion ausgelöst werden kann [92-94].

Aufgrund der herausragenden Bedeutung der DCs für die Antigenaufnahme und die –präsentation erfolgt nun eine detaillierte Beschreibung entsprechend obiger Einteilung in myeloide und plasmazytoide DCs:

Die *tumorassoziierten plasmazytoiden DCs* können über ihren CXCR4-Chemokinrezeptor ihren von Tumorzellen exprimierten Liganden CXCL12 erkennen wodurch eine Einwanderung in das Tumorgewebe möglich wird. Zudem kann CXCL12 die Apoptose verhindern [95]. Aktivierte tumorassoziierte plasmazytoide

DCs können T-Zellen zur IFN- $\gamma$ -Produktion anregen [96]. Andererseits können tumorassoziierte plasmazytoide DCs über die Inhibierung der Immunantwort aufgrund einer verminderten TLR9-Expression [25] oder durch Stimulation der Tumorangiogenese über eine spontane TNF- $\alpha$ - und IL-8-Produktion [26] einen positiven Einfluss auf das Tumorwachstum haben. Daneben sind auch vaskuläre (**CD11c<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>**) DCs in der Lage die Tumorangiogenese zu fördern.

Die myeloiden DCs bilden die zweite große Gruppe der DCs. Sie tragen Oberflächenmarker der myeloiden Zelllinie. Eine ihrer bedeutendsten Fähigkeiten ist die starke Aktivierung von Helfer-T-Zellen T<sub>H</sub>1 und eine effektive Initiation einer tumorspezifischen Immunantwort. Darüber hinaus können myeloide DCs die Faktoren IL-12, IFN- $\gamma$  und IL-10 produzieren oder deren Bildung unterstützen und damit die Tumorangiogenese inhibieren oder eine adaptive Immunantwort stimulieren [97]. Auch die myeloischen DCs stellen eine heterogene Gruppe dar. Beispielsweise exprimieren die **B7-H1<sup>+</sup>(PD1)** myeloiden DCs das inhibitorische Molekül B7-H1, welches eine Reihe von inhibitorischen Signalen ausführen kann, unter anderem die Unterdrückung der Produktion von IL-12 durch myeloide DCs [98-103]. Darüber hinaus existieren auch die Indolamin-2,3-Dioxygenase-positiven (IDO<sup>+</sup>) myeloiden DCs, welche ebenfalls zu einer Schwächung der spezifischen T-zellabhängigen Immunantwort führen können [27, 28]. Zusammenfassend spielen die reifen myeloischen DCs die wichtigste Rolle für eine DC-vermittelte Immunantwort gegen den Tumor. Allerdings sind Tumore in der Lage über eine Verschiebung des Zytokinmusters die DC-Reifung zu stören (VEGF, PGE<sub>2</sub>, IL-10 und TGF- $\beta$ ) oder zu fördern (GM-CSF, IL-4, IL-12 und IFN- $\gamma$ ).

*Zytokine* beeinflussen die tumorabhängige Immunantwort auf praktisch allen Ebenen. Neben den Immunzellen selbst, sind auch Tumor- oder auch Bindegewebszellen zu deren Produktion und Sekretion befähigt. Zu den wichtigsten Zytokinvertretern im Bereich der Immunsurveillance zählen IL-2, IL-12 [104], GM-CSF [105], IFN- $\alpha$  [106-108], IFN- $\gamma$ , LIGHT [109, 110] und der Flt-3-Ligand.

**IL-2** ist ein Interleukin, welches während der T-Zellaktivierung von T-Zellen hergestellt wird und die T-Zell-Differenzierung und -Proliferation unterstützt. Der antitumoröse Effekt von IL-2 konnte von Rosenberg et al. [111] und anderen [112-115] gezeigt werden.

**IL-12** wird hauptsächlich von antigenpräsentierenden Zellen (APCs) produziert und unterstützt zum Beispiel die T-Zell- und NK-Zell-Aktivierung [29], diese Zellen können wiederum IFN- $\gamma$  und TNF- $\beta$  sezernieren.

**GM-CSF** und **Flt3-Ligand** führen zu einer Aktivierung und Expansion von DCs. Zusätzlich werden NKT-Zellen durch GM-CSF aktiviert.

**IFN- $\alpha$**  ist ein wichtiges Zytokin bei der Tumorbekämpfung, welches bereits sehr früh durch die APCs sezerniert wird [116]. Zu seinen wichtigsten Aufgaben zählt die Aktivierung von NK-Zellen [68, 104, 109, 110], die Induktion der MHC-I- und -II-Expression und einer damit verbundenen Verstärkung der Antigenpräsentation [117], die Unterstützung der CD8<sup>+</sup>-T-Zell-abhängigen antitumor-Immunreaktion und die Stimulierung von DCs [104]. Darüber hinaus besitzt IFN- $\alpha$  weitere antitumoröse Eigenschaften durch Erhöhung der Apoptoserate in Tumorzellen durch Induktion der TRAIL-Expression auf T-Zellen [118] und durch Inhibierung der Tumorangiogenese [119].

**IFN- $\gamma$**  spielt eine wichtige Rolle in der Antigenpräsentation durch Steigerung der Expression von antigenpräsentierenden Molekülen wie beispielsweise den MHC-I-Molekülen und anderen relevanten Proteinen. Darüber hinaus erhöht IFN- $\gamma$  die CD8<sup>+</sup> T-Zell-vermittelte Zytotoxizität in Tumoren [69] und regt die Sekretion angiostatischer Chemokine an [119].

Wie bereits skizziert besteht ein eng verknüpftes Wechselspiel zwischen dem nicht-adaptiven und dem adaptiven Immunsystem und den Zytokinen. Die Besonderheit des *adaptiven Immunsystems* liegt darin, dass es eine antigenspezifische zelluläre und auch humorale Immunantwort gegen Krankheitserreger auslösen kann. Ein zusätzliches Merkmal ist die Fähigkeit zur Bildung von Gedächtniszellen nach stattgehabtem Antigenkontakt. Die dabei wichtigsten Zellen sind die B- und T- Lymphozyten, welche im Folgenden vorgestellt werden:

Die **B-Zellen** sind die antikörperproduzierenden Zellen des Immunsystems und somit die Säule der humoralen Immunantwort. B-Zellen reifen im Knochenmark (*bone marrow*) und liegen zunächst als naive B-Zellen vor. Reife B-Zellen produzieren antigenspezifische Antikörper, welche an das Zielantigen binden können. Durch die Antikörperbindung an die antigentragenden Zielstrukturen, können mehrere Wege zur Elimination dieser opsonierten Zellen gegangen werden. Erstens kann eine Antikörperbindung zur Blockierung von überlebenswichtigen intrazellulären Signalen und zur

Apoptoseinduktion führen. Zweitens können Antikörper eine Elimination über eine so genannte *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity* (ADCC) oder durch komplementvermittelte Lyse bewirken. Im Rahmen der ADCC binden Makrophagen und NK-Zellen über spezielle  $F_c$ -Oberflächenrezeptoren an den  $F_c$ -Teil des Antikörpers, wodurch es zu einer Aktivierung der Immunzellen kommt. Neben einer Förderung der Zielzellelimination kann auch die Phagozytose durch APCs und in der Folge die Antigenpräsentation erleichtert werden, wodurch zum Beispiel reife  $CD8^+$  T-Effektorzellen aktiviert werden.

Die **T-Zellen** reifen fast ausschließlich im Thymus und können aufgrund ihres CD-Oberflächenmusters (*cluster of differentiation*) in zwei Hauptgruppen eingeteilt werden, die  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen. Darüber hinaus bezeichnet man den Tumor infiltrierende T-Lymphozyten als TILs (*Tumor infiltrating lymphocytes*). Sie stellen die effektivsten Immunzellen für eine Tumorbekämpfung durch das Immunsystem dar.

Die  $CD4^+$  T-Zellen lassen sich aufgrund des Musters der von ihnen produzierten Zytokine in sogenannten  $CD4^+$   $T_H1$ - und  $CD4^+$   $T_H2$ -Zellen aufteilen. Während die  $T_H1$ -Zellen überwiegend IL-2, TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  produzieren und hauptsächlich für die Aktivierung von APCs und CTLs (*cytotoxic T lymphocytes*) verantwortlich sind, sezernieren die  $T_H2$ -Zellen überwiegend Zytokine wie IL-4 und IL-5, welche für die Aktivierung von B-Zellen verantwortlich sind und somit die humorale Immunantwort verstärken.

$T_H$ -Zellen können sowohl über eine IL-2-Sekretion [120], über Aktivierung von APCs [121] und auch durch eine direkte Interaktion mit CTLs [122] eine CTL-assoziierte Immunantwort gegen Tumore auslösen. Darüber hinaus ist die Anwesenheit von  $T_H1$ -Zellen wichtig für das Überleben von CTLs. Neben der Aktivierung einer antigenspezifischen Immunantwort (*priming*) spielen die  $T_H$ -Zellen auch eine Rolle bei der Ausbildung von Gedächtniszellen [123, 124].  $T_H$ -Zellen können durch Rekrutierung weiterer Immunzellen wie zum Beispiel Eosinophile und Makrophagen [125] Einfluss auf das inflammatorische Mikromilieu des Tumors nehmen und dadurch zu einer Verstärkung der Tumorrejektion führen [126, 127]. Eine weitere Tumorbekämpfung durch  $T_H$ -Zellen kann über eine direkte Wechselwirkung mit Tumorzellen stattfinden, wodurch unter anderem proapoptotische Signale ausgelöst und zytotoxische Faktoren sezerniert werden können [128-130]. Eine wichtige Rolle spielen die  $T_H$ -Zellen auch für die MHC-II-Molekül-assoziierte antitumoröse Immunreaktion. Insbesondere die tumorantigen-spezifischen (siehe unten)  $T_H$ -Zellen sind einerseits in der Lage



Antigene auf ihrer Oberfläche an MHC-II-Moleküle gebunden zu präsentieren. Andererseits können diese Zellen eine Erhöhung der MHC-II-Expression auf Tumoren durch Ausschüttung verschiedener Interferone induzieren [120, 131-135].

Neben den NK-Zellen, spielen  $CD8^+$  T-Zellen eine zentrale Rolle in der Immunabwehr von Tumoren [136-138]. Sie sind die effektivsten Killerzellen des Immunsystems. Wie die  $T_H$ -Zellen, so existieren zunächst die naiven  $CD8^+$  T-Zellen, welche nach Antigenkontakt zu antigenspezifischen Killerzellen heranreifen. Hierbei präsentiert eine APC einer naiven  $CD8^+$  T-Zelle ein spezifisches Peptid gebunden an einem MHC-I-Molekül und mit weiteren kostimulatorischen Molekülen [139]. Eine hinreichende Kostimulation ist für eine erfolgreiche  $CD8^+$ -Aktivierung von entscheidender Rolle. Dringt ein Krankheitserreger in ausreichender Menge in den Körper ein, so kommt es zu einer starken primären Entzündungsreaktion mit Ausschüttung von zahlreichen Mediatoren. Unter solchen Bedingungen können DCs bereits alleine für eine hinreichende Kostimulation der  $CD8^+$ -Zellen sorgen. Jedoch ist es eher unwahrscheinlich, dass für ein tumorassoziiertes Antigen derartige Inflammationsbedingungen erfüllt werden. In diesem Fall binden zusätzlich zu den  $CD8^+$ -Zellen auch  $CD4^+$ -Zellen an die APC und sorgen für eine Steigerung der kostimulatorischen Faktoren in der APC, wodurch schließlich die  $CD8^+$ -Zelle in ausreichender Form aktiviert werden kann [139]. Im Falle einer nicht hinreichenden Kostimulation von  $CD8^+$ -Zellen werden diese entweder anerg oder gehen in Apoptose über, wodurch das Auftreten von Autoimmunreaktionen möglichst minimiert wird [140]. Ein für das *priming* essentielles kostimulatorisches Molekül ist CD28, welches an das B7-Molekül der DC bindet [141]. Darüber hinaus ist eine Kostimulation über TNF-Familien-Rezeptoren, CD 30, HVEM, CD134 (OX40) und GITR für das Überleben von  $CD8^+$ -Zellen und die Entstehung von Gedächtniszellen wichtig [142]. Der klassische Ort für das T-Zell *priming* sind die peripheren Lymphknoten, jedoch wurde auch über erfolgreiches *priming* in den Tumoren selbst berichtet [89, 143]. Eine aktivierte naive T-Zelle produziert in der Hauptsache das IL-2, wodurch ein starker Proliferations- und Differenzierungsreiz zu nunmehr reifen  $CD8^+$  T-Effektorzellen gesetzt wird. Erkennt eine solche reife  $CD8^+$  T-Effektorzelle ihr MHC-I-gebundenes Antigen, kommt es zur Ausschüttung von zytotoxischen Substanzen und zur Initiierung der Apoptose in den Zielzellen, beispielsweise über die Fas:Fas-Ligand-Interaktion [144]. Zusätzlich produzieren aktivierte  $CD8^+$  T-Effektorzellen zusätzlich proinflammatorische Mediatoren.

### 1.2.3 Tumor-assoziierte Antigene (TAAs)

Die Entdeckung der sogenannten Tumor-assoziierten Antigene (TAAs) Anfang der 1990er Jahre stellt einen Meilenstein in der Tumorummunologie dar [2, 145]. Die Existenz von Tumor-spezifischen Antigenen wurde durch den Nachweis einer möglichen aktiven Immunisierung von Mäusen gegen syngene Tumortransplantate, welche durch chemische Behandlung, Viren oder andere Verfahren induziert wurden, erhärtet [146, 147]. TAAs sind Proteine welche entweder praktisch nur im Tumor exprimiert werden oder welche im Tumorgewebe signifikant überexprimiert werden. Entsprechend lassen sich die TAAs in fünf Gruppen einteilen [148]:

#### 1.2.3.1 Differenzierungsantigene

Differenzierungsantigene sind Proteine, welche praktisch ausschließlich in Zellen exprimiert werden, aus denen der Tumor entstanden ist. Diese können von Tumorzellen so stark exprimiert werden, dass eine Immunantwort gegen diese Antigene möglich ist. Häufig in Kombination mit den *cancer testis*-Antigenen wird - trotz der Möglichkeit einer Autoimmunreaktion - gegen diese Antigene geimpft. Wichtige Vertreter aus dieser Gruppe sind das *carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 5* (CEA, gastrointestinale Tumore) [149-151], gp100 und Melan-A (Melanom) [152-155] und das Prostata-spezifische Antigen, *kallikrein-related peptidase 3* (PSA, Prostatakarzinom) [156].

#### 1.2.3.2 Überexprimierte Antigene

Diese Antigene kommen naturgemäß auch in anderen Zellen des Körpers vor, allerdings sind sie in Tumorzellen überexprimiert, wobei auch posttranslationale Veränderungen eine Rolle spielen können, so dass eine Immunantwort gegen diese Antigene möglich wird. Wider Erwarten konnte nach Impfungen mit diesen Antigenen, unter Ausbleiben von Autoimmunreaktionen, das Auftreten spezifischer T-Zellantworten nachgewiesen werden [157-159].

Interessante Vertreter sind Proteine des zellulären Fettstoffwechsels (Adipophilin) [160], antiapoptotische Proteine (Survivin) [161, 162] und Tumorsuppressorgene (p53) [163-165].

### 1.2.3.3 *Cancer Testis*-Antigene

Antigene dieser Gruppe werden physiologischerweise in Spermatozyten und in Trophoblasten der Plazenta exprimiert. Durch Reaktivierung so genannter stiller Gene, beispielsweise durch reziproke Translokation, können diese Gene in die Nähe eines aktiven Promotors gelangen, und so wieder exprimiert werden [166]. Hodengewebe exprimiert weder MHC-I- noch -II-Moleküle, so dass diese Zellen immunprivilegiert sind und im Falle einer Immunreaktion nicht angegriffen werden [167]. Aus diesem Grund rechnen manche Autoren die *cancer testis*-Antigene auch zu den tumorspezifischen Antigenen. Antigene aus dieser Gruppe sind X-chromosomal kodiert [168]. Zu den wichtigsten Vertretern dieser Gruppe zählen MAGE-1 in Melanomen, dessen Entdeckung zu den Meilensteinen der Tumorummunologie zählt [169, 170].

### 1.2.3.4 Mutationsantigene

Mutationsantigene entstehen aus Punktmutationen in Genen [171-173], Genumlagerungen [174-176], abnormem mRNA-splicing [177], unüblichem posttranslationalem splicing [178, 179] oder anderen posttranslationalen Veränderungen [180, 181], so dass diese Antigene spezifisch für den sie exprimierenden individuellen Tumor sind. Normalerweise werden diese Gene ubiquitär exprimiert. Einige dieser Mutationen können in der Tumortransformation beteiligt sein, wie beispielsweise das Fusionsantigen bcr-abl [182-184].

### 1.2.3.5 Onkovirale Antigene

Diese Antigene werden von körperfremden Viren kodiert, welche nach Eindringen in den Körper zu einer Tumorerkrankung führen können. Die wahrscheinlich prominentesten Vertreter aus dieser Gruppe sind die humanen Papillomviren (HPV 16 E7-Protein), wofür Herr Prof. zur Hausen (DKFZ, Heidelberg) 2008 den Nobelpreis erhielt [185-188].

### 1.2.3.6 Identifizierung tumorassoziierter Antigene

Der Grundgedanke bei der Identifizierung tumorassoziierter Antigene besteht in der Tumorerkennung des Immunsystems als Indikator für die Relevanz der Antigenität des Tumors [189]. Die Identifizierung der ersten TAAs erfolgte somit entweder durch

Untersuchung von tumorinfiltrierenden (TILs) oder peripheren Lymphozyten oder durch Untersuchung der humoralen Immunantwort [2, 190, 191].

Ziel der weiteren Forschung war die automatisierte Suche nach neuen TAAs. Hierzu konnten einige viel versprechende Ansätze erarbeitet werden, welche im Folgenden deskriptiv vorgestellt werden:

#### **1.2.3.6.1 SEREX**

SEREX steht für "serologische Identifikation von Antigenen durch rekombinantes Expressionsklonieren". Dieses Programm vergleicht Antiseren von Tumorpatienten mit denen nicht-erkrankter Individuen auf die Erkennung von Proteinen im Hinblick auf ihre Relevanz für eine tumorassoziierte Immunantwort [192-194]. Die so isolierten Antikörper können in cDNA-Expressionsbibliotheken zur Identifizierung von Tumorantigenen verwendet werden.

#### **1.2.3.6.2 Peptidelution**

Die Peptidelution stellt eine der wichtigsten Methoden der vorliegenden Arbeit dar. Hierbei erfolgt eine saure Peptid-Elution aus Tumorzellen aufgereinigten HLA-Molekülen, wobei die Peptide anschließend durch Kapillar-HPLC aufgetrennt werden, bevor sie mittels Massenspektrometrie untersucht werden [195].

#### **1.2.3.6.3 Library-Ansatz**

Nach Expression einer cDNA-Bibliothek aus Tumorzellen in Zielzellen wird untersucht, welche dieser Zellen durch T-Zellen von Tumorpatienten erkannt werden.

#### **1.2.3.6.4 Reverse immunology**

Grundidee der *reverse immunology* ist die Untersuchung bereits bekannter Antigene anhand von Protease-Schnittmustern und MHC-Bindemotiven. Das so theoretisch generierte Epitop wird mittels Peptidsynthese hergestellt und in Wirkungstests untersucht [196]. Zur Vorhersage von solchen Epitopkandidaten dienen Suchprogramme aus der Bioinformatik wie zum Beispiel BIMAS/HLA\_BIND ([http://bimas.dcrn.nih.gov/molbio/hla\\_bind/](http://bimas.dcrn.nih.gov/molbio/hla_bind/)) [197] oder SYFPEITHI (<http://www.syfpeithi.de>) [198].

Die entscheidende Limitation dieses Ansatzes ist, dass hiermit keine neuen TAAs identifiziert werden können.

### 1.3 Immuntherapien bei Tumorerkrankungen

Die Behandlung von Krebspatienten stellt immer noch eine der größten Herausforderungen im klinischen Alltag dar. Insbesondere die Therapiestrategien für fortgeschrittene Tumorerkrankungen sind häufig limitiert. Zusätzlich wird die Problemstellung dadurch komplizierter, dass sich die einzelnen Tumorerkrankungen in ihren Eigenschaften teilweise völlig unterscheiden. In den vergangenen Jahren sind neben der klassischen Behandlungstria bestehend aus (1) Chirurgischer Tumorentfernung, (2) Chemotherapie und (3) Bestrahlung großartige Erfolge durch Weiterentwicklung immntherapeutischer Verfahren zu verzeichnen. Wie bereits in Abschnitt 1.2 vorgestellt, besitzt das Immunsystem vielfältige intrinsische Möglichkeiten der Tumorkämpfung. Allerdings besitzen viele Tumore ebenso viele Möglichkeiten sich einer effektiven Immunantwort zu entziehen. Durch eine gezielte pharmakologische Unterstützung besteht somit die Möglichkeit eine immunologische Tumorreaktion zu erzielen. In der modernen Immuntherapie bestehen prinzipiell die Möglichkeiten einen humoralen und/oder einen zellulären immuntherapeutischen Ansatz zu wählen. Es folgt nun die Vorstellung einiger der Grundlagen der modernen Immuntherapien:

#### 1.3.1 Nicht-zelluläre (humorale) Immuntherapien

Bei humoralen Immuntherapien erfolgt die Applikation von spezifischen Antikörpern. Hierbei handelt es sich in der Regel um passive Therapieansätze, da durch die Verabreichung von Antikörpern prinzipiell kein immunologisches Gedächtnis erzielt wird. Nach anfänglichem Ausbleiben der erhofften Therapieerfolge konnten nach „Humanisierung“ der initial murinen Antikörper gute Ansprechraten und eine Reduktion der unerwünschten Wirkungen erreicht werden, so dass mittlerweile verschiedene Antikörpertherapien standardisiert sind [199-201]. Exemplarisch seien an dieser Stelle die monoklonalen Antikörper bei der Behandlung von B-Zell-Lymphomen und des hormonpositiven Brustkrebses genannt: Rituximab und Trastuzumab.

*Rituximab* bindet als chimärer IgG-Antikörper an das Oberflächenantigen CD20 von B-Zellen und führt zu einer komplementvermittelten Tumorzellyse, zu einer zellvermittelten Zytotoxizität, Apoptose und Proliferationshemmung. Seine Wirksamkeit konnte in zahlreichen Studien gesichert werden, so dass Rituximab als Therapiestandard in der modernen Hämatonkologie Einzug gefunden hat [202, 203]. *Trastuzumab* richtet sich gegen den Her-2-neu-Rezeptor auf Brustkrebszellen und löst durch seine Bindung eine Hemmung von intrazellulären Wachstumssignalen aus.

Seine Wirksamkeit konnte ebenfalls in mehreren klinischen Studien nachgewiesen werden [204, 205].

Eine zusätzliche Wirkungssteigerung wurde versucht durch Kombination von monoklonalen Antikörpern mit Chemotherapeutika oder durch Kopplung mit Radionuklid- oder Toxinen zu erreichen [206-208]. Durch Entwicklung von sogenannten bispezifischen Antikörpern wurde ebenfalls versucht eine Wirkungssteigerung zu erzielen. Dabei bindet die eine Bindungsstelle an ein spezifisches Zielantigen, wohingegen die zweite Bindungsstelle entweder an ein Oberflächenmolekül einer weiteren Immuneffektorzelle oder an einen kostimulatorischen Rezeptor binden kann [209].

Neben der passiven Verabreichung von Antikörpern können auch B-Zellen durch Vakzinierung mit TAAs zur *in vivo* Antikörperproduktion angeregt werden. Zur Wirkungssteigerung wurden neben den TAAs entweder Adjuvantien oder Antigene mit T-Helferzell-stimulatorischer Wirkung appliziert, so dass die beobachteten Erfolge nicht eindeutig auf die B-Zell-abhängige Antikörperproduktion zurückgeführt werden können [210].

### 1.3.2 Zelluläre Immuntherapien

Die zellulären Immuntherapien zielen in der Regel auf die *in vivo*-Generierung von CD8<sup>+</sup> T-Killerzellen ab. Hierzu kann entweder eine Vakzinierung (*aktive* Immunisierung) oder ein adoptiver Transfer (*passive* Immunisierung) von *ex vivo* expandierten autologen oder allogenen T-Zellen erfolgen.

### 1.3.3 Adoptiver Transfer

Als adoptiven Transfer bezeichnet man ein passives Immuntherapieverfahren, bei dem man zunächst allogene oder autologe T-Zellen isoliert und anschließend *ex vivo* expandiert und aktiviert. Die so generierten CD8<sup>+</sup> T-Killerzellen werden anschließend wieder dem Patienten reinfundiert.

Zunächst erfolgt die Isolierung von tumorspezifischen T-Zellen aus dem peripheren Blut, wohingegen früher TILs verwendet wurden. In der Regel werden die T-Zellen anschließend zur Aktivierung und Expansion in eine *in vitro*-Kokultivierung mit DCs gebracht. Zur Unterstützung des Aktivierungs- und Expansionsverhaltens werden den Kulturen zusätzlich verschiedene Zytokine zugefügt.

In der Anwendung unterscheidet man einen myeloablativen von einem nicht-myeloablativen Transfer von Immunzellen. Im Vergleich scheint ein leichter Vorteil für den myeloablativen Ansatz zu bestehen. Die Ursachen hierfür sind bis heute nicht

vollständig geklärt. Man geht davon aus, dass durch eine Myeloablation unter anderem die  $T_{reg}$  Zellen eliminiert werden und eine verstärkte Sekretion von IL-7 und IL-15 stattfindet, so dass schließlich eine effektivere Immunantwort der aktivierten  $CD8^+$  T-Killerzellen möglich ist [211, 212]. Darüber hinaus kann die Effektivität der  $CD8^+$  T-Killerzellen durch eine zusätzliche Gabe von IL-2 oder auch durch IL-21, IL-15 oder IL-7 gesteigert werden. Vergleicht man allerdings die Ergebnisse adoptiver Transferstudien mit denen aus unspezifischen Immuntherapiestudien – beispielsweise mit IL-2 – so lässt sich aktuell kein eindeutiger Vorteil der deutlich aufwendigeren adoptiven Transfertherapie feststellen [213]. In einer Studie mit 13 Melanompatienten konnte durch Kombination einer Chemotherapie mit Cyclophosphamid und Fludarabin zur T-Zelleradikation und anschließendem adoptiven Transfer von *in vivo*-expandierten tumorspezifischen  $CD8^+$  T-Zellen eine objektive Tumorrückbildung in 6 von 13 Patienten beobachtet werden, was ein bemerkenswertes Ergebnis darstellt [214].

Einen weiteren Ansatz stellt die Applikation von  $CD8^+$  T-Zellklonen dar, wofür eine signifikante Tumormunität nachgewiesen werden konnte [212]. Auch *in vivo* genetisch veränderte T-Zellen wurden für einen adoptiven Transfer verwendet. Hierbei erfolgte eine Transduktion von Genen, welche die Migration und die Tumorerkennung verbessern oder die T-Zell-Lebensdauer verlängern sollten [215]. Ferner besteht die Möglichkeit des Transfers von sogenannten CARs (engl. *chimeric antigen receptors*) in T-Zellen, welche aus der intrazellulären Domäne des T-Zell-Rezeptors (TCR) und der Antigenerkennungsdomäne eines Antikörpers aufgebaut sind. Auf diese Weise werden auch Tumorantigene für CTL erkennbar, welche nicht auf MHC-Molekülen präsentiert werden [211].

#### 1.3.4 Vakzinierung

Durch die Vakzinierung wird die *in vivo*-Generierung von aktivierten  $CD8^+$  T-Killerzellen angestrebt, welche in der Folge zu einer immunologischen Tumorrejektion führt. Für die Vakzinierung verwendete Agenzien sind TAAs, welche in Form von Peptiden, Proteinen, RNA- und DNA-Sequenzen oder auch mit antigen-beladenen oder –transfizierten DCs oder als rekombinante virale oder bakterielle Vektoren verabreicht werden können [216].

Prinzipielles Problem der Vakzinierung mit TAAs ist die Generierung einer signifikanten Immunantwort. Aus diesem Grund wurden viele Vakzinierungsansätze zur Steigerung der Immunogenität von TAAs entwickelt.

Vakzinierungsstrategien mit DCs spielen dabei eine herausragende Rolle, da die DCs die wichtigsten APCs für die CD8<sup>+</sup> T-Zellen sind. Eine effektivere Anlockung und Aktivierung von DCs ist zum Beispiel durch die zusätzliche Gabe von GM-CSF [107, 217] oder durch CD40-spezifische Antikörper möglich [218]. Neben dem GM-CSF existieren eine Reihe weiterer Adjuvantien, welche zur Verstärkung einer Immunantwort während einer Vakzinierung eingesetzt werden können: Lipopolysaccharid, CpG-enhaltende Oligonukleotide, IL-2 [210], IL-12 [219, 220], IL-15 [221] und IFNs [222-225].

Durch die Fusion von DCs mit Tumorzellen kann eine Kopräsentation von Tumor- und DC-Oberflächenmolekülen erreicht werden. Allerdings wurde diese Vakzinierungsstrategie aufgrund des hohen technischen Aufwands bisher in keiner klinischen Studie untersucht [226].

Neben der *in vivo*-Aktivierung von DCs besteht auch die Möglichkeit einer *in vitro*-Stimulation. Hierzu verwendet man Kokulturen von DCs mit TAAs (Peptide oder Proteine) oder Tumorlysaten. Die so generierten antigenpräsentierenden DCs werden anschließend dem Patienten verabreicht [227-233]. Zur effektiveren *in vitro*-Aktivierung von DCs werden den Kulturen häufig TNF- $\alpha$ , IL-1, CD40L und Prostaglandine beigefügt. Eine zusätzliche Transfektion mit GM-CSF oder CD40L führt bei Reinjektion zu einer autokrinen DC-Stimulation [234]. Eine effektivere Antigenpräsentation auf DCs kann durch Transduktion von TAAs über rekombinante virale Vektoren [235-237] oder gar durch direkte Transduktion von mRNA von TAAs in DCs erreicht werden [238].

Die Erhöhung der Immunogenität von TAAs stellt ebenfalls einen viel versprechenden Ansatz dar. Diese kann beispielsweise durch Bildung von Fusionsproteinen bestehend aus TAAs und Chemokinen, GM-CSF oder F<sub>c</sub>-Fragmenten von Immunglobulin G erzielt werden [239-241]. Eine Weiterführung stellt die Komplexbildung von TAAs mit Hitzeschockproteinen dar, welche zu einer effektiveren Antigenprozessierung der TAAs durch DCs führt [242]. Darüber hinaus führt eine effektivere Bindung der Antigenpeptide an die MHC-Moleküle oder des MHC-Peptid-Komplexes an den TCR zu einer Verbesserung der Antigenpräsentation, was auch als *epitope engineering* bezeichnet wird [243, 244].

Ebenfalls viel versprechend scheinen DNA-Vakzine zu sein. Insbesondere in Vektorimpfstudien bestehend aus DNA von TAAs mit Bakterien oder Viren konnte eine Regression der Tumorerkrankungen festgestellt werden [245-247].



Es existiert über die bereits genannten Strategien hinaus eine Reihe weiterer Ansätze zur Effektivitätssteigerung der tumorassoziierten Immunantwort. Exemplarisch seien hier die Verlängerung der Immunantwort (z.B. durch IFN- $\alpha$  und IL-15) [248, 249], die Zugabe kostimulatorischer Moleküle [250-252], die Blockierung inhibitorischer Signale [253] und die verlängerte Lebensdauer von CD8<sup>+</sup> T-Effektorzellen genannt. Die Gefahr bei ebensolchen Versuchen der Immunstimulation ist immer auch die Entwicklung von Autoimmunphänomenen, wie dies beispielsweise durch eine Blockade von CTLA-4 beobachtet werden konnte [254, 255]. Zu einer Effektivitätssteigerung könnte auch die Eliminierung von T<sub>reg</sub>-Zellen und eine Hemmung von TGF- $\beta$  führen [256].

Neben einer *in vivo*-Aktivierung von DCs stellt der Versuch der *in vivo*-Aktivierung von NK-Zellen einen neuen Ansatz der nicht-humoralen Immuntherapien dar [257]. Zusammenfassend sei erwähnt, dass trotz der vielen Vakzinierungsstrategien eine objektive Tumorregression in weniger als 5% aller Patienten erzielt werden konnte, was die Notwendigkeit zur Fortsetzung der intensiven Forschung deutlich macht [214].

## 1.4 Nierenzellkarzinom (RCC)

Das Nierenzellkarzinom (RCC) ist ein maligner Tumor des Nierengewebes, welcher von den Epithelien der Nierentubuli ausgeht [258]. Mit einem Anteil von 2% an allen malignen Tumoren ist das RCC relativ selten, allerdings stellt es mit einem Anteil von 90-95% aller malignen Neoplasien der Nieren das häufigste Nierenkarzinom dar [259]. In Deutschland erkranken im Durchschnitt 5 von 100.000 Menschen jährlich. Rathmell et al. konnten einen statischen Anstieg der Inzidenz von ca. 2% pro Decade feststellen [260]. Eine deutliche Prognoseverbesserung konnte durch die fortschreitend besser werdenden bildgebenden Verfahren (MRT, CT) erzielt werden [261, 262]. Einer der Erstbeschreiber des RCC war der Pathologe Grawitz, so dass das RCC auch als Grawitz-Tumor bezeichnet wird.

### 1.4.1 Ätiologie und Pathogenese

Das RCC ist ein bösartiger Tumor des Tubulusepithels. Mithilfe morphologischer, histochemischer und zytogenetischer Kriterien ist folgende Einteilung möglich (jeweilige Ursprungszellen und Häufigkeitsverteilung in Klammern):

- (a) Klarzelliges RCC (proximaler Tubulus, 70-75%),

- (b) Chromophiles RCC (proximaler Tubulus, 15%, einschließlich des papillären RCC von *Kovacs*)
- (c) Chromophobes RCC (distaler Übergangstubulus, 4%)
- (d) Oncozystisches RCC (Übergangstubulus, 2-3%, einschließlich des Oncozytoms)
- (e) Karzinome des Sammel tubulus und medulläre Karzinome (kortikaler medullärer Sammel tubulus, 1%)
- (f) Pleomorphe/spindelförmige/sarcomatoide RCCs (entdifferenziert, isoliert oder einhergehend mit anderen RCC-Typen, 1%)

Eine Reihe von Risikofaktoren konnten in Studien identifiziert werden. Insbesondere tritt bei Männern das RCC etwa doppelt so häufig auf. Darüber hinaus konnte der aktive und passive Tabakkonsum als ein wesentlicher Risikofaktor herausgearbeitet werden [263]. Möglicherweise könnte die von Rathmell et al. beschriebene Inzidenzsteigerung mit einem erhöhten Tabakkonsum in Verbindung stehen [260]. Die Adipositas scheint insbesondere bei Frauen von Bedeutung zu sein [264]. Ebenfalls bei Frauen in der Postmenopause konnte eine erhöhte Inzidenz festgestellt werden. Darüber hinaus wurden auch die Petroleum-, Kadmium- und Asbestexposition als Risikofaktoren beschrieben [258]. Als Risikofaktoren mit starker genetischer Komponente werden die Zystennieren und das von Hippel-Lindau-Syndrom, bei dem ein inaktiviertes VHL-Tumorsuppressorgen vorliegt [265, 266], angesehen. Circa 40% aller Patienten mit von Hippel-Lindau-Syndrom erkranken während ihres Lebens an einem RCC (häufig vom klarzelligen Typ), was schließlich auch die häufigste Todesursache für diese Patienten darstellt.

#### 1.4.2 Stadieneinteilung

Die TNM-Klassifikation bildet die Grundlage für die Stadieneinteilung des RCCs. Häufige Fernmetastasen des RCCs sind pulmonale Metastasen (55%), lokoregionäre und mediastinale Lymphknoten (35%), hepatische und ossäre Metastasen (jeweils ca. 32%), die kontralaterale Niere (11%) und schließlich Metastasen des ZNS und des Herzens (jeweils 5%).

Eine Übersicht zur TNM-Klassifikation liefert Tabelle 1.

#### 1.4.3 Therapie

Die Therapie des RCCs ist abhängig vom Tumorstadium. Nach wie vor ist die chirurgische Tumorentfernung der Goldstandard in der Behandlung des RCCs. Im fortge-

schriftlichen Stadium sind die Behandlungsmethoden allerdings auch heute noch stark beschränkt und die Prognose sehr limitiert (5-Jahres Überlebens Rate kleiner 20%). Im Folgenden werden zunächst einige Grundlagen der konventionellen RCC-Therapie beschrieben (Abschnitt 1.4.3.1), bevor auf die immuntherapeutischen Ansätze eingegangen wird (Abschnitt 1.4.3.2).

### 1.4.3.1 Konventionelle Therapie

Die von Robson et al. in den 1960er Jahren vorgeschlagene radikale Nephrektomie mit Entfernung der betroffenen Niere, der Gerotaschen Faszie, der lokoregionären Lymphknoten und einer ipsilateralen Adrenaektomie stellt heute den Goldstandard in der RCC-Therapie dar [267, 268].

**Tabelle 1:** TNM-Klassifikation des Nierenzellkarzinoms, nach AJCC Cancer Staging Handbook, 6. Edition (2002)

T	Primärtumor
Tx	Nicht beurteilbarer Primärtumor
T0	Kein Anhalt auf Primärtumor
T1	Maximaler Tumordurchmesser 7 cm, Begrenzung auf die Niere
T1a	Maximaler Tumordurchmesser 4 cm
T1b	Tumordurchmesser > 4 cm aber < 7 cm
T2	Tumordurchmesser > 7 cm, Begrenzung auf die Niere
T3	Tumor infiltriert perirenale Strukturen, kein Durchbruch der Gerota-Faszie
T3a	Tumor infiltriert die Nebenniere oder perirenales Fettgewebe
T3b	makroskopische Ausbreitung in Nierenvene(n) oder Vena cava <i>caudal</i> des Zwerchfells
T3c	Tumor mit makroskopischer Ausbreitung in Vena cava <i>cranial</i> des Zwerchfells
T4	Tumor durchbricht die Gerota-Faszie
N	Regionale Lymphknoten
Nx	Regionäre Lymphknoten nicht beurteilbar
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase in einem regionären Lymphknoten
N2	Metastasen in > 1 regionären Lymphknoten
M	Fernmetastasen
Mx	Vorhandensein von Fernmetastasen nicht beurteilbar
M0	Keine Fernmetastasen vorhanden
M1	Fernmetastasen vorhanden

Allerdings stellt diese Behandlungsmethode einen erheblichen Eingriff dar, so dass unter der immer besser werdenden Bildgebung mittels Computertomographie (CT) oder Magnetresonanztomographie (MRT) auch vermehrt differenziertere Verfahren an Bedeutung gewinnen. Insbesondere bei präoperativ eingeschränkter Nierenfunktion wird häufig eine „nephronsparende“ Tumorsektion angestrebt. Für diese Teilresektionsverfahren konnte in Studien kein Nachteil gegenüber der radikalen Nephrektomie festgestellt werden [269-271]. Darüber hinaus wurde in den vergangenen Jahren auch der Vorteil der ipsilateralen Adrenaektomie kritisch diskutiert [272].

Im Gegensatz zu den sehr guten Ergebnissen nach chirurgischer Therapie im nicht-fortgeschrittenen Tumorstadium konnte insbesondere für die Tumorerkrankungen mit Fernmetastasen weder durch chemo- noch durch strahlentherapeutische Ansätze keine zufrieden stellende Resultate generiert werden. In einer großen Metaanalyse von Yagoda et al. mit 3502 RCC-Patienten konnte lediglich in 5,6% der Fälle (197 Patienten) eine komplette oder partielle Remission durch eine Chemotherapie erzielt werden [273].

Eine noch untergeordnetere Rolle im Rahmen der kurativen Therapieansätze nimmt die Strahlentherapie ein. Lediglich für Tumorstadien größer T3 konnte eine Prognoseverbesserung durch eine postoperative Bestrahlung nachgewiesen werden [274]. Bei weniger fortgeschrittenen Tumorstadien konnten weder für prä- noch für postoperative Bestrahlungsprotokolle vergleichbare Ergebnisse gewonnen werden [275-278]. Allerdings besitzt die Strahlentherapie einen festen Stellenwert für palliative Therapieansätze [279]. Zur Tumorlastreduktion scheint die Radiofrequenzablation an Bedeutung zu gewinnen [280].

**Tabelle 2:** Kumulative Übersicht über verschiedene klinische immuntherapeutische Studien beim fortgeschrittenen Nierenzellkarzinom (RCC)

Therapie	Studien	Patienten	Complete Remission (CR) [%]	Partielle Remission (RR) [%]
IL-2	26	1477	4	15
IFN- $\alpha$	13	678	3	14
IFN- $\gamma$	9	224	2	9
IFN- $\alpha$ +IL-2	21	642	5	20
IFN- $\alpha$ +IL-2+5-FU	2	141	2	34
IFN- $\alpha$ /Vinblastin	7	312	2	15
IFN- $\alpha$ +5-FU	1	21	4	5

### 1.4.3.2 Immuntherapie

Das RCC zählt zu den immunogenen Tumoren. Aufgrund beobachteter Spontanremissionen und den Erfolgen der Therapiestrategien mit unspezifischen Immuntherapien bestehend insbesondere aus IL-2, IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und IL-12 gab es seit den 1990er Jahren zahlreiche klinische Immuntherapiestudien [281-286]. Tabelle 2 gibt eine kumulative Übersicht über die wichtigsten Immuntherapiestudien. Auch die Nutzung der NK-Toxizität zeigte eine Verbesserung der Regression [287]. Mithilfe des anti-VEGF-Antikörpers Bevacizumab konnte ebenfalls eine Verzögerung der Tumorprogression erzielt werden [288, 289].

## 1.5 Cholangiozelluläres Karzinom (CCC)

Das cholangiozelluläre Karzinom (CCC) ist ein bösartiger Tumor der Gallengänge mit einer Prävalenz von 1:500.000 und einer durchschnittlichen 5-Jahresüberlebensrate von 10-30%. Eine Sonderform des CCCs ist der Klatskintumor, welcher meist an der Hepatikusgabel lokalisiert ist und nach Bismuth in 4 Typen eingeteilt wird:

- (1) Typ I : Lokalisation des Ductus hepaticus communis ohne Hepatikusgabel
- (2) Typ II : Mitbeteiligung der Hepatikusgabel
- (3) Typ III : Beteiligung bis an die Segmentabgänge (Typ IIIa rechts, Typ IIIb links)
- (4) Typ IV : Rechte und linke Zusammenflüsse sind betroffen, keine kurative Resektion mehr möglich

Risikofaktoren sind die primär sklerosierende Cholangitis (PSC), die Colitis ulcerosa, parasitäre Lebererkrankungen und chronische Gallengangsentzündungen.

Der Goldstandard in der CCC-Diagnostik ist die Ultraschalldiagnostik, gefolgt von den radiologischen Schnittbildverfahren CT und MRT. Zu den diagnostischen Tools gehört auch die endoskopisch retrograde Cholangiopankreatikografie.

Eine kurative Therapie ist heute nur durch eine chirurgische Totalresektion möglich. Chemo- und stahlentherapeutische Ansätze sind im fortgeschrittenen Tumorstadium praktisch wirkungslos. Die photodynamische Therapie (intravenöse Hämoporphyrin-gabe mit anschließender Lichtbehandlung) stellt einen neueren Therapieansatz dar [290].

## 1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Krebserkrankungen sind nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache in den entwickelten Industrieländern. Das Nierenzellkarzinom ist mit einer Gesamthäufigkeit von etwa 3% aller maligner Tumore relativ selten, allerdings mit einer Häufigkeit von 80-90% die häufigste bösartige Neubildung der Niere.

Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war die Isolierung und Charakterisierung von Tumorantigenen, welche auf der Zelloberfläche von Nierenzell- und Cholangiozellulären Karzinomen als Peptide über die MHC-I-Moleküle (*Major Histocompatibility Complex*, MHC) präsentiert werden.

Zusätzlich sollte die MHC-II-Expression im RCC genauer untersucht werden, und ebenfalls tumorassoziierte MHC-II-restringierte Peptide isoliert und charakterisiert werden. Neu identifizierte TAAs sollten im Rahmen einer klinischen Peptid-basierten Vakzinierungsstudie eingesetzt werden.

Aus intraoperativ entnommenem vitalem RCC-Tumorgewebe sollten zunächst Primärzellsuspensionen hergestellt werden. Ziel war die Überführung möglichst vieler Primärzellsuspensionen in stabile Langzeitkulturen, welche für weitere Untersuchungen zur Verfügung stehen würden.

## 2 Material und Methoden

In diesem Kapitel erfolgt eine detaillierte Besprechung der in dieser Arbeit verwendeten Methoden in der Reihenfolge ihrer Verwendung.

**Kapitel 2.1** dient der Vorstellung der Affinitätschromatographie sowie der hierfür notwendigen Vorversuche. Die Methoden zur Quantifizierung der so isolierten MHC-Moleküle werden in **Kapitel 2.2** besprochen. Herzstück der methodischen Peptid-Analyse der vorliegenden Arbeit ist die *liquid chromatography tandem massspectrometry* (LC-MS/MS, **Kapitel 2.3**). Erstmals wurde mit Hilfe des für die MHC-I-Peptidanalyse bestehende Protokolls auch eine systematische Untersuchung von MHC-II-restringierten Peptiden durchgeführt. Zur genaueren Untersuchung der Rolle von MHC-II-Molekülen im RCC erfolgte eine immunhistochemische Studie in Kooperation mit dem Pathologischen Institut, Tübingen (**Kapitel 2.4**). Zusätzlich wurde der Versuch zur Etablierung von stabilen RCC-Langzeitzellkulturen aus RCC-Primärzellsuspensionen unternommen (**Kapitel 2.5**).

### 2.1 Affinitätschromatographie

Mit Hilfe der Affinitätschromatographie können aus einer Lösung MHC-Peptidkomplexe isoliert werden. Das Prinzip beruht auf eine Interaktion zwischen dem MHC-Peptidkomplex und einem Antikörper, welcher kovalent an eine inerte und poröse Matrix gekoppelt ist. Auch bereits vorgeformte Antikörper/MHC-Komplexe können durch Interaktion mit Protein A affinitätschromatographisch isoliert werden.

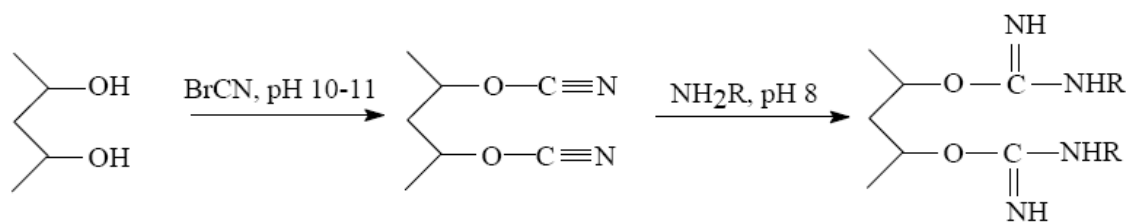
Die Proteinlösung wird zur Aufreinigung über eine Säule mit der Affinitätsmatrix gepumpt, dabei kommt es zur spezifischen Interaktion mit dem gewünschten Bindungspartner. Die Elution des adsorbierten Proteins kann entweder durch eine kompetitive Verdrängung aus der Bindung oder durch eine Konformationsänderung aufgrund einer Variation des pH-Wertes bzw. der Ionenstärke erreicht werden.

Zur Isolierung der gewünschten MHC-Moleküle wurden in der vorliegenden Arbeit zwei verschiedene Affinitätschromatographien eingesetzt, welche entweder Protein A-Sepharose oder CNBr-Sepharose verwendeten.

Protein A, ursprünglich aus der Zellwand des Bakterium *Staph. aureus* isoliert, bindet Immunglobuline reversibel über deren F<sub>c</sub>-Teil und ermöglicht somit deren Aufreinigung. Interessanterweise ist die Bindung unter leicht alkalischen (pH 8) stärker als unter sauren (pH 3) Bedingungen.

Mithilfe der CNBr-Sephrose ist es möglich jedes beliebige Protein auf der Affinitäts-säule zu immobilisieren. Dabei erfolgt eine kovalente Bindung eines spezifischen Antikörpers an die CNBr-Sephrose. Die in dieser Arbeit verwendete Sepharose enthielt Agarosekügelchen mit einem Durchmesser von etwa 90  $\mu\text{m}$ . Unter alkalischen Bedingungen (NaOH, pH 10-11) erfolgte die kovalente Kopplung von CNBr (s. Abbildung 2.1). Die so aktivierte CNBr-Sephrose wird gefriergetrocknet mit weiteren Zusätzen vom Hersteller geliefert.

Vor AK-Kopplung wurde die Säule mit HCl gewaschen, um eine Hydrolyse der aktivierten Gruppen zu verhindern.



**Abbildung 2** Schema der Kopplung von Peptiden über primäre Aminogruppen an CNBr-aktivierte Sepharose.

Die Säule wird gequollen, bevor der spezifische Antikörper unter leicht basischen Bedingungen kovalent an CNBr bindet (siehe auch Abbildung 2). Überschüssige Liganden werden herausgespült und freie CNBr-Sephrose-Gruppen mit Glycin blockiert. Durch Bindung des gewünschten Proteins an die spezifische Affinitätssäule ist dessen Isolierung möglich. Die Elution erfolgt unter sauren Bedingungen.

## 2.1.1 Vorversuche

Im Rahmen der Vorversuche wurden Antikörper über Protein A gereinigt, CNBr-Sephrose-Säulen hergestellt und die PEG-Gruppen der Zentrikon-Ultrafilter ausgewaschen.

### 2.1.1.1 Reinigung monoklonaler Antikörper über Protein A-Sephrose-Säulen

#### Materialien:

Protein-A-Sephrose (Protein-A-Sephrose CL-4B, Pharmacia Biotech)

PBS (BioWHITTAKER), ddH<sub>2</sub>O (doppelt sterilfiltriert aus Heraeus Destamat Bi 18E)

Kopplungspuffer (KP): 0,5 M NaCl (Merck), 0,1 M NaHCO<sub>3</sub> (Merck), pH 8,3

Zitrat-Puffer: 50 mM Zitronensäure (Merck), pH 3,0



pH-Meter (Knick 765)

Magnetrührer (IKA Labortechnik RCT basic)

#### Durchführung:

Da reine monoklonale AK, mit denen im Folgenden die CNBr-Sepharose-Säulen für die MHC-Aufreinigung hergestellt wurden, eine effektivere Kopplung zeigen, erfolgte deren Anreicherung primär über eine Protein-A Sepharose.

Alle folgenden Schritte wurden, falls nicht anders angegeben, bei 4°C durchgeführt.

1,2 g Protein-A-Sepharose wurden in 5 ml ddH<sub>2</sub>O geschwenkt und der Überstand verworfen. Die Säule wurde für 30 min mit PBS equilibriert (Flussrate 1-2 ml/min). Daraufhin wurde die zu reinigende Antikörperlösung geladen und für 2-3 h zirkulär über die Säule gepumpt. Es folgte ein 30minütiger Waschschrift mit PBS (Flussrate 1-2 ml/min). Nach Ablassen des PBS bis zum Gelbetrand wurde die Säule für die Elution mit 8 ml Zitrat-Puffer überschichtet. Die ersten 1,5 ml des Eluats wurden verworfen, der Rest in 18 ml KP aufgefangen. Zur Bestimmung der Ausbeute wurde die OD<sub>280</sub> der erhaltenen Antikörperlösung gemessen und die Konzentration wie folgt berechnet:

$$c_{AK} = OD_{280} \times 0,7 \text{ mg/ml} .$$

Im Anschluss an die Elution wurde, nachdem die Säule erneut mit PBS equilibriert wurde, die AK-Lösung nochmals geladen und eluiert. Dies wurde bis zu einer Antikörperkonzentration im aufgefangenen Eluat < 0,2 mg/ml wiederholt.

Bei Versuchsende wurde die Protein-A-Sepharose-Säule in 50% Ethanol gelagert.

### **2.1.1.2 Herstellung der AK-CNBr-Sepharose-Säulen**

#### Materialien:

CNBr-Sepharose 4B (Amersham Biosciences)

1 mM HCl (Fluka)

0,2 M Glycin (Roth), pH 8

Antikörper: aus Hybridomüberstand, über Protein A-Sepharose-Säule aufgereinigt

W6/32: bindet MHC-Klasse-I-Moleküle (HLA-A,B,C)

L243: bindet MHC-Klasse-II-Moleküle (HLA-DR)

Megafuge (Heraeus)

Biofuge (Heraeus)

Pumpe (Pharmacia Biotech)

Durchführung:

40 mg Sepharose pro mg eingesetztem AK wurden in 20-40 ml 1 mM HCl für 30 min bei RT unter Rotation gequollen. Nach Abzentrifugation der Sepharose (300 rpm in der Megafuge, 4 min bei 4°C ohne Bremse) wurde der Überstand verworfen. Die berechnete AK-Menge wurde auf das gequollene Gelbett pipettiert. AK W6/32 diente der Isolierung von MHC-I-Molekülen und AK L243 der Isolierung von MHC-II-Molekülen.

Zur Bestimmung der Kopplungseffizienz wurden 100 µl der AK-CNBr-Sepharose direkt nach der AK-Zugabe abgenommen, abzentrifugiert (13000 rpm in der Biofuge, 10 min) und die OD des Überstandes bei  $\lambda = 280$  nm gemessen ( $t_0$ -Wert).

Die AK-CNBr-Sepharose wurde daraufhin für etwa 90-120 min bei RT unter Rotation inkubiert. Parallel wurden regelmäßig 100 µl der Suspension entnommen und die  $OD_{280}$  des Überstandes nach Zentrifugation bestimmt. Zur Ermittlung der Kopplungseffizienz wurde der Quotient der  $OD_{280}$  vor und nach der Inkubation berechnet:  $t_{\text{End}}\text{-Wert}/t_0\text{-Wert} \times 100\%$ . Bei einem Wert  $> 95\%$  wurde fortgefahren.

Im Anschluss wurde die Sepharose abzentrifugiert (300 rpm in der Megafuge, 4 min bei 4°C ohne Bremse), der Überstand verworfen und das Gelbett mit 20-40 ml 0,2 M Glycin 60 min bei RT rotiert. Nach Abzentrifugation der Sepharose (300 rpm in der Megafuge, 4 min bei 4°C ohne Bremse) wurde das Gelbett 2x mit PBS gewaschen und die so erhaltene AK-CNBr-Sepharose bis zu Versuchsbeginn in etwa 20 ml PBS im Kühlraum aufbewahrt.

Vor Aufreinigung des Tumorlysates erfolgte eine Equilibrierung der Säule für 30 min mit PBS (Flussrate 1-2 ml/min). Bei der Herstellung von Säulen mit verschiedenen Antikörpern wurden diese sukzessive geschaltet.

### **2.1.1.3 PEG-Gruppenauswaschung der Zentricon-Ultrafilter**

Materialien:

Zentricon-Ultrafiltereinheit (centricon concentrators 10, Amicon)

25% TFA (PE Biosystems), ddH<sub>2</sub>O

Durchführung:

Freie PEG (Polyethylenglykol)-Gruppen in den Zentricon-Ultrafiltereinheiten, in denen später das MHC-Lysat aufgefangen wurde, können durch TFA im Eluat herausgelöst

werden und führen damit bei der folgenden MS zu störenden Signalen. Durch ein vorheriges Auswaschen der PEG-Gruppen kann dies verhindert werden.

Dazu wurden in jedes Zentrikon 2,5 ml H<sub>2</sub>O + 25 µl 25% TFA pipettiert und dieses unter Zentrifugation durch den Filter gepresst. Der Vorgang wurde 1x wiederholt.

### **2.1.2 Gewebeaufschluss**

#### Materialien:

Aufschluss-Puffer (2x): 200 ml PBS, 2,4 g 1,2 %CHAPS (Roche), 6 "complete" protease inhibitor tablets (Roche).

Mixer mit Edelstahlbecher (Waring)

Potter (Glas-Col) und Potterglas (Schütt Labortechnik)

Dounce- Glashomogenisator, Glasgefäß mit Kolben Größe L und S (Braun)

Sterilfilter, 0,22 µm (Sartorius)

Spritze 50 ml (Multimed)

Ultrasenzrifuge (Beckman)

#### Durchführung:

Alle folgenden Schritte wurden, falls nicht anders angegeben, im Kühlraum bei 4°C durchgeführt.

Das intraoperativ entnommene Tumor- bzw. Normalgewebe wurde bis zur MHC-Präparation bei -80°C aufbewahrt und erst unmittelbar vor Beginn des Versuchs auf Eis gelagert.

Die Homogenisation des Gewebes erfolgte mit 10-40 ml 2-fach Aufschluss-Puffer im Mixer für ca. 3 min auf höchster Stufe. Der erhaltene Brei wurde mit weiteren 10-40 ml 1-fach Aufschlusspuffer verdünnt und portionsweise in ein Potter-Glas zum weiteren Aufschluss überführt (5 min, 800 rpm). Dabei wurde das Potterglas während dem Pottern, um eine Erwärmung möglichst zu vermeiden, immer auf Eis gehalten. Das Lysat wurde in einen 250 ml-Erlenmeyerkolben überführt und 1 h bei 4°C gerührt. Danach wurde das Lysat mit dem Dounce-Glashomogenisator weiter aufgeschlossen. Es wurde zuerst der L- (Spaltbreite = 50-70 µm) und später der S- (Spaltbreite = 10-30 µm) Kolben verwendet. Sobald der S-Kolben nahezu reibungslos durch das Lysat gedrückt werden konnte, wurde dieses in einen neuen Erlenmeyerkolben überführt und nochmals 1 h bei 4°C kräftig gerührt.

Das erhaltene Zellysate wurde anschließend in 50 ml-Falcon-Röhrchen überführt und größere Gewebestücke durch Zentrifugation (400 rpm in der Megafuge, 20 min bei 4°C) abgetrennt. Der Überstand wurde 1 h bei 40000 rpm in der Ultrazentrifuge bei 4°C zentrifugiert und anschließend sterilfiltriert (Filter mit 0,22 µm-Poren). Ein Aliquot des Tumorslysats (500 µl) wurde für den Immunoblot (s.u.) abgenommen und bei -80°C eingefroren.

Im Anschluss erfolgte die Präzipitation der MHC-Peptidkomplexe über die in Abschnitt 2.1.1.2 verschieben CNBr-Säulen.

### **2.1.3 Präzipitation der MHC-Moleküle an der Affinitäts-Säule**

#### Materialien:

25% TFA (Trifluoressigsäure); 10% TFA; 0,1% TFA

PBS, ddH<sub>2</sub>O

Flachsüttler (IKA-Vibrax-VXR)

#### Durchführung:

Alle folgenden Schritte wurden, falls nicht anders angegeben, im Kühlraum bei 4°C durchgeführt.

Das erhaltene Tumorslysate aus Abschnitt 2.1.2 wurde auf die gepackte Sepharose-Säulen zuerst linear und im Anschluss daran zirkulär über Nacht gepumpt (Flussrate immer 1-2 ml/min).

Am nächsten Morgen wurde die Lösung in 50 ml-Falcon-Röhrchen aufgefangen und bei -80°C aufbewahrt. 1 Aliquot (500 µl) des Tumorslysats wurde zur MHC-Quantifizierung durch den Immunoblot (s.u.) abgenommen und bei -80°C eingefroren. Die Sepharose-Säulen wurden danach mit PBS (30 min bei einer Flussrate von 1-1,5 ml/min) und ddH<sub>2</sub>O (60 min bei einer *flow rate* von 1-1,5 ml/min) gewaschen. Die Elution der gebundenen MHC-Moleküle erfolgte im Anschluss mit 150 µl 0,1% TFA + 10 µl 10% TFA pro 10 mg an der CNBr-Säule gebundenem AK. Zur vollständigen Elution wurden die Säulen noch 2x mit 150 µl 0,1% TFA pro 10 mg AK behandelt. Das Eluat aus den 3 Elutionsschritten wurde in eine Zentrifuge-Ultrafiltereinheit gesammelt.

Nach Abnahme einer Probe zur Quantifizierung der MHC-Moleküle über die Edman-Sequenzierung (5% des Gesamteluats, Lagerung bei 4°C) wurden die gesammelten

Eluate über Nacht durch den Zentrifilter zentrifugiert (4000 rpm in der Megafuge bei 4°C). Die Filtrate wurden am nächsten Morgen bei -80°C eingefroren.

Der Zentrifilter erlaubt nur das Passieren von Molekülen mit einer Masse < 10 kDa. Dies bedeutet, dass nur MHC-Klasse-I- bzw. MHC-Klasse-II-gebundene Peptide, jedoch nicht die MHC-Moleküle filtriert werden.

Die Filtrate wurden im Anschluss in der Lyophilisieranlage Vaco5 (ZIRBUS) eingetrocknet und in 550 µl MS-Puffer-A-Lösung (4mM NH<sub>4</sub>Ac in 100% H<sub>2</sub>O, pH 3,0 (eingestellt mit Ameisensäure)) gelöst. Jeweils 150 µl der Probe wurden zur Analyse durch LC-MS verwendet. Dabei erfolgte zuerst eine Auftrennung über eine RP-HPLC (*Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography*), bevor die einzelnen Peptidfraktionen im ESI-Q-ToF-MS analysiert wurden. Das Edmangerät und das MS bediente die Diplom-Biologin Margret Müller.

## 2.2 MHC-Quantifizierung

Die Ausbeute der MHC-Moleküle wurde zum einem über Edmansequenzierung und zum anderen über einen Immunoblot mit den Aliquots aus den Tumorlysaten vor und nach MHC-Präzipitation bestimmt.

### 2.2.1 WESTERN-Blot (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

#### Materialien:

Tris-HCl (Sigma)

SDS (Sigma)

40% Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid (29:1, Sigma)

10% Ammoniumpersulfat (APS, Sigma)

N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED, Sigma)

Glycin (Roth)

PPM (*prestained protein marker*) (Invitrogen)

Monomer HLA-A\*0201: HIV-1RT; ILKEPVHGV; eingesetzt in der Konz: 100µg/ml

Laufpuffer: 25 mM Tris, 190 mM Glycin, 0,1% SDS, pH 8,75

Ladepuffer (LP): 125 mM Tris-HCl (Sigma) pH 6,8, 3,5% SDS (Sigma), 20% Glycin (Roth), 10% β -Mercaptoethanol (Sigma)

Minigelkammer (Mini-Protean II Electrophoresis Cell, Bio Rad)

Spannungsquelle (Power Pac 200, Biorad)

#### Durchführung:

Zuerst wurde das Trenngel (Tabelle 3) gemischt, zwischen die Platten der Minigelkammer gegossen und mit Isopropanol überschichtet.

Nach beendeter Polymerisation wurde das Isopropanol aus der Gelkammer entfernt und das Sammelgel (Tabelle 3) auf das Trenngel gegeben.

**Tabelle 3:** Pipettierschema von Trenn- und Sammelgel

<b>Trenngel 15%</b>	<b>Sammelgel 5%</b>
7,3 ml H <sub>2</sub> O	12,8 ml H <sub>2</sub> O
5 ml 1,5 M Tris, pH 8,6	5 ml 1 M Tris, pH 6,8
7,5 ml 40 % Acrylamid	2 ml 40 % Acrylamid
0,2 ml 10% SDS	0,2 ml 10% SDS
0,02 ml TEMED	0,02 ml TEMED
zuletzt: 0,1 ml 10% APS (Reaktionsstarter)	zuletzt: 0,1 ml 10% APS (Reaktionsstarter)

**Tabelle 4:** Pipettierschema der Proben für die SDS-PAGE.

<b>Auftragstasche</b>	<b>PPM</b>	<b>Monomer</b>	<b>Tumorlysat v. IP</b>	<b>Tumorlysat n. IP</b>	<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	<b>NaOH</b>	<b>LP</b>
1	10 µl						10 µl
2		1 µl			9 µl		
3		2 µl			8 µl		
4		3 µl			7 µl		
5		4 µl			6 µl		
6		5 µl			5 µl		
7		6 µl			4 µl		
8		7 µl			3 µl		
9			10 µl				
10			5 µl		5 µl	1 µl	
11				10 µl			
12				5 µl	5 µl		

IP: Immunpräzipitation

Die Auftragstaschen wurden durch Einfügen eines Kammes in das Sammelgel geformt. Nach abgeschlossener Polymerisation wurde das Gel in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt, diese mit Laufpuffer gefüllt und die Luftblasen, die sich zwischen den Glasplatten gesammelt hatten, mit einer Spritze entfernt. Anschließend wurde der Kamm vorsichtig herausgezogen und die vorbereiteten Proben entspre-

chend Tabelle 4 in die Auftragstaschen geladen. Dabei wurde rechts außen ein Proteinmarker und daneben die Proben 2-8, welche vorher für 5 min bei 95°C inkubiert wurden, geladen. Diese bilden eine Verdünnungsreihe, die als Eichgerade für die spätere Proteinbestimmung dient.

Die Elektrophorese erfolgte bei 110 V fürs Sammelgel und anschließend bei 140 V fürs Trenngel über insgesamt 2 h. Bei Konstanthaltung der vorgegebenen Spannung wurden Stromstärke und Leistung automatisch bestimmt. Die aufgetrennten Proteine wurden im Anschluss auf eine Nitrozellulosemembran transferiert.

## **Western Blot**

### Materialien:

1.AK: rabbit-anti-human- $\beta_2$ -Mikroglobulin-IgG (Abcam), 1:50000 verdünnt in TBB mit 0,02% Azid

2.AK: horse-anti-rabbit-IgG (Amersham Life Science), 1:5000 verdünnt in TBB  
Entwicklungslösung (Western Blot Chemiluminescence extra plus, NEN Life Science Products)

Anodenpuffer: 50 mM Natriumborat (Sigma), 20% Methanol (Merck), pH 9

Kathodenpuffer: 50 mM Natriumborat (Sigma), 0,05% SDS, pH 9

TBB: 0,1% Nonidet P-40 (Sigma), 3% BSA (Sigma), 5 mM EDTA (Roth) in TBS

TBS: 50 mM Tris-HCl (Sigma), 150 mM NaCl (Merck), pH 8,0

TWB: 0,1% Nonidet P-40 (Sigma) in TBS

Nitrocellulosemembran (Hybond ECL, Pharmacia)

Filterpapier (Whatman 3MM)

semidry-Apparatur (Transfer-Blot Kammer SD1, CTI)

Image-Station (Fuji Film, LAS-1000)

Software Image Gauge (Fuji Film)

### Durchführung:

Der Transfer der aufgetrennten Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte durch Anlegen eines elektrischen Felds senkrecht zum Gel. Die interessierenden Proteine wurden über spezifische Antikörper direkt auf der Folie detektiert.

Zum Blotten wurde eine semidry-Apparatur verwendet.

Dazu wurden zuerst vier Lagen Filterpapier, getränkt in Anodenpuffer, dann die Nitrocellulosemembran, ebenfalls getränkt in Anodenpuffer, das Polyacrylamidgel, ge-

tränkt in Kathodenpuffer und zuletzt wieder vier Lagen Filterpapier, getränkt in Kathodenpuffer, nacheinander auf den Anodendeckel geschichtet. Luftblasen, die den Transfer der Proteine auf die Nitrozellulosemembran behindern könnten, wurden sorgfältig aus den Schichten gestrichen. Die Blotapparatur wurde mit Kathodendeckel geschlossen und zusätzlich mit einem Gewicht von 2 kg beschwert, um einen lückenlosen Kontakt zwischen den einzelnen Schichten zu gewährleisten.

Der Blot erfolgte bei 40 mA für 3 h. Bei Konstanthaltung der vorgegebenen Stromstärke wurde die Spannung automatisch gewählt.

Die Nitrocellulosemembran wurde im Anschluss über Nacht in TBB im Kühlraum geschwenkt, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen.

Am Folgetag wurde die Membran mit einem anti- $\beta_2$ -Mikroglobulin-AK für 1,5 h bei 4°C inkubiert. Nach 3x 5 min Waschen in TWB erfolgte die Inkubation mit dem 2. AK, welcher an eine Meerrettich-Peroxidase konjugiert ist und an die F(ab)<sub>2</sub>-Fragmente des ersten AK bindet. Danach folgten mehrere Waschschriffe (1x 5min in TBS, 3x 10 min in TWB, 2x 5 min in TBS).

Im Anschluss wird durch Zugabe der Entwicklungslösung eine lichtemittierende Reaktion gestartet. Hierbei oxidiert der Meerrettich-Peroxidase-Anteil des 2. AK das zyklische Diacylhydrazid Luminol unter Lichtemission ( $\lambda = 428 \text{ nm}$ ). Diese Lichtemission wurde an der Image-Station detektiert. Das Bild wurde mit der Software Image Gauge ausgewertet.

Eine Regressionsgerade wurde durch die im Densitometer gemessenen Eichwerte gelegt. Über die Geradengleichung wurden die MHC-Molekülmengen berechnet.

### **2.2.2 Edman-Sequenzierung**

Der Edman-Abbau, eine durch Pehr Edman entwickelte Methode zur Bestimmung der Aminosäuresequenz, ist ein zyklischer Prozess, bei dem in jedem Reaktionszyklus von einem Ende der Peptidkette die endständige N-terminale AS abgespalten und identifiziert wird. Die Reaktion beruht auf drei abgrenzbaren Schritten: Kupplung, Spaltung und Konvertierung.

Die Kupplung erfolgt durch Kopplung von Phenylisothiocyanat (PITC) an die freie N-terminale Aminogruppe der Peptidkette. Dabei entsteht ein disubstituierter Thioharnstoff: das Phenylthiocarbamoylpeptid (PTC-Peptid). Die Spaltung der ersten AS erfolgt mit wasserfreier Säure (z.B. Trifluoressigsäure) als heterozyklisches Derivat einer Anilinothiazolinon (ATZ)-Aminosäure. Nach Extraktion der instabilen ATZ-Aminosäure in hydrophobem Lösungsmittel wird diese beim Konvertierungsschritt



unter saurer Katalyse in ihr stabileres Derivat, die Phenylthiohydantoin-(PTH)-Aminosäure, umgelagert. Die Auftrennung der PTH-Aminosäure erfolgt chromatographisch. Zur Identifizierung werden die Retentionszeiten mit denen einer Referenzprobe, die die PTH-Derivate aller bekannten Aminosäuren enthält, verglichen. Die Ausbeute wird über die Peakhöhe der Absorption bei 269 nm bestimmt.

Bei den Versuchen wurde das automatische Proteinsequenziergerät Procise 494A Protein Sequencer, ABI mit einer speziellen C18-Säule (Spheri-5 PTH 5 µm, 220 x 2,1 mm; Perkin Elmer) verwendet.

In der vorliegenden Arbeit diente der Edman-Abbau zur Quantifizierung der Menge an MHC-Molekülen in den Eluatn und eventuell der Menge an AK, die sich ebenfalls von der Säule lösten.

Das Vorhandensein einer AS zeigte sich in der Zunahme der Intensität und deren Abnahme im folgenden Zyklus. Die Höhe der Intensität ist ein Maß für deren Menge in der Probe. Zur Analyse wurde ein Aliquot von 5% geladen (Verdünnungsfaktor 20). Für die Analyse der MHC-Moleküle wurde nach folgenden Sequenzen gesucht:

<b>MHC-I-Molekül:</b>		<b>MHC-II-Molekül:</b>	
α-Kette:	GSHSMRY	α-Kette:	IKEEHVI
β <sub>2</sub> -Mikroglobulin	IQRTPKI	β <sub>1</sub> -Kette	GDTRPRF
<b>W6/32:</b>		<b>L243 :</b>	
κ-Kette:	NIVMTQS	κ-Kette:	NIVMTQS
γ-Kette	EVQLVE(T/Q)	γ-Kette	DIQVGE

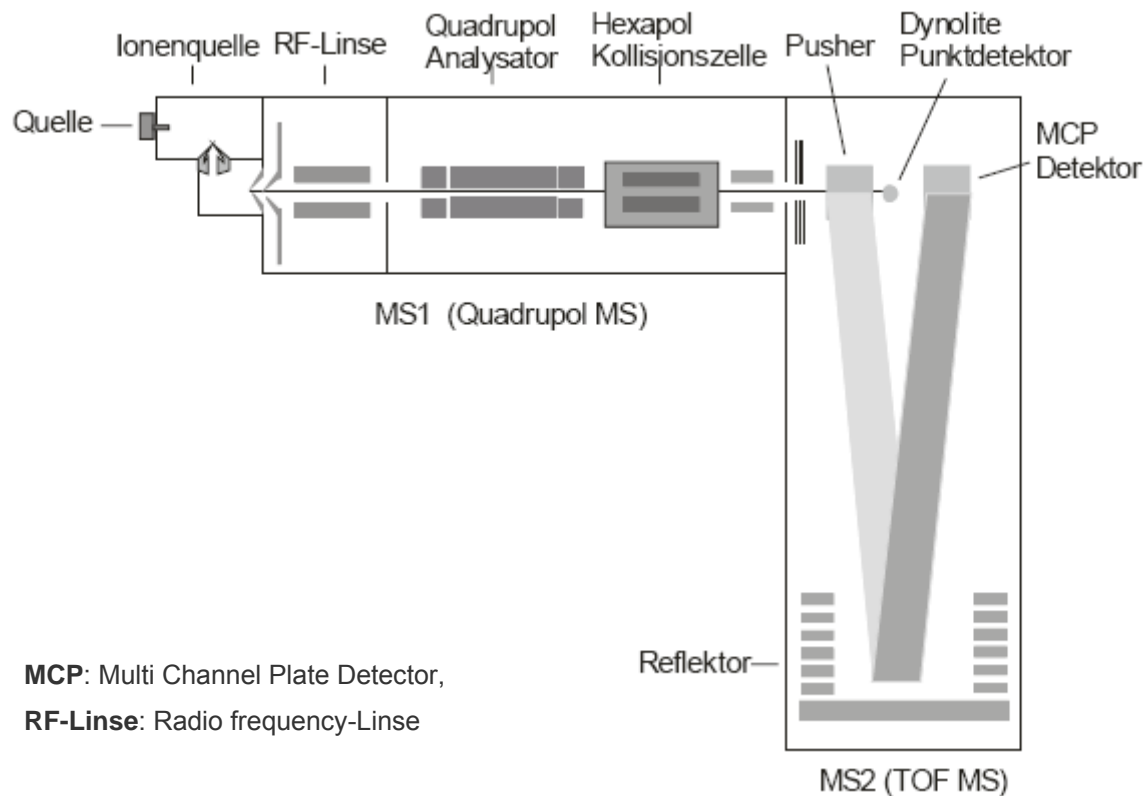
Die Quantifizierung erfolgte über die Mittelwerte der AS-Intensitäten der jeweiligen Sequenz, dabei wurde bei der AS Histidin der doppelte Wert der berechneten Intensität einbezogen, da diese AS beim Edman-Abbau zum Teil zerstört wird.

AS mit hoher Intensität, die sich nicht an den gewünschten Positionen der gesuchten Sequenzen befanden, deuteten auf Ankeramino-säuren und ergaben damit erste Hinweise auf die Sequenz der MHC-gekoppelten Peptide.

## 2.3 Massenspektrometrie

### 2.3.1 Theorie der Massenspektrometrie

**Abbildung 3:** Schematischer Aufbau eines LC-Tandem-Massenspektrometers (Quelle: Q-Tof-Handbuch der Firma Micromass)



Mit Hilfe der MS lassen sich die Molekülmassen freier Ionen im Hochvakuum bestimmen. Hierbei erzeugt eine Ionenquelle aus einer Substanzprobe einen Strahl gasförmiger Ionen, welche dann vom Massenanalysator hinsichtlich ihres Masse/Ladungs-Quotienten ( $m/z$ ) aufgetrennt und von einem Detektor erkannt werden, der ein Massenspektrum liefert. Das Massenspektrum gibt Aufschluss über die Art der Ionen und ihre relative Menge. Tabelle 5 stellt die verschiedenen Komponenten eines Massenspektrometers zusammen.

**Tabelle 5:** Komponenten eines Massenspektrometers

<b>Ionenquelle</b>	<b>Massenanalysator</b>	<b>Detektor</b>
Elektronenstoß-Ionisation (EI)	Quadrupol	Faraday-Cup
Chemische Ionisation (CI)	Magnetisches Sektorfeld	Konversionsdynode mit Sekundärelektronenvervielfacher (SEV)
Fast Atom Bombardment (FAB)	Elektrisches Sektorfeld	Szintillationszähler
Elektrospray-Ionisation (ESI)	Flugzeitanalysator (TOF)	Vielkanalplatte ( <i>multi-channel plate</i> )
Matrixunterstützte Laser-desorption/Ionisation (MALDI)	Elektrische Ionenfalle (ion trap)	
	Elektromagnetische Ionenfalle (Ionenzyklotron)	

In dieser Arbeit erfolgte die Peptidanalyse mit einem Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometer (ESI-MS).

Das ESI-MS wurde 1989 von Fenn et al. entdeckt. Das Prinzip beruht auf einer Desolvatisierung gelöster Ionen, wobei nur wenig zusätzliche Energie auf die Ionen übertragen wird. Um dies zu erreichen wird die zu analysierende Lösung kontinuierlich durch eine Kapillare geführt, an die ein hohes Potential ( $V = 1000\text{-}2000\text{ V}$ ) angelegt ist. Das starke elektrische Feld führt beim Austritt zur Dispersion der Lösung in viele kleine geladene Tröpfchen. Diese wandern bei Atmosphärendruck durch einen senkrecht zur Flugrichtung stehenden Stickstoffstrom auf die *Interface*-Platte zu, welche den Elektrospray-Ionisierungsraum vom Massenanalysator trennt. Der dabei auftretende kontinuierliche Lösungsmittelverlust durch Verdampfen hat eine immer größere Zunahme der Ladungsdichte auf der Oberfläche der Tröpfchen zur Folge, was schließlich zum spontanen Zerfall in Mikrotröpfchen führt (Coulomb-Explosionen).

Der Prozess, der zur Bildung der eigentlichen freien Gasphasen-Ionen führt, wird zurzeit durch zwei Modellvorstellungen erklärt:

Das erste Modell ist die *single ion in droplet* Theorie von F. Röllgen. Diese Theorie geht davon aus, dass freie gasförmige Ionen durch Desolvatisierung entstehen, indem sie mit den Stickstoffmolekülen an der Öffnung der Interface-Platte zum Massenspektrometer kollidieren.

Das zweite Modell, die Ionenemissionstheorie von J. Iribane und B. Thomson, beschreibt eine direkte Ionenemission aus hochgeladenen Tröpfchen.

Zur Massenanalyse der Ionen wurde in dieser Arbeit ein Q-Tof-Masenspektrometer (Micromass, Manchester) verwendet. Dieses Gerät ist aus zwei funktionellen Einheiten: MS1 und MS2 (siehe auch Abbildung 3) aufgebaut. Bei Verwendung des Gerätes wird je nach Fragestellung das konventionelle vom Tandem-MS-Experiment unterschieden.

Im konventionellen MS-Experiment werden alle primär vorhandenen desolvatisierten Ionen detektiert. Hierzu wandern diese durch den Quadrupol und die Kollisionszelle, die argonfrei unter Hochvakuum steht.

Beim Tandem-MS-Experiment werden die vorhandenen Ionen fragmentiert bevor sie weiter analysiert werden. In diesem Experiment passieren nur Ionen eines bestimmten  $m/z$ -Verhältnisses den Quadrupol-Analysator, um zur Hexapol-Kollisionszelle zu gelangen. Dies wird durch Anlegen eines kombinierten Wechsel- und Gleichspannungsfeldes an den vier parallelen stabförmigen Metallelektroden des Quadrupols erreicht. Aufgrund des elektrischen Feldes beginnen die Ionen entsprechend ihres  $m/z$ -Verhältnisses zu oszillieren. Nur Ionen mit einem bestimmten  $m/z$ -Verhältnis können das Quadrupol auf einer stabilen oszillierenden Bahn durchlaufen. Alle anderen Ionen fliegen auf instabilen Bahnen und werden durch Kollisionen mit den Metallstäben aufgehalten.

Bei Erreichen der Hexapol-Kollisionszelle, welche bei diesem Versuch mit einem inertem Gas wie z.B. Argon gefüllt ist, stoßen die Ionen gegen die Gasmoleküle und fragmentieren (*collisionally induced decomposition*, CID). Bei manchen Gasen wird abhängig von den Druckverhältnissen für eine effektive Fragmentierung eine zusätzliche Beschleunigungsspannung (Kollisionsspannung, 20-60 V) kurz vor der Stoßaktivierung benötigt.

Im Folgenden wird der Ionenstrahl durch eine Hexapol-Transferlinse auf den „Pusher“ fokussiert, der mit maximaler Frequenz von 20 kHz den Ionenstrahl in Richtung des orthogonal angeordneten Reflektrons ablenkt. Dieses Reflektron-Tof-Massenspektrometer (MS2) stellt den analytischen Teil des Gerätes dar. Der Detektor kann über die Flugzeitdifferenz zwischen Pusher-Aktivierung und Eintreffen der Ionen auf dem Detektor (*multi channel plate*, MCP) die  $m/z$ -Werte ermitteln.

Das Gerät hat eine Auflösung von etwa  $R = m/\Delta m \geq 5000$ .  $\Delta m$  beschreibt hierbei die Differenz zwischen einem Ion der Masse  $m$  und einem weiteren Ion der Masse  $m + \Delta m$ , welches von  $m$  unterschieden werden kann, dar. Der analytische Bereich liegt

zwischen 2 und 4000 Da. Aufgrund möglicher Mehrfachladungen können unter Umständen auch höhermolekulare Verbindungen detektiert werden. Zur Steuerung des ESI-Q-Tof-Massenspektrometers, der Datenaufnahme und der Datenprozessierung wurde die PC-Software MassLynx NT verwendet.

### 2.3.1.1 Auswertung von MS-Spektren

Das MS-Spektrum spiegelt die Peptidfragmente in einer Reihe von Peaks mit verschiedenen Intensitäten wider. Der Bruch erfolgt in der Regel im Peptidrückgrat.

Rechts oben gibt das MS-Spektrum das  $m/z$ -Verhältnis des 2-fach positiv geladenen Ions, welches fragmentiert wurde, wieder. Zur Umrechnung in die Masse des 1-fach positiv geladenen Ions wird folgende Formel benutzt:

$$M(1+) = (m/z(2+) \times 2) - 1.$$

Das Spektrum zeigt Peaks sowohl einfach geladener als auch zweifach geladener Produkt-Ionen. Isotopenpeaks einfach geladener Ionen haben einen Abstand von 1, im Gegensatz zu denen der zweifach geladenen Ionen, welche einen Abstand von 0,5 zeigen. Da die einfach geladenen Ionen in Fragmentspektren häufiger vorkommen und eindeutiger sind, erfolgt die Auswertung hauptsächlich über diese. Die folgenden Ausführungen beziehen sich deswegen auf einfach geladene Ionen.

Man unterscheidet zwischen Produkt-Ionen, die den N-Terminus (a, b, c) des Peptids und solchen die den C-Terminus (x, y, z) enthalten. Die y- und b- Ionen werden in der Regel mit der höchsten Intensität detektiert. Das a-Ion, das auch oft zu finden ist, entsteht aus dem b-Ion durch die Abspaltung von Kohlenmonoxid (CO:  $\Delta m = -28$  Da). Daneben treten begleitende Serien auf mit Abständen von  $\Delta m = -18$  Da (Verlust von Wasser bei S, T, D, E),  $\Delta m = -17$  Da (Verlust von Ammoniak bei Q, K, R) und  $\Delta m = -64$  Da (Verlust von Methylsulfensäure bei oxidiertem M) auf.

Die Abspaltung der endständigen AS zeigt sich im Abstand zweier Produkt-Ionen einer gleichen Serie. Dabei gibt der Abstand die Masse der abgespaltenen AS wieder. Neben endständigen Abspaltungen können allerdings auch interne Fragmente auftreten, die bei zwei Brüchen des Peptidrückgrats bei einem Molekül entstehen. Dies tritt z. B. bei einem C-terminalen Y häufig auf. Die y-Produkt-Ionen verlieren dabei statt der nächsten N-terminalen AS oft das C-terminale Y.

Weitere Hinweise auf das Vorkommen einer AS im Peptid kann man durch die Immonium-Ionen der spezifischen AS (F, H, Y) erhalten, welche sich in einem niedrigen

Massenbereich ( $m/z < 200$ ) befinden. Tabelle 6 gibt eine Übersicht über die Massen der üblichen AS-Reste und deren Immonium-Ionen.

**Tabelle 6:** Massen der üblichen AS-Reste und Immonium-Ionen.

<b>AS-Rest (1-Buchstabencode)</b>	<b>Masses das AS- Restes</b>	<b>Masse des Immoni- umions</b>
Alanin (A)	71	44
Arginin (R)	156	129
Asparagin (N)	114	87
Aspartat (D)	115	88
Cystein (C)	103	76
Glutamat (E)	129	102
Glutamin (Q)	128	101
Glycin (G)	57	30
Histidin (H)	137	110
Isoleucin (I)	113	86
Leucin (L)	113	86
Lysin (K)	128	101
Methionin (M)	131	104
Phenylalanin (F)	147	120
Prolin (P)	97	70
Serin (S)	87	60
Threonin (T)	101	74
Tryptophan (W)	186	159
Tyrosin (Y)	163	136
Valin (V)	99	72

Bei zusätzlicher Anwendung des MASCOT- oder BLAST-Programms ist die Identifizierung des Peptids in der Regel möglich.

Hierbei ist zu beachten, dass die MASCOT- und BLAST-Programme nur bereits bekannte Peptide identifizieren können. Mutierte oder zusammengesetzte Peptide, die durch die Tumortransformation neu entstanden sind werden nicht gefunden.

## 2.4 MHC-II-Immunhistochemie

### Materialien:

Blocking Solution (Zytochem Plus HRP-Kit, Zytomed)

Ventana iView DAB detection kit (Nexes System, Ventana Medical Systems, Illkirch, France)

Entellan (Merck)

### Durchführung:

Die Paraffinschnitte wurden zur Entparaffinisierung erst mit Xylol für 3x10 min behandelt, und dann in eine absteigende Alkoholreihe (100, 70, 50, 30%) für je 5 min getaucht. Nach 5minütigem Waschen in PBS, wurde die endogene Peroxidase durch 10minütige Inkubation der Schnitte in 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in dH<sub>2</sub>O, blockiert.

Die Schnitte wurden ferner durch Kochen in Citratpuffer (4 min, Dampfkochtopf) vorbehandelt und unspezifische Bindungen durch Inkubation mit *Blocking Solution* für 20 min gesättigt.

Die Detektion erfolgte durch das Ventana iView DAB detection kit entsprechend der Anleitung des Herstellers. Anschließend erfolgte eine Kernfärbung mit Hämatoxylin nach Mayer und die Schnitte wurden nach dem Trocknen mit Entellan eingedeckt.

## 2.5 RCC-Primärzell suspensionen/-kulturen

### Materialien:

Collagenase (Sigma)

Hyaluronidase V (Sigma)

Desoxyribonuklease I (Sigma)

Cell strainer 40 µm (BD, Biosciences)

*Primärkulturmedium:* RPMI-1640 + Na HCO<sub>3</sub> (2 g/l) + HEPES (2,4 g/l) + L-Glutamin (2 µmol/l, PAA Laboratories) + 2-Mercaptoethanol (30 µmol/l, Roh) + nicht-essentielle Aminosäuren (100fach, Sigma) + 1 mM Na-Pyruvat + Penicillin (50 µg/ml, PAA Laboratories) + Streptomycin (50 µg/ml, PAA Laboratories) + Gentamycin (PAA Laboratories) + Epidermal growth factor (EGF, 10 ng/ml, Invitrogen) + Fibroblast growth factor (bFGF, 5 ng/ml, Invitrogen) + Insulin-Transferrin-Selenium X (1% Gibco)+ 10 % FCS

Durchführung:

Ziel der Erstellung von Primärzellsuspensionen und –kulturen war die Generierung stabiler RCC-Zelllinien.

Ca. 1 g Tumorgewebe wurde mit dem Skalpell zerkleinert, in PBS aufgenommen und zentrifugiert (1500 rpm, 5 min, RT). Nach zweimaligem Waschen des Pellets wurde dieses zum weiteren Aufschluss in eine Enzymlösung (RPMI-1640, 0,2 mg/ml Collagenase IV, 0,1 mg/ml Hyaluronidase V und 40 U/ml Desoxyribonuklease I) aufgenommen und für ca. 4 h bei 36°C rotiert. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert (1500 rpm, 5 min, RT) und zweimal gewaschen. Das erhaltene Zellpellet wurde in PBS gelöst und zur Generierung von Einzelzellen unter Druck durch Verwendung eines Spritzenstempel filtriert (40 µm-Poren). Der Filter wurde solange gespült bis ein Endvolumen von 50 ml der filtrierten Zellsuspension erreicht wurde. Die Zellen wurden pelletiert (1500 rpm, 5 min, RT) und einmal mit PBS gewaschen. Das erhaltene Zellpellet wurde in Primärkulturmedium aufgenommen, in verschiedenen Verdünnungen (unverdünnt, 1:2, 1:3, 1:6) in einer 12-Loch-Platte ausplattiert und im Brutschrank bei 37°C, 7,5% CO<sub>2</sub> in humider Atmosphäre kultiviert.

Durch Mediumwechsel wurden nach 24 h alle nicht adhätierenden Zellen entfernt. Zur Vermeidung eines zusätzlichen Zellstress wurde in den ersten Tagen und Wochen das Medium vorsichtig und höchstens zur Hälfte zweimal pro Woche gewechselt. Die Passagierung erfolgte bei einer 80%igen Konfluenz.

Tumorzellen welche im Verlauf der Kultivierung mit Fibroblasten überwucherten (mikroskopisch als spindelförmige Zellen erkennbar), wurden nicht weiter bearbeitet. Zeigten die Zellen eine normale Morphologie mit konstantem und stabilem Wachstum wurden gegebenenfalls Wachstumsfaktoren (EGF und bFGF) zugefügt.



### 3 Ergebnisse

Im Folgenden werden die während dieser Dissertationsarbeit generierten Ergebnisse in chronologisch-methodischer Reihenfolge dargestellt.

In Abschnitt 3.1 wird zunächst das nach Weinschenk et al [195] modifizierte Konzept zur Isolierung und Identifizierung möglicher Tumor-assoziierten Antigene vorgestellt. Die untersuchten Tumor- und Normalgewebe werden anschließend in einer Übersicht aufgelistet. Hier wird neben den jeweiligen histologischen Merkmalen, der zugehörigen TNM-Klassifizierung/Staging und den Gewebemassen auch die HLA-Typisierung der Tumorpatienten zusammengefasst. Der Abschnitt 3.1 endet mit der Ergebnisdarstellung zur MHC-Quantifizierung mittels Edman-Sequenzierung und Western-Blotting.

Inhalt dieser Arbeit war es neben Isolierung und Charakterisierung von MHC-Klasse I-Liganden auch erstmals eine entsprechende Analyse für MHC-Klasse II-Liganden zu etablieren und durchzuführen.

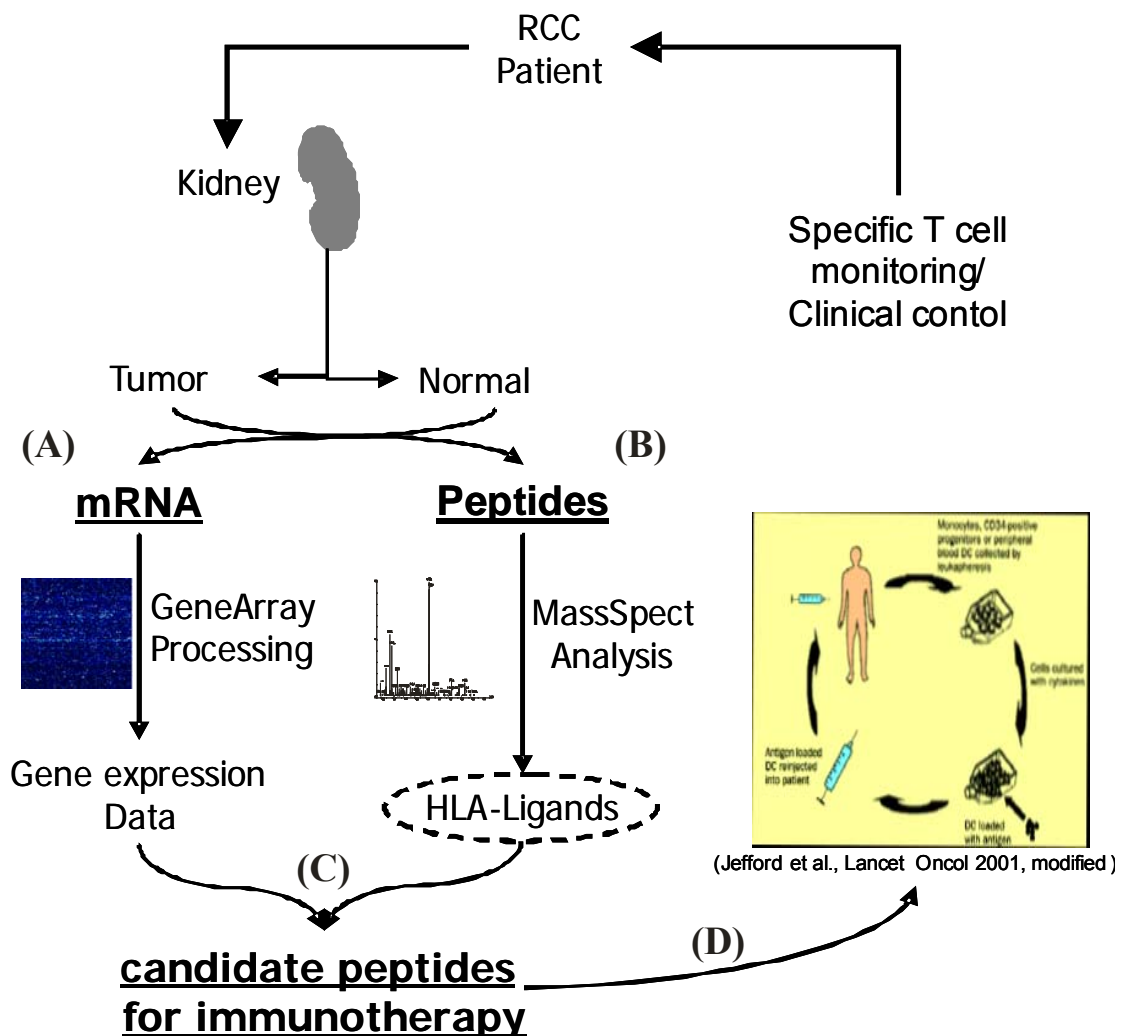
In Abschnitt 3.2 werden zunächst alle identifizierten MHC-Klasse I-Liganden aus den Eluaten der RCC-Tumorgewebe dargestellt. Im folgenden Abschnitt 3.3 werden die histologischen und proteomischen Ergebnisse aus der Untersuchung von MHC-Klasse II-Molekülen und zugehöriger MHC-Klasse II-Liganden im Tumor- und Normalgewebe von humanen Nierenzellkarzinomgeweben vorgestellt.

Aufgrund der bis heute sehr begrenzten Therapiemöglichkeiten für das Cholangiozelluläre Karzinom im sogenannten therapierefraktären Stadium erfolgte eine erstmalige Analyse der MHC-Klasse I- und -Klasse II-Liganden in Gewebeproben von intraoperativ gewonnenen humanen CCC-Geweben. Die Ergebnisse der MHC-Klasse I-Analyse sind in Abschnitt 3.3 zusammengefasst.

Zusätzlich zur Untersuchung der *in vivo*-Untersuchungen am Nierenzellkarzinom wurde im Rahmen dieser Arbeit der Versuch zur Etablierung eines Protokolls zur Anlage von Primärzellkulturen aus vitalem humanem RCC-Tumorgewebe unternommen. Ergebnisse aus dieser Versuchsreihe und die Zusammensetzung von Peptid-Impfcocktails für ausgewählte Impfpatienten sind Gegenstand der Abschnitte 3.4 und 3.5.

### 3.1 Identifizierung und Charakterisierung der Peptide von potentiell tumorassoziierten Antigenen

Für die Identifizierung und Charakterisierung von Peptiden potentiell tumorassoziierter Antigene wurde ein nach Weinschenk et al. [195] modifiziertes Protokoll verwendet. Die folgende **Abbildung 4** dient der schematischen Darstellung der einzelnen Schritte vom (Tumor-) Gewebe bis zur Patientenvakzinierung:



**Abbildung 4:** Schema zur Gewinnung von tumorassoziierten Antigenen: Nach Entfernung der mit Tumor befallenen Niere erfolgt die separate Aufarbeitung des Tumor- und Normalgewebes. **(A)** Generierung eines Genexpressionsprofils (RNA) für Tumor- und Normalgewebe mit anschließendem Vergleich der Expressionsprofile; **(B)** Unabhängig von der Genexpressionsanalyse erfolgt die Identifizierung von MHC-Klasse I- und II-Peptiden aus dem homogenisierten Gewebe mittels massenspektrometrischer Analyse; **(C)** Nach Analyse der Expressionsprofile und Identifizierung von Peptiden möglicher Tumor-assoziierten Antigene erfolgt die Aufstellung eines Impfcocktails; **(D)** Schließlich erfolgt die Vakzinierung des Patienten mit den Peptiden aus dem Impfcocktail.

Für das tumoröse und normale Nierengewebe von Krebspatienten erfolgt eine zunächst getrennte Analyse mittels (RNA-)Genexpressionsanalyse und Isolierung MHC-Liganden. Mögliche tumorassoziierte Antigene und deren Peptide können dadurch identifiziert werden. Eignet sich der Krebspatient für eine Tumorstimmung, so erhält es einen Peptidcocktail, bestehend aus den gefundenen Peptiden und bereits bekannten Peptiden.

### 3.1.1 Verwendete Tumorgewebe

Zur Identifizierung potentieller Tumor-assoziiertes Antigene wurden 14 Nierenzellkarzinome (RCC) und ein Gallengangskarzinom (*Cholangiocellular carcinoma, CCC*) und die zugehörigen tumorfreen Normalgewebe aufgearbeitet. Eine Übersicht über die verwendeten Gewebeprouben ist in Tabelle 7 gegeben. Zusätzlich finden sich hier neben der TNM-Klassifizierung und Staging der einzelnen Tumore auch histologische Eigenschaften, bisherige Therapie, MHC-Restriktion und Gewebemassen.

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte eine mechanische und anschließend chemische Homogenisierung von Tumor- und Normalgeweben der folgenden Spender: RCC127, RCC135, RCC143, RCC146, RCC154, RCC157, RCC163, RCC182. Für die Spender RCC155, RCC158 und RCC180 konnten nur die Tumorgewebe zur Herstellung von Lysaten verwendet werden. Für die Gewebeprouben RCC127 bis einschließlich RCC154 wurde eine Immunpräzipitation für MHC-Klasse I-Moleküle mit Protein A-Sepharose durchgeführt. Die MHC-Präzipitation für alle weiteren Tumore erfolgte sowohl für MHC-Klasse I- als auch für –Klasse II-Moleküle durch Verwendung einer Cyan-Bromid (CNBr)-Sepharose. Dabei wurden nur die Eluate aus der MHC-Immunpräzipitation der Tumorgewebe von RCC135, RCC143, RCC157, RCC180, RCC211 und CCC2 für LC-MS-Läufe verwendet. Die LC-MS-Läufe wurden für RCC135, RCC143 und CCC2 mit Eluaten aus der MHC-Klasse I-Immunpräzipitation und für RCC157, RCC180 und RCC211 mit Eluaten aus der MHC-Klasse II-Immunpräzipitation durchgeführt. Die LC-MS-Untersuchung aller anderer angefertigten Eluate ist noch ausstehend.

**Tabelle 7:** Liste der verwendeten und präparierten Tumor- und Normalgewebe. Die grau unterlegten Zeilen repräsentieren Tumore mit identifizierten MHC-assoziierten Peptiden.

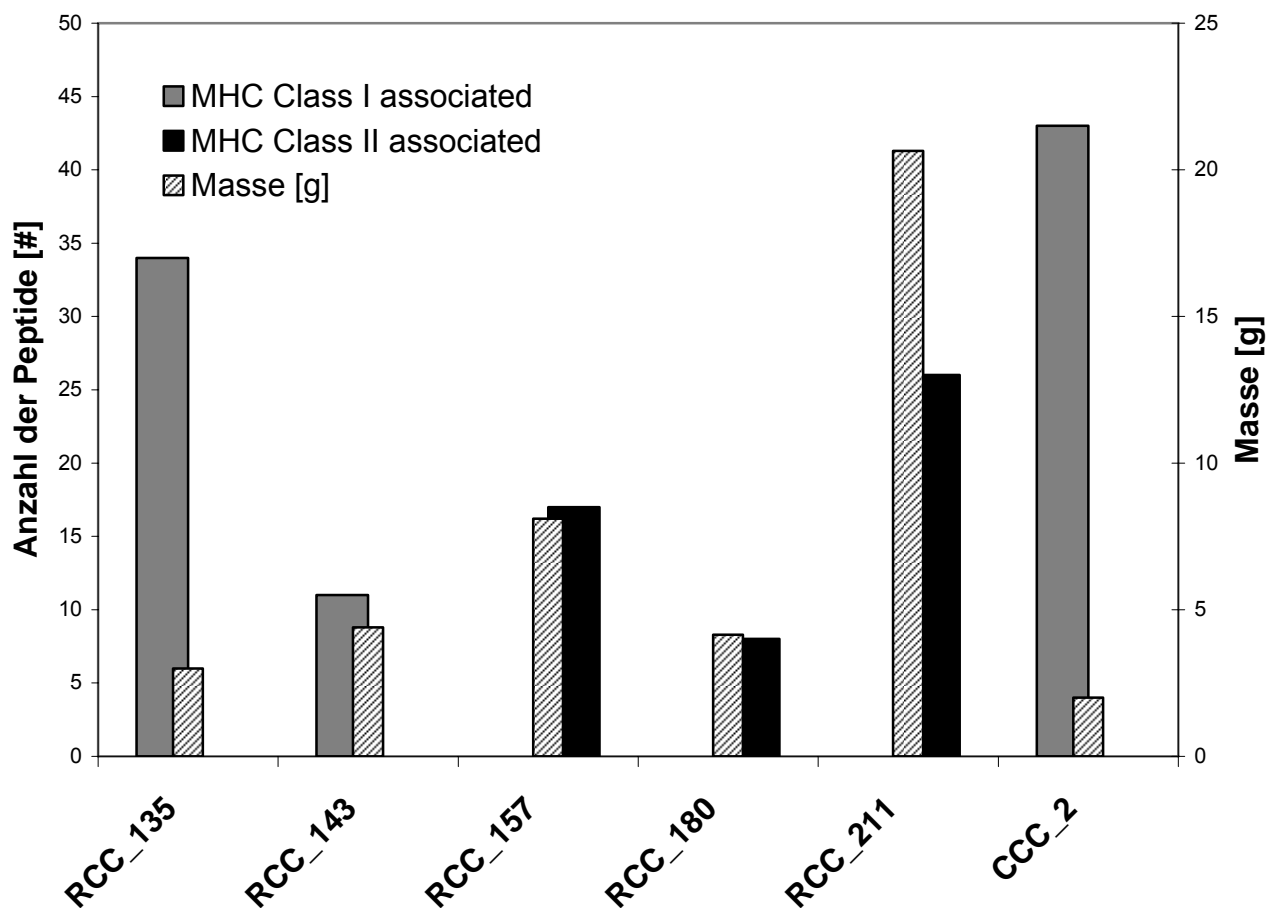
Proben-ID	Therapie	Histologie	TNM-Klassifizierung / Grading	HLA-Typisierung	Gewicht [g]	
					Normal	Tumor
RCC 127	Nephrektomie li.	Klarzelliges Nierenzellkarzinom	pT1b,pN0,pM0 / G2	A*03, A*29, B*35, B*44	6,6	7,7
RCC 135	Nephrektomie	Klarzelliges mäßig bis wenig differenziertes Nierenzellkarzinom	pT1b,pN0,pMx / G2/3	A*02, A*03, B*47, B*51	4,5	3,0
RCC 139	Nephrektomie re.	Klarzelliges, hochdifferenziertes Nierenzellkarzinom	pT1b, pNx, pMx / G1	A*25, A*29, B*08, B*18	4,5	4,5
RCC 143	Nephrektomie li.	ccRCC, klarzellig, zystisch regressiv verändertes Nierenzellkarzinom	pT1b N0 M0 / G2	A*01, A*24, B*07, B*13	7,0	4,4
RCC 146	Nephrektomie li.	Klarzelliges Nierenzellkarzinom	pT1a, pN0, pMx / G1/2	A*11, A*24, B*39, B*40	2,0	2,0
RCC 154	Laparoskopische Nephrektomie li.	Klarzelliges Nierenzellkarzinom	pT3a, pN0, pMx / G2	A*03, A*11, B*35, B*39, DQB1*04,DQB1*05,DRB1*08,DRB1*16,DRB5	4,0	3,0
RCC 155	Nephrektomie re.	Klarzelliges Nierenzellkarzinom	pT3b, pN0, pMx / G2	A*01, B*07, B*08, DRB1*02,DQB1*03,DRB1*03,DRB1*04,DRB3,DRB4	-	3,1
RCC 157	Laparoskopische Nephrektomie re.	Klarzelliges eosinophiles Nierenzellkarzinom	pT3a, pN0, pMx / G2	A*25, A*32, B*52, B*57 DRB 1*07, DRB 1*16, DRB 4, DRB 5	3,0	8,1
RCC 158 <sup>2,3</sup>	Resektion der Orbita-Metastase	Orbitametastase eines klarzelligen Nierenzellkarzinom	Multifokale Tumormanifestation auch ZNS/Schädel	A*03, A*26, B*07, B*39, DRB1*01,DRB1*16,DRB5	-	1,0
RCC 163	Laparoskopische Nephrektomie li.	Klarzelliges Nierenzellkarzinom	pT3b, pNx, pM0 / G2	A*24, A*33, B*13, B*14, DRB1*07,DRB1*13,DRB3,DRB4	3,2	17,8
RCC 180 <sup>2</sup>	Nierenteilresektion re., Radiatio, Chemo-/Immuntherapie, Tamoxifen-Therapie	Klarzelliges Nierenzellkarzinom	pT2 pN0 pM0 / G2	A*01, A*31, B*18, B*55, DRB1*13,DRB1*14,DRB3	-	4,2
RCC 182	Thorakoabdominelle Tumornephrektomie re.	Klarzelliges mäßig differenziertes Nierenzellkarzinom	pT3b, pNx, pMx / G2	A*03, A*30, B*07, B*40, DRB1*01,DRB1*13,DRB3	1,7	5,4
RCC 190	Nephrektomie und Adrenalectomie re.	Hellzelliges, teils papillär strukturiertes Nierenzellkarzinom	pT3, pN2, pM0 / G2	A*02, A*23, B*27, B*50, DRB1*11,DRB1*15	14,8	14,8
RCC 211	Nephrektomie re.	Papilläres Nierenzellkarzinom, Leberfiliae	pT3c, pNx, pM1 / G2	A*03, B*13, B*35 DRB 1*07, DRB 1*07, DRB 4	0,4	20,7
CCC 1	-	-	-	-	-	1,0
CCC 2	Primäre Radionuklidtherapie	-	-	A*02	-	1,5

<sup>2</sup> kein Normalgewebe<sup>3</sup> Orbita-Fernmetastase

Nach Vereinbarung erfolgte eine Weitergabe aller Gewebe von Krebspatienten mit einer HLA-A\*02-positiven HLA-Typisierung an die Immatics Biotechnologies GmbH.

Einschlusskriterium der nephrektomierten Patienten in die Vakzinierungsstudie war das Vorliegen eines Tumors im Stadium Stage 3 oder Stage 4 mit metachronen Metastasen. Für Patienten mit Cholangiozellulärem Karzinom hatten ein therapierefraktes Karzinomstadium als Einschlusskriterium. Diese Kriterien wurden für die Patienten RCC135, RCC182 und CCC2 erfüllt.

In Abbildung 5 sind die Anzahl der HLA-Liganden für das jeweilige massenspektrometrisch untersuchte Eluat und die primäre Gewebemasse dargestellt. Demnach konnte kein Zusammenhang zwischen der Anzahl der gefundenen HLA-Liganden und der Tumormasse gefunden werden.



**Abbildung 5:** Gegenüberstellung der identifizierten Peptide (*grau*: MHC-I-assoziiert; *schwarz*: MHC-II-assoziiert) und der Gewebemasse (*schraffiert*). Für die Tumorgewebe RCC135, RCC143 und CCC2 wurden nur MHC-I-restringierte Peptide untersucht. Eine ausschließliche Untersuchung von MHC-II-restringierten Peptiden erfolgte für die Tumore RCC157, RCC180 und RCC211. Zwischen Tumormasse und Peptidanzahl konnte keine Beziehung gefunden werden

### 3.1.2 Quantifizierung der MHC-Moleküle

Zunächst erfolgte ein mechanischer und chemischer Aufschluss der Gewebeproben. Anschließend wurde eine Affinitätschromatographie mittels Protein A- oder CNBr-Sepharose als stationäre Phase durchgeführt. Zur Isolierung von MHC-Klasse I- und -Klasse-II- Molekülen wurden die Antikörper W6/32 und L243 verwendet, welche in unserem Labor durch Frau Claudia Falkenburger hergestellt wurden. Durch eine saure Elution konnten schließlich die Eluate, bestehend aus Antikörperketten, MHC-Molekülen und den zugehörigen Liganden, hergestellt werden. Bevor aus dem homogenisierten Zellysat affinitätschromatographisch die Isolierung der MHC-Moleküle mit ihren Liganden durchgeführt wurde, erfolgte zunächst eine Überprüfung der Antikörperkopplung an die aktivierte Sepharose (Abschnitt 3.1.2.1).

Zur Quantifizierung der Proteinmenge – und damit der MHC-/Liganden-Menge – wurden der Edman-Abbau (Abschnitt 3.1.2.2) und das Western-Blotting (Abschnitt 3.1.2.3) zur Proteinquantifizierung verwendet. Im Folgenden sind die einzelnen Ergebnisse präsentiert.

#### 3.1.2.1 Photometrische Proteinbestimmung

Die photometrische Antikörperquantifizierung (Wellenlänge  $\lambda = 280\text{ nm}$ ) dient der Überprüfung der Kopplungseffizienz des verwendeten Antikörpers (W6/32 oder L243) an die verwendete Sepharose (CNBr-aktiviert). Dabei wurde die Extinktion einer 1:10 verdünnten Antikörperlösung vor und nach Kopplung an die aktivierte Sepharose gemessen. Der errechnete Kopplungskoeffizient ist schließlich ein Maß für die Güte der Kopplung des verwendeten Antikörpers an die aktivierte Sepharose.

In Tabelle 8 sind die berechneten Kopplungskoeffizienten aufgelistet. Für die Gewebeproben RCC158, RCC180 und CCC2 lag nur Tumorgewebe vor. Erkennbar ist, dass die Kopplungskoeffizienten weitestgehend >95% beträgt, so dass von einer effizienten Antikörperkopplung an die stationäre Phase ausgegangen werden kann.

**Tabelle 8:** Kopplungskoeffizienten der Antikörper W6/32 oder L243 an die stationäre Phase (Protein A- oder CNBr-aktivierte Sepharose). Bei Kopplungskoeffizienten >95% kann eine effiziente Antikörperkopplung an die stationäre Phase angenommen werden

Tumor	Tumor (W6/32) [%]	Normal (W6/32) [%]	Tumor (L243) [%]	Normal (L243) [%]	Sepharose- Akti- vierung
RCC143	98,0	97,4	99,1	99,0	Prot. A
RCC157	98,6	97,4	99,1	99,1	CNBr
RCC158	98,9	-	97,8	-	CNBr
RCC180	99,7	-	96,5	-	CNBr
RCC182	99,7	97,8	99,7	99,7	CNBr
CCC2	94,6	-	97,2	-	CNBr

### 3.1.2.2 Edman-Abbau

Zur Abschätzung der Anzahl auswertbarer Peptide im Eluat erfolgte eine Quantifizierung der MHC-Moleküle im Eluat mit Hilfe der sogenannten Edman-Sequenzierung. Hierfür wurden 5% des gewonnenen Eluats verwendet. Während der Edman-Sequenzierung kommt es zu einem sukzessiven Abbau der N-terminalen Aminosäuren vom Proteinfragment. Die Identifizierung der jeweiligen Aminosäure erfolgt durch Vergleich der Retentionszeiten mit einer Referenzmessung. Die AS-Quantifizierung wird durch anschließende photometrische Peakhöhenbestimmung bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 269 \text{ nm}$  erzielt.

Eine exemplarische Darstellung der Einzelergebnisse zur Edman-Ausbeute liefert Tabelle 9.

**Tabelle 9:** Ergebnisse der Edman-Ausbeute für die Tumor- und Normalgewebelysate der RCC127, RCC143 und RCC154.

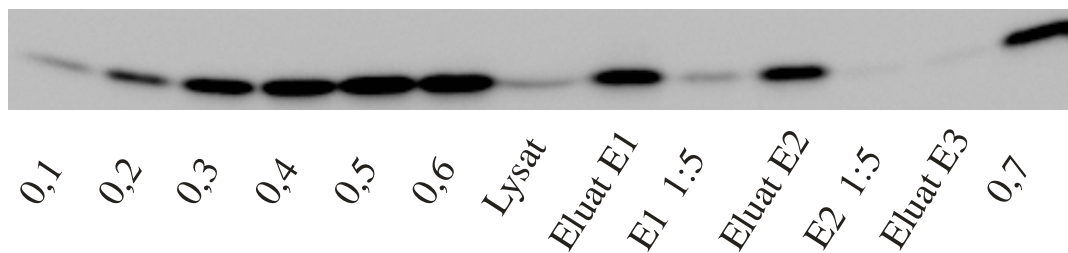
RCC (T or N)	Gewebemenge[g]	Präp- Methode	Sepharosemenge [291]	Antikörper	Antikörpermenge [291]	Edman- Ausbeute [E1, $\alpha$ , pmol]
RCC127T	7,7	PA	600	W6/32	10,6	26,7
RCC127N	6,6	PA	600	W6/32	12,1	20,4
RCC143T	4,4	PA	600	W6/32	12,0	5,9
RCC143N	7,0	PA	600	W6/32	10,8	4,0
RCC154T	3,0	PA	400	W6/32	9,7	1,0
RCC154N	4,0	PA	400	W6/32	9,7	11,6

### 3.1.2.3 Western-Blotting / Immuno-Blot

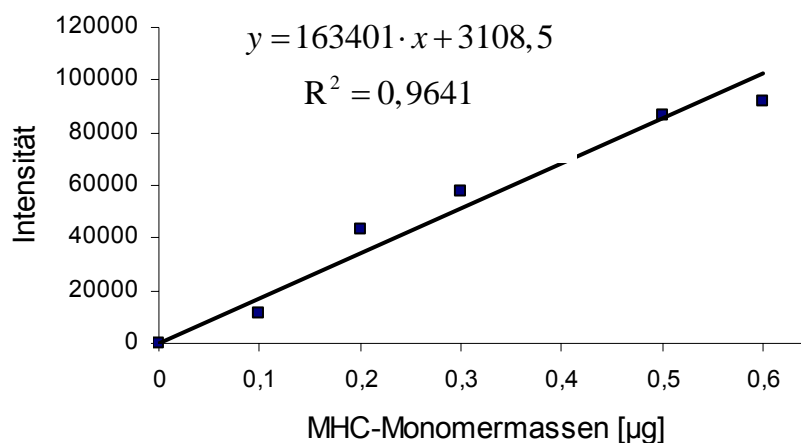
Zusätzlich zur Edman-Quantifizierung wurde eine zusätzliche MHC-Quantifizierung mithilfe eines Immunoblots für die Tumorpräparationen RCC127, RCC135 und RCC143 durchgeführt.

Exemplarisch werden im Folgenden die Ergebnisse für den RCC 135 vorgestellt. In der Abbildung 6A ist von links nach rechts eine Titrationsreihe mit unterschiedlichen Mengen eines MHC-Klasse-I-Monomers erkennbar (0,1  $\mu\text{g}$ , 0,2  $\mu\text{g}$ , 0,3  $\mu\text{g}$ , 0,4  $\mu\text{g}$ , 0,5  $\mu\text{g}$ , 0,6  $\mu\text{g}$ ), welche der Erstellung einer Eichgeraden dient (Abbildung 6B). Nach der Titrationsreihe erfolgte die Auftragung des Lysates vor Immunpräzipitation. Anschließend folgt die Auftragung der nach Durchführung der Immunpräzipitation gewonnenen Eluate nach der ersten und der zweiten Elution im Verdünnungsverhältnis 1:1 und 1:5. Zur Detektion des  $\beta_2$ -Mikroglobulins wurde polyklonales rabbit-anti-human- $\beta_2$ -Mikroglobulin-IgG verwendet.

**A**



**B**



**Abbildung 6:** **A:** Ergebnis des Western-Blots für den RCC135. Von links nach rechts erkennt man die aufsteigende Titrationsreihe mit MHC-Klasse-I-Monomeren, gefolgt von der primären Lysatprobe und anschließend die Eluat-Proben mit einem Verdünnungsverhältnis von 1:1 und 1:5; **B:** Graphische Darstellung der Intensitäten der gemessenen Titrationsreihe mit der zugehörigen Regressionsgeraden.



Durch Verwendung der Eichgeraden und Messung der Intensität der Lysate ist es anschließend möglich, die Menge der im Lysat vorhandenen Menge an  $\beta_2$  - Mikroglobulin zu berechnen. Die gemessene Intensität korreliert dabei praktisch linear mit der aufgetragenen Menge.

Die Methode der kleinsten Quadrate erlaubt die Ermittlung einer Regressionsgeraden aus den gemessenen Intensitäten der Titrationsreihe. Für den gezeigten Immunoblot gilt für die Regressionsgerade:

$$y = 163401 \cdot x + 3108,5 \quad (3.1)$$

In Menge der Gleichung (3.1) stellt  $y$  die Intensität der Messprobe dar und  $x$  die zugehörige Masse in  $[\mu\text{g}]$ .

Durch Subtraktion der Menge vor und nach der Immunpräzipitation erhält man die MHC-Klasse-I-Menge welche durch die Immunpräzipitation separiert werden konnte. Für den RCC135 konnte eine von ca. 0,28  $\mu\text{g}$  gemessen werden. Die geladene Probe hatte ein Volumen von 10  $\mu\text{l}$ , bei einem Gesamtlisatvolumen von 82  $\mu\text{l}$ . Somit betrug die Gesamtmenge an MHC-Klasse-I-Molekülen ca. 2300  $\mu\text{g}$ .

### 3.1.3 Identifizierte MHC Klasse-I-Liganden im Nierenzellkarzinom

Durch Verwendung des W6/32-Antikörpers für die Affinitätschromatographie konnten insgesamt 45 MHC-Klasse-I-restringierte Peptide aus Tumorgewebe isoliert und charakterisiert werden. In den Tabellen 10 und 11 sind diese Peptide aus den Tumorgewebe RCC135 und RCC143 aufgelistet. In der tabellarischen Darstellung der einzelnen Peptide findet sich neben der Peptidsequenz auch der Name des Quellproteins (engl. Source protein), der Genname (engl. Gene Name), die zugehörige Gene-ID und die HLA-Restriktion des Peptids wieder. Die HLA-Restriktion des gefundenen Peptids wurde mithilfe der SYFPEITHI-Datenbank für MHC-Liganden und den bekannten MHC-Bindungsmotiven versucht zuzuordnen. Dies konnte allerdings nicht für alle gefundenen Peptide erreicht werden.

**Tabelle 10:** MHC-Klasse-I-Peptide aus der LC-Massenspektrometrischen Analyse des Lyophilisats für den **RCC135**. Insgesamt wurden 34 Peptide gefunden, wovon 8 Peptide aus potentiell tumorrelevanten Quellproteinen stammen (grau unterlegt). Neben der Peptidsequenz ist das Quellprotein, die Gene-ID und die zugehörige HLA-Restriktion aufgelistet. Die Auswertung der generierten MS-Spektren erfolgte durch Margret Müller, Nina Hillen, Jörn Dengjel und Gitsios Gitsioudis. (*n.v.: keine Zuordnung möglich*)

Gene Name und Source protein können auf der Datenbank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez> gefunden werden. Die Zuordnung der Liganden zu den HLA-Molekülen erfolgte entsprechend ihrer *anchor residues* mithilfe der Datenbank SYFPEITHI (<http://www.syfpeithi.de>).

Peptid	Source protein, Gene Name	Gene ID	HLA Restriktion
DAPIVAHL	Carnitine palmitoyltransferase 1A (liver) (CPT1A)	1374	HLA-B*51
IDIKGPSL	AHNAK nucleoprotein (desmoyokin) (AHNAK)	79026	HLA-B*47
QIDSPLSGK	Vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM1)	7412	HLA-A*03
VLSSRLAFA	Major histocompatibility complex, class II, DR beta 3 (HLA-DRB3)	3125	HLA-A*02
GTIVSSVPR	Major histocompatibility complex, class II, DO alpha (HLA-DOA)	3111	HLA-A*03
ALATLIHQV	COP9 constitutive photomorphogenic homolog subunit 7A (COPS7A)	50813	HLA-A*02
YPLLISRI	/Rac guanine nucleotide exchange factor (GEF) 2 (ARHGEF2)	9181	HLA-B*51
GEHGLIIRV	Nardilysin (N-arginine dibasic convertase) (NRD1)	4898	HLA-B*47
KLDPTKTTL	N-myc downstream regulated gene 1, isoform CRA_b (NDRG1)	10397	HLA-A*02
VLIPKLPQL	ORM1-like3 (ORMDL3)	94103	HLA-A*02
KVLERVNAV	proteasome (prosome, macropain) activator subunit 2 (PA28 beta) (PA28 beta)	5721	HLA-A*02
YLLPAIVHI	Dead box polypeptide 5 (DDX5)	1655	HLA-A*02
NPYDSVKKI	Ubiquitin D (UBD)	10537	HLA-B*51
IMLEALERV	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide G (SNRPG)	6637	HLA-A*02
LDFLWHNM	Transducin (beta)-like 3 (TBL3)	10607	HLA-B*47
SLMHFILK	dynein, light chain, roadblock-type 1 (DYNLRB1)	83658	HLA-A*03
TLSDLRVYL	sulfiredoxin 1 homolog (SRXN1)	140809	HLA-A*02
DAYVLPKLY	Ribosomal protein S26 (RPS26)	6231	HLA-B*51
DAENAMRYI	Nuclear cap binding protein subunit 2 (NCBP2)	22916	HLA-B*51
YPPPEVRNI	Splicing factor 3A, subunit 1 (SF3A1)	10291	HLA-B*51
IPYQDLPHL	Monoglyceride lipase (MGLL)	11343	HLA-B*51
ALKNPPINTK	Actin related protein 2/3 complex, subunit 5 (ARPC5)	10092	HLA-A*03
LPHHRVIEV	NODAL modulator 3 (NOMO3)	408050	HLA-B*51
KIADRFLLY	LIM domain only 4 (LMO4)	8543	HLA-A*03
DPYEVSYRI	BTG family, member 2 (BTG2)	7832	HLA-B*51
RDLLIRHM	Septin 9 (SEPT9)	10801	HLA-B*47
NYIDKVRFL	Vimentin (VIM)	7431	<i>n.v.</i>
YDFLIREGY	Transcriptional adaptor 2 (TADA2L)	6871	HLA-B*47

**Fortsetzung**

Peptid	Source protein, Gene Name	Gene ID	HLA Restriktion
FFPDKPITQY	Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein (DDOST)	1650	<i>n.v.</i>
REIFLSQPILL	protein phosphatase 1, catalytic subunit, alpha isoform (PPP1CA)	5499	HLA-B*47
DAEMTTRMV	Proteasome, subunit, beta type 10 (PSMB10)	5699	HLA-B*51
VVNVKPLTGK	chromosome 12 open reading frame 23 (C12orf23)		HLA-A*03
DALDKIRLI	heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member 1 (HSP90B1)	7184	HLA-B*51
RSYSDPPLK	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (HNRNPF)	3185	HLA-A*03

**Tabelle 11:** MHC-Klasse-I-Peptide aus der LC-Massenspektrometrischen Analyse des Lyophilisats für den **RCC143**. Insgesamt wurden 11 Peptide gefunden, wovon keines aus einem potentiell tumorrelevantem Quellprotein stammt. Neben der Peptidsequenz ist das Quellprotein und die Gene-ID aufgelistet

Gene Name und Source protein können auf der Datenbank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez> gefunden werden.

Peptid	Source protein, Gene Name	Gene ID
GHWAEPLYL	glutamate receptor, metabotropic 3, GRM3	2913
PTEPATIIAT	torsin A interacting protein 2, Tor1aip2	240832
DAHNMLLFE	RAB33A, member RAS oncogene family, RAB33A	9363
GHRGTVRDY	annexin A3, ANXA3	306
SKHRVVTCM	dynein, cytoplasmic 1, intermediate chain 1, DYNC111	1780
RSDPQLIVQ	TNFRSF1A-associated via death domain, TRADD	8717
KEDPVVVGGE	zinc finger, AN1-type domain 6, ZFAND6	54469
DGIRPLPEY	mediator complex subunit 1, MED1	5469
TADHNLLLY	transducin (beta)-like 3, TBL3	10607
QVKPGESLEV	FYN binding protein (FYB-120/130), FYB	2533
PRPQVLLL	collagen, type IV, alpha 3, COL4A3	1285

Beim RCC143 (HLA A\*01, A\*24, B\*07, B\*13) konnte mithilfe des Programms SYF-PEITHI keine HLA-Zuordnung der Peptide erfolgen.

Kriterien für die Einstufung eines Peptids als potentiell tumorrelevant war die Überexpression des Quellproteins im Tumor im Vergleich zum Normalgewebe, in der Arbeitsgruppe bereits bekannte tumorassoziierte Proteine oder Peptide und in der Literatur beschriebene Relevanz für Malignome.

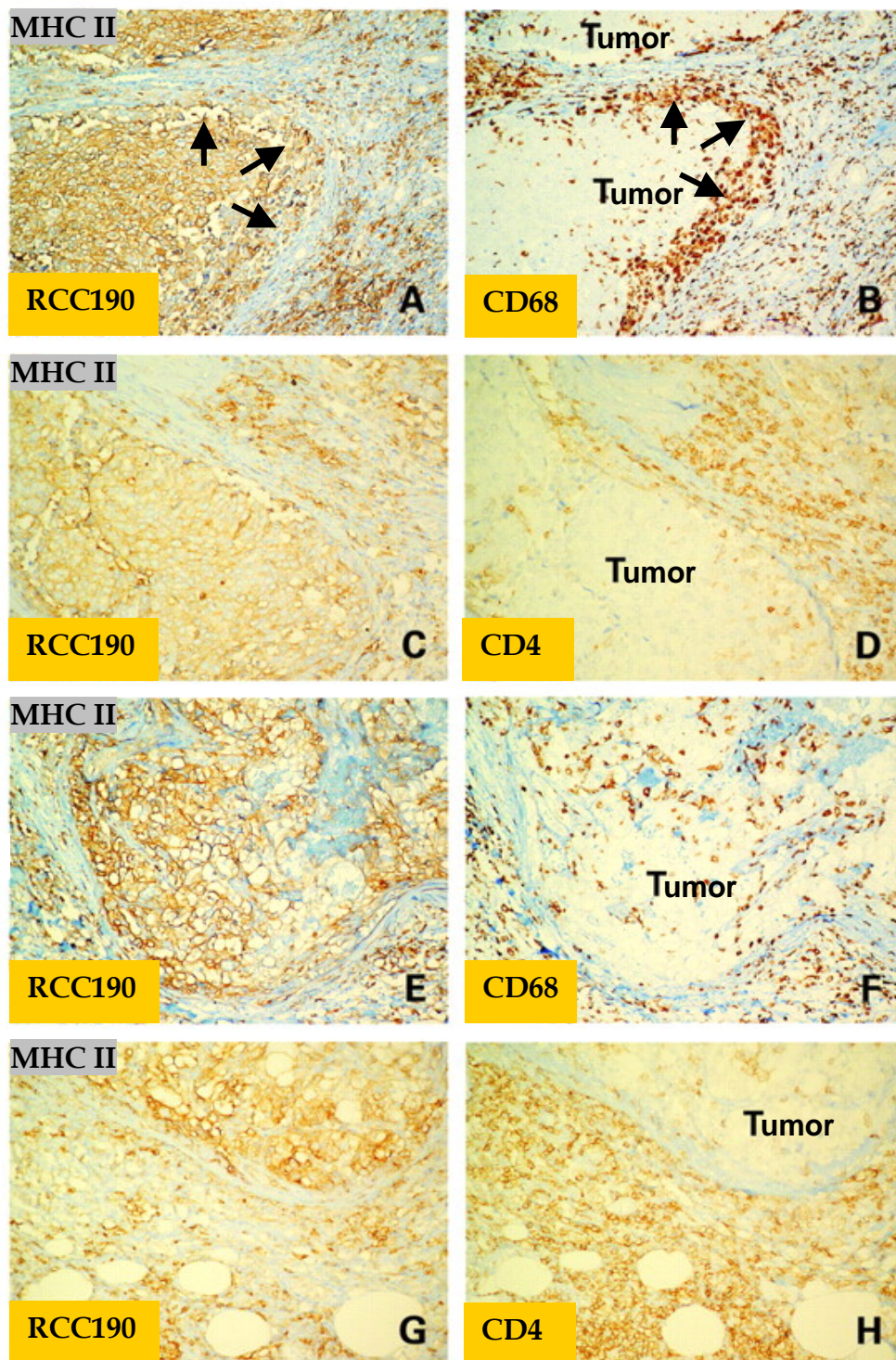
## **3.2 MHC Klasse-II-Liganden im Nierenzellkarzinomgewebe**

Die Bedeutung der MHC-Klasse-I-Moleküle für die Vakzinierungstherapie des Nierenzellkarzinoms wurde bereits in mehreren Studien belegt und klinische Impfstudien durchgeführt [292-294].

Neben der Isolierung und Charakterisierung von MHC-Klasse-I-restringierten Peptiden in Tumorgeweben des soliden Nierenzellkarzinoms wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals die routinemäßige Untersuchung der an MHC-Klasse-II-Moleküle gebundenen Peptide durchgeführt. Neben der Analyse der MHC-II-restringierten Peptide erfolgte eine Untersuchung der Expression von MHC-II-Molekülen im Tumorgewebe des Nierenzellkarzinoms und der räumlichen Verteilung von tumorinfiltrierenden Immunzellen (TII).

### **3.2.1 Verteilung der MHC Klasse-II-Liganden im RCC**

Zur Evaluation einer möglichen Relevanz von MHC-Klasse-II-assoziierten Peptiden für immuntherapeutische Ansätze im Rahmen einer Vakzinierungsbehandlung von RCC-Patienten stellte sich zunächst die Frage nach der quantitativen Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen im Tumorgewebe des RCCs. Zur Untersuchung der MHC-Klasse-II-Expression im RCC-Tumorgewebe wurden paraffinfixierte Tumorpräparate mittels immunhistochemischer Färbung für die Antigene MHC-Klasse-II, CD68 und CD4 analysiert. Die Anfertigung der immunhistochemischen Färbungen erfolgte in Kooperation mit dem Institut für molekulare Pathologie des Pathologischen Instituts der Universität Tübingen (AG Frau Prof. Klingel). Die von Dengjel et al. [295] veröffentlichte Abbildung 7 ist an dieser Stelle repräsentativ für die histologischen Ergebnisse aufgeführt. Die Anfärbung des CD68-Antigens dient der Darstellung von tumorinfiltrierenden Makrophagen. Durch CD4-Antigenfärbung wurden die den Tumor infiltrierenden CD4-positiven T-Lymphozyten identifiziert. Da die CD4-positiven T-Helferzellen eine große Rolle für die adaptive Immunantwort spielen, könnte deren Aktivierung durch MHC-II-Moleküle im Tumor eine Steigerung der Immunantwort im Tumor bewirken.



**Abbildung 7:** *modifiziert* nach Quelle [295]: MHC-Klasse-II-Expression in Nierenzellkarzinomgeweben zweier Patienten RCC190 und RCC211. Immunhistochemisch wurden die Oberflächenmoleküle MHC-Klasse-II (A,C,E und G), CD68 (B,F) (Makrophagen-Marker) und CD4 (D,H) (Lymphozytenmarker) angefärbt. Deutlich zu erkennen ist die enge räumliche Beziehung zwischen den MHC-II-Molekülen und den tumorinfiltrierenden Immunzellen (Pfeile in A und B).

Angefertigt in Kooperation mit der AG von Frau Prof. Klingel (Molekulare Pathologie des Pathologischen Instituts Tübingen)

Eine konstitutive Expression von MHC-II-Molekülen findet sich in Thymusepithelien und in hämatopoetischen Zellen wie beispielsweise den Dendritischen Zellen oder Monocyten [296]. Neben der konstitutiven MHC-II-Expression kann in einer Vielzahl von Zellen eine induzierte MHC-II-Expression durch verschiedene immunologische und/oder neuroendokrine Mediatoren erreicht werden. Für die Regulation der MHC-II-Expression spielen die Moleküle CIITA und RFX5 eine zentrale Rolle. Während CIITA als nicht-DANN-bindendes Protein Bindungsziel für die meisten regulierenden Mediatoren darstellt, ist das Fehlen des RFX5-Faktors als Untereinheit des nucleären RFX-Komplexes die häufigste Ursache für eine defiziente MHC-II-Expression bei Patienten [297-300]. Durch Transfektion des CIITA-Gens in Tumorzellen konnte die MHC-II-Expression gesteigert werden, so dass eine zusätzliche Kombination mit B7-Genen einen neuen Ansatz für die Krebsvakzinierung bieten könnte [301]. Während in B-Zellen die Mediatoren IL-4, IL-10 und IL-13 zu einer Hochregulation der MHC-II-Expression führen, induziert IFN- $\gamma$  die MHC-II-Expression in vielen unterschiedlichen Zelltypen, unter anderem den Zellen der Makrophagen-Monocyten-Linien, den Endo- und Epithelzellen, den Fibroblasten und Muskelzellen [296].

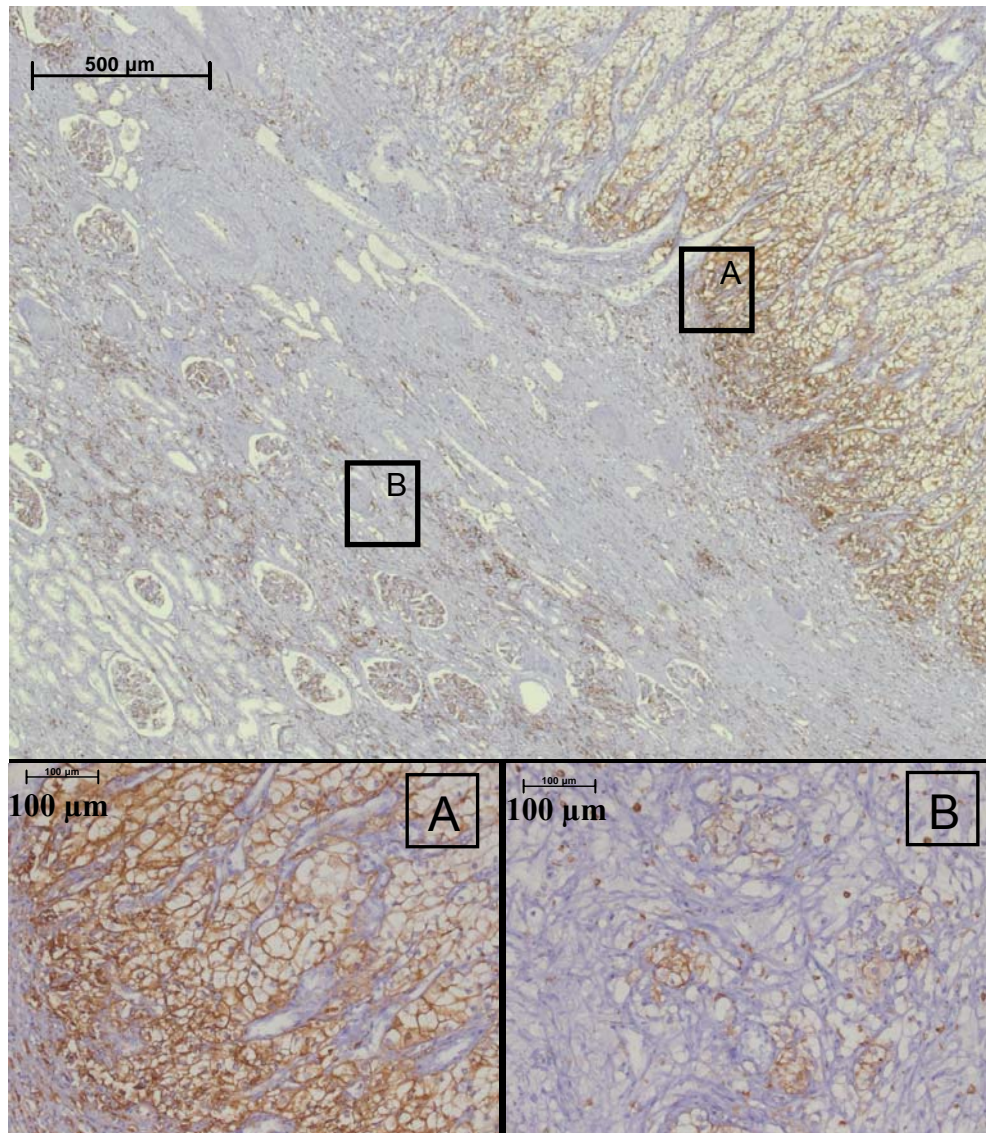
In der mRNA-Genexpressionsanalyse, welche von Oliver Schoor durchgeführt wurde, konnte gezeigt werden, dass in den Tumoren RCC190 und RCC211 aus Abbildung 7 eine MHC-II-Überexpression im Vergleich zu den Normalgeweben besteht. In Tabelle 12 sind mehrere MHC-II-Expressionsdaten exemplarisch aufgelistet (Quelle[295]):

**Tabelle 12:** mRNA-Expressionsdaten IFN-induzierter Gene: Aufgrund der deutlichen Überexpression der IFI16- und IFI44-mRNA ist es wahrscheinlich, dass die hier aufgelisteten MHC-II-mRNA-Überexpressionsfaktoren durch Wirkung des IFNs hervorgerufen wird.

Gene symbol	Entrez Gene ID	Gene Name	Expressionsfaktor: Tumor vs. Normal	
			RCC190	RCC211
HLA-DPA1	3113	MHC, class II, DP $\alpha$ 1	4,9	13,9
HLA-DPB1	3115	MHC, class II, DP $\beta$ 1	2,8	14,9
HLA-DQB1	3119	MHC, class II, DQ $\beta$ 1	6,5	5,3
HLA-DRB1	3123	MHC, class II, DR $\beta$ 1	2,8	4,3
PSMB8	5696	Proteasome subunit, $\beta$ type, 10 (LMP7)	6,1	6,5
PSMB9	5698	Proteasome subunit, $\beta$ type, 10 (LMP2)	6,5	16,0
PSMB10	5699	Proteasome subunit, $\beta$ type, 10 (MECL1)	5,3	13,0
IFI16	3428	IFN $\gamma$ -induced protein 16	4,3	11,3
IFI44	10561	IFN-induced protein 44	2,5	2,8



Aus Tabelle 12 ist leicht zu erkennen, dass neben den IFN-induzierten Faktoren I-FI16 und IFI44 auch die Proteine LMP2, LMP7 und MECL1<sup>4</sup> überexprimiert sind, was jeweils auf ein IFN-reiches Milieu hindeutet. Vor diesem Hintergrund erscheint es sehr wahrscheinlich, dass die Induktion des MHC-II-Expression im Tumorgewebe durch IFN- $\gamma$  ausgelöst wird.



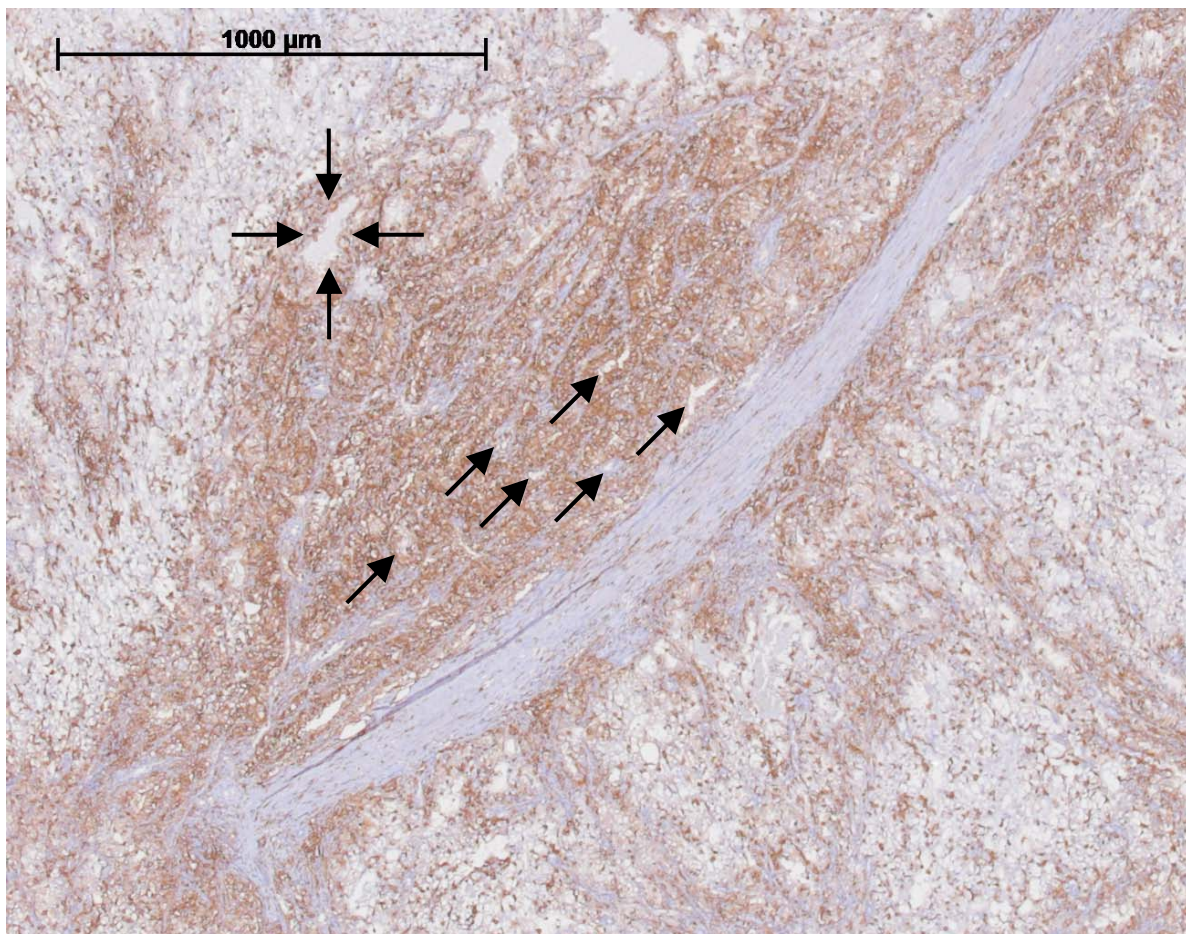
**Abbildung 8:** Immunhistochemische Untersuchung des RCC137. In der Übersichtsaufnahme (oben) ist der Tumor-Normalgewebe-Übergang erkennbar. Im Normalgewebe können mehrere Glomerula identifiziert werden. Aufgrund der glomerulär konstitutiv vorhandenen Immunzellen werden diese Bereiche durch das MHC-II-Staining angefärbt. In vergrößerter Darstellung wurde ein Abschnitt des unmittelbaren Randbereiches (A) und ein Bereich inmitten des Normalgewebes (B) abgebildet.

<sup>4</sup> Die Proteine die Proteine LMP2, LMP7 und MECL1 ersetzen die konstitutiven proteasomalen Untereinheiten zur Bildung des sogenannten Immunproteasoms (Dengjel et al.)



Neben der engen räumlichen Beziehung zwischen den CD4-/CD68-positiven Immunzellen und den HLA-II-positiven Zellen konnte in der Immunhistochemiestudie gesehen werden, dass die Expression der MHC-II-Moleküle vor allem im Randbereich zwischen Tumor- und Normalgewebe stattfindet. Repräsentativ dafür ist in Abbildung 8 die immunhistologische Untersuchung des RCC137 gezeigt.

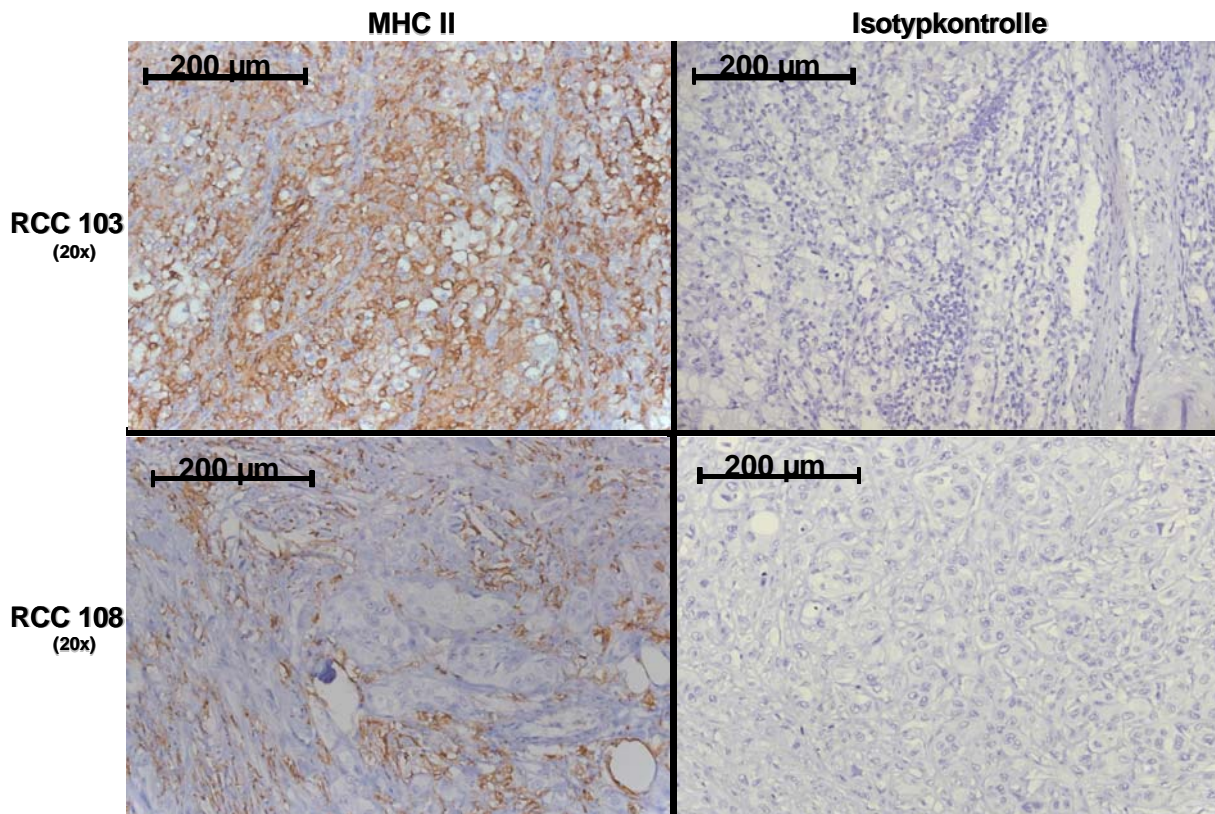
Die folgende Abbildung 9 wurde durch MHC-II-Staining innerhalb des Tumorgewebes RCC103 gewonnen. Zu erkennen ist eine deutliche Überexpression von MHC-II-Molekülen eines gut vaskularisierten Tumorbereichs in unmittelbarer Nachbarschaft zu einem Bindegewebsstrang.



**Abbildung 9:** MHC-II-Staining innerhalb des Tumorgewebes RCC103: Deutliche Überexpression von MHC-II-Molekülen eines gut vaskularisierten Tumorbereichs (*Pfeile: Blutgefäße*) in unmittelbarer Nachbarschaft zu einem Bindegewebsstrang.

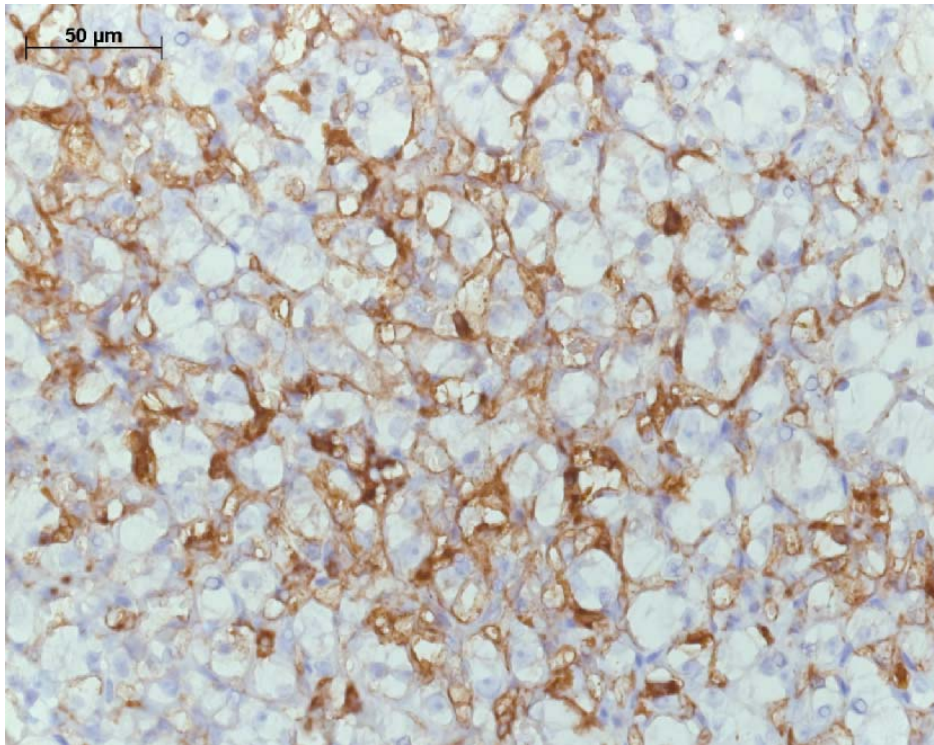


Zur Überprüfung der Spezifität der Antikörper-Antigen-Bindung des verwendeten Antikörpers für das MHC-II-Staining wurden anstelle des spezifischen anti-MHC-II-Antikörpers unspezifische mouse-IgG-Antikörper im ansonsten unveränderten Färbeprotokoll verwendet. In dieser sogenannten Isotypenkontrolle konnte keine Anfärbung der MHC-II-Moleküle erreicht werden (siehe Abbildung 10)



**Abbildung 10:** Isotypenkontrolle zur Überprüfung der Bindungsspezifität der verwendeten anti-MHC-II-Antikörper. Für die Isotypenkontrolle (*rechts*) wurden unspezifische mouse-IgG-Antikörper verwendet. Somit ist beim verwendeten mouse-anti-MHC-II-IgG-Antikörper von einer sehr guten Spezifität auszugehen.

Die immunhistochemische Studie abschließend, folgt nun die Vorstellung eines für das untersuchte Patientenkollektiv besonderer Einzelfall. Das hier untersuchte Tumorpräparat stammt von einem 49-jährigen Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz, Zustand nach zweimaliger Nierentransplantation und der HLA-Typisierung A\*02, A\*24, B\*08, B\*44. Zuletzt erfolgte eine Transplantatnephrektomie bei Nierenzellkarzinom des Transplantats. Der Patient hatte eine immunsuppressive Therapie mit Cyclosporin A, Decortin und Mycophenolatmofetil. Eine Suppression der MHC-II-Expression ist insbesondere ist für Corticosteroide bekannt [12-14]. Allerdings führen



**Abbildung 11:** Immunhistochemische Untersuchung auf MHC-II-Expression bei einem medikamentös immunsupprimierten Patienten (RCC181): Trotz der immunsuppressiven Therapie konnte eine deutliche MHC-II-Expression auf Tumorzellen nachgewiesen werden.

alle genannten Immunsuppressiva auch zu einer Hemmung des zellulären Immunsystems mit konsekutiv potentiell reduzierter Exkretion neuroendokriner und immunologischer Mediatoren. Trotz dieser Voraussetzungen konnte immunhistochemisch im Tumorresektat ebenfalls eine deutliche MHC-II-Expression an den Tumorzellen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 11).

### 3.2.2 Identifizierte MHC Klasse-II-Peptide im RCC

Durch Verwendung des L243-Antikörpers für die Affinitätschromatographie konnten insgesamt 50 MHC-Klasse-I-restringierte Peptide aus Tumorgewebe isoliert und charakterisiert werden. In den Tabellen 13, 14 und 15 sind diese Peptide aus den Tumorgewebe RCC157, RCC180 und RCC211 aufgelistet. In der tabellarischen Darstellung der einzelnen Peptide findet sich neben der Peptidsequenz auch der Name des Quellproteins (engl. Source protein), der Genname (engl. Gene Name) und die zugehörige Gene-ID. Auf eine detaillierte HLA-Restriktion wurde hier aufgrund der aktuell noch teilweise mehrdeutigen MHC-Bindungsmotive verzichtet.

**Tabelle 13:** MHC-Klasse-II-Peptide aus der LC-Massenspektrometrischen Analyse des Lyophilisats für den **RCC157**. Insgesamt wurden 17 Peptide gefunden, wovon zwei aus potentiell tumorrelevanten Quellproteinen stammen (grau unterlegt). Neben der Peptidsequenz sind das Quellprotein und die Gene-ID.

Gene Name und Source protein können auf der Datenbank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez> gefunden werden.

Peptid	Source protein, Gene Name	Gene ID
IKEEHVIIQAE	MHC class II antigen, DR alpha (HLA-DRA)	3122
FVRFDSVDVGEY	MHC class II antigen, DRB1 (HLA-DRB1)	3123
SVSTVLTSKYR	Hemoglobin alpha 1-2 hybrid (HBA2)	3040
LASVSTVLTSKY	Hemoglobin alpha 1-2 hybrid (HBA2)	3040
VDEVGGEALGRL	Beta-globin (HBB)	3043
GKVDVDEVGGEALGRL	Beta-globin (HBB)	3043
WGKVDVDEVGGEALGRLL	Beta-globin (HBB)	3043
VNVDEVGGEALGRL	Beta-globin (HBB)	3043
VVYPWTQRF	Hemoglobin, gamma G (HBG2)	3048
VVYPWQRF	Hemoglobin, gamma G (HBG2)	3048
LVVYPWQRF	Hemoglobin, gamma G (HBG2)	3048
FTTTTTGTIPGLPS	Zinc finger protein 608 (ZNF608)	57507
DPNCSAAGDSCTCAGSC	Metallothionin A2 (MT2A)	4502
LVVFLVSTRK	NOL6 protein (NOL6)	65083
VDGEPLGRVSFEL	Peptidylprolyl isomerase A-like (PPIA)	388817
KGVLSNISSITDL	Tetraspanin 4 (TSPAN4)	7106
GRVYPWQTSTD	Taste receptor, type 1, member 1 (TAS1R1)	80835

**Tabelle 14:** MHC-Klasse-II-Peptide aus der LC-Massenspektrometrischen Analyse des Lyophilisats für den **RCC180**. Insgesamt wurden 8 Peptide gefunden, wovon zwei aus potentiell tumorrelevanten Quellproteinen stammen (grau unterlegt). Neben der Peptidsequenz sind das Quellprotein und die Gene-ID.

Gene Name und Source protein können auf der Datenbank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez> gefunden werden.

Peptid	Source protein, Gene Name	Gene ID
IAANIVQV	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase (PFKFB4)	5210
DEGKVIRF	Zinc finger RNA binding protein (ZFR)	51663
EDGKVRIF	WD repeat domain 53 (WDR53)	348793
VQKPSYYVR	Perilipin 2/ Adipophilin (PLIN2/ADFP)	123
LSHLQVLYL	Toll-like receptor 5 (TLR5)	7100
SFDYIQR	v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1 (ETS1)	2113

**Fortsetzung**

Peptid	Source protein, Gene Name	Gene ID
TERIIAVSF	Tensin 1 (TNS1)	7145
EEEAKYEFLK	Ring finger protein 17 (RNF17)	56163

**Tabelle 15:** MHC-Klasse-II-Peptide aus der LC-Massenspektrometrischen Analyse des Lyophilisats für den **RCC211**. Insgesamt wurden 25 Peptide gefunden, wovon zwei aus potentiell tumorrelevanten Quellproteinen stammen (grau unterlegt). Neben der Peptidsequenz sind das Quellprotein und die Gene-ID. Die Tumorpräparation wurde durch Anna Missiou durchgeführt.

Gene Name und Source protein können auf der Datenbank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez> gefunden werden.

Peptid	Source protein, Gene Name	Gene ID
GSEMVVAGKLQDRGPD	inter-alpha (globulin) inhibitor H4 (plasma Kalikrein-sensitive glycoprotein) (ITIH4)	3700
VRFDSDVGEY	MHC class II antigen	
GAYKAIPVAQDLN	secreted phosphoprotein 1 (SPP1)	6696
GAYKAIPVAAQDLNAPS	secreted phosphoprotein 1 (SPP1)	6696
NGAYKAIPVAQDLNAP	secreted phosphoprotein 1 (SPP1)	6696
YSIFSYATKRQDNE	C-reactive protein, pentraxin-related (CRP)	1401
GKIVDLVKELDR	serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 anti-proteinase, antitrypsin), member 1 (SERPINA1)	5265
KIAFSATRTINVPL	complement component 1, q subcomponent, C chain (C1QC)	714
NLRFLATTPNSL	fibronectin 1 (FN1)	2335
KTVPRAKPPVK		54906
VVYPWTQRF	Hemoglobin, gamma G (HBG2)	3048
SNTDLVPAPAVRILTPE	growth differentiation factor 15 (GDF 15)	9518
NVYILGGSQLF	kelch-like 7 (KLHL7)	55975
INEQWLLTTAKNL	Haptoglobin (HP)	3240
GILGTAVLTLFTP	solute carrier family 17 (SLC17A5)	179308
TTAVVMAEVLKGLTCLLLL	solute carrier family 35 (UDP-galactose transporter), member A2 (SLC35A2)	7355
KAVLTIDEKGTEA	serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 anti-proteinase, antitrypsin), member 1 (SERPINA1)	5265
PYFPTTARKL	solute carrier family 4, sodium bicarbonate co-transporter, member 4 (SLC4A4)	8671
LMHPDALEEPDDQNRI	Fc fragment of IgG, receptor, transporter, alpha (FCGRT)	2217
FFLLLLLTVLTG	mucin 1, cell surface associated (MUC1)	4582
LASVSTVLTSKYR	hemoglobin, alpha 2 (HBA2)	3040
LIQVQATVVGLLAHV	solute carrier family 41, member 3 (SLC41A3)	54946
KLNSRSSQIDQAI	microtubule-actin crosslinking factor 1 (MACF1)	23499
QDRLQPHLLEMLIQ	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class T (PIGT)	51604
KDSTYLSSTLTLSK	immunoglobulin light chain variable region	647478

Insgesamt konnten in der MHC-II-Peptidanalyse vier Peptide gefunden werden, deren Quellproteine der aktuellen Literatur zufolge eine wichtige Rolle für Krebserkrankungen spielen. Von den drei untersuchten Patienten erfüllte lediglich RCC211 die Kriterien für einen Einschluss in die Vakzinierungsstudie. Allerdings wurden für diesen Peptid-Vakzinierungscocktail keine MHC-II-Peptide verwendet.

Etwa 22% aller gefundenen MHC-II-assoziierten Peptide stammen von Hämoglobin-Antigenen. Unter den Hämoglobin-Antigenen ist das Beta-globin das häufigste Quellprotein für die gefundenen Peptide.

### 3.3 Cholangiozelluläres Karzinom

Die Therapie des fortgeschrittenen cholangiozellulären Karzinoms stellt noch immer eine große therapeutische Herausforderung dar. Daraus erwuchs die Motivation, gerade bei Patienten mit cholangiozellulärem Karzinom erstmals eine Untersuchung der im Tumor präsentierten MHC-restringierten Peptide durchzuführen. Im Rahmen dieser Arbeit konnten durch Verwendung des W6/32-Antikörpers für die Affinitätschromatographie insgesamt 43 MHC-Klasse-I-restringierte Peptide aus einem Tumorsektat mit einem Gewicht von 1,5 g isoliert und charakterisiert werden. In Tabelle 16 sind diese Peptide aus dem Tumorgewebe CCC2 aufgelistet. In der tabellarischen Darstellung der einzelnen Peptide findet sich neben der Peptidsequenz auch der Name des Quellproteins (engl. Source protein), der Genname (engl. Gene Name) und zugehörige Gene-ID. Auf eine detaillierte HLA-Restriktion wurde hier verzichtet.

**Tabelle 16:** MHC-Klasse-I-Peptide aus der LC-Massenspektrometrischen Analyse des Lyophilisats für den **CCC2**. Insgesamt wurden 43 Peptide gefunden, wovon drei aus potentiell tumorrelevanten Quellproteinen stammen (grau unterlegt). Neben der Peptidsequenz sind das Quellprotein und die Gene-ID aufgelistet.

Gene Name und Source protein können auf der Datenbank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez> gefunden werden.

Peptid	Source protein, Gene Name	Gene ID
EHRMLLKHM	tau tubulin kinase 1, TTBK1	84630
ENSVKHIPSLA	calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2, CAMKK2	10645
QDCVEVSRPEG	BPESC1 blepharophimosis, epicanthus inversus and ptosis, candidate 1 (non-protein coding), BPESC1	60467
QSVMEELNTAP	cylandromatosis (turban tumor syndrome), CYLD	1540
PVFMGRVYD	serpin peptidase inhibitor, clade G (C1 inhibitor), member 1, SERPING1	710
QTSRLLKEVS	adenosine deaminase, tRNA-specific 3, TAD3 homolog, A-DAT3	113179
STFEPHQEAD	calpain 9, CAPN9	10753
TCPYIRDPL	CD46 molecule, complement regulatory protein, CD46	4179

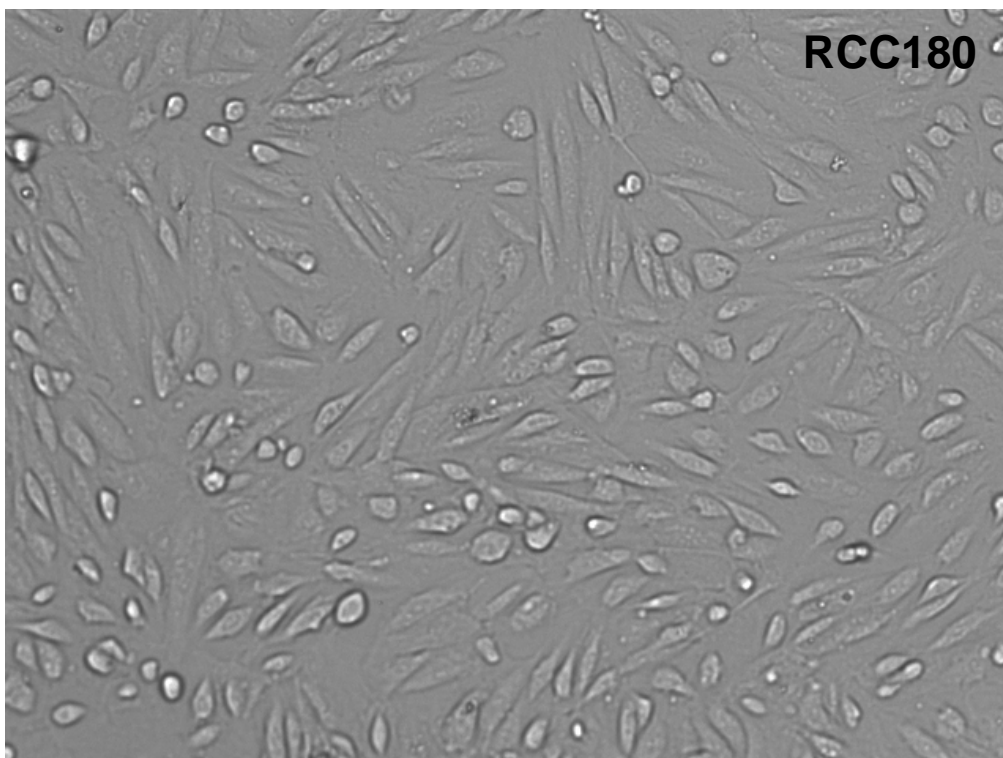
**Fortsetzung**

<b>Peptid</b>	<b>Source protein, Gene Name</b>	<b>Gene ID</b>
YVYEYPSRY	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 9, NEDD9	4739
DAENAMRYI	nuclear cap binding protein subunit 2, NCBP2	22916
RQITQVYGF	protein phosphatase 6, catalytic subunit, PPP6C	5537
DALDKIRLI	heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member 1, HSP90B1	7184
MCPNMPNKS	chemokine (C-X-C motif) receptor 7, CXCR7	57007
PANVVLKWY	chromosome 11 open reading frame 73, C11orf73	51501
NPYDSVKKI	ubiquitin D, UBD	10537
GGMKHKGRVLR	solute carrier family 1 (high affinity aspartate/glutamate transporter), member 6, SLC1A6	6511
PTFKENYRF	coagulation factor VIII, procoagulant component, F8	2157
RVYIGRLSY	cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 9, CYP2C9	1559
DPYEVSRYI	B-cell translocation gene 1, anti-proliferative, BTG1	694
PDYEVEAYR	testis specific protein, Y-linked 1, TSPY1	7258
TFMDHVLRY	ATP citrate lyase, ACLY	47
KAFNLSSTLTK	zinc finger protein 117, ZNF117	51351
KATLVCLISDF	similar to immunoglobulin lambda locus	100290481
NLDLKEAKSWQ	calcium binding and coiled-coil domain 1, CALCOCO1	57658
LWQREAITLSD	TATA box binding protein (TBP)-associated factor, RNA polymerase I, B, TAF1B	9014
LWRAGEASQAW	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor-like 2, NFKBIL2	4796
NLDLKEAKSWQ	calcium binding and coiled-coil domain 1, CALCOCO1	57658
VVYPWTQRF	hemoglobin, beta, HBB	3043
VFIYLFQKFLS	NIPA-like domain containing 2, NIPAL2	79815
IDFSTDIAKE	chromosome 4 open reading frame 35, C4orf35	85438
LIFDEERDI	cadherin 7, type 2, CDH7	1005
FTASGNLPLLL	meiosis inhibitor 1, MEI1	150365
LVVYPWTQRF	hemoglobin, beta, HBB, 3043	
VFVATFLRY	stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase), SCD	6319
SSDNESVASKN	neuron navigator 2, NAV2	89797
YDGALLGDRSL	eukaryotic translation initiation factor 4H, EIF4H	7458
QKSVKVLKLP	AVL9 homolog, AVL9	23080
LGVLELAIGF	protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, gamma, PRKACG	5568
RLLEIALGF	fibrillin 1, FBN1	2200
PFFFVNIFV	calcium channel, voltage-dependent, P/Q type, alpha 1A subunit, CACNA1A	773
THPILKILT	McKusick-Kaufman syndrome, MKKS	8195



### 3.4 Primärzellkulturen aus Nierenzellkarzinomgewebe

Aus intraoperativ entnommenen vitalen Tumorgeweben wurde im Rahmen dieser Arbeit der Versuch zur Etablierung von sogenannten Primärzellsuspensionen unternommen. Dabei sollten auf der Grundlage dieser Primärzellsuspensionen Tumorzelllinien der einzelnen Patienten generiert werden. Es wurden für die Tumore RCC157, RCC160, RCC162, RCC163, RCC166, RCC167, RCC168, RCC169, RCC170, RCC171, RCC172, RCC173, RCC174, RCC178, RCC180 und RCC181 Primärzellsuspensionen hergestellt. Nur selten gelang es mehrere Passagen für die jeweiligen Zellkulturen zu erzielen. Die beiden Hauptursachen hierfür waren das Überwiegen von Fibroblasten und das Auftreten von Kontaminationen. Die Abbildung 12 zeigt die Zellkultur vom RCC180 im Zustand der beginnenden Konfluenz.



**Abbildung 12:** Zellkultur im Stadium der beginnenden Konfluenz aus einer Primärzellsuspension des nativen RCC180-Tumorgewebes.

### 3.5 Peptidcocktails für Impfpatienten

Entsprechend der oben genannten Kriterien wurden die Patienten RCC135, RCC182 und CCC2 in die Vakzinierungsstudie eingeschlossen. Durch Evaluation der gefundenen Peptide auf Tumorassoziation und durch Erfahrungswerte wurden die im Folgenden aufgelisteten Impfcocktails zusammengestellt.

#### 3.5.1 Impfcocktail für RCC135

In der Peptidanalyse des RCC135 konnten insgesamt 34 Peptide charakterisiert werden, wovon 8 Peptide aus potentiell tumorrelevanten Quellproteinen stammen. Für das Quellprotein des Peptids NPYDSVKKI Ubiquitin-D (UBD) konnte sowohl eine in der Literatur beschriebene Assoziation mit Nierenerkrankungen [302] als auch eine UBD-Überexpression im Tumorgewebe nachgewiesen werden. Dadurch wurden die Kriterien für ein Vakzinierungspeptid erfüllt, so dass dieses Peptid in den individuellen Impfcocktail aufgenommen wurde. Die restlichen Peptide des Impfcocktails waren tumorassoziierte Peptiden, welche von der Arbeitsgruppe zusammengestellt wurden.

**Tabelle 17:** Zusammensetzung des Impfcocktails für den Impfpatienten **RCC135**. Neben den bereits bekannten tumorassoziierten Peptiden konnte in diesem Fall das Peptid NPYDSVKKI individuell im Tumorgewebe nachgewiesen werden (grau unterlegt).

HLA	Vakzin	Gen	Sequenz	Länge
A*02	APOL-1	APOL	FLGENISNFL	9
A*02	APOL-2	APOL	ALADGVQKV	9
A*02	Survivin	Survivin	ELTLGEFLKL	10
A*02	G250-1	G250	HLSTAFARV	9
B*51	UBD-2	UBD	DANPYDSVKKI	11
B*51	UBD-1	UBD	NPYDSVKKI	9
DR	PADRE	PADRE	aKXVAAWTLKAAa	13

#### 3.5.2 Impfcocktail für RCC182

Entsprechend der MS-Spektrenanalyse, welche von Margret Müller, Nina Hillen und Jörn Dengjel durchgeführt wurde, und der Expressionsdaten wurde der in Tabelle 18 gezeigte Impfcocktail erstellt. Der Anteil der MHC-II-restringierten Peptide ist im Vergleich zu den früheren Impfcocktails größer.



**Tabelle 18:** Zusammensetzung des Impfcocktails für den Impfpatienten **RCC182**

HLA	Vakzin	Gen	Sequenz	Länge
A*03	RGS-1	RGS	GLASFKSFLK	10
A*03	ADFP-2	ADFP	SLLTSSKGQLQK	12
A*03	ADFP-3	ADFP	TSALPIIQK	9
A*03	MMP7	MMP7	SLFPNSPKWTSK	12
B*07	ADFP-4	ADFP	IARNLTQQL	9
B*07	IBP3	IBP3	RPTLWAAAL	9
B*07	G250-2	G250	SPRAAEPVQL	10
DR	MMP7-1	2MMP7	SQDDIKGIQKLYGKRS	16
DR	IBP3-1	2IBP3	HSKIIIIKKGHAK	13
DR	Cyclin D1	Cyclin D1	NPPSMVAAGSVVAAV	15

### 3.5.3 Impfcocktail für CCC2

Im Rahmen eines Heilversuches wurde nach erfolgreicher MS-Spektren-Analyse des CCC2 ein individueller Impfcocktail zusammengestellt. Dabei wurde das Peptid NPYDSVKKI aus dem Quellprotein Ubiquitin D (UBD), welches im Tumorgewebe nachgewiesen werden konnte, in den Impfcocktail aufgenommen. Darüber hinaus wurden weitere drei UBD-Peptide mit MHC-I- oder MHC-II-Restriktion in den Impfcocktail aufgenommen (siehe Tabelle 19).

**Tabelle 19:** Zusammensetzung des Impfcocktails für den Impfpatienten CCC2. Das Peptid NPYDSVKKI (grau unterlegt) aus dem Quellprotein Ubiquitin D (UBD), welches im Tumorgewebe nachgewiesen werden konnte ist in den Impfcocktail aufgenommen worden.

HLA	Vakzin	Gen	Sequenz	Länge
B*51	UBD-2	UBD	DANPYDSVKKI	11
B*51	UBD-1	UBD	NPYDSVKKI	9
B*51	TD26-1	TD26	DAYREFEVL	9
B*51	TD26-2	TD26	EPWRLLKL	8
B*51	MET-6	MET	DAQTFHTRI	9
B*51	MET-7	MET	LAPGILVL	8
B*15	TD26-3	TD26	WLGSSPVMY	9
B*15	TD26-4	TD26	RLLKLRLLY	9
B*15	MET-8	MET	VLPEFRDSY	9
B*15	MET-9	MET	HIFLGATNY	9
DR	2UBD-2	2UBD	SYGIDKEKTIHLTLK	15
DR	2UBD-3	2UBD	KAMIEKTKGIIPETQ	15
DR	2MET-1	2MET	VLLFTLVQRSNGECK	15
DR	2MET-3	2MET	VKCVAPYPSLLSSED	15

## 4 Diskussion

Das Nierenzellkarzinom tritt in 2-3% aller malignen Tumorerkrankungen des Erwachsenenalters auf. Unter den urologischen Tumoren hat das RCC die schlechteste Prognose [303]. Die histologische Eigenschaft des RCCs scheint keinen Einfluss auf die Prognose des erkrankten Patienten zu haben. Im Anfangsstadium der RCC-Erkrankung treten meist keine deutlichen Beschwerden auf, so dass sich diese Erkrankung zum Zeitpunkt der Erstdiagnose in der Regel in einem fortgeschrittenen Stadium befindet. Zum Vergleich beträgt die 5-Jahresüberlebensrate (5-JÜR) im Stadium I > 90%, im Stadium II ca. 85%, im Stadium III ca. 60% und im Stadium IV 10% [304].

Aufgrund der häufig frustrierten refraktären Therapieverläufe - insbesondere im fortgeschrittenen RCC-Erkrankungsstadium – durch Verwendung konventioneller Therapiestrategien ist die Erforschung und Entwicklung neuer Therapien notwendig. Hierbei spielen *immunmodulatorische* Ansätze eine viel versprechende Rolle. Neben dem erfolgreichen Einsatz von Immuntherapien bei Melanom-, Lymphom- und Mammakarzinom-Patienten, gilt auch das RCC – nicht zuletzt auch wegen der klinisch beobachteten Spontanremissionen – zu den sogenannten immunogenen Tumoren. Therapien mit immunmodulatorischen Substanzen wie IL-2 und IFN- $\alpha$  gehören inzwischen zur Standardtherapie (siehe Tabelle 2). Auch die Verwendung von anti-VEGF-Antikörpern stellt einen viel versprechenden Ansatz dar [288, 289]. Leider konnte in den bisher durchgeführten klinischen RCC-Vakzinierungsstudien mit verschiedenen Ansätzen keine Tumorstillstandverögerung oder eine -regression gesehen werden. Möglicherweise könnte die Effektivität einer Peptidvakzinierung durch Kombination von MHC-I- und -II-Liganden gesteigert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden MHC-II-Moleküle von Tumorslysaten aus intraoperativ entnommenen RCCs mittels LC-MS isoliert und charakterisiert.

Für die Generierung einer lang anhaltenden und effektiven Immunreaktion gegen den Tumor, ist die Aktivierung von CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen notwendig. Im Gegensatz zu den MHC-I-assoziierten TAAs wurden bisher kaum MHC-II-assoziierte TAAs beschrieben, welche überwiegend aus der Koinkubation der Zielantigene mit APCs gewonnen worden sind [305]. MHC-II-Moleküle werden unter nicht-entzündlichen Bedingungen praktisch ausschließlich auf Zellen des hämatopoetischen Systems und im Thymusepithel exprimiert [296], so dass deren Isolierung auf Tumorzellen bisher

nicht in Erwägung gezogen worden ist. Im Rahmen einer Inflammationsreaktion können MHC-II-Moleküle – insbesondere unter IFN- $\gamma$ -Stimulation [306] - auch von somatischen und Tumorzellen exprimiert werden [307]. Insbesondere für das RCC erfolgte bereits die Beschreibung von inflammatorischen Verhältnissen [308, 309], so dass im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Expression von MHC-II-Molekülen auf RCC-Zellen untersucht wurde und die chromatographische Isolierung von MHC-II-Molekülen und deren Liganden erfolgte.

Neben der Untersuchung von RCC-Tumorgewebe erfolgte im Rahmen dieser Arbeit die Isolierung und Charakterisierung von MHC-I-Molekülen eines Patienten mit therapierefraktärem Cholangiozellulärem Carcinom (CCC). Einige dieser Peptide wurden im Rahmen eines Heilversuchs für eine Peptidvakzinierung eines CCC-Patienten verwendet.

#### **4.1 Diskussion der Peptidstudien**

In diesem Abschnitt erfolgt die Diskussion von identifizierten Peptiden, mit besonderer Bedeutung für den Tumor. Der Besprechung der MHC-I-restringierten Peptide, folgen die Peptide der MHC-II-Studien bei Nierenzellkarzinom. Insgesamt konnten 96 Peptide aus den RCC-Homogenisaten charakterisiert werden, wovon 17 Peptide für die folgende Diskussion in Frage kommen.

Schließlich werden die MHC-I-assoziierten Peptide aus der CCC-Heilstudie vorgestellt.

##### **4.1.1 Präsentierte MHC-I-Peptide**

Bis heute wurden für das RCC eine Reihe von MHC-I-assoziierten TAA-Peptiden identifiziert. Ziel der in dieser Arbeit durchgeführten MHC-I-Peptidstudien, war die Charakterisierung weiterer Peptide von bereits bekannten oder neuen TAAs, deren Expression charakteristisch für die Krebserkrankung ist. Die Charakterisierung der gefundenen Peptide erfolgte mit Hilfe einer massenspektrometrischen (LC/MS)-Peptidsequenzierung. Die charakterisierten TAA-Peptide wurden für die Verwendung im Rahmen einer klinischen Peptid-Vakzinierungsstudie – in Kooperation mit der Urologischen Klinik der Universitätsklinik Tübingen, Prof. Stenzl - zur Induktion einer CTL-Antwort bei metastasierten RCC-Patienten evaluiert. Zusätzlich zur Peptid-Charakterisierung erfolgte eine Gen-Expressionsanalyse mit Hilfe von GeneChip-

Arrays, welche durch Herrn Oliver Schoor in Zusammenarbeit mit der Microarray Facility Tübingen durchgeführt wurden.

#### 4.1.1.1 RCC135-Peptidstudie

Im Tumorgewebe des RCC135 konnten insgesamt 9 Peptide gefunden, deren Quellproteine eine relevante Rolle für die Krebserkrankung spielen. Hiervon wurden zwei Peptide des Quellproteins **Ubiquitin D**, UBD (*DANPYDSVKKI* und *NPYDSVKKI*) in den Vakzinierungscocktail aufgenommen, welcher dem Patienten im Rahmen der Peptid-Vakzinierungsstudie verabreicht wurde. Das UBD-Gen wurden 1996 von Fan et al. beim Mapping des HLA-F-Gens entdeckt [310, 311]. Es konnte gezeigt werden, dass vor allem naive B-Zellen und DCs UBD exprimieren [312]. Lukasiak et al. konnten eine UBD-Überexpression induziert durch proinflammatorische Zytokine insbesondere in Leber- und Kolonkarzinomen nachweisen [313]. Neben einer Beteiligung an der Regulation des Zellzyklus konnte für UBD auch eine nicht-kovalente Bindung an das Mitosespindel-Kontrollprotein MAD2 nachgewiesen werden. Das MAD2-Protein ist verantwortlich für die Integrität des Spindelapparates während der Mitose. Eine Inhibierung des MAD2-Systems kann zu einer chromosomalen Instabilität führen, ein viel beobachtetes Phänomen im Rahmen der Tumorentstehung [314, 315]. Darüber hinaus konnten Lee et al. zeigen, dass in Leber-, Uterus-, Rektum-, Pankreas- und Dünndarmadenokarzinomen das UBD-Protein überexprimiert ist [316], was zusätzlich die Bedeutung von UBD für die Tumorentstehung bestärkt. Da in der RCC135-Tumorprobe eine signifikante Überexpression im Vergleich zum RCC-Normalgewebe vorlag, wurden die UBD-Peptide *DANPYDSVKKI* und *NPYDSVKKI* in den Impfcocktail aufgenommen.

Das Peptid *QIDSPLSGK* stammt vom Quellprotein *Vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM1)*. Die Transkription von VCAM1 wird durch NF- $\kappa$ B reguliert [317], wobei für das RCC bereits eine Aktivierung von NF- $\kappa$ B beschrieben worden ist [318, 319]. Hierdurch kommt es unter anderem zu einer Hemmung der Apoptose in RCC-Zellen [318]. Insbesondere der Verlust des VHL-Proteins, welches in ca. 53% aller klarzelligem RCC beobachtet werden kann [320], führt über die *Hypoxia inducible factor- $\alpha$  (HIF- $\alpha$ )/transforming factor- $\alpha$* - und schließlich über die *epidermal growth factor receptor/phosphatidylinositol 3-kinase/AKT/I $\kappa$ B kinase- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B*-Signalkaskade zu einer VCAM1-Überexpression [321]. Histopathologisch konnte dass RCC135-Gewebe einem klarzelligem RCC mit mäßiger bis geringer Differenzierung zugeordnet werden.

Shioi et al. konnten zeigen, dass gerade beim klarzelligen und papillären RCC eine VCAM1-Überexpression mit einer besseren Prognose statistisch korreliert [320].

Auch Yao et al. beschrieben die Bedeutung des Genexpressionsniveaus von VCAM1 für die Berechnung eines Gen-Scores, welcher einer verbesserten Prognoseabschätzung dienen soll. Dieser Gen-Score besteht neben dem Expressionslevel von VCAM1 auch aus den Expressionsniveaus von EDNRB und RGS5 [23].

Als Quellprotein für das Peptid *ALATLIHQV* konnte **COPS7A** identifiziert werden. Für dieses Antigen ist vor allem eine proteinstabilisierende Eigenschaft bekannt [322, 323]. Insbesondere in einem Komplex mit HIF-1- $\alpha$  dient es der Stabilität von HIF- $\alpha$ , wobei eine HIF-1- $\alpha$ -Überexpression beim klarzelligen RCC mit sarkomatoider Differenzierung als prognostisch ungünstig gilt [324]. Im Falle einer COPS7A-Überexpression im untersuchten Tumorgewebe könnte dieses ebenfalls als Zielantigen für eine Tumorstabilisierung verwendet werden.

Ein identifiziertes Peptid des Proteins Nardilysin (N-arginine dibasic convertase, **NRD1**) ist *GEHGLIIRV*. Eine umfangreiche Übersicht über die Regulation der NRD1-Expression und dessen biologische Funktionen gibt Ellen et al. [325]. In sich differenzierenden Zellen, wie zum Beispiel in Epithelien, und bei zellulärem Stress kommt es zu einer NRD1-Überexpression [326-329], wohingegen es unter Zellwachstum zu einer Inhibierung der NRD1-Expression kommt [330]. Insgesamt rechnet man dem NRD1 eine tumorbenachteiligende Wirkung zu [331]: Unter NRD1-Überexpression konnte zum Beispiel eine p53-abhängige anti-oncogene Funktion mit Zellwachstumsarrest und einer p53-vermittelten Apoptose nachgewiesen werden [330, 332-335]. Darüber hinaus konnte für wenig differenzierte Kolonadenokarzinome und in Metastasezellen eine Herunterregulation von NRD1 nachgewiesen werden [327, 336, 337]. Entsprechend seiner biologischen Funktion in der Regulation von Zelldifferenzierung und -wachstum wird NRD1 beim Menschen ubiquitär exprimiert. Somit ist das NRD1-Peptid für den Einsatz in der Tumorstabilisierung einerseits aufgrund der NRD1-Funktion im Zelldifferenzierungs-/wachstumszyklus und andererseits aufgrund möglicher autoimmunogener Nebenwirkungen eher ungeeignet.

**PA28 beta** konnte als Quellprotein dem Peptid *KVLERVNAV* zugeordnet werden. Der Proteasomaktivator PA28 spielt eine besondere Rolle für die MHC-I-Antigenprozessierung, da PA28 selektiv die Präsentation viraler MHC-I-Epitope her-

aufreguliert. Im Gegenzug wird die PA28-Expression in Tumorzellen herunterreguliert, was zum Beispiel zu einer Beeinträchtigung des humanen TRP2-Tumorantigens führt [338]. Darüber hinaus konnten Miyagi et al. für das kolorectale Karzinom zeigen, dass sowohl proteasomale Untereinheiten als auch die MHC-Moleküle vermindert exprimiert wurden [339]. Eine Überexpression dieses Antigens wäre somit im Tumor wünschenswert, da hierdurch möglicherweise eine effektivere Tumorantigenpräsentation erfolgen könnte.

Aus dem Dynein-Leichtkettenabschnitt (**DYNLRB1**) konnte das Peptid *SLMHSEILK* charakterisiert werden. DYNLRB1 ist ein 11 kDa zytoplasmatisches Protein, welches in der Lage ist andere intermediäre Kettenproteine zu binden, wie zum Beispiel Rab6 [340]. Im hepatozellulären Karzinom (HCC) konnte eine Überexpression von DYNLRB1 nachgewiesen werden, mit einer vermutlichen Beteiligung an der Tumorphysion. Darüber hinaus konnten Wanschers et al. zeigen, dass die Expression von DYNLRB1 sowohl unter mild hypoxischen (1% O<sub>2</sub>) als auch unter schwer hypoxischen (0% O<sub>2</sub>) Zuständen induziert werden kann [340]. Zu den biologischen Eigenschaften des DYNLRB1 zählen vor allem die Beteiligung an der Zellmigration, an der Zellteilung, am vesikulären Transport und an der Gewährleistung der Funktion des Golgi-Apparates [340]. Somit könnte es unter einer Tumorphysion zu einer DYNLRB1-Überexpression kommen, welche zur Absiedlung von Metastasen durch Erleichterung der Zellmigration führen könnte. Somit könnte auch dieses Peptid für den Einsatz als Peptidvakzin in Fragen kommen.

Ein weiteres interessantes Peptid ist *KIADRFLLY*, welches dem LIM domain only 4 (**LMO4**) entspringt. Dieses Antigen wurde von Visvader et al. [341] als „Mammakarzinom-Autoantigen“ beschrieben, denn sie konnten für LMO4 nachweisen, dass es zum einen die Differenzierung des Brustepithels hemmt, und zudem im Mammakarzinom überexprimiert wird [341]. Normalerweise findet sich eine gesteigerte LMO4-Expression in proliferierenden Zellen und Organen und in postmitotischen Zellen [342, 343]. Über das Mammakarzinom hinaus konnte eine Überexpression auch in Pankreaskarzinomen und bei T-Zelllymphomen gezeigt werden [344]. Als Coaktivator in der TGF- $\beta$ -Singalkaskade kann insbesondere LMO4 durch Potenzierung des wachstumshemmenden Effektes von TGF- $\beta$  einen Einfluss auf die Tumorigenese haben [345]. Zusammenfassend könnte auch das gefundene LMO4-Peptid bei pas-

sendem Expressionsprofil des Zieltumors für eine Peptidvakzinierung eingesetzt werden.

**BTG2** ist das Quellprotein des charakterisierten Peptids *DPYEVSYRI*. Boiko et al. konnten insbesondere für das Nierenzell- und das Mammakarzinom zeigen, dass es sich hierbei um ein Mitglied der BTG/Tob-Familie handelt, welche in einem Protein-Protein-Komplex an Transkriptionsfaktoren binden kann, wodurch sie Einfluss auf die Zellzyklusprogression nimmt [346]. Im Falle einer Herunterregulation oder gar dem Fehlen der BTG/Tob-Expression konnte sowohl experimentell als auch klinisch das gehäufte Auftreten von Karzinomen beobachtet werden [347, 348]. Es wird angenommen, dass diese Proteinfamilie eine Tumorsuppressorwirkung durch Verbindung der Signalwege von p53 und Rb ausübt [347]. Mehrere Arbeitsgruppen konnten darüber hinaus nachweisen, dass insbesondere im Pankreaskarzinom, im klarzelligem RCC und im Mammakarzinom in der Regel eine Herunterregulation oder eine beeinträchtigte Expression vorliegt [349-351]. In einer Zusammenschau besitzt die BTG/Tob-Familie eine wichtige tumorinhibierende Wirkung und kommt darüber hinaus aufgrund der üblichen verminderten Expression im RCC als Zielantigen für eine Vakzinierung eher nicht in Frage. Zusätzlich könnte es auch an anderer Stelle im Körper nach BTG-Vakzinierung zu einer Beeinträchtigung der BTG/Tob-Wirkung kommen.

Aus der Familie der Septine konnte, respektive aus **SEPT9**, das Peptid *RDLLIRHM* identifiziert werden. Die Septine-Genfamilie kodiert für zytoplasmatische GTPasen und hydrolysierende Proteine, sie sind unter anderem an Zellbewegung, Vesikeltransport, Apoptose und der Aufrechterhaltung der Zellpolarität beteiligt [352, 353]. In der Regel liegt eine ubiquitäre Septin-Expression vor [354]. Bei genauerer Untersuchung der Septine konnte bislang keine eindeutige Zuordnung zu den Tumorsuppressorgenen oder den Proto-Oncogenen erfolgen [355-357]. Indes mehren sich die Hinweise dafür, dass die spezifischen Isoformen für die biologische Funktion von entscheidender Bedeutung sind [358]. Chacko et al. konnten eine signifikante Überexpression der Isoform SEPT9\_v4 in Metastasen in verschiedenen Organen, insbesondere auch in der Niere nachweisen [359]. Mittlerweile wächst die Evidenz für einen pro-neoplastischen Effekt durch SEPT9-Überexpression, vermittelt weniger durch Beeinflussung des Zellzyklus, sondern durch Veränderung der Zellmembranedynamik, des Vesikeltransportes und der Zellpolarität [360]. Impfpatienten der assoziierten Peptidvakzinierungsstudie befinden sich in der Regel in einem fortgeschritte-

nen Tumorstadium. Somit könnte das obige SEPT9-Peptid in Zusammenschau mit dem individuellen Expressionslevel für eine Aufnahme in den Vakzinierungscocktail in Frage kommen.

#### 4.1.1.2 RCC143- Peptidstudie

Die untersuchte RCC143-Tumorprobe hatte eine Masse von 6,97 g. Insgesamt konnten mittels LC-Massenspektrometrischer Analyse 11 MHC-I-assoziierte Peptide isoliert werden (siehe Tabelle 11). In der aktuellen Literatur konnte für keines der Quellproteine der charakterisierten Peptide eine beschriebene Tumorrelevanz gefunden werden.

#### 4.1.2 Präsentierte MHC-II-Peptide

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse aus den MHC-II-Peptidstudien der Tumorgewebe RCC157, RCC180 und RCC211 diskutiert. Im Gegensatz zu den MHC-I-assoziierten TAAs fürs RCC wurden bislang kaum MHC-II-assoziierte TAAs beschrieben. Die durch Tumoringflammation induzierte MHC-II-Expression auf Tumor- und anderen Stromazellen stellte das entscheidende funktionale Phänomen dar zur direkten Untersuchung von MHC-II-assoziierten Peptiden im Tumorgewebe. Dank einer *state-of-the-art* LC-MS-Technologie ist es trotz der wenigen MHC-II-Molekül-Peptid-Komplexe möglich, eine Charakterisierung der assoziierten Peptide vorzunehmen [195]. Die gefundenen Peptide stammen daher sowohl von Tumorzellen und Stromazellen als auch von tumorinfiltrierenden Immunzellen [295].

##### 4.1.2.1 RCC157- Peptidstudie

Das untersuchte RCC157-Tumorgewebe hatte eine Masse von 3 g. Mittels LC-MS konnten insgesamt 17 MHC-II-assoziierte Peptide charakterisiert werden (siehe Tabelle 13), wovon zwei Peptide und ihre Quellproteine für die folgende Diskussion ausgewählt wurden. Auffällig war die relativ große Anzahl an Hämoglobin-Peptiden, welche ca. 53% aller gefundenen Peptide ausmachten.

Eines der beiden zur Diskussion ausgewählten Peptide ist *KGVLSNISSITDL*, welches aus dem Quellprotein **TSPA4** stammt, einem Mitglied der transmembrane 4 superfamily, welche charakteristischerweise vier hydrophobe Domänen besitzen. TSPA4 ist an wichtigen zellulären Prozessen beteiligt, wie Integrin-vermittelte Signalwege, Zellbewegung, Metastasierung [361] und Zellproliferation und -differenzierung [362, 363]. Beim squamösen Gingivakarzinom zählt das Expressionslevel der Tetraspanine zu den potentiellen Biomarkern [364]. Im Nierengewebe und



in der Haut spielen Tetraspanine eine wichtige Rolle in der Ausbildung einer intakten Basalmembran [365]. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Tetraspanine in Tumoren potentiell überexprimiert werden und in der Absiedlung von Metastasen beteiligt sein können. Auf der anderen Seite werden Tetraspanine auch an anderen Organen exprimiert wie zum Beispiel der Haut, so dass der Einsatz des oben genannten Peptids möglicherweise autoimmunologische Effekte auslösen könnte. Dennoch könnte dieses Peptid - je nach individueller Expression im Tumorgewebe - als mögliches Impfpeptid diskutiert werden.

*DPNCSCAAGDSCTCAGSC* ist ein Peptid, welches aus dem Metallothionin A2 (**MT2A**)-Antigen stammt. Methallothionine werden in der Niere hauptsächlich im *proximalen Tubulussystem* exprimiert - ebenfalls häufigster Entstehungsort des klarzellig-nierenzellkarzinoms [366] - und sorgen unter anderem für eine Detoxifikation von Schwermetallen und Neutralisierung von Sauerstoffradikalen [367, 368]. Darüber hinaus ist für Methallothionine eine antiapoptotische und mitogene Wirkung bekannt [369, 370]. Zusätzlich können Methallothionine durch hypoxische Zustände induziert werden [371]. Eine Isoform-Expressionsstudie der Metallothionine von Ngyen et al. ergab eine signifikante Überexpression von MT-2A [372]. Darüber hinaus scheint eine erhöhte Metallothionin-Expression mit einem Krankheitsprogress vergesellschaftet zu sein [373-376]. Nicht nur die Colokalisation von natürlicher MT2A-Expression und dem häufigsten Entstehungsort des klarzelligen Nierenzellkarzinoms, sondern auch seine vielfältigen tumorfördernden Wirkungen qualifizieren das gefundene MT2A-Peptid für den engeren Auswahlkreis der mögliche Vakzinierungspeptide.

#### **4.1.2.2 RCC180- Peptidstudie**

Das untersuchte RCC180-Tumorgewebe hatte eine Masse von 4,15 g. Insgesamt konnten mittels LC-Massenspektrometrischer Analyse 8 MHC-II-assoziierte Peptide isoliert werden (siehe Tabelle 14), wovon zwei Peptide und ihre Quellproteine für die folgende Diskussion ausgewählt wurden. Allerdings muss hier kritisch bemerkt werden, dass diese Peptide fast alle zu kurz für Klasse-II-Liganden sind, da HLA-DR Durchschnittslängen von 16-17 AA bietet, und eine Mindestlänge von 11-13 AA besteht. Somit handelt es sich bei diesen Peptiden vermutlich um Artefakte.

Es konnte das Peptid *IAANIVQV* aus dem Quellprotein 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (**PFKFB4**) charakterisiert werden. Eine Überexpression von PFKFB-4 und PFKFB-3 wurde für das Magen- und Pankreaskarzinom

beschrieben. Zu den wesentlichsten induzierenden Faktoren zählt HIF-1- $\alpha$ . Möglicherweise spielt PFKFB-4 auch eine wesentliche Rolle im Rahmen des Warburg-Effektes, wonach die Energiegewinnung in Tumoren in erster Linie durch die Glykolyse und anschließend durch Lactatverbrennung erfolgt [377, 378]. Auch im Kolon- und Mammakarzinom konnte eine PFKFB-4-Überexpression nachgewiesen werden [379]. PFKFB-4 besitzt somit eine wichtige Rolle für den Energiehaushalt von Tumoren und wird unter anderem durch HIF-1- $\alpha$  induziert. Entsprechend des Expressionslevels könnte dieses Peptid für eine Peptidvakzinierung qualifizieren.

Ein weiteres sehr interessantes Peptid (*VQKPSYYVR*) entstammt dem Perilipin 2/ Adipophilin-Protein (**PLIN2/ADFP**). ADFP wird in einer Vielzahl von Geweben exprimiert, unter anderem dem Fettgewebe, dem laktierenden Brustgewebe, den Sertoli- und Leydigzellen und während des fettigen Umbaus im Rahmen der alkoholtoxischen Leberzirrhose [380-383]. Auch dieses Quellprotein kann im Rahmen einer Hypoxie über HIF-1- $\alpha$  induziert werden [384]. Eine ADFP-Überexpression konnte im Nierenzellkarzinom nachgewiesen werden [385], wobei die ADFP-Expression einen starken Einfluss auf die Differenzierung des klarzelligeren Nierenzellkarzinoms haben könnte [386]. Allerdings konnte Yao et al. nachweisen, dass eine starke ADFP-Expression mit einem besseren Überleben einhergehen könnte [385, 386]. Interessanterweise konnten Yao et al. ebenfalls nachweisen, dass in Metastasen eine Herunterregulation der ADFP-Expression stattfindet [386], was zusätzlich dafür sprechen könnte, dass die ADFP-Überexpression im RCC-Primärtumor möglicherweise mit der Lokalisation der physiologischen ADFP-Expression in den proximalen Tubulusepithelzellen begründet sein könnte [385, 387]. Zusätzlich bestärkt die Theorie, dass sich Metastasen genetisch vom Primarius unterscheiden [388, 389]. Gegenberichte hierzu wurden von Weigelt B et al. [390] und Stickle JS et al. [391] geliefert.

ADFP ist ein wichtiges Quellprotein für Impfpeptide, aus dem beispielsweise drei der insgesamt 10 Impfpeptide für den RCC182-Patienten generiert wurden. In erster Linie ist hier die individuell ausgesprochen starke ADFP-Überexpression von Entscheidung.

#### **4.1.2.3 RCC211-Peptidstudie**

Das untersuchte RCC211-Tumorgewebe hatte eine Masse von 20,65 g. Insgesamt konnten mittels LC-Massenspektrometrischer Analyse 25 MHC-II-assoziierte Peptide

isoliert werden (siehe Tabelle 15), wovon zwei Peptide und ihre Quellproteine für die folgende Diskussion ausgewählt wurden.

Das erste zu diskutierende Peptid *SNTDLVPAPAVRILTPE* entstammte dem growth differentiation factor 15 (**GDF 15**). Dieses Antigen ist ein Mitglied der Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) superfamily, welche nach Spaltung durch eine furinähnliche Proconvertase in die aktive Form umgewandelt wird, welches in den Kreislauf diffundieren kann [392, 393]. GDF15 scheint an verschiedenen wichtigen zellulären Prozessen beteiligt zu sein wie zum Beispiel Wachstumshemmung, Apoptoseinduktion, Zellabtrennung und Proinvasivität [394]. Die Rolle von GDF15 für die Tumorentstehung wird aktuell kontrovers diskutiert und es scheint, dass seine tumorfördernde oder tumorhemmende Wirkung vom Tumorstadium und dem histologischen Ursprung des Tumors abhängt [395-400]. Möglicherweise ist GDF15 auch an der Entstehung des Ewing-Tumors beteiligt, welcher den häufigsten Nierentumor im Kindesalter darstellt [401]. Xue et al. konnten nachweisen, dass GDF15 an der lymphogenen Metastasierung der kolorektalen Karzinoms beteiligt ist [395].

Abschließend erfolgt die Diskussion eines *mucin 1, cell surface associated (MUC1)*-Peptids *FFLLLLLTVLTG*. Das MUC1-Gen gehört zur Mucin-Familie, welche für membranständige O-glykosylierte Phosphoproteine kodieren.

Eine MUC1-Expression findet im normalen Nierengewebe hauptsächlich im distalen Tubulusepithel und im Sammelrohr statt [402]. Interessanterweise konnten mehrere Arbeitsgruppen nachweisen, dass eine MUC1-Überexpression in praktisch allen klarzelligen RCCs stattfindet [402-404]. Ursache hierfür ist wahrscheinlich die direkte MUC1-Induzierung durch HIF-1- $\alpha$ , dem bedeutendsten karzinogenen Signalweg der Niere [405, 406]. Dabei konnte eine direkte Bindung von HIF-1- $\alpha$  an den MUC1-Promotor nachgewiesen werden [405]. Für das klarzellige RCC konnte darüber hinaus eine Korrelation zwischen einer MUC1-Überexpression und einem metastasierenden Tumorverlauf mit schlechter Prognose gefunden werden [403, 404, 407]. Insbesondere für das Mamma- und das Prostatakarzinom konnte MUC1 als Ziel für eine Immuntherapie und für genetische Therapieansätze identifiziert werden [408-410]. Brossart et al. konnten spezifische CTLs für ein HLA-A2-restringiertes MUC1-Peptid generieren und anschließend im Rahmen einer DC-basierten Immuntherapie bei fortgeschrittenen RCC-Patienten ein immunologisches und klinisches Ansprechen feststellen [411]. Möglicherweise könnte durch zusätzlichen Einsatz von MHC-II-

restringierten MUC1-Peptiden eine noch effektivere immunologische Tumorantwort erzielt werden, so dass das obige MUC1-Peptid für weitere Peptidimpfungen beim klarzelligen RCC verwendet werden könnte.

#### 4.1.3 Diskussion der CCC2-Peptidstudie

Das untersuchte CCC2-Tumorgewebe hatte eine Masse von 1,5 g. Insgesamt konnten mittels LC-Massenspektrometrischer Analyse 43 MHC-I-assoziierte Peptide isoliert werden (siehe Tabelle 16), wovon drei Peptide und ihre Quellproteine für die folgende Diskussion ausgewählt wurden.

Das erste Peptid *YVYEYPSRY* konnte dem Quellprotein *neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 9* (**HEF1/Cas-L/NEDD9**, im Folgenden HEF1) zugeordnet werden. In erster Linie ist HEF1 ein cytoplasmatisches Strukturprotein, welches die Anordnung anderer Proteinkomplexe reguliert [412]. Je nach vorliegender Stöchiometrie kommt es zu einer variablen Beeinflussung der assoziierten Proteinkomplexe. Somit sind Einflüsse auf verschiedene zelluläre Signalwege möglich. In Zellkulturen konnten zusätzlich mitotische Defekte durch HEF1 induziert werden [413, 414]. Eine HEF1-Überexpression konnte in verschiedenen metastasierten Tumoren des Menschen, allen voran dem metastasierten Melanom nachgewiesen werden [415, 416]. Veränderungen in der Expression des Gerüstproteins NEDD9 konnten als Stimulus für die Entwicklung von Metastasen und anderer Tumore beobachtet werden [412, 416]. Insgesamt könnte dieses Peptid für eine Peptidvakzinierung im Rahmen eines CCC von besonderem Interesse sein, da dieser meist in einem fortgeschrittenen Tumorstadium diagnostiziert wird.

Das zweite Peptid *DALDKIRLI* entstammt aus dem *heat shock protein 90 kDa beta* (*Grp94*), member 1, (**HSP90B1**). Bei CCC-Patienten konnte beobachtet werden, dass in der Nähe von Grp94-exprimierenden Zellen CD83-positive DCs zu finden waren [417]. Möglicherweise könnte dies ein Hinweis auf die Immunogenität dieses Antigen sein, so dass der Einsatz des oben genannten Peptids für eine Tumorzakzinierung zu einer Verstärkung der Immunantwort führen könnte.

Schließlich konnte im untersuchten CCC-Tumor ebenfalls das **UBD**-Peptid *NPYDSVKKI* nachgewiesen werden. Für eine ausführliche Diskussion dieses Antigen wird auf die Diskussion der RCC135-Peptide verwiesen. Im Rahmen des Heil-

versuches fand dieses UBD-Peptid Eingang in den Peptidvakzinierungscocktail für den CCC2-Patienten.

## 4.2 Diskussion ausgewählter Methoden

In den folgenden zwei Abschnitten erfolgt die Diskussion der zentralen methodischen Ansätze dieser Arbeit. Als erstes wird der mechanische Aufschluss des Tumorgewebes mit anschließender LC-massenspektrometrischer Peptidsequenzierung besprochen (Abschnitt 4.2.1). Schließlich wird der Ansatz zur Etablierung von Primärzell-suspensionen und –langzeitkulturen aus intraoperativ entnommenem Tumorgewebe diskutiert (Abschnitt 4.2.2).

### 4.2.1 Massenspektrometrische Untersuchung mechanisch aufgeschlossener Gewebeproben

Sowohl die *liquid chromatography tandem-massspectrometry* (LC-MS/MS) zur Peptidsequenzierung als auch die Affimetrix-GeneChip-Analyse sind sehr gut etablierte und zuverlässige Methoden. Dennoch ergeben sich in der praktischen Verwendung einige prinzipielle methodische Limitationen. Die Vorhersage der potentiellen *Peptidausbeute* zusätzlich erschwerend ist die Tatsache, dass keine Korrelation zwischen Tumormasse und Peptidausbeute besteht (siehe Abbildung 5). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die Down-Regulation der MHC-Expression in Tumoren sein, welche als *escape-Mechanismus* bekannt ist [40, 418]. Interessant wäre an dieser Stelle eine quantitative Untersuchung der MHC-I/-II-Moleküle bei kleineren versus größeren Tumoren. Da die MHC-II-Expression in Tumorzellen sekundär über Immunmodulatoren wie zum Beispiel IFN- $\gamma$  induziert wird, sollte das Expressionslevel hauptsächlich von der lokalen Tumorentzündung abhängen. Die *nicht-Homogenität* des resezierten Tumorpräparates ist ein weiteres systematisches Problem. Somit besteht das untersuchte Tumorgewebe neben den hauptanteiligen Tumorzellen, auch aus Adipozyten, Fibroblasten und Immunzellen. Aufgrund der methodischen Nachweisempfindlichkeit führen kleinere MHC-Mengen zu keiner effektiven Ausbeuterate, so dass man mit guter Näherung annehmen kann, dass die charakterisierten Peptide fast ausschließlich von Tumorzellen stammen. Zusätzlich muss beachtet werden, dass ein sehr kurzes Resektions-zu-Gefrier-Zeitintervall ( $\Delta t$ ) eingehalten wird, da es andernfalls zu Nekrosen – insbesondere für ( $\Delta t > 30 \text{ min}$ ) - kommen kann. Ein zusätzliches Problem ist die hohe proteolytische Proteindegradation unter Raumtemperatur

(RT), wodurch als erstes die Oberflächenproteine der Zellen und später auch die Zellen selbst geschädigt werden. Insgesamt entsteht sowohl durch nekrotische Tumorveränderungen in der Postresektionsphase als auch durch die enzymatische Proteindegradation ein Verlust der zur Verfügung stehenden vitalen Tumormasse und somit zu einer Minderung der Nachweiswahrscheinlichkeit der vorhandenen Proteine. Schließlich konnte im Vergleich zwischen den Expressionsprofilen und den charakterisierten Peptidspektren kein Zusammenhang festgestellt werden. Intuitiv würde man annehmen, dass mit steigender Expressionsrate eines Proteins, zum Beispiel eines Tumorantigens, auch seine Präsentationsrate auf MHC-Oberflächenmolekülen zunehmen müsste. Weinzierl et al. konnten nachweisen, dass die Höhe der Gentranskriptionsrate – abgebildet am mRNA-Level – nicht mit der quantitativen Häufigkeit der Peptidpräsentation auf der Zelloberfläche zusammenhängt [419]. Dieses Erkenntnis ist durchaus eine ernsthafte Herausforderung im Hinblick auf eine effektive peptidbasierte Immunisierungstherapie, da nicht zuletzt mehrere Peptide eines potentiellen TAAs präsentiert werden müssen, um eine effektive T-Zellaktivierung zu generieren.

#### 4.2.2 Diskussion der Primärzellsuspensionen

Die Gewinnung von Langzeitkulturen aus nativen RCC-Resektaten stellt eine große technische Herausforderung dar. Erstmals konnte eine RCC-Kurzzeitkultur im Jahre 1957 durch Richter und Akin erfolgreich hergestellt werden [420]. In den folgenden Jahren haben sich viele Wissenschaftler, insbesondere Binder und Ebert, der Aufgabe zur Erarbeitung eines zuverlässigen Protokolls zur Gewinnung von Primärzellkulturen aus nativem RCC-Gewebe gewidmet. Trotz der großen Erfahrung von Binder und Ebert bei der Etablierung von RCC-Langzeitkulturen aus RCC-Primärzellsuspensionen berichten diese Autoren über niedrige Erfolgsraten von circa 12,7% [421, 422].

Im Rahmen dieser Arbeit konnten Primärzellsuspensionen aus insgesamt 16 intraoperativ entnommenen soliden RCC-Gewebeproben (RCC157, RCC160, RCC162, RCC163, RCC166, RCC167, RCC168, RCC169, RCC170, RCC171, RCC172, RCC173, RCC174, RCC178, RCC180 und RCC181) erfolgreich hergestellt werden. Allerdings gelang leider keine Etablierung einer stabilen Langzeitkultur. Hierfür konnten insgesamt drei Ursachen identifiziert werden: zum ersten *stellten* die Tumorzellen nach einigen initialen Passagen ihr *Wachstum spontan ein*. Zum anderen kam es zu einer schnellen oder allmählichen Selektionierung von Fibroblasten unter Kultivie-

rungsbedingungen. Schließlich erforderte das häufige Auftreten von bakteriellen und/oder Pilzkontaminationen die Erweiterung des initialen Primärzellsuspensionsprotokolls um die Hinzunahme von Antimykotika und Antibiotika. Die Schaffung von *in vivo*-Bedingungen im Rahmen einer Zellkultur ist trotz der Verwendung von Kälberserum und anderen Agenzien natürlich limitiert. Dies stellt nach Ansicht des Autors auch die größte systematische Schwäche der Zellkulturmethode dar. Um realitätsnähere Kultivierungsbedingungen zu erzielen, könnten eine so genannte 3D-Zellkultur verwendet werden. Auch der Einsatz von Glas- oder Polystyrolbehältern mit einem Extrazellulären Matrix-Layer (ECM-Layer) wären denkbar [423]. Fehlender Kontakt zu einer Oberfläche mit Hilfe von Integrinen führt häufig zur Initiierung von Apoptose [424, 425]. Im Rahmen der initialen chirurgischen Devaskularisierung des Tumors, des Resektions-zu-Aufarbeitungszeitraums und der Aufarbeitungsdauer kommt es zu einer unumgänglichen ischämischen Veränderung der Zellen. Darüber hinaus sorgen die natürlich vorkommenden Proteinasen für proteolytische Zersetzungsprozesse des Tumorgewebes mit konsekutiver ubiquitärer Zellschädigung. Durch Verwendung von Aprotinin im Rahmen der Gewebearbeitung wurde versucht die Proteolyse etwas zu hemmen. Während der primären Suspensionsherstellung und dem Abschaben des Zellrasens kommt es zu einer unvermeidbaren mechanischen Alteration der Tumorzellen, wodurch eventuell eine Apoptose induziert werden könnte.

#### **4.3 Schlussfolgerungen für die Peptid-basierte Vakzinierungstherapie für das RCC**

Von allen untersuchten RCC-Patienten konnten RCC135 und RCC182 in die RCC-Vakzinierungsstudie aufgenommen werden. Der CCC2-Patient erhielt im Rahmen einer Heilstudie ebenfalls einen Peptid-Vakzinierungscocktail. Durch Evaluation der gefundenen Peptide auf Tumorassoziation, bereits bekannte TAAs und mit Hilfe der Genexpressionsanalyse erfolgte eine Zusammenstellung der individuellen Impfcocktails. Sowohl beim RCC135 als auch beim CCC2 konnte das UBD-Peptid *NPYDSVKKI* mittels LC-MS/MS nachgewiesen werden. Somit wurde dieses Peptid in die Impfcocktails für den RCC135 und CCC2 aufgenommen. Darüber hinaus waren für die Zusammenstellung des CCC2-Impfcocktails zum einen die Resultate der Genexpressionsanalyse und bereits bekannte TAAs (siehe Tabelle 16) entscheidend.

Die Peptide wurden synthetisiert und zusammen mit Montanid zur unspezifischen Immunmodulation geimpft.



## 5 Zusammenfassung

Die übergeordnete Anstrengung der vorliegenden Arbeit bestand darin, neue Tumor-assoziierte Antigene und deren Peptide zu finden, welche für eine Peptid-basierte Vakzinierungstherapie von RCC- und CCC-Patienten verwendet werden können.

Nach dem mechanischen und chemischen Aufschluss von intraoperativ entnommenen RCC- und CCC-Gewebeproben erfolgte eine affinitätschromatographische Isolierung von MHC-Peptidkomplexen. Durch Quantifizierung der MHC-Moleküle und des  $\beta_2$ -Mikroglobulins wurde versucht eine Abschätzung der zu erwartenden Peptidmenge zu erzielen. Anschließend wurden die Peptide durch saure Elution von ihren tragenden MHC-Molekülen abgelöst und mit Hilfe einer *state-of-the-art* tandem-massenspektrometrischen Untersuchung charakterisiert.

Insgesamt wurden im Rahmen der MHC-I-Peptidstudie die Eluate der Tumore RCC135, RCC143 und CCC2 vollständig analysiert. Dadurch konnten 88 Peptide isoliert und charakterisiert werden, wovon 11 Peptide aufgrund der biologischen Wirkung und Eigenschaft ihrer Quellproteine als potentiell tumor-assoziiert diskutiert wurden. Insbesondere das Ubiquitin D (UBD)-Peptid (*NPYDSVKKI*) wurde aufgrund seiner zusätzlichen Überexpression im RCC135-Tumorgewebe in den Impfcocktail aufgenommen, welcher dem RCC135-Patienten verabreicht wurde. Darüber hinaus wurden Eluate der Tumore RCC127, RCC146, RCC154, RCC155, RCC157, RCC158, RCC163, RCC180, RCC182 angefertigt, welche für zukünftige massenspektrometrische Analysen zur Verfügung stehen. Erstmals wurden mithilfe des oben genannten methodischen Ansatzes CCC-Gewebe untersucht. Dem CCC2-Patienten wurde im Rahmen einer Heilstudie bei therapierefraktärem Verlauf ebenfalls ein Peptipcocktail appliziert, welcher sowohl MHC-I- als auch MHC-II-UBD-Peptide beinhaltet.

Durch histologische und proteomische Studien konnten neue Erkenntnisse über die Rolle von MHC-II-Molekülen und -Peptiden im RCC gewonnen werden. In den immunhistochemischen Untersuchungen zahlreicher RCC-Gewebe konnte gezeigt werden, dass neben den bekannten MHC-II-exprimierenden Zellen auch die RCC-Tumorzellen zur MHC-II-Überexpression fähig sind. Durch Nachweis von Entzündungszellen (Makrophagen und T-Zellen) in unmittelbarer Nähe zu den MHC-II-exprimierenden Tumorzellen und durch Untersuchung des Expressionsprofils (insbe-

sondere IFN- $\gamma$ ) ist hier am ehesten von einer durch Tumorinflammation getriggerten MHC-II-Induzierung in Tumorzellen auszugehen. Insgesamt konnten durch MS-Spektrenanalyse der Tumor-Eluate RCC157, RCC180 und RCC211 60 Peptide isoliert und charakterisiert werden, wovon 6 Peptide aufgrund der biologischen Wirkung und Eigenschaft ihrer Quellproteine als potentiell tumor-assoziiert diskutiert wurden.

In einer weiteren Studie wurden zunächst Primärzellsuspensionen aus intraoperativ entnommenen RCC-Geweben angefertigt. Anschließend wurde versucht, diese Primärzellsuspensionen in Langzeitkulturen überzuführen, was allerdings aufgrund von Kontaminationen, Selektionierung von Fibroblasten und spontaner Wachstumseinstellung trotz Zugabe von Wachstumsfaktoren und Kälberserum-Nährmedium nicht erzielt werden konnte. Allerdings wurden im Rahmen der Protokolloptimierung Veränderungen vorgenommen, welche für folgende Versuche hilfreich sein könnten.

Mithilfe der methodischen Ansätze dieser Arbeit konnten neue Impfpeptide identifiziert werden, welche bereits im Rahmen von kontrollierten klinischen Studien verwendet worden sind. Durch Weiterführung des methodischen Konzeptes, wird es auch in Zukunft möglich sein, neue Erkenntnisse auf dem Gebiet der Tumorbilogie, respektive für RCCs und CCCs, zu gewinnen. So könnte ein entscheidender Beitrag für eine Patienten-individuelle Tumorthherapie geleistet werden. Hierdurch wäre bei früher therapeutischer Intervention eine effektivere Immunantwort und möglicherweise eine Verbesserung der Heilungschancen denkbar.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

ADCC	Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity	LP	Ladepuffer
AK	Antikörper	LPS	Lipopolysaccharid
APC	Antigenpräsentierenden Zellen	MALDI	Matrixunterstützte Laser-desorption/Ionisation
APS	Ammoniumpersulfat	MCA	Methylcholantren
AS	Aminosäure	MCP	Multi Channel Plate
bFGF	Fibroblast growth factor	MHC	Major Histocompatibility Complex
CARs	Chimeric antigen receptors	MRT	Magnetresonanztomographie
CCC oder CACC	Gallengangskarzinom (Cholangiozellulär Carcinoma)	MS-Spektren	Massenspektren
CD	Cluster of differentiation	MΦ	Makrophagen
CI	Chemische Ionisation	NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
CID	Collisionally Induced Decomposition	NO	Stickstoffmonoxid
CNBr-Sepharose	Bromcyan-aktivierte Sepharose	PEG	Polyethylenglykol
CT	Computertomographie	PITC	Phenylisothiocyanat
CTL	Cytotoxic T lymphocytes	PPM	Prestained protein marker
DC	Dendritische Zellen	PSC	Primär sklerosierende Cholangitis
DNA	Desoxyribonucleinsäure	RCC	Nierenzellkarzinom (Renal Cell Carcinoma)
ECM	Extrazelluläre Matrix	RC-HPLC	Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography
EGF	Epidermal growth factor	RF-Linse	Radio frequency-Linse
EI	Elektronenstoß-Ionisation	RT	Raumtemperatur
ESI	Elektrospray-Ionisation	SDS-Polyacrylamid	Sodium dodecyl-phosphate-Polyacrylamid
FAB	Fast Atom Bombardment	SEREX	Serologische Identifikation von Antigenen durch rekombinantes Expressionsklonieren
HCC	Hepatozelluläres Karzinom	SEV	Sekundärelektronenvervielfacher
HIF	Hypoxia inducible factor	TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
HLA	Human Leukocyte Antigen	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase	TFA	Trifluoressigsäure
Ig	Immunglobulin	TGF-β	Transforming growth factor-β
IL	Interleukin	TILs	Tumor infiltrating immune cells
IP	Immunpräzipitation	TILs	Tumor infiltrating lymphocytes
KIRs	Killer immunoglobulin-like receptors	TLR	Toll-like Rezeptor
KP	Kopplungspuffer	TOF	Time Of Flight
LC-MS	Liquid Chromatography - Mass Spectrometry	Treg	Regulatorische T-Zellen
LC-MS/MS	Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry	ULBPs	UL16 binding proteins

## 7 Danksagung

Herrn Prof. Dr. H.-G. Rammensee danke ich für die Aufnahme in sein Institut, für die Überlassung des Themas und für zahlreiche lehrreiche Gespräche.

Herrn Prof. Dr. Stefan Stevanović für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und für die kompetente Betreuung und Unterstützung über die gesamte Zeit.

Thea Nastke, Margret Müller und Johanna Engelhard für ihre Hilfe bei alltäglichen technischen und methodischen Herausforderungen im Labor und die Bereitstellung der exzellenten Antikörper.

Oliver Schoor, Mathias Schuler, Nina Hillen, Florian Altenberend, Andreas Weinzierl und Verena Meyer für die zahlreichen Genexpressions- und MS-Analysen.

Ein besonderer Dank an Herrn Jörg Hennenlotter und die gesamte urologische Abteilung für die stets freundliche und sehr gute Kooperation, insbesondere bei der Beschaffung von Tumorproben und klinische Daten.

Frau Prof. Dr. Dorothee Wernet für die Durchführung der HLA-Typisierungen.

Herrn Prof. Dr. Peter Overath für seine Ratschläge und zahlreiche konzeptionelle wissenschaftliche Anregungen.

Patricia Hristić für ihre fortwährend freundliche Hilfsbereitschaft.

Allen anderen Mitarbeiter des Instituts für das gute Arbeitsklima.

Ein ganz besonderer Dank meinen Eltern, für ihre uneingeschränkte Unterstützung während meines gesamten Studiums und darüber hinaus.

Ein ganz besonderer Dank an Anna, Maria und Dimitrios für ihre Unterstützung und die unschätzbare wertvollen gemeinsamen Momente.

## 8 Literatur

1. De Plaen, E., et al., *Immunogenic (tum-) variants of mouse tumor P815: cloning of the gene of tum- antigen P91A and identification of the tum- mutation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(7): p. 2274-8.
2. van der Bruggen, P., et al., *A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma*. Science, 1991. **254**(5038): p. 1643-7.
3. Knuth, A., et al., *Cytolytic T-cell clones against an autologous human melanoma: specificity study and definition of three antigens by immunoselection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(8): p. 2804-8.
4. Nagorsen, D. and E. Thiel, *Clinical and immunologic responses to active specific cancer vaccines in human colorectal cancer*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(10): p. 3064-9.
5. Smith, F.O., et al., *Treatment of metastatic melanoma using interleukin-2 alone or in conjunction with vaccines*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(17): p. 5610-8.
6. Marchand, M., et al., *Tumor regressions observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide encoded by gene MAGE-3 and presented by HLA-A1*. Int J Cancer, 1999. **80**(2): p. 219-30.
7. Schmitt, M., et al., *RHAMM-R3 peptide vaccination in patients with acute myeloid leukemia, myelodysplastic syndrome, and multiple myeloma elicits immunologic and clinical responses*. Blood, 2008. **111**(3): p. 1357-65.
8. Ai, W.Z., et al., *Anti-idiotypic antibody response after vaccination correlates with better overall survival in follicular lymphoma*. Blood, 2009. **113**(23): p. 5743-6.
9. Böcker, D., Heitz, *Pathologie*. 2 ed. 2000: Urban + Fischer.
10. Fauci, A.S.B., Eugene; Kasper, Dennis L.; Hauser, Stephen L.; Longo, Dan L.; Jameson, J. Larry; Loscalzo, Joseph, *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 17th ed. March 6, 2008): McGraw-Hill Professional.
11. Nowell, P.C., *The clonal evolution of tumor cell populations*. Science, 1976. **194**(4260): p. 23-8.
12. Yeo, C.J., *Tumor suppressor genes: a short review*. Surgery, 1999. **125**(4): p. 363-6.
13. Yanai, H., et al., *HMGB proteins function as universal sentinels for nucleic-acid-mediated innate immune responses*. Nature, 2009. **462**(7269): p. 99-103.
14. Dunn, G.P., L.J. Old, and R.D. Schreiber, *The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting*. Immunity, 2004. **21**(2): p. 137-48.
15. Ichim, C.V., *Revisiting immunosurveillance and immunostimulation: Implications for cancer immunotherapy*. J Transl Med, 2005. **3**(1): p. 8.
16. Nagrosen, *Antigen-spezifische T-Zell-Immunität und Antigen-präsentierende Zellen bei malignen Erkrankungen*, in *Charité Centrum 14 für Tumormedizin, Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie, Campus Benjamin Franklin*. 2007, Humold-Universität Berlin: Berlin.
17. Coussens LM, W.Z., *Inflammation and cancer*. Nature 2002(420): p. 860-7.
18. Prehn, R., *The immune reaction as a stimulator of tumor growth*. Science, 1972(176): p. 170-1.
19. Prehn, R., *Immunostimulation of chemical oncogenesis in the mouse*. . Int J Cancer, 1977. **20**: p. 918-922.
20. Outzen, H., *Development of carcinogen-induced skin tumors in mice with varied states of immune capacity*. Int J Cancer 1980(26): p. 87-92.
21. Dvorak, H., *Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing*. N Engl J Med 1986(315): p. 1650-9.
22. Bonifaz L, B.D., Mahnke K, Rivera M, Nussenzweig MC, Steinman RM, *Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state*

- leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance.* J.Exp.Med., 2002(196): p. 1627-1638.
23. Colonna M, T.G., Liu YJ, *Plasmacytoid dendritic cells in immunity.* Nat.Immunol., 2004(5): p. 1219-1226.
  24. Curiel TJ, C.P., Mottram P, Alvarez X, Moons L, Evdemon-Hogan M, Wei S, Zou L, Kryczek I, Hoyle G, Lackner A, Carmeliet P, Zou W, *Dendritic cell subsets differentially regulate angiogenesis in human ovarian cancer.* Cancer Res., 2004(64): p. 5535-5538.
  25. Smyth MJ, H.Y., Takeda K, Yagita H, *New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer.* Nat.Rev.Cancer, 2002(2): p. 850-861.
  26. Cerwenka A, L.L., *Natural killer cells, viruses and cancer.* Nat.Rev.Immunol., 2001(1): p. 41-49.
  27. Zou W, M.V., Coulomb-L'Hermin A, Borvak J, Nome F, Isaeva T, Wei S, Krzysiek R, Durand-Gasselien I, Gordon A, Pustilnik T, Curiel DT, Galanaud P, Capron F, Emilie D, Curiel TJ, *Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells.* Nat.Med., 2001(7): p. 1339-1346.
  28. Salio M, C.M., Vermi W, Facchetti F, Palmowski MJ, Smith CL, Shepherd D, Colonna M, Cerundolo V, *Plasmacytoid dendritic cells prime IFN-gamma-secreting melanoma-specific CD8 lymphocytes and are found in primary melanoma lesions.* Eur.J.Immunol., 2003(33): p. 1052-1062.
  29. Vanhamme L, M.G., Schuh AC, Breitman ML, Vogt PK, *Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 alpha induce anchorage independence in v-jun transgenic murine cells.* Cancer Res., 1993(53): p. 615-621.
  30. Suganuma M, O.S., Marino MW, Sakai A, Sueoka E, Fujiki H, *Essential role of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) in tumor promotion as revealed by TNF-alpha-deficient mice.* Cancer Res., 1999(59): p. 4516-4518.
  31. Jaiswal M, L.N., Burgart LJ, Gores GJ, *Inflammatory cytokines induce DNA damage and inhibit DNA repair in cholangiocarcinoma cells by a nitric oxide-dependent mechanism.* Cancer Res., 2000(60): p. 184-190.
  32. Leibovich SJ, P.P., Shepard HM, Wiseman DM, Shively V, Nuseir N, *Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumour necrosis factor-alpha.* Nature 1987(329): p. 630-632.
  33. Wong GH, E.J., Oberley LW, Goeddel DV, *Manganous superoxide dismutase is essential for cellular resistance to cytotoxicity of tumor necrosis factor.* Cell, 1989(58): p. 923-931.
  34. Balkwill, F., *Tumor necrosis factor or tumor promoting factor?* Cytokine Growth Factor Rev., 2002(13): p. 135-141.
  35. Gorelik L, F.R., *Transforming growth factor-beta in T-cell biology.* Nat.Rev.Immunol., 2002(2): p. 46-53.
  36. Pasche, B., *Role of transforming growth factor beta in cancer.* J.Cell Physiol., 2001(186): p. 153-168.
  37. O'Connell J, B.M., O'sullivan GC, Collins JK, Shanahan F, *The Fas counterattack: cancer as a site of immune privilege.* Immunol.Today, 1999(20): p. 46-52.
  38. Toi M, T.T., Yamamoto Y, Kurisaki T, Suzuki H, Tominaga T, *Clinical significance of the determination of angiogenic factors.* Eur.J.Cancer, 1996(32A): p. 2513-2519.
  39. Gabrilovich DI, C.H., Girgis KR, Cunningham HT, Meny GM, Nadaf S, Kavanaugh D, Carbone DP, *Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells.* Nat.Med., 1996(2): p. 1096-1103.
  40. Bubenik, J., *Tumour MHC class I downregulation and immunotherapy.* Oncol.Rep., 2003: p. 2005-2008.

41. Ochsenbein AF, S.S., Odermatt B, Pericin M, Karrer U, Hermans J, Hemmi S, Hengartner H, Zinkernagel RM, *Roles of tumour localization, second signals and cross priming in cytotoxic T-cell induction*. Nature, 2001(411): p. 1058-1064.
42. Ochsenbein AF, K.P., Karrer U, Ludewig B, Pericin M, Hengartner H, Zinkernagel RM, *Immune surveillance against a solid tumor fails because of immunological ignorance*. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 1999(96): p. 2233-2238.
43. Spiotto MT, Y.P., Rowley DA, Nishimura MI, Meredith SC, Gajewski TF, Fu YX, Schreiber H, *Increasing tumor antigen expression overcomes "ignorance" to solid tumors via crosspresentation by bone marrow-derived stromal cells*. Immunity, 2002(17): p. 737-747.
44. Romero P, D.P., Valmori D, Pittet M, Ogg GS, Rimoldi D, Chen JL, Lienard D, Cerottini JC, Cerundolo V, *Ex vivo staining of metastatic lymph nodes by class I major histocompatibility complex tetramers reveals high numbers of antigen-experienced tumor-specific cytolytic T lymphocytes*. J.Exp.Med., 1998(188): p. 1641-1650.
45. Shevach, E., *Fatal attraction: tumors beckon regulatory T cells*. Nat.Med., 2004(10): p. 900-901.
46. Woo EY, Y.H., Chu CS, Schlienger K, Carroll RG, Riley JL, Kaiser LR, June CH, *Cutting edge: Regulatory T cells from lung cancer patients directly inhibit autologous T cell proliferation*. J.Immunol., 2002(168): p. 4272-4276.
47. Woo EY, C.C., Goletz TJ, Schlienger K, Yeh H, Coukos G, Rubin SC, Kaiser LR, June CH, *Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer*. Cancer Res., 2001(61): p. 4766-4772.
48. Liyanage UK, M.T., Joo HG, Tanaka Y, Herrmann V, Doherty G, Drebin JA, Strasberg SM, Eberlein TJ, Goedegebuure PS, Linehan DC, *Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma*. J.Immunol., 2002(169): p. 2756-2761.
49. Abbas AK, S.A., *Dendritic cells giveth and taketh away*. Nat.Immunol., 2005(6): p. 227-228.
50. Ehrlich, P., *Ueber den jetzigen stand der Karzinomforschung*. Ned. Tijdschr. Geneesk., 1909. **5**: p. 273-290.
51. Burnet, M., *Cancer; a biological approach. I. The processes of control*. Br Med J, 1957. **1**(5022): p. 779-86.
52. Burnet, F.M., *The concept of immunological surveillance*. Prog Exp Tumor Res, 1970. **13**: p. 1-27.
53. Burnet, F.M., *Immunological factors in the process of carcinogenesis*. Br. Med. Bull., 1964(20): p. 154-158.
54. Thomas, L., *Cellular and Humoral Aspects of the Hypersensitive States*, ed. H.S. Lawrence. 1959, New York: Hoeber-Harper.
55. Stutman, O., *Immunodepression and malignancy*. Adv Cancer Res, 1975. **22**: p. 261-422.
56. Grant, G.A. and J.F. Miller, *Effect of neonatal thymectomy on the induction of sarcomata in C57 BL mice*. Nature, 1965. **205**(976): p. 1124-5.
57. Trainin, N., et al., *Enhancement of lung adenoma formation by neonatal thymectomy in mice treated with 7,12-dimethylbenz(a)anthracene or urethan*. Int J Cancer, 1967. **2**(4): p. 326-36.
58. Burstein, N.A. and L.W. Law, *Neonatal thymectomy and non-viral mammary tumours in mice*. Nature, 1971. **231**(5303): p. 450-2.
59. Sanford, B.H., et al., *Long-term spontaneous tumor incidence in neonatally thymectomized mice*. J Immunol, 1973. **110**(5): p. 1437-9.

60. Stutman, O., *Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic-nude mice*. Science, 1974. **183**(124): p. 534-6.
61. Stutman, O., *Chemical carcinogenesis in nude mice: comparison between nude mice from homozygous matings and heterozygous matings and effect of age and carcinogen dose*. J Natl Cancer Inst, 1979. **62**(2): p. 353-8.
62. Stutman, *Proceedings of the International Workshop on Nude Mice Vol.I*, ed. J.R.C. Poulsen. 1973, Stuttgart: Gustav Fischer.
63. Hunig, T., *T-cell function and specificity in athymic mice*. Immunol Today 1983(4): p. 84-87.
64. Maleckar JR, S.L., *The composition of the T cell receptor repertoire in nude mice*. J Immunol, 1987(138): p. 3873-3876.
65. Penn, I., *Malignancies associated with immunosuppressive or cytotoxic therapy*. Surgery, 1978. **83**(5): p. 492-502.
66. Birkeland, S.A., et al., *Cancer risk after renal transplantation in the Nordic countries, 1964-1986*. Int J Cancer, 1995. **60**(2): p. 183-9.
67. Dighe AS, R.E., Old LJ, Schreiber RD, *Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN-gamma receptors*. Immunity, 1994(1): p. 447-456.
68. Kaplan DH, S.V., Dighe AS, Stockert E, Aguet M, Old LJ, Schreiber RD, *Demonstration of an interferon-gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice*. Proc. Natl. Acad. Sci., 1998(95): p. 7556-7561.
69. Shankaran V, I.H., Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ and Schreiber RD, *IFN-gamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity*. Nature, 2001(410): p. 1107-1111.
70. Street SE, C.E.a.S.M., *Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis*. Blood, 2001(97): p. 192-197.
71. Street SE, T.J., MacGregor D and Smyth MJ, *Suppression of lymphoma and epithelial malignancies effected by interferon-gamma*. J. Exp. Med., 2002(196): p. 129-134.
72. van den Broek MF, K.D., Ossendorp F, Toes R, Vamvakas S, Lutza WK, Melief CJM, Zinkernagel RM and Hengartner H, *Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice*. J. Exp. Med., 1996(184): p. 1781-1790.
73. Smyth MJ, T.K., Street SE, Cretney E, Trapani JA, Taniguchi M, Kawano T, Pelikan SB, Crowe NY and Godfrey DI, *Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells*. J. Exp. Med., 2000(191): p. 661-668.
74. Smyth MJ, T.K., Street SE, MacGregor D, Godfrey DI and Trapani JA, *Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma*. J. Exp. Med., 2000(192): p. 755-760.
75. Dunn GP, O.L., and Schreiber RD, *The Three Es of Cancer Immunoediting*. Annu. Rev. Immunol., 2004(22): p. 329-360.
76. Dunn GP, B.A., Ikeda H, Old LJ, and Schreiber RD, *Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape*. Nat. Immunol., 2002(3): p. 991-998.
77. Cooper, M.A., T.A. Fehniger, and M.A. Caligiuri, *The biology of human natural killer-cell subsets*. Trends Immunol, 2001. **22**(11): p. 633-40.
78. Orange, J.S. and Z.K. Ballas, *Natural killer cells in human health and disease*. Clin Immunol, 2006. **118**(1): p. 1-10.
79. Walzer, T., et al., *Natural killer cells: from CD3(-)NKp46(+) to post-genomics meta-analyses*. Curr Opin Immunol, 2007. **19**(3): p. 365-72.
80. Lanier, L., *NK cell receptors*. Annu.Rev.Immunol. , 1998(16): p. 359-393.
81. Adam C, K.S., Allgeier T, Braumuller H, Luking C, Mysliwicz J, Kriegeskorte A, Busch DH, Rocken M, Mocikat R, *DC-NK cell cross talk as a novel CD4+ T-cell-independent pathway for antitumor CTL induction*. Blood 2005(106): p. 338-344.



82. Gresser I, B.F., *Endogenous type I interferons as a defense against tumors*. Cytokine Growth Factor Rev. , 2002(13): p. 111-118.
83. Belardelli F, F.M., Proietti E, Kirkwood JM *Interferon-alpha in tumor immunity and immunotherapy*. Cytokine Growth Factor Rev. , 2002(13): p. 119-134.
84. Dunn GP, B.A., Sheehan KC, Shankaran V, Uppaluri R, Bui JD, Diamond MS, Koebel CM, Arthur C, White JM, Schreiber RD, *A critical function for type I interferons in cancer immunoediting*. Nat.Immunol. , 2005(6): p. 722-729.
85. Moretta A, B.C., Vitale M, Pende D, Cantoni C, Mingari MC, Biassoni R, Moretta L, *Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity*. Annu.Rev.Immunol., 2001(19): p. 197-223.
86. Bauer S, G.V., Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, Spies T, *Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA*. Science, 1999(285): p. 727-729.
87. Steinle A, L.P., Morris DL, Groh V, Lanier LL, Strong RK, Spies T, *Interactions of human NKG2D with its ligands MICA, MICB, and homologs of the mouse RAE-1 protein family*. Immunogenetics 2001(53): p. 279-287.
88. Brunda MJ, L.L., Warriar RR, Wright RB, Hubbard BR, Murphy M, Wolf SF, Gately MK, *Antitumor and antimetastatic activity of interleukin 12 against murine tumors*. J.Exp.Med., 1993(178): p. 1223-1230.
89. Yu P, L.Y., Liu W, Chin RK, Wang J, Wang Y, Schietinger A, Philip M, Schreiber H, Fu YX, *Priming of naive T cells inside tumors leads to eradication of established tumors*. Nat.Immunol. , 2004(5): p. 141-149.
90. Groh V, S.A., Bauer S, Spies T, *Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells*. Science 1998(279): p. 1737-1740.
91. Iwai Y, T.S., Honjo T, *PD-1 blockade inhibits hematogenous spread of poorly immunogenic tumor cells by enhanced recruitment of effector T cells*. Int.Immunol. , 2005(17): p. 133-144.
92. Sallusto F, L.A., *The instructive role of dendritic cells on T-cell responses*. Arthritis Res. , 2002(3, 4 Suppl): p. 127-132.
93. Mellman I, S.R.D.c., *Specialized and regulated antigen processing machines*. Cell Biol Toxicol, 2001(106): p. 255-258.
94. Probst HC, M.K., Okazaki T, Honjo T, van den BM, *Resting dendritic cells induce peripheral CD8+ T cell tolerance through PD-1 and CTLA-4*. Nat.Immunol. , 2005(6): p. 280-286.
95. Moretta A, B.C., Mingari MC, Biassoni R, Moretta L, *What is a natural killer cell?* Nat.Immunol., 2002(3): p. 6-8.
96. Takeda K, H.Y., Smyth MJ, Kayagaki N, Yamaguchi N, Kakuta S, Iwakura Y, Yagita H, Okumura K *Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells*. Nat.Med., 2001(7): p. 94-100.
97. Iwai Y, I.M., Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T, Minato N, *Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade*. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 2002(99): p. 12293-12297.
98. Uyttenhove C, P.L., Theate I, Stroobant V, Colau D, Parmentier N, Boon T, Van den Eynde BJ, *Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase*. Nat.Med., 2003(9): p. 1269-1274.
99. de JR, B.M., Hooibrink B, Van dP-K, Miedema F, van Lier RA, The. Eur.J.Immunol. , 1992(22): p. 993-999.
100. Strome SE, D.H., Tamura H, Voss SG, Flies DB, Tamada K, Salomao D, Cheville J, Hirano F, Lin W, Kasperbauer JL, Ballman KV, Chen L, *B7-H1 blockade augments*

- adoptive T-cell immunotherapy for squamous cell carcinoma.* Cancer Res., 2003(63): p. 6501-6505.
101. Dong H, S.S., Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, Roche PC, Lu J, Zhu G, Tamada K, Lennon VA, Celis E, Chen L, *Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion.* Nat.Med., 2002(8): p. 793-800.
  102. Curiel TJ, W.S., Dong H, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, Krzysiek R, Knutson KL, Daniel B, Zimmermann MC, David O, Burow M, Gordon A, Dhurandhar N, Myers L, Berggren R, Hemminki A, Alvarez RD, Emilie D, Curiel DT, Chen L, Zou W, *Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity.* Nat.Med., 2003(9): p. 562-567.
  103. Munn DH, S.M., Lee JR, Jhaver KG, Johnson TS, Keskin DB, Marshall B, Chandler P, Antonia SJ, Burgess R, Slingluff CL, Jr., Mellor AL, *Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase.* Science 2002(297): p. 1867-1870.
  104. Santini SM, L.C., Logozzi M, Parlato S, Spada M, Di PT, Belardelli F, *Type I interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cell development and activity in vitro and in Hu-PBL-SCID mice.* J.Exp.Med., 2000(191): p. 1777-1788.
  105. Ortaldo JR, P.W., Wasserman K, Herberman RB, *Effects of metabolic inhibitors on spontaneous and interferon-boosted human natural killer cell activity.* J.Immunol., 1980(125): p. 1839-1844.
  106. Fan Z, Y.P., Wang Y, Wang Y, Fu ML, Liu W, Sun Y, Fu YX, *NK cell activation by LIGHT triggers tumor specific CD8+ T cell immunity to reject established tumors.* Blood, 2005.
  107. Dranoff, G., *GM-CSF-based cancer vaccines.* Immunol.Rev., 2002(188): p. 147-154.
  108. Biron, C., *Role of early cytokines, including alpha and beta interferons (IFN-alpha/beta), in innate and adaptive immune responses to viral infections.* Semin.Immunol., 1998(10): p. 383-390.
  109. Trinchieri G, S.D., Granato D, Perussia B, *Antagonistic effects of interferons on the cytotoxicity mediated by natural killer cells.* Fed.Proc., 1981(40): p. 2705-2710.
  110. Biron CA, S.G., Welsh RM, *Interferon induces natural killer cell blastogenesis in vivo.* J.Leukoc.Biol., 1984(35): p. 31-37.
  111. Rosenberg, S., Yanelli, JR, Yang, JC, Topalian, SL, Schwartzentruber, DJ, Weber, JS, Parkinson, DR, Seipp, CA, Einhorn, JH, White, DE, *Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor infiltrating lymphocytes and IL-2.* J. Natl. Cancer Inst., 1994(86): p. 1159-66.
  112. Nagorsen D, M.F., Panelli MC, *Cytokine and chemokine expression profiles of maturing dendritic cells using multiprotein platform arrays.* Cytokine, 2004(25): p. 31-5.
  113. Thompson JA, P.D., Klarnet JP, Kern DE, Greenberg PD, Cheever MA, *Eradication of disseminated murine leukemia by treatment with high-dose interleukin 2.* J.Immunol., 1986(137): p. 3675-3680.
  114. Papa MZ, M.J., Rosenberg SA, *Antitumor efficacy of lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin 2 in vivo: successful immunotherapy of established pulmonary metastases from weakly immunogenic and nonimmunogenic murine tumors of three distinct histological types.* Cancer Res., 1986(46): p. 4973-4978.
  115. Mule JJ, Y.J., Afreniere RL, Shu SY, Rosenberg SA, *Identification of cellular mechanisms operational in vivo during the regression of established pulmonary metastases by the systemic administration of high-dose recombinant interleukin 2.* J.Immunol., 1987(139): p. 285-294.

116. Fellous M, N.U., Wallach D, Merlin G, Rubinstein M, Revel M, *Interferon-dependent induction of mRNA for the major histocompatibility antigens in human fibroblasts and lymphoblastoid cells*. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 1982(79): p. 3082-3086.
117. Noguchi Y, R.E., Chen YT, Old LJ, *Influence of interleukin 12 on p53 peptide vaccination against established Meth A sarcoma*. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 1995(92): p. 2219-2223.
118. Kayagaki N, Y.N., Nakayama M, Eto H, Okumura K, Yagita H, *Type I interferons (IFNs) regulate tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) expression on human T cells: A novel mechanism for the antitumor effects of type I IFNs*. J.Exp.Med., 1999(189): p. 1451-1460.
119. Qin Z, S.J., Pradera F, Kammertoens T, Seliger B, Pircher H, Blankenstein T, *A critical requirement of interferon gamma-mediated angiostasis for tumor rejection by CD8+ T cells*. Cancer Res., 2003(63): p. 4095-4100.
120. Nistico P, T.R., Giacomini P, Cavallari A, D'Agnano I, Fisher PB, Natali PG, *Effect of recombinant human leukocyte, fibroblast, and immune interferons on expression of class I and II major histocompatibility complex and invariant chain in early passage human melanoma cells*. Cancer Res., 1990(50): p. 7422-7429.
121. Cheever MA, C.W., *Therapy with cultured T cells: principles revisited*. Immunol.Rev., 1997(157): p. 177-194.
122. Fallarino F, G.U., Bianchi R, Vacca C, Fioretti MC, Puccetti P, *Th1 and Th2 cell clones to a poorly immunogenic tumor antigen initiate CD8+ T cell-dependent tumor eradication in vivo*. J.Immunol., 2000(165): p. 5495-5501.
123. Giuntoli RL, L.J., Kobayashi H, Kennedy R, Celis E, *Direct costimulation of tumor-reactive CTL by helper T cells potentiate their proliferation, survival, and effector function*. Clin.Cancer Res., 2002(8): p. 922-931.
124. Janssen EM, L.E., Wolfe T, Christen U, von Herrath MG, Schoenberger SP, *CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes*. Nature 2003(421): p. 852-856.
125. Tsung K, D.J., Tsung YL, Norton JA, *Macrophages as effector cells in interleukin 12-induced T cell-dependent tumor rejection*. Cancer Res., 2002(62): p. 5069-5075.
126. Hung K, H.R., Lafond-Walker A, Lowenstein C, Pardoll D, Levitsky H, *The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response*. J.Exp.Med., 1998(188): p. 2357-2368.
127. Knutson KL, D.M., *Tumor antigen-specific T helper cells in cancer immunity and immunotherapy*. Cancer Immunol.Immunother., 2005(54): p. 721-728.
128. Echchakir H, B.M., Dorothee G, Martinvalet D, Le GS, Bounsell L, Chouaib S, Bensussan A, Mami-Chouaib F, *Cutaneous T cell lymphoma reactive CD4+ cytotoxic T lymphocyte clones display a Th1 cytokine profile and use a fas-independent pathway for specific tumor cell lysis*. J.Invest Dermatol., 2000(115): p. 74-80.
129. Schattner EJ, M.J., Bishop J, Yoo DH, Chadburn A, Crow MK, Friedman SM, *CD4+ T-cell induction of Fas-mediated apoptosis in Burkitt's lymphoma B cells*. Blood 1996(88): p. 1375-1382.
130. Thomas WD, H.P., *TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induces apoptosis in Fas ligand-resistant melanoma cells and mediates CD4 T cell killing of target cells*. J.Immunol., 1998(161): p. 2195-2200.
131. Lucin K, I.Z., Jonjic N, *Prognostic significance of T-cell infiltrates, expression of beta 2-microglobulin and HLA-DR antigens in breast carcinoma*. Pathol.Res.Pract., 1994(190): p. 1134-1140.
132. Concha A, R.-C.F., Cabrera T, Nogales F, Collado A, Garrido F, *Different patterns of HLA-DR antigen expression in normal epithelium, hyperplastic and neoplastic malignant lesions of the breast*. Eur.J.Immunogenet., 1995(22): p. 299-310.

133. Yazawa T, K.H., Fujiwara M, Matsui M, Horiguchi H, Satoh H, Fujimoto M, Yokoyama K, Ogata T, *Lack of class II transactivator causes severe deficiency of HLA-DR expression in small cell lung cancer.* J.Pathol., 1999(187): p. 191-199.
134. Trieb K, L.T., Lang S, Windhager R, Kotz R, Dirnhofer S, *Evaluation of HLA-DR expression and T-lymphocyte infiltration in osteosarcoma.* Pathol.Res.Pract., 1998(194): p. 679-684.
135. Altomonte M, F.E., Visintin A, Maio M, *Targeted therapy of solid malignancies via HLA class II antigens: a new biotherapeutic approach?* Oncogene 2003(22): p. 6564-6569.
136. Hellstrom, K.E. and I. Hellstrom, *Cellular immunity against tumor antigens.* Adv Cancer Res, 1969. **12**: p. 167-223.
137. Melief, C.J., *Tumor eradication by adoptive transfer of cytotoxic T lymphocytes.* Adv Cancer Res, 1992. **58**: p. 143-75.
138. Greenberg, P.D., *Adoptive T cell therapy of tumors: mechanisms operative in the recognition and elimination of tumor cells.* Adv Immunol, 1991. **49**: p. 281-355.
139. Schoenberger SP, T.R., van d, V, Offringa R, Melief CJ, *T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions.* Nature, 1998(393): p. 480-483.
140. Guerder S, M.J., Flavell R, *The role of the T cell costimulator B7-1 in autoimmunity and the induction and maintenance of tolerance to peripheral antigen.* Immunity, 1994(1): p. 155-166.
141. Sharpe AH, F.G., *The B7-CD28 superfamily.* Nat.Rev.Immunol. , 2002(2): p. 116-126.
142. Watts, T., *TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses.* Annu.Rev.Immunol., 2005(23): p. 23-68.
143. Feuerer M, B.P., Garbi N, Mahnke Y, Limmer A, Hommel M, Hammerling GJ, Kyewski B, Hamann A, Umansky V, Schirmmacher V, *Bone marrow as a priming site for T-cell responses to blood-borne antigen.* Nat.Med., 2003(9): p. 1151-1157.
144. Medana IM, G.A., Oxenius A, Martinic MM, Wekerle H, Neumann H, *MHC class I-restricted killing of neurons by virus-specific CD8+ T lymphocytes is effected through the Fas/FasL, but not the perforin pathway.* Eur.J.Immunol., 2000(30): p. 3623-3633.
145. Boon T, v.d.B.P., *Human tumor antigens recognized by T lymphocytes.* J. Exp. Med., 1996(183): p. 725-729.
146. Old, L.J. and E.A. Boyse, *Immunology of Experimental Tumors.* Annu Rev Med, 1964. **15**: p. 167-86.
147. Klein, G., *Tumor antigens.* Annu Rev Microbiol, 1966. **20**: p. 223-52.
148. Khazaie, K., A. Bonertz, and P. Beckhove, *Current developments with peptide-based human tumor vaccines.* Curr Opin Oncol, 2009. **21**(6): p. 524-30.
149. Tsang, K.Y., et al., *Generation of human cytotoxic T cells specific for human carcinoembryonic antigen epitopes from patients immunized with recombinant vaccinia-CEA vaccine.* J Natl Cancer Inst, 1995. **87**(13): p. 982-90.
150. Kawashima, I., et al., *The multi-epitope approach for immunotherapy for cancer: identification of several CTL epitopes from various tumor-associated antigens expressed on solid epithelial tumors.* Hum Immunol, 1998. **59**(1): p. 1-14.
151. Alves, P.M., et al., *Immunogenicity of the carcinoembryonic antigen derived peptide 694 in HLA-A2 healthy donors and colorectal carcinoma patients.* Cancer Immunol Immunother, 2007. **56**(11): p. 1795-805.
152. Vigneron, N., et al., *A peptide derived from melanocytic protein gp100 and presented by HLA-B35 is recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on melanoma cells.* Tissue Antigens, 2005. **65**(2): p. 156-62.
153. Lennerz, V., et al., *The response of autologous T cells to a human melanoma is dominated by mutated neoantigens.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(44): p. 16013-8.

154. Godefroy, E., et al., *Identification of two Melan-A CD4+ T cell epitopes presented by frequently expressed MHC class II alleles*. Clin Immunol, 2006. **121**(1): p. 54-62.
155. Larrieu, P., et al., *A HLA-Cw\*0701 restricted Melan-A/MART1 epitope presented by melanoma tumor cells to CD8+ tumor infiltrating lymphocytes*. Cancer Immunol Immunother, 2008. **57**(5): p. 745-52.
156. Correale, P., et al., *In vitro generation of human cytotoxic T lymphocytes specific for peptides derived from prostate-specific antigen*. J Natl Cancer Inst, 1997. **89**(4): p. 293-300.
157. Andersen MH, P.L., Becker JC, Straten PT, *Identification of a cytotoxic T lymphocyte response to the apoptosis inhibitor protein survivin in cancer patients*. Cancer Res., 2001(61): p. 869-872.
158. Schmidt SM, S.K., Muller MR, Weck MM, Appel S, Kanz L, Grunebach F, Brossart P, *Survivin is a shared tumor-associated antigen expressed in a broad variety of malignancies and recognized by specific cytotoxic T cells*. Blood 2003(102): p. 571-576.
159. Schmitz M, D.P., Weigle B, Schmachtenberg F, Stevanovic S, Ockert D, Rammensee HG, Rieber EP, *Generation of survivin-specific CD8+ T effector cells by dendritic cells pulsed with protein or selected peptides*. Cancer Res., 2000(60): p. 4845-4849.
160. Schmidt, S.M., et al., *Induction of adipophilin-specific cytotoxic T lymphocytes using a novel HLA-A2-binding peptide that mediates tumor cell lysis*. Cancer Res, 2004. **64**(3): p. 1164-70.
161. Schmitz, M., et al., *Generation of survivin-specific CD8+ T effector cells by dendritic cells pulsed with protein or selected peptides*. Cancer Res, 2000. **60**(17): p. 4845-9.
162. Schmidt, S.M., et al., *Survivin is a shared tumor-associated antigen expressed in a broad variety of malignancies and recognized by specific cytotoxic T cells*. Blood, 2003. **102**(2): p. 571-6.
163. Azuma, K., et al., *Mutated p53 gene encodes a nonmutated epitope recognized by HLA-B\*4601-restricted and tumor cell-reactive CTLs at tumor site*. Cancer Res, 2003. **63**(4): p. 854-8.
164. Barfoed, A.M., et al., *Cytotoxic T-lymphocyte clones, established by stimulation with the HLA-A2 binding p5365-73 wild type peptide loaded on dendritic cells In vitro, specifically recognize and lyse HLA-A2 tumour cells overexpressing the p53 protein*. Scand J Immunol, 2000. **51**(2): p. 128-33.
165. Fujita, H., et al., *Evidence that HLA class II-restricted human CD4+ T cells specific to p53 self peptides respond to p53 proteins of both wild and mutant forms*. Eur J Immunol, 1998. **28**(1): p. 305-16.
166. Petermann F., e.a., *Entwicklungswissenschaft*. 2003: Springer.
167. Smith, C. and V. Cerundolo, *Immunotherapy of melanoma*. Immunology, 2001. **104**(1): p. 1-7.
168. Jager, E., et al., *Simultaneous humoral and cellular immune response against cancer-testis antigen NY-ESO-1: definition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2-binding peptide epitopes*. J Exp Med, 1998. **187**(2): p. 265-70.
169. Traversari, C., et al., *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): p. 1453-7.
170. Wang, X.F., et al., *Selective identification of HLA-DP4 binding T cell epitopes encoded by the MAGE-A gene family*. Cancer Immunol Immunother, 2007. **56**(6): p. 807-18.
171. Gjertsen MK, B.J., Saeterdal I, Myklebust J, Gaudernack G, *Cytotoxic CD4+ and CD8+ T lymphocytes, generated by mutant p21-ras (12Val) peptide vaccination of a patient, recognize 12Val-dependent nested epitopes present within the vaccine peptide*

- and kill autologous tumour cells carrying this mutation. Int.J.Cancer, 1997(72): p. 784-790.*
172. Linard B, B.S., Benlalam H, Labarriere N, Guilloux Y, Diez E, Jotereau F, *A ras-mutated peptide targeted by CTL infiltrating a human melanoma lesion. J.Immunol., 2002(168): p. 4802-4808.*
173. Gedde-Dahl T, I., Spurkland A, Eriksen JA, Thorsby E, Gaudernack G, *Memory T cells of a patient with follicular thyroid carcinoma recognize peptides derived from mutated p21 ras (Gln-->Leu61). Int.Immunol., 1992(4): p. 1331-1337.*
174. Yotnda P, F.H., Garcia-Pons F, Garcia Z, Gourru G, Vernant JP, Lemonnier FA, Leblond V, Langlade-Demoyen P, *Cytotoxic T cell response against the chimeric p210 BCR-ABL protein in patients with chronic myelogenous leukemia. J.Clin.Invest, 1998(101): p. 2290-2296.*
175. ten Bosch GJ, T.A., Friede T, Melief CJ, Leeksa OC, *Recognition of peptides corresponding to the joining region of p210BCR-ABL protein by human T cells. Leukemia 1995(9): p. 1344-1348.*
176. Norbury LC, C.R., Christmas SE, *b3a2 BCR-ABL fusion peptides as targets for cytotoxic T cells in chronic myeloid leukaemia. Br.J.Haematol., 2000(109): p. 616-621.*
177. Khong HT, R.S., *Pre-existing immunity to tyrosinase-related protein (TRP)-2, a new TRP-2 isoform, and the NY-ESO-1 melanoma antigen in a patient with a dramatic response to immunotherapy. J.Immunol., 2002(168): p. 951-956.*
178. Hanada K, Y.J., Yang JC, *Immune recognition of a human renal cancer antigen through post-translational protein splicing. Nature 2004(427): p. 252-256.*
179. Vigneron N, S.V., Chapiro J, Ooms A, Degiovanni G, Morel S, van der BP, Boon T, Van den Eynde BJ, *An antigenic peptide produced by peptide splicing in the proteasome. Science, 2004(304): p. 587-590.*
180. Skipper JC, H.R., Gulden PH, Brichard V, Van PA, Chen Y, Shabanowitz J, Wolfel T, Slingluff CL, Jr., Boon T, Hunt DF, Engelhard VH, *An HLA-A2-restricted tyrosinase antigen on melanoma cells results from posttranslational modification and suggests a novel pathway for processing of membrane proteins. J.Exp.Med., 1996(183): p. 527-534.*
181. Vlad AM, M.S., Cudic M, Paulsen H, Otvos L, Jr., Hanisch FG, Finn OJ, *Complex carbohydrates are not removed during processing of glycoproteins by dendritic cells: processing of tumor antigen MUC1 glycopeptides for presentation to major histocompatibility complex class II-restricted T cells. J.Exp.Med., 2002(196): p. 1435-1446.*
182. Yotnda, P., et al., *Cytotoxic T cell response against the chimeric p210 BCR-ABL protein in patients with chronic myelogenous leukemia. J Clin Invest, 1998. 101(10): p. 2290-6.*
183. Bosch, G.J., et al., *Recognition of BCR-ABL positive leukemic blasts by human CD4+ T cells elicited by primary in vitro immunization with a BCR-ABL breakpoint peptide. Blood, 1996. 88(9): p. 3522-7.*
184. Makita, M., et al., *Leukemia-associated fusion proteins, dek-can and bcr-abl, represent immunogenic HLA-DR-restricted epitopes recognized by fusion peptide-specific CD4+ T lymphocytes. Leukemia, 2002. 16(12): p. 2400-7.*
185. Hausen, H.z., *Proliferation-inducing viruses in non-permissive systems as possible causes of human cancers. Lancet 2001(357): p. 381-384.*
186. zur Hausen, H., de Villiers, E. M., *Virus target cell conditioning model to explain some epidemiologic characteristics of childhood leukemias and lymphomas. Int. J. Cancer, 2005. 115 (1).*
187. Tarpey I, S.S., Hickling J, Birley HD, Renton A, McIndoe A, Davies DH, *Human cytotoxic T lymphocytes stimulated by endogenously processed human papillomavirus*

- type 11 E7 recognize a peptide containing a HLA-A2 (A\*0201) motif. Immunology, 1994(81): p. 222-227.*
188. Konya J, D.J., *Immunity to oncogenic human papillomaviruses. Adv.Cancer Res., 2001(82): p. 205-238.*
  189. Gordan, J.D. and R.H. Vonderheide, *Universal tumor antigens as targets for immunotherapy. Cytotherapy, 2002. 4(4): p. 317-27.*
  190. Kawakami, Y., et al., *Identification of the immunodominant peptides of the MART-1 human melanoma antigen recognized by the majority of HLA-A2-restricted tumor infiltrating lymphocytes. J Exp Med, 1994. 180(1): p. 347-52.*
  191. Sahin, U., O. Tureci, and M. Pfreundschuh, *Serological identification of human tumor antigens. Curr Opin Immunol, 1997. 9(5): p. 709-16.*
  192. Tureci O, S.U., Pfreundschuh M., *Serological analysis of human tumor antigens: molecular definition and implications. Mol Med Today, 1997. 3(8): p. 342-349.*
  193. Chen YT, G.A., Scanlan MJ, *Serological analysis of expression cDNA libraries (SEREX): an immunoscreening technique for identifying immunogenic tumor antigens. Methods Mol Med, 2005(103): p. 207-216.*
  194. Chen G, Z.W., Cao X, Li F, Liu X, Yao L, *Serological identification of immunogenic antigens in acute monocytic leukemia. Leuk. Res., 2005. 29(5): p. 503-509.*
  195. Weinschenk, T., et al., *Integrated functional genomics approach for the design of patient-individual antitumor vaccines. Cancer Res, 2002. 62(20): p. 5818-27.*
  196. Celis E, T.V., Crimi C, DeMars R, Wentworth PA, Chesnut RW, Grey HM, Sette A, Serra HM, *Induction of anti-tumor cytotoxic T lymphocytes in normal humans using primary cultures and synthetic peptide epitopes. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 1994(91): p. 2105-2109.*
  197. Parker KC, B.M., Coligan JE, *Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains. J.Immunol., 1994(152): p. 163-175.*
  198. Rammensee H, B.J., Emmerich NP, Bachor OA, Stevanovic S, *SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. Immunogenetics, 1999(50): p. 213-219.*
  199. von MM, A.G., Weiner LM, *Monoclonal antibody therapy for cancer. Annu.Rev.Med., 2003(54): p. 343-369.*
  200. Jones PT, D.P., Foote J, Neuberger MS, Winter G, *Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. Nature 1986(321): p. 522-525.*
  201. Queen C, S.W., Selick HE, Payne PW, Landolfi NF, Duncan JF, Avdalovic NM, Levitt M, Junghans RP, Waldmann TA, *A humanized antibody that binds to the interleukin 2 receptor. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 1989(86): p. 10029-10033.*
  202. McLaughlin P, G.-L.A., Link BK, Levy R, Czuczman MS, Williams ME, Heyman MR, ce-Bruckler I, White CA, Cabanillas F, Jain V, Ho AD, Lister J, Wey K, Shen D, Dallaire BK, *Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. J.Clin.Oncol., 1998(16): p. 2825-2833.*
  203. Maloney, D.G., et al., *Phase I clinical trial using escalating single-dose infusion of chimeric anti-CD20 monoclonal antibody (IDEC-C2B8) in patients with recurrent B-cell lymphoma. Blood, 1994. 84(8): p. 2457-66.*
  204. Slamon DJ, L.-J.B., Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L, *Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. N.Engl.J.Med., 2001(344): p. 783-792.*
  205. Baselga J, N.L., Albanell J, Kim YM, Mendelsohn J, *Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin) enhances the antitumor activity of paclitaxel and*

- doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts. Cancer Res.*, 1998(58): p. 2825-283.
206. Press OW, E.J., Appelbaum FR, Martin PJ, Nelp WB, Glenn S, Fisher DR, Porter B, Matthews DC, Gooley T, *Phase II trial of 131I-B1 (anti-CD20) antibody therapy with autologous stem cell transplantation for relapsed B cell lymphomas. Lancet* 1995(346): p. 336-340.
207. Waldmann TA, W.J., Carrasquillo JA, Reynolds JC, Paik CH, Gansow OA, Brechbiel MW, Jaffe ES, Fleisher TA, Goldman CK, Top LE, Bamford R, Zaknoen E, Roessler E, Kasten-Sportes C, England R, Litou H, Johnson JA, Jackson-White T, Manns A, Hanchard B, Junghans RP, Nelson DL, *Radioimmunotherapy of interleukin-2R alpha-expressing adult T-cell leukemia with Yttrium-90-labeled anti-Tac. Blood* 1995(86): p. 4063-4075.
208. Kreitman RJ, W.W., Robbins D, Margulies I, Stetler-Stevenson M, Waldmann TA, Pastan I, *Responses in refractory hairy cell leukemia to a recombinant immunotoxin. Blood* 1999(94): p. 3340-3348.
209. Grosse-Hovest L, M.S., Minoia R, Wolf E, Zakhartchenko V, Wenigerkind H, Lassnig C, Besenfelder U, Muller M, Lytton SD, Jung G, Brem G, *Cloned transgenic farm animals produce a bispecific antibody for T cell-mediated tumor cell killing. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 2004(101): p. 6858-6863.
210. Timmerman JM, C.D., Davis TA, Hsu FJ, Benike C, Hao ZM, Taidi B, Rajapaksa R, Caspar CB, Okada CY, van BA, Liles TM, Engleman EG, Levy R, *Idiotype-pulsed dendritic cell vaccination for B-cell lymphoma: clinical and immune responses in 35 patients. Blood* 2002(99): p. 1517-1526.
211. Geiger TL, J.M., *Development and application of receptor-modified T lymphocytes for adoptive immunotherapy. Transfus.Med.Rev.*, 2001(15): p. 21-34.
212. Brentjens RJ, L.J., Santos E, Marti F, Gong MC, Lyddane C, King PD, Larson S, Weiss M, Riviere I, Sadelain M, *Eradication of systemic B-cell tumors by genetically targeted human T lymphocytes co-stimulated by CD80 and interleukin-15. Nat.Med.*, 2003(9): p. 279-286.
213. Figlin RA, T.J., Bukowski RM, Vogelzang NJ, Novick AC, Lange P, *Multicenter, randomized, phase III trial of CD8(+) tumor-infiltrating lymphocytes in combination with recombinant interleukin-2 in metastatic renal cell carcinoma. J. Clin. Oncol.*, 1999. 17(8): p. 2521-2529.
214. Dudley ME, W.J., Robbins PF, Yang JC, Hwu P, Schwartzentruber DJ, Topalian SL, Sherry R, Restifo NP, Hubicki AM, Robinson MR, Raffeld M, Duray P, Seipp CA, Rogers-Freezer L, Morton KE, Mavroukakis SA, White DE, Rosenberg SA, *Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. Science* 2002(298): p. 850-854.
215. Sadelain M, R.I., Brentjens R, *Targeting tumours with genetically enhanced T lymphocytes. Nat.Rev.Cancer*, 2003(3): p. 35-45.
216. Missiou, A., *Generierung von Epitopen auf Nierenzellkarzinomen und anschließende Generierung von CD8+ T-Zellen*, in *Interfakultären Institut für Zellbiologie der Universität Tübingen, Abteilung Immunologie*. 2007, Universität Tübingen: Tübingen. p. 155.
217. Dranoff G, J.E., Lazenby A, Golumbek P, Levitsky H, Brose K, Jackson V, Hamada H, Pardoll D, Mulligan RC, *Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 1993(90): p. 3539-3543.
218. Chiodoni C, P.P., Stoppacciaro A, Rodolfo M, Parenza M, Colombo MP, *Dendritic cells infiltrating tumors cotransduced with granulocyte/macrophage colony-*



- stimulating factor (GM-CSF) and CD40 ligand genes take up and present endogenous tumor-associated antigens, and prime naive mice for a cytotoxic T lymphocyte response.* J.Exp.Med., 1999(190): p. 125-133.
219. Gajewski TF, F.F., Ashikari A, Sherman M, *Immunization of HLA-A2+ melanoma patients with MAGE-3 or MelanA peptide-pulsed autologous peripheral blood mononuclear cells plus recombinant human interleukin 12.* Clin.Cancer Res., 2001(7): p. 895s-901s.
220. Cao, X., et al., *Interleukin 12 stimulates IFN-gamma-mediated inhibition of tumor-induced regulatory T-cell proliferation and enhances tumor clearance.* Cancer Res, 2009. **69**(22): p. 8700-9.
221. Waldmann TA, D.S., Tagaya Y, *Contrasting roles of IL-2 and IL-15 in the life and death of lymphocytes: implications for immunotherapy.* Immunity., 2001(14): p. 105-110.
222. Kirkwood JM, I.J., Sosman JA, Sondak VK, Agarwala SS, Ernstoff MS, Rao U, *High-dose interferon alfa-2b significantly prolongs relapse-free and overall survival compared with the GM2-KLH/QS-21 vaccine in patients with resected stage IIB-III melanoma: results of intergroup trial E1694/S9512/C509801.* J.Clin.Oncol., 2001(19): p. 2370-2380.
223. Kirkwood JM, I.J., Lawson DH, Atkins MB, Agarwala SS, Collins K, Mascari R, Morrissey DM, Chapman PB, *High-dose interferon alfa-2b does not diminish antibody response to GM2 vaccination in patients with resected melanoma: results of the Multicenter Eastern Cooperative Oncology Group Phase II Trial E2696.* J.Clin.Oncol., 2001(19): p. 1430-1436.
224. Agarwala SS, K.J., *Update on the role of adjuvant interferon for high risk melanoma.* Forum (Genova.), 2000(10): p. 230-239.
225. Pizzocaro G, P.L., Colavita M, Ferri S, Artusi R, Boracchi P, Parmiani G, Marubini E, *Interferon adjuvant to radical nephrectomy in Robson stages II and III renal cell carcinoma: a multicentric randomized study.* J.Clin.Oncol., 2001(19): p. 425-431.
226. Gong J, C.D., Kashiwaba M, Kufe D, *Induction of antitumor activity by immunization with fusions of dendritic and carcinoma cells.* Nat.Med., 1997(3): p. 558-561.
227. Lambert LA, G.G., Maloney M, Barth Jr RJ, *Equipotent Generation of Protective Antitumor Immunity by Various Methods of Dendritic Cell Loading With Whole Cell Tumor Antigens.* J.Immunother., 2001(24): p. 232-236.
228. Paglia P, C.C., Rodolfo M, Colombo MP, *Murine dendritic cells loaded in vitro with soluble protein prime cytotoxic T lymphocytes against tumor antigen in vivo.* J.Exp.Med., 1996(183): p. 317-322.
229. Hsu FJ, B.C., Fagnoni F, Liles TM, Czerwinski D, Taidi B, Engleman EG, Levy R, *Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells.* Nat.Med., 1996(2): p. 52-58.
230. Nestle FO, A.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): p. 328-332.
231. Mayordomo JJ, Z.T., Storkus WJ, Zitvogel L, Celluzzi C, Falo LD, Melief CJ, Ildstad ST, Kast WM, Deleo AB, *Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with synthetic tumour peptides elicit protective and therapeutic antitumour immunity.* Nat.Med., 1995(1): p. 1297-1302.
232. Shimizu K, T.E., Giedlin M, Mule JJ, *Enhancement of tumor lysate- and peptide-pulsed dendritic cell-based vaccines by the addition of foreign helper protein.* Cancer Res., 2001(61): p. 2618-2624.

233. Porgador A, G.E., *Bone marrow-generated dendritic cells pulsed with a class I-restricted peptide are potent inducers of cytotoxic T lymphocytes.* J.Exp.Med., 1995(182): p. 255-260.
234. Klein C, B.H., Mulligan RC, *Comparative analysis of genetically modified dendritic cells and tumor cells as therapeutic cancer vaccines.* J.Exp.Med., 2000(191): p. 1699-1708.
235. Dyall J, L.J., Schnell S, Sadelain M, *Lentivirus-transduced human monocyte-derived dendritic cells efficiently stimulate antigen-specific cytotoxic T lymphocytes.* Blood 2001(97): p. 114-121.
236. Song W, K.H., Carpenter H, Torii H, Granstein R, Rafii S, Moore MA, Crystal RG, *Dendritic cells genetically modified with an adenovirus vector encoding the cDNA for a model antigen induce protective and therapeutic antitumor immunity.* J.Exp.Med., 1997(186): p. 1247-1256.
237. Specht JM, W.G., Do MT, Lam JS, Royal RE, Reeves ME, Rosenberg SA, Hwu P, *Dendritic cells retrovirally transduced with a model antigen gene are therapeutically effective against established pulmonary metastases.* J.Exp.Med., 1997(186): p. 1213-1221.
238. Boczkowski D, N.S., Snyder D, Gilboa E, *Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells in vitro and in vivo.* J.Exp.Med., 1996(184): p. 465-472.
239. Tao MH, L.R., *Idiotypic/granulocyte-macrophage colony-stimulating factor fusion protein as a vaccine for B-cell lymphoma.* Nature 1993(362): p. 755-758.
240. Boyle JS, B.J., Lew AM, *Enhanced responses to a DNA vaccine encoding a fusion antigen that is directed to sites of immune induction.* Nature, 1998(392): p. 408-411.
241. You Z, H.X., Hester J, Toh HC, Chen SY, *Targeting dendritic cells to enhance DNA vaccine potency.* Cancer Res., 2001(61): p. 3704-3711.
242. Srivastava, P., *Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity.* Nat.Rev.Immunol., 2002(2): p. 185-194.
243. Pardoll, D., *Spinning molecular immunology into successful immunotherapy.* Nat.Rev.Immunol., 2002(2): p. 227-238.
244. Slansky JE, R.F., Boyd LF, Fahmy T, Jaffee EM, Schneck JP, Margulies DH, Pardoll DM, *Enhanced antigen-specific antitumor immunity with altered peptide ligands that stabilize the MHC-peptide-TCR complex.* Immunity, 2000(13): p. 529-538.
245. Carroll MW, O.W., Chamberlain RS, Rosenberg SA, Moss B, Restifo NP, *Highly attenuated modified vaccinia virus Ankara (MVA) as an effective recombinant vector: a murine tumor model Vaccine.* 1997(15): p. 387-394.
246. Sizemore DR, B.A., Sadoff JC, *Attenuated Shigella as a DNA delivery vehicle for DNA-mediated immunization.* Science 1995(270): p. 299-302.
247. Karanikas V, L.C., Colau D, van BN, De SC, Lethe B, Connerotte T, Corbiere V, Demoitie MA, Lienard D, Dreno B, Velu T, Boon T, Coulie PG, *Monoclonal anti-MAGE-3 CTL responses in melanoma patients displaying tumor regression after vaccination with a recombinant canarypox virus.* J.Immunol., 2003(171): p. 4898-4904.
248. Marrack P, M.T., Bender J, Hildeman D, Kedl R, Teague K, Kappler J, *T-cell survival.* Immunol.Rev., 1998(165): p. 279-285.
249. Sprent J, Z.X., Sun S, Tough D, *T-cell turnover in vivo and the role of cytokines.* Immunol.Lett., 1999(65): p. 21-25.
250. Kwon B, L.H., Kwon BS, *New insights into the role of 4-1BB in immune responses: beyond CD8+ T cells.* Trends Immunol., 2002(23): p. 378-380.
251. Weinberg AD, V.A., Croft M, *OX-40: life beyond the effector T cell stage.* Semin.Immunol., 1998(10): p. 471-480.

252. Hendriks J, G.L., Tesselaar K, van Lier RA, Schumacher TN, Borst J, *CD27 is required for generation and long-term maintenance of T cell immunity*. Nat.Immunol., 2000(1): p. 433-440.
253. van EA, S.R., Hurwitz AA, Ziskin J, Villasenor J, Medema JP, Overwijk WW, Restifo NP, Melief CJ, Offringa R, Allison JP, *Elucidating the autoimmune and antitumor effector mechanisms of a treatment based on cytotoxic T lymphocyte antigen-4 blockade in combination with a B16 melanoma vaccine: comparison of prophylaxis and therapy*. J.Exp.Med., 2001(194): p. 481-489.
254. Hodi FS, M.M., Soiffer RJ, Haluska FG, Butler M, Seiden MV, Davis T, Henry-Spires R, MacRae S, Willman A, Padera R, Jaklitsch MT, Shankar S, Chen TC, Korman A, Allison JP, Dranoff G, *Biologic activity of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 antibody blockade in previously vaccinated metastatic melanoma and ovarian carcinoma patients*. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 2003(100): p. 4712-4717.
255. Suttmuller RP, v.D.L., van EA, Schumacher TN, Wildenberg ME, Allison JP, Toes RE, Offringa R, Melief CJ, *Synergism of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and depletion of CD25(+) regulatory T cells in antitumor therapy reveals alternative pathways for suppression of autoreactive cytotoxic T lymphocyte responses*. J.Exp.Med., 2001(194): p. 823-832.
256. Sentman CL, B.M., Barber A, Zhang T, *NK cell receptors as tools in cancer immunotherapy*. Adv.Cancer Res., 2006(95): p. 249-292.
257. Rosenberg SA, Y.J., Restifo NP, *Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines*. Nat.Med., 2004(10): p. 909-915.
258. Bühling K.J., L.J., Witt K., *Allgemeine und spezielle Pathologie*. 2 ed. 2000, München, Jena: Urban&Fischer.
259. Jemal, A., et al., *Cancer statistics, 2005*. CA Cancer J Clin, 2005. **55**(1): p. 10-30.
260. Rathmell, W.K. and P.A. Godley, *Renal cell carcinoma*. Curr Opin Oncol, 2004. **16**(3): p. 247-52.
261. Chow WH, D.S., Warren JL, Fraumeni JF, Jr, *Rising incidence of renal cell cancer in the United States*. JAMA 1999(281): p. 1628-1631.
262. Jayson M, S.H., *Increased incidence of serendipitously discovered renal cell carcinoma*. Urology, 1998(51): p. 203-205.
263. Theis, R.P., et al., *Smoking, environmental tobacco smoke, and risk of renal cell cancer: a population-based case-control study*. BMC Cancer, 2008. **8**: p. 387.
264. Klinghoffer, Z., et al., *Obesity and renal cell carcinoma: epidemiology, underlying mechanisms and management considerations*. Expert Rev Anticancer Ther, 2009. **9**(7): p. 975-87.
265. Pavlovich CP, S.L., *Searching for the hereditary causes of renal-cell carcinoma*. Nat.Rev.Cancer, 2004(4): p. 381-393.
266. Cohen AJ, L.F., Berg S, Marchetto DJ, Tsai S, Jacobs SC, Brown RS, *Hereditary renal-cell carcinoma associated with a chromosomal translocation*. N.Engl.J.Med., 1979(301): p. 592-595.
267. Robson, C., *Radical nephrectomy for renal cell carcinoma*. J. Urol., 1963(89): p. 37-42.
268. Robson CJ, C.B., Anderson W, *The results of radical nephrectomy for renal cell carcinoma*. J. Urol., 1969. **167**(2 Pt 2): p. 873-875.
269. Fergany AF, H.K., Novick AC, *Long-term results of nephron sparing surgery for localized renal cell carcinoma: 10-year followup*. J. Urol., 2000. **163**(2): p. 442-445.
270. Licht MR, N.A., *Nephron sparing surgery for renal cell carcinoma*. J. Urol., 1993. **149**(1): p. 1-7.

271. Steinbach F, S.M., Muller SC, Thuroff JW, Melchior SW, Stein R, *Conservative surgery of renal cell tumors in 140 patients: 21 years of experience.* J. Urol., 1992. **148**(1): p. 24-29.
272. Tsui KH, S.O., Barbaric Z, Figlin R, de Kernion JB, Beldegrun A, *Is adrenalectomy a necessary component of radical nephrectomy? UCLA experience with 511 radical nephrectomies.* J. Urol., 2000. **163**(2): p. 437-441.
273. Yagoda A, A.-R.B., Petrylak D, *Chemotherapy for advanced renal-cell carcinoma: 1983-1993.* Semin. Oncol., 1995. **22**(1): p. 42-60.
274. Soignet SL, F.S., Douer D, Tallman MS, Kantarjian H, Calleja E, *United States multicenter study of arsenic trioxide in relapsed acute promyelocytic leukemia.* J. Clin. Oncol., 2001. **19**(18): p. 3852-3860.
275. Juusela H, M.K., Alftan O, Oravisto KJ, *Preoperative irradiation in the treatment of renal adenocarcinoma.* Scand J Urol Nephrol, 1977. **11**(3): p. 277-281.
276. Finney, R., *The value of radiotherapy in the treatment of hypernephroma--a clinical trial.* Br. J. Urol., 1973. **45**(3): p. 258-269.
277. Kjaer M, F.P., Engelholm SA, *Postoperative radiotherapy in stage II and III renal adenocarcinoma. A randomized trial by the Copenhagen Renal Cancer Study Group.* Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1987. **13**(5): p. 665-672.
278. Werf-Messing B, v.d.H.R., Ledeboer RC., *Renal cell carcinoma trial.* Strahlentherapie [Sonderb], 1981(76): p. 169-175.
279. Plasswilm L, K.R., Hehr T, Bamberg M, *Therapieansätze beim Nierenzellkarzinom aus der Sicht der Strahlentherapie.* Onkologe, 2001(7): p. 759-766.
280. Hines-Peralta A, G.S., *Review of radiofrequency ablation for renal cell carcinoma.* Clin. Cancer Res., 2004. **10**(18 Pt 2): p. 6328S-6334S.
281. Simons JW, J.E., Weber CE, Levitsky HI, Nelson WG, Carducci MA, Lazenby AJ, Cohen LK, Finn CC, Clift SM, Hauda KM, Beck LA, Leiferman KM, Owens AH, Jr., Piantadosi S, Dranoff G, Mulligan RC, Pardoll DM, Marshall FF, *Bioactivity of autologous irradiated renal cell carcinoma vaccines generated by ex vivo granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene transfer.* Cancer Res., 1997(57): p. 1537-1546.
282. Barbuto JA, E.L., Neves AR, Bergami-Santos P, Leite KR, Marques R, Costa F, Martins SC, Camara-Lopes LH, Buzaid AC, *Dendritic cell-tumor cell hybrid vaccination for metastatic cancer.* Cancer Immunol.Immunother., 2004(53): p. 1111-1118.
283. Roigas J, M.G., *Nonmyeloablative allogeneic stem cell transplantation in metastatic renal cell carcinoma: a new therapeutic option or just a clinical experiment?* World J.Urol., 2005(23): p. 213-220.
284. Childs R, C.A., Contentin N, Bahceci E, Schrump D, Leitman S, Read EJ, Tisdale J, Dunbar C, Linehan WM, Young NS, Barrett AJ, *Regression of metastatic renal-cell carcinoma after nonmyeloablative allogeneic peripheral-blood stem-cell transplantation.* N.Engl.J.Med., 2000(343): p. 750-758.
285. Hernberg M, V.P., Bono P, Ahtinen H, Maenpaa H, joensuu H, *Interferon alfa-2b three times daily and thalidomide in the treatment of metastatic renal cell carcinoma.* J.Clin.Oncol., 2003(21): p. 3770-3776.
286. Bleumer I, K.A., Oosterwijk E, Hofmann R, Varga Z, Lamers C, Kruit W, Melchior S, Mala C, Ullrich S, De MP, Mulders PF, Beck J, *A phase II trial of chimeric monoclonal antibody G250 for advanced renal cell carcinoma patients.* Br.J.Cancer, 2004(90): p. 985-990.
287. Pietra G, R.C., Falco M, Vitale M, Castriconi R, Pende D, Millo E, Anfossi S, Biassoni R, Moretta L, Mingari MC, *The analysis of the natural killer-like activity of*

- human cytolytic T lymphocytes revealed HLA-E as a novel target for TCR alpha/beta-mediated recognition.* Eur.J.Immunol., 2001(31): p. 3687-3693.
288. Yang JC, H.L., Sherry RM, Hwu P, Schwartzentruber DJ, Topalian SL, Steinberg SM, Chen HX, Rosenberg SA, *A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer.* N.Engl.J.Med., 2003(349): p. 427-434.
289. Yang, J., *Bevacizumab for patients with metastatic renal cancer: an update.* Clin.Cancer Res., 2004(10): p. 6367S-6370S.
290. Braunwald, E., Fauci, Anthony S., Harrison, Tinsley Randolph, Kasper, Dennis L, *Principles of internal medicine.* 16th ed. 2005, New York: McGraw-Hill.
291. Janssen EM, L.E., Wolfe T, Christen U, von Herrath MG, Schoenberger SP, *CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes.* Nature, 2003(421): p. 852-856.
292. Brossart, P., *Dendritic cells in vaccination therapies of malignant diseases.* Transfus Apher Sci, 2002. **27**(2): p. 183-6.
293. Kubler, H. and J. Vieweg, *Vaccines in renal cell carcinoma.* Semin Oncol, 2006. **33**(5): p. 614-24.
294. Wierecky, J., et al., *Immunologic and clinical responses after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells in metastatic renal cancer patients.* Cancer Res, 2006. **66**(11): p. 5910-8.
295. Dengjel, J., et al., *Unexpected abundance of HLA class II presented peptides in primary renal cell carcinomas.* Clin Cancer Res, 2006. **12**(14 Pt 1): p. 4163-70.
296. Mach, B., et al., *Regulation of MHC class II genes: lessons from a disease.* Annu Rev Immunol, 1996. **14**: p. 301-31.
297. Durand, B., et al., *Functional complementation of major histocompatibility complex class II regulatory mutants by the purified X-box-binding protein RFX.* Mol Cell Biol, 1994. **14**(10): p. 6839-47.
298. Herrero Sanchez, C., et al., *The DNA-binding defect observed in major histocompatibility complex class II regulatory mutants concerns only one member of a family of complexes binding to the X boxes of class II promoters.* Mol Cell Biol, 1992. **12**(9): p. 4076-83.
299. Stimac, E., et al., *Defective HLA DRA X box binding in the class II transactivator transcription factor mutant 6.1.6 and in cell lines from class II immunodeficient patients.* J Immunol, 1991. **146**(12): p. 4398-405.
300. Hasegawa, S.L., et al., *Protease treatment of nuclear extracts distinguishes between class II MHC X1 box DNA-binding proteins in wild-type and class II-deficient B cells.* J Immunol, 1993. **150**(5): p. 1781-93.
301. Ostrand-Rosenberg, S., *Tumor immunotherapy: the tumor cell as an antigen-presenting cell.* Curr Opin Immunol, 1994. **6**(5): p. 722-7.
302. Ross, M.J., et al., *Role of ubiquitin-like protein FAT10 in epithelial apoptosis in renal disease.* J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(4): p. 996-1004.
303. Jemal, A., et al., *Cancer statistics, 2004.* CA Cancer J Clin, 2004. **54**(1): p. 8-29.
304. Fauci AS, B.E., Kasper DL et al., editors, *Bladder and renal cell carcinomas,* in *Harrison's principles of internal medicine.* 2008, McGraw-Hill Professional.
305. Chauv, P., et al., *Identification of MAGE-3 epitopes presented by HLA-DR molecules to CD4(+) T lymphocytes.* J Exp Med, 1999. **189**(5): p. 767-78.
306. LeibundGut-Landmann, S., et al., *Mini-review: Specificity and expression of CIITA, the master regulator of MHC class II genes.* Eur J Immunol, 2004. **34**(6): p. 1513-25.
307. Gastl, G., et al., *Major histocompatibility complex class I and class II expression in renal cell carcinoma and modulation by interferon gamma.* J Urol, 1996. **155**(1): p. 361-7.

308. Blay, J.Y., et al., *Role of interleukin-6 in the paraneoplastic inflammatory syndrome associated with renal-cell carcinoma*. Int J Cancer, 1997. **72**(3): p. 424-30.
309. Elsasser-Beile, U., et al., *Enhanced expression of IFN-gamma mRNA in CD4(+) or CD8(+) tumour-infiltrating lymphocytes compared to peripheral lymphocytes in patients with renal cell cancer*. Br J Cancer, 2000. **83**(5): p. 637-41.
310. Fan, W., et al., *Identification of seven new human MHC class I region genes around the HLA-F locus*. Immunogenetics, 1996. **44**(2): p. 97-103.
311. Ji, F., et al., *FAT10 level in human gastric cancer and its relation with mutant p53 level, lymph node metastasis and TNM staging*. World J Gastroenterol, 2009. **15**(18): p. 2228-33.
312. Bates, E.E., et al., *Identification and analysis of a novel member of the ubiquitin family expressed in dendritic cells and mature B cells*. Eur J Immunol, 1997. **27**(10): p. 2471-7.
313. Lukasiak, S., et al., *Proinflammatory cytokines cause FAT10 upregulation in cancers of liver and colon*. Oncogene, 2008. **27**(46): p. 6068-74.
314. Liu, Y.C., et al., *A MHC-encoded ubiquitin-like protein (FAT10) binds noncovalently to the spindle assembly checkpoint protein MAD2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(8): p. 4313-8.
315. Raasi, S., G. Schmidtke, and M. Groettrup, *The ubiquitin-like protein FAT10 forms covalent conjugates and induces apoptosis*. J Biol Chem, 2001. **276**(38): p. 35334-43.
316. Lee, C.G., et al., *Expression of the FAT10 gene is highly upregulated in hepatocellular carcinoma and other gastrointestinal and gynecological cancers*. Oncogene, 2003. **22**(17): p. 2592-603.
317. Tu, Z., et al., *I kappa B kinase is critical for TNF-alpha-induced VCAM1 gene expression in renal tubular epithelial cells*. J Immunol, 2001. **166**(11): p. 6839-46.
318. Oya, M., et al., *Constitutive activation of nuclear factor-kappaB prevents TRAIL-induced apoptosis in renal cancer cells*. Oncogene, 2001. **20**(29): p. 3888-96.
319. Oya, M., et al., *Increased nuclear factor-kappa B activation is related to the tumor development of renal cell carcinoma*. Carcinogenesis, 2003. **24**(3): p. 377-84.
320. Shioi, K., et al., *Vascular cell adhesion molecule 1 predicts cancer-free survival in clear cell renal carcinoma patients*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(24): p. 7339-46.
321. An, J. and M.B. Rettig, *Mechanism of von Hippel-Lindau protein-mediated suppression of nuclear factor kappa B activity*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(17): p. 7546-56.
322. Bemis, L., et al., *Distinct aerobic and hypoxic mechanisms of HIF-alpha regulation by CSN5*. Genes Dev, 2004. **18**(7): p. 739-44.
323. Wolf, D.A., C. Zhou, and S. Wee, *The COP9 signalosome: an assembly and maintenance platform for cullin ubiquitin ligases?* Nat Cell Biol, 2003. **5**(12): p. 1029-33.
324. Ku, J.H., et al., *Expression of hypoxia inducible factor-1alpha and 2alpha in conventional renal cell carcinoma with or without sarcomatoid differentiation*. Urol Oncol, 2009.
325. Ellen, T.P., et al., *NDRG1, a growth and cancer related gene: regulation of gene expression and function in normal and disease states*. Carcinogenesis, 2008. **29**(1): p. 2-8.
326. Kokame, K., H. Kato, and T. Miyata, *Homocysteine-respondent genes in vascular endothelial cells identified by differential display analysis. GRP78/BiP and novel genes*. J Biol Chem, 1996. **271**(47): p. 29659-65.
327. van Belzen, N., et al., *A novel gene which is up-regulated during colon epithelial cell differentiation and down-regulated in colorectal neoplasms*. Lab Invest, 1997. **77**(1): p. 85-92.

328. Zhou, D., K. Salnikow, and M. Costa, *Cap43, a novel gene specifically induced by Ni<sup>2+</sup> compounds*. *Cancer Res*, 1998. **58**(10): p. 2182-9.
329. Lachat, P., et al., *Expression of NDRG1, a differentiation-related gene, in human tissues*. *Histochem Cell Biol*, 2002. **118**(5): p. 399-408.
330. Kurdistani, S.K., et al., *Inhibition of tumor cell growth by RTP/rit42 and its responsiveness to p53 and DNA damage*. *Cancer Res*, 1998. **58**(19): p. 4439-44.
331. Cangul, H., et al., *Enhanced expression of a novel protein in human cancer cells: a potential aid to cancer diagnosis*. *Cell Biol Toxicol*, 2002. **18**(2): p. 87-96.
332. Stein, S., et al., *NDRG1 is necessary for p53-dependent apoptosis*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(47): p. 48930-40.
333. Rutherford, M.N., et al., *The leukemogenic transcription factor E2a-Pbx1 induces expression of the putative N-myc and p53 target gene NDRG1 in Ba/F3 cells*. *Leukemia*, 2001. **15**(3): p. 362-70.
334. Yu, J., et al., *Identification and classification of p53-regulated genes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(25): p. 14517-22.
335. Kim, K.T., et al., *Function of Drg1/Rit42 in p53-dependent mitotic spindle checkpoint*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(37): p. 38597-602.
336. Guan, R.J., et al., *Drg-1 as a differentiation-related, putative metastatic suppressor gene in human colon cancer*. *Cancer Res*, 2000. **60**(3): p. 749-55.
337. Bandyopadhyay, S., et al., *The Drg-1 gene suppresses tumor metastasis in prostate cancer*. *Cancer Res*, 2003. **63**(8): p. 1731-6.
338. Sijts, A., et al., *The role of the proteasome activator PA28 in MHC class I antigen processing*. *Mol Immunol*, 2002. **39**(3-4): p. 165-9.
339. Miyagi, T., et al., *Impaired expression of proteasome subunits and human leukocyte antigens class I in human colon cancer cells*. *J Gastroenterol Hepatol*, 2003. **18**(1): p. 32-40.
340. Wanschers, B., et al., *Rab6 family proteins interact with the dynein light chain protein DYNLRB1*. *Cell Motil Cytoskeleton*, 2008. **65**(3): p. 183-96.
341. Visvader, J.E., et al., *The LIM domain gene LMO4 inhibits differentiation of mammary epithelial cells in vitro and is overexpressed in breast cancer*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(25): p. 14452-7.
342. Kenny, D.A., et al., *Identification and characterization of LMO4, an LMO gene with a novel pattern of expression during embryogenesis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(19): p. 11257-62.
343. Sugihara, T.M., et al., *Mouse deformed epidermal autoregulatory factor 1 recruits a LIM domain factor, LMO-4, and CLIM coregulators*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(26): p. 15418-23.
344. Yu, J., et al., *LIM only 4 is overexpressed in late stage pancreas cancer*. *Mol Cancer*, 2008. **7**: p. 93.
345. Lu, Z., et al., *LMO4 can interact with Smad proteins and modulate transforming growth factor-beta signaling in epithelial cells*. *Oncogene*, 2006. **25**(20): p. 2920-30.
346. Winkler, G.S., *The mammalian anti-proliferative BTG/Tob protein family*. *J Cell Physiol*. **222**(1): p. 66-72.
347. Boiko, A.D., et al., *A systematic search for downstream mediators of tumor suppressor function of p53 reveals a major role of BTG2 in suppression of Ras-induced transformation*. *Genes Dev*, 2006. **20**(2): p. 236-52.
348. Suzuki, T., et al., *Phosphorylation of three regulatory serines of Tob by Erk1 and Erk2 is required for Ras-mediated cell proliferation and transformation*. *Genes Dev*, 2002. **16**(11): p. 1356-70.

349. Ficazzola, M.A., et al., *Antiproliferative B cell translocation gene 2 protein is down-regulated post-transcriptionally as an early event in prostate carcinogenesis*. *Carcinogenesis*, 2001. **22**(8): p. 1271-9.
350. Kawakubo, H., et al., *Loss of B-cell translocation gene-2 in estrogen receptor-positive breast carcinoma is associated with tumor grade and overexpression of cyclin d1 protein*. *Cancer Res*, 2006. **66**(14): p. 7075-82.
351. Struckmann, K., et al., *Impaired expression of the cell cycle regulator BTG2 is common in clear cell renal cell carcinoma*. *Cancer Res*, 2004. **64**(5): p. 1632-8.
352. Hall, P.A. and S.E. Russell, *The pathobiology of the septin gene family*. *J Pathol*, 2004. **204**(4): p. 489-505.
353. Kartmann, B. and D. Roth, *Novel roles for mammalian septins: from vesicle trafficking to oncogenesis*. *J Cell Sci*, 2001. **114**(Pt 5): p. 839-44.
354. Sorensen, A.B., et al., *Alternative splicing, expression, and gene structure of the septin-like putative proto-oncogene Sint1*. *Gene*, 2002. **285**(1-2): p. 79-89.
355. Sorensen, A.B., et al., *Sint1, a common integration site in SL3-3-induced T-cell lymphomas, harbors a putative proto-oncogene with homology to the septin gene family*. *J Virol*, 2000. **74**(5): p. 2161-8.
356. Kalikin, L.M., H.L. Sims, and E.M. Petty, *Genomic and expression analyses of alternatively spliced transcripts of the MLL septin-like fusion gene (MSF) that map to a 17q25 region of loss in breast and ovarian tumors*. *Genomics*, 2000. **63**(2): p. 165-72.
357. Russell, S.E., et al., *Isolation and mapping of a human septin gene to a region on chromosome 17q, commonly deleted in sporadic epithelial ovarian tumors*. *Cancer Res*, 2000. **60**(17): p. 4729-34.
358. Scott, M., et al., *Multimodality expression profiling shows SEPT9 to be overexpressed in a wide range of human tumours*. *Oncogene*, 2005. **24**(29): p. 4688-700.
359. Chacko, A.D., et al., *SEPT9\_v4 expression induces morphological change, increased motility and disturbed polarity*. *J Pathol*, 2005. **206**(4): p. 458-65.
360. Polo, S., S. Pece, and P.P. Di Fiore, *Endocytosis and cancer*. *Curr Opin Cell Biol*, 2004. **16**(2): p. 156-61.
361. Boucheix, C., et al., *Tetraspanins and malignancy*. *Expert Rev Mol Med*, 2001. **2001**: p. 1-17.
362. Boismenu, R., et al., *A role for CD81 in early T cell development*. *Science*, 1996. **271**(5246): p. 198-200.
363. Berditchevski, F., *Complexes of tetraspanins with integrins: more than meets the eye*. *J Cell Sci*, 2001. **114**(Pt 23): p. 4143-51.
364. Hirano, C., et al., *Tetraspanin gene expression levels as potential biomarkers for malignancy of gingival squamous cell carcinoma*. *Int J Cancer*, 2009. **124**(12): p. 2911-6.
365. Karamatic Crew, V., et al., *CD151, the first member of the tetraspanin (TM4) superfamily detected on erythrocytes, is essential for the correct assembly of human basement membranes in kidney and skin*. *Blood*, 2004. **104**(8): p. 2217-23.
366. Tannenbaum, M., *Ultrastructural pathology of human renal cell tumors*. *Pathol Annu*, 1971. **6**: p. 249-77.
367. Waalkes, M.P., et al., *Down-regulation of metallothionein expression in human and murine hepatocellular tumors: association with the tumor-necrotizing and antineoplastic effects of cadmium in mice*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1996. **277**(2): p. 1026-33.
368. Mididoddi, S., et al., *Isoform-specific expression of metallothionein mRNA in the developing and adult human kidney*. *Toxicol Lett*, 1996. **85**(1): p. 17-27.



369. Zhang, X.H. and I. Takenaka, *Incidence of apoptosis and metallothionein expression in renal cell carcinoma*. Br J Urol, 1998. **81**(1): p. 9-13.
370. Izawa, J.I., et al., *Metallothionein expression in renal cancer*. Urology, 1998. **52**(5): p. 767-72.
371. Yamasaki, M., et al., *Metallothionein is up-regulated under hypoxia and promotes the survival of human prostate cancer cells*. Oncol Rep, 2007. **18**(5): p. 1145-53.
372. Nguyen, A., et al., *In vivo gene expression profile analysis of metallothionein in renal cell carcinoma*. Cancer Lett, 2000. **160**(2): p. 133-40.
373. Zelger, B., et al., *Immunohistochemically demonstrated metallothionein expression in malignant melanoma*. Histopathology, 1993. **23**(3): p. 257-63.
374. Zhang, X.H., et al., *Immunohistochemical localization of metallothionein in human prostate cancer*. J Urol, 1996. **156**(5): p. 1679-81.
375. Bahnson, R.R., et al., *Immunohistochemical localization of metallothionein in transitional cell carcinoma of the bladder*. J Urol, 1991. **146**(6): p. 1518-20.
376. Yamasaki, Y., et al., *Metallothionein expression as prognostic factor for transitional cell carcinoma of bladder*. Urology, 2006. **67**(3): p. 530-5.
377. Bobarykina, A.Y., et al., *Hypoxic regulation of PFKFB-3 and PFKFB-4 gene expression in gastric and pancreatic cancer cell lines and expression of PFKFB genes in gastric cancers*. Acta Biochim Pol, 2006. **53**(4): p. 789-99.
378. Minchenko, O., et al., *Hypoxia induces transcription of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase-4 gene via hypoxia-inducible factor-1alpha activation*. FEBS Lett, 2004. **576**(1-2): p. 14-20.
379. Minchenko, O.H., et al., *Overexpression of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-4 in the human breast and colon malignant tumors*. Biochimie, 2005. **87**(11): p. 1005-10.
380. Brasaemle, D.L., et al., *Adipose differentiation-related protein is an ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated protein*. J Lipid Res, 1997. **38**(11): p. 2249-63.
381. Gao, J. and G. Serrero, *Adipose differentiation related protein (ADRP) expressed in transfected COS-7 cells selectively stimulates long chain fatty acid uptake*. J Biol Chem, 1999. **274**(24): p. 16825-30.
382. Frolov, A., et al., *High density lipoprotein-mediated cholesterol uptake and targeting to lipid droplets in intact L-cell fibroblasts. A single- and multiphoton fluorescence approach*. J Biol Chem, 2000. **275**(17): p. 12769-80.
383. Heid, H.W., et al., *Adipophilin is a specific marker of lipid accumulation in diverse cell types and diseases*. Cell Tissue Res, 1998. **294**(2): p. 309-21.
384. Saarikoski, S.T., S.P. Rivera, and O. Hankinson, *Mitogen-inducible gene 6 (MIG-6), adipophilin and tuftelin are inducible by hypoxia*. FEBS Lett, 2002. **530**(1-3): p. 186-90.
385. Yao, M., et al., *Gene expression analysis of renal carcinoma: adipose differentiation-related protein as a potential diagnostic and prognostic biomarker for clear-cell renal carcinoma*. J Pathol, 2005. **205**(3): p. 377-87.
386. Yao, M., et al., *Expression of adipose differentiation-related protein: a predictor of cancer-specific survival in clear cell renal carcinoma*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(1): p. 152-60.
387. Thoenes, W., S. Storkel, and H.J. Rumpelt, *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): p. 125-43.
388. Yokota, J., *Tumor progression and metastasis*. Carcinogenesis, 2000. **21**(3): p. 497-503.

389. Yuan, J., et al., *Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma have potent antitumor effect against human renal cell carcinoma*. *Urology*, 2005. **65**(3): p. 594-9.
390. Weigelt, B., et al., *Gene expression profiles of primary breast tumors maintained in distant metastases*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(26): p. 15901-5.
391. Stickel, J.S., et al., *HLA ligand profiles of primary renal cell carcinoma maintained in metastases*. *Cancer Immunol Immunother*, 2009. **58**(9): p. 1407-17.
392. Fairlie, W.D., et al., *MIC-1 is a novel TGF-beta superfamily cytokine associated with macrophage activation*. *J Leukoc Biol*, 1999. **65**(1): p. 2-5.
393. Selander, K.S., et al., *Serum macrophage inhibitory cytokine-1 concentrations correlate with the presence of prostate cancer bone metastases*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2007. **16**(3): p. 532-7.
394. Bauskin, A.R., et al., *Role of macrophage inhibitory cytokine-1 in tumorigenesis and diagnosis of cancer*. *Cancer Res*, 2006. **66**(10): p. 4983-6.
395. Xue, H., et al., *Identification of serum biomarkers for colorectal cancer metastasis using a differential secretome approach*. *J Proteome Res*. **9**(1): p. 545-55.
396. Baek, S.J., et al., *Cyclooxygenase inhibitors regulate the expression of a TGF-beta superfamily member that has proapoptotic and antitumorigenic activities*. *Mol Pharmacol*, 2001. **59**(4): p. 901-8.
397. Albertoni, M., et al., *Anoxia induces macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1) in glioblastoma cells independently of p53 and HIF-1*. *Oncogene*, 2002. **21**(27): p. 4212-9.
398. Li, P.X., et al., *Placental transforming growth factor-beta is a downstream mediator of the growth arrest and apoptotic response of tumor cells to DNA damage and p53 overexpression*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(26): p. 20127-35.
399. Karan, D., et al., *Dysregulated expression of MIC-1/PDF in human prostate tumor cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003. **305**(3): p. 598-604.
400. Lee, D.H., et al., *Macrophage inhibitory cytokine-1 induces the invasiveness of gastric cancer cells by up-regulating the urokinase-type plasminogen activator system*. *Cancer Res*, 2003. **63**(15): p. 4648-55.
401. Vicha, A., et al., *Malignant peripheral primitive neuroectodermal tumor of the kidney*. *Cancer Genet Cytogenet*, 2002. **139**(1): p. 67-70.
402. Leroy, X., et al., *Expression of human mucin genes in normal kidney and renal cell carcinoma*. *Histopathology*, 2002. **40**(5): p. 450-7.
403. Kraus, S., et al., *MUC1 mucin and trefoil factor 1 protein expression in renal cell carcinoma: correlation with prognosis*. *Hum Pathol*, 2002. **33**(1): p. 60-7.
404. Langner, C., et al., *Expression of MUC1 (EMA) and E-cadherin in renal cell carcinoma: a systematic immunohistochemical analysis of 188 cases*. *Mod Pathol*, 2004. **17**(2): p. 180-8.
405. Aubert, S., et al., *MUC1, a new hypoxia inducible factor target gene, is an actor in clear renal cell carcinoma tumor progression*. *Cancer Res*, 2009. **69**(14): p. 5707-15.
406. Kaelin, W.G., Jr., *The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein and clear cell renal carcinoma*. *Clin Cancer Res*, 2007. **13**(2 Pt 2): p. 680s-684s.
407. Leroy, X., et al., *MUC1 expression is correlated with nuclear grade and tumor progression in pT1 renal clear cell carcinoma*. *Am J Clin Pathol*, 2002. **118**(1): p. 47-51.
408. Taylor-Papadimitriou, J., et al., *MUC1 and the immunobiology of cancer*. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2002. **7**(2): p. 209-21.
409. Li, Y. and P.J. Cozzi, *MUC1 is a promising therapeutic target for prostate cancer therapy*. *Curr Cancer Drug Targets*, 2007. **7**(3): p. 259-71.

410. Liu, M., et al., *Gene-based vaccines and immunotherapeutics*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101 Suppl 2**: p. 14567-71.
411. Wierecky, J., M. Mueller, and P. Brossart, *Dendritic cell-based cancer immunotherapy targeting MUC-1*. Cancer Immunol Immunother, 2006. **55**(1): p. 63-7.
412. O'Neill, G.M., et al., *A new central scaffold for metastasis: parsing HEF1/CasL/NEDD9*. Cancer Res, 2007. **67**(19): p. 8975-9.
413. Pugacheva, E.N. and E.A. Golemis, *The focal adhesion scaffolding protein HEF1 regulates activation of the Aurora-A and Nek2 kinases at the centrosome*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(10): p. 937-46.
414. Dadke, D., et al., *Deregulation of HEF1 impairs M-phase progression by disrupting the RhoA activation cycle*. Mol Biol Cell, 2006. **17**(3): p. 1204-17.
415. Natarajan, M., et al., *HEF1 is a necessary and specific downstream effector of FAK that promotes the migration of glioblastoma cells*. Oncogene, 2006. **25**(12): p. 1721-32.
416. Kim, M., et al., *Comparative oncogenomics identifies NEDD9 as a melanoma metastasis gene*. Cell, 2006. **125**(7): p. 1269-81.
417. Takagi, S., et al., *Dendritic cells, T-cell infiltration, and Grp94 expression in cholangiocellular carcinoma*. Hum Pathol, 2004. **35**(7): p. 881-6.
418. Atkins, D., et al., *Down-regulation of HLA class I antigen processing molecules: an immune escape mechanism of renal cell carcinoma?* J Urol, 2004. **171**(2 Pt 1): p. 885-9.
419. Weinzierl, A.O., et al., *Distorted relation between mRNA copy number and corresponding major histocompatibility complex ligand density on the cell surface*. Mol Cell Proteomics, 2007. **6**(1): p. 102-13.
420. Richter, K.M. and R.H. Akin, *The cultivation of several genitourinary tract tumors*. Trans South Cent Sect Am Urol Assoc, 1957. **52**: p. 67-91.
421. Ebert, T. and N.H. Bander, *Kidney-derived cell lines*. Semin Urol, 1989. **7**(4): p. 247-51.
422. Ebert, T., et al., *Establishment and characterization of human renal cancer and normal kidney cell lines*. Cancer Res, 1990. **50**(17): p. 5531-6.
423. Mrksich, M., *Using self-assembled monolayers to model the extracellular matrix*. Acta Biomater, 2009. **5**(3): p. 832-41.
424. Robertus, J., W.R. Browne, and B.L. Feringa, *Dynamic control over cell adhesive properties using molecular-based surface engineering strategies*. Chem Soc Rev. **39**(1): p. 354-78.
425. Alberts B. , J.A., Lewis J., Raff M., Roberts K. and Walter P., *Molecular Biology of the Cell*. 2002, London: Garland Science.

## 9 Lebenslauf

## 10 Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die Arbeit selbständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.