

Aus dem Interfakultären Institut für Zellbiologie der Universität Tübingen
Abteilung Immunologie

**Kartierung des HLA-Ligandoms der akuten myeloischen Leukämie
zur Entwicklung einer therapeutischen Multipeptidvakzine**

Inaugural–Disseration
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Berlin, Anne Claudia

2018

Dekan: Professor Dr. med. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. S. Stevanovic
2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. A. Yazdi
3. Berichterstatter: Professor Dr. P. Brossart

Tag der Disputation: 25/04/2018

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis:..... III

Tabellenverzeichnis: V

Abkürzungsverzeichnis: VII

1 Einleitung 1

 1.1 *Zusammenspiel zwischen Tumorgenese und Immunsystem* 1

 1.2 *Immunologische Grundlagen*..... 2

 1.2.1 T-Lmphozyten 4

 1.2.2 Major Histokompatibilitätskomplex (MHC)/Humanes Leukozytenantigen (HLA) 6

 1.3 *Tumorantigene*..... 10

 1.4 *Krebsimmuntherapie*..... 14

 1.5 *Akute myeloische Leukämie (AML)* 17

 1.5.1 Ätiologie 18

 1.5.2 Pathogenese: 19

 1.5.3 Risikofaktoren: 21

 1.5.4 Klinik: 22

 1.5.5 Diagnostik 23

 1.5.6 Therapie 24

 1.5.7 Prognose: 33

 1.6 *Ziele der vorliegenden Arbeit* 34

2 Material und Methoden 36

 2.1 *Material* 36

 2.1.1 Reagenzien, Verbrauchsmaterial, Geräte 36

 2.1.2 Zusammensetzung von Puffern und Medien 39

 2.2 *Patienten- und Spendercharakteristiken* 40

Methoden 47

 2.2.1 Allgemeine, zellbiologische Methoden 47

 2.2.2 Quantifizierung der HLA-Oberflächenmolekülexpression 48

 2.2.3 Methoden zur qualitativen HLA-Ligandomanalyse 49

 2.2.4 Peptidsynthese 52

 2.2.5 Methoden der T-Zellkultivierung und funktionellen Charakterisierung 53

 2.2.6 Software und statistische Analyse 55

 2.2.7 Quantitative Bestimmung der WT-mRNA Expression 56

3 Ergebnisse 57

 3.1 *Quantitative HLA-Ligandomanalyse* 57

 3.2 *Qualitative HLA-Ligandomanalyse* 63

 3.2.1 LC-MS/MS basierte Identifikation natürlich präsentierter HLA-Klasse-I- & -II-Liganden maligner und benigner granulo- und monozytärer Zellen 63

 3.2.2 Vergleichende Analysen des HLA-Klasse-I-Ligandoms 67

 3.2.3 Identifikation natürlich präsentierter HLA-Klasse-I-Liganden etablierter AML-assoziierter Antigene 72

 3.2.4 Subgruppen-spezifischer Vergleich des HLA-Ligandoms von FLT3-ITD Mutationsträgern und FLT3-wildtypischen Patienten 78

 3.3 *Funktionelle T-Zell-Analysen zur orientierenden Charakterisierung des immunogenen Potentials exemplarisch ausgewählter HLA-Klasse-I-LiTAPs*..... 82

 3.4 *Qualitative HLA-Analyse des HLA-Klasse-II-Ligandoms* 92

 3.5 *Funktionelle T-Zell-Analysen zur orientierenden Charakterisierung des immunogenen Potentials exemplarisch ausgewählter HLA-Klasse-II-LiTAPs* 101

4	Diskussion	104
4.1	<i>Diskussion der HLA-Klasse-I-Ligandomanalyse</i>	105
4.1.1	Diskussion der Ergebnisse der quantitativen HLA-Ligandomanalyse.....	105
4.1.2	Diskussion der Ergebnisse qualitativen Ligandomanalyse.....	107
4.1.3	Diskussion der Ergebnisse der Analysen zum immunogenen Potential ausgewählter Peptide.....	115
4.2	<i>Diskussion der HLA-Klasse II-Ligandomanalysen</i>	121
4.3	<i>Auf dem Weg zur therapeutischen Anwendung und Ausblick</i>	123
4.3.1	Interaktion einer Zytostatikabehandlung mit dem Immunpeptidom.....	124
4.3.2	Kartierung des Immunopeptidom der Leukämie-Stammzellen.....	125
4.3.3	Neoantigene.....	127
4.3.4	Tumormikromilieu: Immunsuppression & -evasion.....	129
5	Zusammenfassung	134
6	Anhang	i
7	Literaturverzeichnis	iv
8	Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift	xxviii
9	Veröffentlichungen	xxix
10	Danksagung	xxx
11	Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1.1: Graphische, schematische Darstellung der Antigenbeladung von MHC-Klasse-I-Molekülen	9
Abbildung 1.2: Modellvorstellung der Entstehung und Regulation einer anti-Tumor-Antwort	14
Abbildung 3.1: Durchflusszytometrie-basierte Quantifizierungsergebnisse für Kalibrierungsbeads	58
Abbildung 3.2: FACS-basierte quantitative Analyse der HLA-Klasse-I &-II Molekülexpression/Zelle für maligne myeloische Vorläuferzellen sowie autologe benigne, ausgereifte granulo- und monozytäre Zellen für AML 18.	59
Abbildung 3.3: quantitative Analyse der HLA-Klasse-I-Oberflächenexpression für fünf AML-Patienten basierend auf der HLA-Klasse-I-Expression (W6/32 mAb) für AML-Blasten (CD34 ⁺) und autologe, benigne Zellen (CD15 ⁺)	60
Abbildung 3.4: quantitative Analyse der HLA-Klasse-II-Oberflächenexpression für fünf AML-Patienten basierend auf der HLA-Klasse-DR-Expression (L243 mAb) für AML-Blasten (CD34 ⁺) und autologe, benigne Zellen (CD15 ⁺)	61
Abbildung 3.5: Darstellung der mittleren HLA-Klasse-I-Expression (links) und HLA-Klasse-II-Expression (rechts) für CD34 ⁺ AML-Blasten im Vergleich CD15 ⁺ autologen, benignen Zellen	61
Abbildung 3.6: Vergleich der mittleren HLA-Klasse-I-Expression (links; W6/32mAb) und HLA-Klasse-II-Expression (rechts; L243mAb) von CD34 ⁺ AML-Blasten und benignen, hämatopoetischen Vorläuferzellen (CD34 ⁺ , CD38 ⁻) freiwilliger gesunder Spender	62
Abbildung 3.7: Visualisierung der Reproduzierbarkeit und Variationsbreite der einzelnen, angefertigten technischen Replikate der LC-MS/MS-Experimente	64
Abbildung 3.8: Anzahl verschiedener Einzelpeptididentifikationen und ihrer korrespondierenden Quellproteine aus der LC-MS/MS-Analyse für HLA-Klasse-I(W6/32) und -II(Tü39) von primären 15 AML-Proben	66
Abbildung 3.9: Ergebnisse der vergleichenden Analyse des Quellproteoms von 15 AML-Patienten, 30 gesunden PBMC- und sowie 5 gesunden BMNC-Spendern	68
Abbildung 3.10: Vergleichende Analyse des HLA-Klasse-I-Quellproteoms der Patienten (n=15)- und Spenderkohorte (PBMC: n=30; BMNC: n=5) auf der Basis der HLA-restringierten Repräsentationsfrequenz	69
Abbildung 3.11: Repräsentation etablierter AML-Antigene durch natürlich präsentierte HLA-Klasse-I-Peptide im HLA-Ligandom von 15 AML-, 30 PBMC- und 5 BMNC-Proben	77
Abbildung 3.12: Proximitätsanalyse zur Ermittlung der internen Heterogenität beider Subgruppen anhand der Bestimmung euklidischer Distanzen für die FLT3-ITD (n=8) und FLT3-WT (n=7)-Subgruppen	80
Abbildung 3.13: vergleichende Analyse des Quellproteoms FLT3-WT (n=7) und FLT3-ITD (n=8) -Subgruppenquellproteome	81
Abbildung 3.14: Vergleichende Analyse des HLA-Klasse-I-AML-exklusiven Quellproteoms für die FLT3-ITD-Mutationsträger und FLT3-wildtypischen Patienten auf der Basis der HLA-restringierten Repräsentationsfrequenz	82

Abbildung 3.15: exemplarische Darstellung der T-Zellreaktion im INF- γ -ELISPOT Assay der Patienten-PBMCs nach 12-Tage-Stimulation mit 4 verschiedenen, HLA-A*03-restringierten AML-LiTAP-Pools P'1-P'4 anhand von AML 29	89
Abbildung 3.16: Exemplarische Darstellung der funktionellen Charakterisierung präsensitiverter Kontrollspender-PBMCs nach Stimulation mit zwei HLA-A*03-restringierten AML-LiTAP-Pools P'1 und P'2 im INF- γ -ELISPOT Assay	90
Abbildung 3.17: Darstellung durchflusszytometrisch-erhobener Messergebnisse für AML 29 im Anschluss an die intrazelluläre Zytokinfärbung nach Kreuzstimulation der PBMCs mit Peptidpools P'1 und P'2)	91
Abbildung 3.18: vergleichende Analyse des Quellproteoms von 12 AML-Patienten, 13 gesunden PBMC- und sowie 2 gesunden BMNC-Spendern	93
Abbildung 3.19: Vergleichende Analyse des HLA-Klasse-II-Ligandoms bzw. des respektiven Quellproteoms der Patienten (n=12) - und Spenderkohorte (PBMC n=13, BMNC n=2)) auf der Basis der HLA-restringierten Repräsentationsfrequenz	94
Abbildung 3.20: vergleichende Analyse des AML-HLA-Klasse-I-&-II-Quellproteoms	98
Abbildung 3.21: Exemplarische Darstellung detektierter positiver T-Zellreaktionen für P''1-P''3 anhand des Experiments für AML 32	102

Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1.1: Klassifikation der Tumorantigene mit ausgewählten Beispielen	11
Tabelle 1.2: Klassifikation der AML in Anlehnung an die WHO-Klassifikation der AML und verwandter Erkrankungen (Stand: 2016)	22
Tabelle 1.3 Überblick über die wichtigsten Remissionsformen mit ihren jeweiligen Definitionskriterien	23
Tabelle 1.4 Übersicht über einige ausgewählte neue bzw. sich aktuell in der klinischen Entwicklung befindenden Therapeutika bzw. Therapiestrategien	26
Tabelle 1.5: Überblick über bereits für Vakzinierungsstudien verwendete Leukämie-assoziierte Antigene, sowie Informationen zu deren onkogenem und immunogenem Potential	30
Tabelle 1.6: Überblick über einige ausgewählte Impfstudien auf der Basis von WT1-Peptiden	31
Tabelle 1.7: Klassifikation der Risikogruppen anhand molekular- und zytogenetischer Faktoren in Anlehnung an das European Leukemia (Version 2016);	34
Tabelle 2.1: Übersicht über die verwendeten Reagenzien mit jeweiligem Hersteller und Sitz der Firma	36
Tabelle 2.2 Übersicht über die verwendeten Antikörper mit jeweiligem Hersteller und Sitz der Firma	37
Tabelle 2.3 Übersicht über die verwendeten, rekombinant hergestellten Zytokine mit jeweiligem Hersteller und Sitz der Firma	37
Tabelle 2.4 Übersicht über die verwendeten Kontrollpeptide	37
Tabelle 2.5 Übersicht über die verwendeten Geräte mit jeweiligem Hersteller und Sitz der Firma	38
Tabelle 2.6: Übersicht über die verwendeten Verbrauchsmaterialien mit jeweiligem Hersteller und Sitz der Firma	39
Tabelle 2.7: Patientenübersicht der HLA-Quantifizierungs-Studie inklusive einer Übersicht über die bestimmten HLA-Klasse-I und -II Moleküle/Zelle	41
Tabelle 2.8: Patientenübersicht der HLA-Klasse-I und -II Ligandomkartierungsstudie	42
Tabelle 2.9: Tabellarische Übersicht der Patienten-Kohorte 1, verwendet für die funktionelle Charakterisierung ausgewählter LiTAPs der HLA-Klassen-I und -II	43
Tabelle 2.10: Tabellarische Übersicht der Patienten-Kohorte 2, verwendet für die funktionelle Charakterisierung ausgewählter LiTAPs der HLA-Klassen-I und -II	44
Tabelle 2.11: Übersicht über die für die HLA-Ligandomkartierung analysierten, gesunden, Spender (PBMC (PB) und BMNC (KM)-Spender) inkl. Informationen zu den jeweiligen Peptid- & Quellproteinidentifikationszahlen	46
Tabelle 3.1: Tabellarische Übersicht der TOP 15 HLA-Klasse-I-LiTAAAs und ihre korrespondierenden LiTAPs	71
Tabelle 3.2: Übersicht über die Detektion natürlich präsentierte HLA-Klasse-I-Liganden abgeleitet aus etablierten AML-Antigenen in der Patientenkohorte (n=15) sowie der Spenderkohorte (BMNC: n=5; PBMC: n=30)	74
Tabelle 3.3: Analyse der WT-1-mRNA-Expression und HLA-restringierten WT-1-Peptidpräsentation	78

Tabelle 3.4 Übersicht über die für die Analyse ausgewählten HLA-Klasse-I-LiTAPs und zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der funktionellen Charakterisierungs-experimente der Peptide in gesunden Spendern sowie den beiden Patientenkohorten K1 und K2	83
Tabelle 3.5: Übersicht über die best-platzierten 36 HLA- Klasse-II-LiTAAAs (inkl. Korrespondierender LiTAPs), die in mindestens 20 % aller analysierten AML-Patienten (n=12) detektiert wurden	95
Tabelle 3.6: Tabellarische Übersicht der LiTAAAs, die im Rahmen der LC-MS/MS-basierten vergleichenden Analyse sowohl im HLA-Klasse-I-Lig	99
Tabelle 3.7: Übersicht der drei detektierten nested Peptides für HLA-Klasse-I-und -II-Sequenzen sowie ihrer jeweiligen korrespondierenden Quellproteine	101
Tabelle 3.8: Übersicht der Ergebnisse der funktionellen Charakterisierung sechs ausgewählter HLA-Klasse-II-Peptidsequenzen im Interferon- γ -Elispot	102
Tabelle 6.1 Übersicht über die Top 132 HLA-Klasse-I-LiTAAAs und ihre korrespondierenden LiTAPs.	i

Abkürzungsverzeichnis:

A	annus/Jahr
AA	Aminosäure
AML	Akute myeloische Leukämie
- sAML	sekundäre akute myeloische Leukämie
- tAML	therapieassoziierte akute myeloische Leukämie
APC	antigenpräsentierende Zelle
APL	Promyelozytenleukämie
BCIP	5-bromo-4chloror-3-indolyl-phosphate
CAR	Chimärer Antigen-Rezeptor
CD	Cluster of differentiation
CLIP	class-II-associated invariant-chain peptide
CLL	chronisch lymphatische Leukämie
CMV	Cytomegalievirus
CR	complete remission/komplette Remission
CTL	zytotoxischer T-Lymphozyt
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4
DAMP	danger associated molecular pattern
DC	Dendritische Zelle
DLI	Donor derived lymphocyte infusion
DMSO	Dimethylsulfoxid
EBV	Epstein-Barr-Virus
ELN	European Leukemia Network
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAAP	Endoplasmatic Reticulum Aminopeptidase Associated with Antigen Processing
FACS	Durchflusssytometrie/fluorescence activated cell sorting
FCS	Fetales Kälberserum
FLT3	fms-like tyrosine kinase 3
Fox p3	Forkhead box protein 3
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor

GvH	Graft versus host
GvL	Graft versus leukemia
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HCL	Salzsäure
HCT-CI	Hematopoetic Cell Transplantation-comorbidity Index
HSZ/HSC	Hämatopoetische Stammzelle
HSCT	Hämatopoetische Stammzelltransplantation
HSV	Herpes-Simplex-Virus
ICAM	InterCellular dehision Molecule
ICOS	Inducible costimulator
ICS	Intracelluar Cytokine Staining
INF	Interferon
KM	Knochenmark
LAA	Leukämie-assoziiertes Antigen
LSC	Leukämische Stammzelle/leukemic stem cell
mAb	monoclonal Antibody
MIF	Mittlere Fluoreszenzintensität
MDSC	myeloid-derived suppressor cells
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MHC	Major Histokompatibilitätskomplex
miHA	minor Antigen
MPO	Myeloperoxidase
MRD	minimal residual disease
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NaAzid	Natriumazid
NFKB	Nuclear Factor kappa B
NPM	Nucleophosmin
PAMPs	Pathogen-associated molecular pattern
PBMC	Periphere mononukleräre Blutzelle
PBS	Phosphate buffered Sialine; Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase chain reaction
PD-1	programmed cell death protein 1

PD-1L	programmed cell death protein 1 ligand
PHA	Phytohämagglutinin
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
PSM	Peptide-Spectrum-Match
RHAMM	receptor for hyaluronic-acid-mediated motility
RNA	Ribonukleinsäure
SOG.	so genannt
SZT	Stammzelltransplantation
T	time/Zeit
TAA:	tumor associated antigen
TAP	transporter associated with antigen processing
TCR	T-Zellrezeptor
TCM	T-Zellkultivierungsmedium
T _{cm}	central memory T-Zelle
T _{eff}	Effektor T-Zelle
TGF	Transforming growth factor
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor
T _{em}	Effector memory T-Zelle
TIL	Tumor-infiltrierender Lymphozyt
TIM-3	T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3
TLR	Toll-like receptor
T _N	naive T-Zelle
TNF	Tumornekrosefaktor
T _{reg}	regulatorische T-Zelle
WHO	world health organization
WT-1	Wilms' tumor 1
Z.n.	Zustand nach

1 Einleitung

1.1 Zusammenspiel zwischen Tumorgenese und Immunsystem

Seit Jahrhunderten träumt die Medizin von einer zuverlässigen, erfolgreichen Tumorbehandlung. Auf der Suche nach einem effektiven und potenten Therapieverfahren werden breitgefächert verschiedenste Ansätze verfolgt, neue Ideen diskutiert, entwickelt und z. T. klinisch erprobt. Auf diesem langen, anspruchsvollen und steinigen Weg mit großen Herausforderungen und vielen Rückschlägen hat sich unter anderem die Immuntherapie als vielversprechender Ansatz herauskristallisiert. Diese Therapieform basiert auf der Idee, das Immunsystem eines Patienten durch möglichst gezielte Stimulation bzw. Inhibition kontrolliert zu beeinflussen.

1891 injizierte der New Yorker Arzt William Coley, ein Pionier der Immuntherapie, einem Krebspatienten mit infauster Prognose erstmals eine Streptococcus-Pyogenes-haltige Lösung direkt in den Tumor. Im Zuge wiederholter Injektionen im Verlauf der Folgemonate beobachtete er eine eindeutige Regression der Tumormasse (Coley 1891). Anwendung findet sein therapeutischer Grundgedanke heute noch in Form der BCG-Installation (Bacilli-Calmette-Guerrin, BCG) in der Behandlung des oberflächlichen Blasenkrebses (Herr and Morales 2008).

Zu Beginn des 20. Jahrhunderts postulierte Paul Ehrlich, das Immunsystem sei in der Lage, kontinuierlich entstehende Tumorzellen zu erkennen und zu eliminieren. Durch diese „Schutzfunktion des Körpers“ könne die Ausbildung eines manifesten Tumors unterbunden werden (Ehrlich 1909). In den 1950er und 60er Jahren formulierten Lewis Thomas und Sir Frank M. Burnet in Anlehnung an diese Hypothese das Konzept der Immunosurveillance. Entsprechend dieser Theorie prüft das Immunsystem kontinuierlich das körpereigene Gewebe hinsichtlich maligner Transformationsprozesse. Transformations-abhängige Veränderungen der Zelloberflächenstrukturen dienen dabei der Erkennung und Eliminierung der entarteten Zellen. Trotz vereinzelter, kontinuierlich stattfindender maligner Zelltransformation könne auf diese Weise die Manifestation eines Tumors im gesunden Organismus verhindert werden (Burnet 1957, Burnet 1967, Burnet 1970).

Ihre These konnte jedoch erst am Übergang des 20. zum 21. Jahrhundert vollständig belegt werden. Die Argumentation stützte sich insbesondere auf die Erkenntnisse, dass

1) immunsupprimierte, transplantierte Patienten eine vergleichsweise deutlich erhöhte Rate an nicht-Virus-induzierten Tumoren aufwiesen, 2) spontane Antikörper-oder Zellvermittelte Anti-Tumor-Antworten in Krebspatienten detektiert werden konnten und 3) die Existenz zytotoxischer T-Lymphozyten positiv mit dem Krankheitsverlauf der Patienten korrelierte (Dunn, Bruce et al. 2002, Dunn, Old et al. 2004, Mapara and Sykes 2004, Sato, Olson et al. 2005, Haanen, Baars et al. 2006, Guiguet, Boue et al. 2009).

Da jedoch auch immunkompetente Patienten vor der Manifestation einer Tumorerkrankung nicht gefeit sind, entwickelte sich in den letzten 15 Jahren die Theorie des *Immunoeditings*. Dieses Modell bildet die Grundlage neuer, individualisierter Krebsimmuntherapien. Es schreibt dem Immunsystem neben der bereits etablierten Tumor-protaktiven Komponente auch eine Tumor-fördernde bzw. -formende Eigenschaft zu. In einem dreistufigen Prozess („3Es“) sei das Immunsystem gestaltend an der Tumorentwicklung beteiligt. Während der *Eliminationsphase* (1. Phase) werden transformierte Zellen durch ein effizientes, kompetentes Immunsystem eliminiert. Einzelnen Tumorzellen gelinge es, sich der destrukturierenden Wirkung des Immunsystems zu entziehen und in die Phase des *Equilibriums* überzutreten. Während dieser zweiten Phase, die Jahre andauern kann, unterliegen die Zellen entweder einem Ruhezustand oder (epi-)genetischen Modifikationsprozessen. Nach absolutem, erfolgreichen Entzug immunologischer Kontrolle vollziehe sich der Übergang in die dritte Stufe (*Escape*). Während dieser letzten Phase erfolge aufgrund verschiedener, erworbener Resistenzmechanismen, sowie der Etablierung eines immunsupprimierenden Tumormikromilieus (TME) die Ausbildung eines Primärtumors, einer Metastase oder eines Rezidivs.

Entsprechend dieses Konzeptes manifestieren sich Tumore also entweder in Folge insuffizienter Immunosurveillance, als Konsequenz aus der Selektion hypoimmunogener (prä-)neoplastischer Zellpopulationen oder durch die Ausbildung eines TMEs (Aguirre-Ghiso 2007, Schreiber, Old et al. 2011).

1.2 Immunologische Grundlagen

Das Abwehrsystem gilt Ärzten und Naturwissenschaftlern als potenteste Waffe des menschlichen Körpers. Dem äußerst vielschichtigen, ausgeklügelten System gelingt es

durch ein hochkomplexes Zusammenspiel seiner verschiedenen Komponenten zwischen „körperfremd“ und „selbst“ zu unterscheiden und diverse Krankheitserreger, sowie entartete Zellen erfolgreich zu vernichten. Dieser hochadaptive Abwehrapparat kann in einen angeborenen (innate) und einen erworbenen (adaptive) Anteil unterschieden werden. Beide lassen sich jeweils noch einmal in humorale und zelluläre Bestandteile unterteilen. Funktionell sind diese Teilsysteme eng verknüpft und ergänzen sich gegenseitig. Das angeborene Immunsystem erkennt bestimmte Pathogenmuster (pathogen-associated patterns; PAMPs) und ermöglicht auf diese Weise eine schnelle, verhältnismäßig unspezifische Antwort auf ein breites Pathogenspektrum. Zu den zellulären Bestandteilen der angeborenen Immunität gehören die Zellpopulationen wie Makrophagen, Monozyten und Natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Das erworbene Abwehrsystem wird zwar erst verzögert aktiv, verfügt dafür jedoch über die Fähigkeit einer vielfältigen, Epitop-spezifischen Pathogenerkennung. Diese beruht auf dem Prinzip der klonalen Selektion. Durch verschiedene Mechanismen, beispielsweise der Rekombination antigenerkennender Oberflächenmoleküle, wie z. B. des T-Zell-Rezeptors (siehe unten), gelingt es der erworbenen Abwehr, sich unterschiedlichsten antigenen Strukturen anzupassen.

Ein weiteres wichtiges Merkmal des adaptiven Immunsystems ist seine Fähigkeit ein sog. immunologisches Gedächtnis ausbilden zu können. Dieses ermöglicht bei erneutem Antigenkontakt eine deutlich schnellere und spezifischere Immunantwort.

Die humorale Komponente des adaptiven Systems besteht vor allem in der Antikörpervermittelten Abwehr und dient insbesondere der Antagonisierung und Opsonierung extrazellulärer Pathogene. Dem gegenüber stehen die T-Lymphozyten, antigenpräsentierenden Zellen (APC) sowie B-Lymphozyten als Hauptakteure des zellulären Anteils der erworbenen Immunantwort.

Im Folgenden soll auf den Bereich der T-Zell-vermittelten Immunität näher eingegangen werden. Die naiven T-Zellen durchlaufen zunächst einen Reifungsprozess im Thymus. Dort erfolgt neben der Rekombination des T-Zell-Rezeptors (siehe unten), der Determinierung der Linienzugehörigkeit ($CD8^+$, $CD4^+$ -T-Zelle; siehe unten) auch die sog. positive und negative Selektion der T-Zellen. Diese Selektionsprozesse gewährleisten sowohl die Erkennung des MHC-Peptid-Komplexes durch den T-Zell-

Rezeptor, als auch die Elimination autoreaktiver T-Zellen (Shortman, Egerton et al. 1990).

Die Grundlage einer adäquaten T-Zell-Antwort bildet eine Antigenpräsentation durch professionelle APCs in Kombination mit einer adäquaten Kostimulation (z. B. über CD80 oder CD86)(Lenschow, Walunas et al. 1996). Eine inadäquate Kostimulation führt hingegen zu einer unvollständigen T-Zellaktivierung bzw. zu einem Stadium der T-Zellanergie (Guerder, Meyerhoff et al. 1994).

Ein adäquat erfolgter Antigenkontakt einer naiven T-Zelle mit nachfolgender Aktivierung wird als T-Zellpriming bezeichnet (Lenschow, Walunas et al. 1996). Die Aktivierung der antigenpräsentierenden Zellen im Rahmen einer Entzündungsreaktion wird ebenso wie die begleitende Hypervaskularisierung und Chemotaxis durch Zytokinsekretion des angeborenen Abwehrsystems vermittelt (Iwasaki and Medzhitov 2015).

1.2.1 T-Lymphozyten

Grundsätzlich lassen sich die T-Zellen (Thymozyten) in zwei große Subpopulationen unterteilen: $CD8^+$ - und $CD4^+$ -T-Zellen. Bei den $CD8^+$ -T-Zellen handelt es sich überwiegend um zytotoxische T-Lymphozyten (CTLs). Diese sind in der Lage, Zellen mit fremdem oder verändertem Proteinrepertoire direkt zu erkennen und zu eliminieren. Die Apoptose induzieren die CTLs in den jeweiligen Zielzellen dabei durch eine Granzym- und Perforinsekretion. Alternativ wird der programmierte Zelltod nach Bindung des CTL-Fas-Liganden (CD95L) an den Fas-Rezeptor (CD95) einer Zielzelle eingeleitet (Henkart 1994). In Folge der Antigenerkennung beginnen die zytotoxischen T-Zellen mit der Produktion diverser Zytokine, u. a. $TNF-\alpha$ und $-\beta$ sowie $INF-\gamma$ (Mruphy, Rravers and Walport M (2008) a). $TNF-\alpha$ und $-\beta$ aktivieren ihrerseits Makrophagen und induzieren somit über die Bindung an TNFR-1 ebenfalls den programmierten Zelltod (Mruphy, Rravers and Walport (2008) a).

Die $CD4^+$ -T-Zellen (sog. T-Helferzellen) werden aktuell anhand ihres Zytokinproduktionsmusters und ihrer Gewebelokalisation in sieben Gruppen eingeteilt: Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, folliculäre T-Helferzellen (Tfh) und regulatorische T-Zellen (Tregs) (Geginat, Paroni et al. 2013). Beeinflusst wird dieser individuelle

Differenzierungsprozess in der Regel vor allem durch das umgebende Zytokinmilieu, kostimulatorische Moleküle sowie die Peptidliganden während des Erstkontaktes (Zhu and Paul 2010).

Die INF- γ -produzierenden Th1-Zellen unterstützen vor allem die Zell-vermittelte Zytolyse durch eine Aktivierung von Makrophagen und CTLs. Daneben verfügen sie selbst ebenfalls über ein zytotoxisches Potential. Diese Wirkung entfalten Th-1-Zellen gleich den CD8⁺-T-Zellen über den Fas-Liganden sowie die Sekretion von Granzym und Perforin (Appay, van Lier et al. 2008, Marshall and Swain 2011). Die IL (Interleukin)-4-, IL-5- und IL-13-produzierenden Th2-Zellen unterstützen hingegen eine humorale Polarisierung und begünstigen einen Antikörperklassenwechsel zu IgG1, IgE und IgA. Gleichzeitig wird ihnen eine hemmende Wirkung auf die zytotoxische Immunreaktion zugeschrieben (Murphy, Travers and Walport M (2008) a).

Regulatorische T-Zellen, die sich in natürlich vorkommende nTregs (Hauptanteil) und Antigen-induzierte iTregs subdifferenzieren lassen, wirken hemmend auf die Funktion und Aktivierung der zytotoxischen T- sowie NK-Zellen. Ihre physiologische Aufgabe besteht in der Aufrechterhaltung der immunologischen Homöostase und peripheren Toleranz (Schmetterer, Neunkirchner et al. 2012). Vielen Tumoren gelingt es sich diesen regulativen Effekten durch die Inhibition antitumorale Immunität zu Nutze zu machen (Yuan and Malek 2012). Die Sekretion der immunmodulatorischen Mediatoren IL-10 und TGF- β , sowie der starke IL-2-Konsum hemmen die Aktivierung und Proliferation der Immuneffektorzellen (Davidson, DiPaolo et al. 2007).

Die Antigenerkennung der T-Zellen basiert in der Regel auf der Interaktion ihres T-Zell-Rezeptors (TCR) und des MHC-Peptidkomplexes der jeweilig beteiligten Zelle. Die Spezifität einer T-Zelle wird also durch ihren TCR bestimmt. Anhand seines Aufbaus werden zwei TCR-Gruppen unterschieden: $\alpha\beta$ -TCR (95% der peripheren T-Zellen) und $\gamma\delta$ -TCR. Letzterer besteht aus einer γ - und einer δ -Kette. Die Antigenerkennung dieser TCR-Form erfolgt MHC-unabhängig (Kalyan and Kabelitz 2013).

Der $\alpha\beta$ -TCR hingegen, aufgebaut aus einer α - und einer β - Kette, erkennt Antigene MHC-restringiert. Dieses Heterodimer besteht aus zwei konstanten (C- α , - β) sowie zwei variablen (V- α , - β) Regionen. Die Diversität der TCRs resultiert aus somatischen Rekombinationen während der T-Zell-Entwicklung im Thymus. Es werden dabei

jeweils ein *variable* (V)-, ein *joining* (J)- sowie für die β - Kette ein *diversity* (D)-Segment mit dem *constant* (C)-Segment (re-)kombiniert, wodurch ein hochdifferenziertes, wie vielfältiges T-Zell-Repertoire entsteht (Kalyan and Kabelitz 2013).

1.2.2 Major Histokompatibilitätskomplex (MHC)/Humanes Leukozytenantigen (HLA)

Unter dem Begriff Haupthistokompatibilitätskomplex wird eine Gengruppe zusammengefasst, die im Erbgut fast aller Wirbeltiere enthalten ist (Horton, Wilming et al. 2004). Die resultierenden MHC-Rezeptoren spielen als Zelloberflächenmoleküle eine entscheidende Rolle für die immunologische Erkennung, die Individualität eines Organismus, sowie die Histokompatibilität bei Gewebeübertragungen (Snell 1944). Daneben existieren noch eine Reihe anderer Genloci von vergleichsweise geringerer Relevanz für die Gewebeverträglichkeit, die unter dem Namen *minor histocompatibility complex* (miHC) subsumiert werden (Marsh 2000).

Beim Menschen ist der MHC-Rezeptor auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 lokalisiert. Da er in Folge leukozytärer Oberflächenantigenvarianten verschiedener Individuen entdeckt wurde, wird er in der Regel auch als *human leukocyte antigen complex* (HLA) bezeichnet. Es werden drei HLA-Klassen (HLA-I bis -III) unterschieden. Dabei kodiert jede dieser Klassen für verschiedene, immunologisch wichtige Proteine. In den Klasse-I- und -II-Regionen sind u. a. die Information der strukturgebenden Proteine der jeweiligen Rezeptoren enthalten (Gruen and Weissman 1997). Daneben finden sich im HLA-Klasse-II-Locus auch einige, für die Antigenpräsentation relevante Gene, wie z. B. die Peptidtransporter TAP1/2 (Beck and Trowsdale 1999). In der HLA-Klasse-III-Region befindet sich u. a. die Erbinformation für den Tumornekrosefaktor (TNF)- α &- β .

Die polygenen HLA-Klasse-I und -II Komplexe gelten als die polymorphsten Gene des Menschen, woraus sich u. a. seine immunologische Individualität ergibt (Robinson, Halliwell et al. 2013). Da die Hauptaufgabe der MHC-Rezeptoren in der Antigenpräsentation gegenüber dem Immunsystem besteht, resultiert aus diesem Polymorphismus die Fähigkeit unterschiedliche Bestandteile antigener Strukturen zu

präsentieren. In Abhängigkeit der individuellen HLA-Allotypausstattung variiert die Reaktionsfähigkeit gegenüber diversen Krankheitserregern bzw. Krankheiten. Dies kann sowohl zum Selektionsvorteil als auch -nachteil gereichen (Borghans, Beltman et al. 2004).

Die HLA-Rezeptoren sind wichtige Bestandteile des adaptiven Immunsystems. Sie präsentieren den T-Lymphozyten antigene Strukturen in Form kurzer Peptidketten und geben Aufschluss über den (intrazellulären) Zustand ihrer Zelle. Daneben dienen sie gemäß der *Missing-Self-Hypothese* auch dem Schutz „gesunder, autologer“ Zellen vor den natürlichen Killerzellen, die alle Zellen mit stark reduzierter MHC-Expression eliminieren (Kärre 1985).

Die HLA-Klasse-I-Peptidkomplexe interagieren mit den CD8⁺-Lymphozyten, während die HLA-Klasse-II-Komplexe ihre Peptidsequenzen den CD4⁺-T-Zellen präsentieren. Neben ihren verschiedenen Interaktionspartnern unterscheiden sich die beiden HLA-Klassen auch in ihrem Expressionsmuster. MHC-Klasse-I-Rezeptoren werden mit Ausnahme der Trophoblasten von allen kernhaltigen Zellen, sowie Thrombozyten exprimiert. Die HLA-Klasse-II-Moleküle werden hingegen nur auf den antigenpräsentierenden Zellen, beispielsweise dendritische Zellen (DCs) und Makrophagen detektiert. Sofern eine Pathogenpräsentation nicht erforderlich ist bzw. keine malignen Transformationsprozesse stattgefunden haben, werden über MHC-Klasse-II zelleigene Proteine abgebildet. Darüber hinaus scheinen, insbesondere nach entsprechender Induktion, auch Mastzellen, eo- und basophile Granulozyten, sowie Endo- & Epithelzellen in der Lage zu sein, HLA-Klasse-II-Rezeptoren zu exprimieren (Boniface and Davis 1995).

Eine äußerst potente Steigerung der HLA-Klasse-I und -II-Expression wurde besonders in Folge erhöhter Interferon- γ -Spiegel beobachtet (Boehm, Klamp et al. 1997).

1.2.2.1 HLA-Klasse-I (HLA-Klasse-A, B, C)

Der MHC-Klasse-I-Komplex besteht prinzipiell aus zwei Anteilen: der größeren, sog. schweren Kette (Domäne $\alpha 1-3$), die durch die $\alpha 3$ -Domäne in der Zellmembran verankert ist, sowie der löslichen, kleineren Untereinheit, dem $\beta 2$ -Mikroglobulin. Das

$\alpha 1/2$ -Heterodimer im zentral-lokaliserten MHC-Anteil bildet die Peptidbindungstasche. Die präsentierten Peptide sind in der Regel in einer flach, gestreckten Konformation gebunden und acht bis zehn Aminosäuren (AA) lang. Prinzipiell ragen diese Sequenzen nicht über die peptidbindende Grube hinaus. Die Peptidbindung erfolgt durch die sechs (Seitenketten-)Bindungstaschen A–F der Grube, welche in Bezug auf ihre Größe, ihre elektromechanischen Eigenschaften sowie ihre Form hochgradig polymorph gestaltet sind. Den größten Anteil an der Peptidbindung haben die sog. Ankerresiduen. Unter diesem Namen wird eine kleine Gruppe nahverwandter AA zusammengefasst, die an einer spezifischen, definierten Position in der Peptidsequenz eines HLA-Allels lokalisiert sind. Für die meisten HLA-Allele befinden sich diese Ankerreste in Position 2 (B-Tasche) und am C-Terminus (F-Tasche). Gemeinsam mit zusätzlichen Hilfsankern definieren sie das sog. Bindungsmotiv eines HLA-Allotyps. Diese Bindungsmotive werden unter anderem verwendet, um mit der Hilfe internetbasierter Datenbanken (z. B.z. B. SYFPEITHI) potentielle MHC-Liganden vorherzusagen oder HLA-Allotypannotationen für Peptidsequenzen vorzunehmen (Rammensee, Bachmann et al. 1999).

Die $\alpha 3$ -Domäne ist zwar nicht an der Peptidbindung, dafür jedoch an der Ausbildung der immunologischen Synapse durch direkte Interaktion mit CD8 während der T-Zell-Rezeptor-Bindung beteiligt.

Die Antigenpräsentation über HLA-Klasse-I setzt einen mehrstufigen Prozess voraus. Zunächst werden intrazelluläre, ubiquitinylierte Proteine im Rahmen der intrazellulären Proteolyse im Proteasom abgebaut. Als Hauptabbauinstrument gilt das 26S-Proteasom. Im Verlauf einer Immunantwort erfolgen Interferon-bedingte Modifikationen des konstitutiv exprimierten „Normalproteasoms“. Dieses veränderte, sog. Immunproteasom, zeichnet sich durch eine vergleichsweise stärkere und veränderte Antigenpräsentation aus (Van den Eynde and Morel 2001, Rivett and Hearn 2004).

Die im Rahmen der Prozessierung entstandenen Peptide werden mittels des *transporter associated with antigen processing* (TAP) aus dem Zytosol ins Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) transferiert. Dabei werden bevorzugt 8–16 AA-lange Sequenzen transportiert (Koopmann, Post et al. 1996). Während der C-Terminus bereits durch die proteosomale Bindungsstelle festgelegt ist, unterliegt der N-terminale während dieser Phase häufig noch Veränderungen durch Aminopeptidasen (Mester,

Hoffmann et al. 2011). Im Lumen des ERs werden die Peptide mit der Hilfe des *Peptide-Loading-Complexes* (PLC) auf die MHC-Moleküle „aufgeladen“ und in die Bindetaschen „eingelagert“ (Stoltze, Nussbaum et al. 2000). Anschließend werden die MHC-Peptid-Komplexe nach der Dissoziation des PLCs im Rahmen des sekretorischen Pathways zur Zelloberfläche transportiert (Cresswell, Androlewicz et al. 1994). Dieser Prozeß ist in Abbildung 1.1 noch einmal vereinfacht, schematisch dargestellt.

Der Großteil aller über HLA-Klasse-I präsentierten Peptide stammt von intrazellulären Proteinen ab. Mitunter werden jedoch auch einige extrazelluläre Proteine und membranständige Glykoproteine im Rahmen der sog. *Cross-Präsentation* von MHC-Klasse-I präsentiert (Ramirez and Sigal 2004, Joffre, Segura et al. 2012).

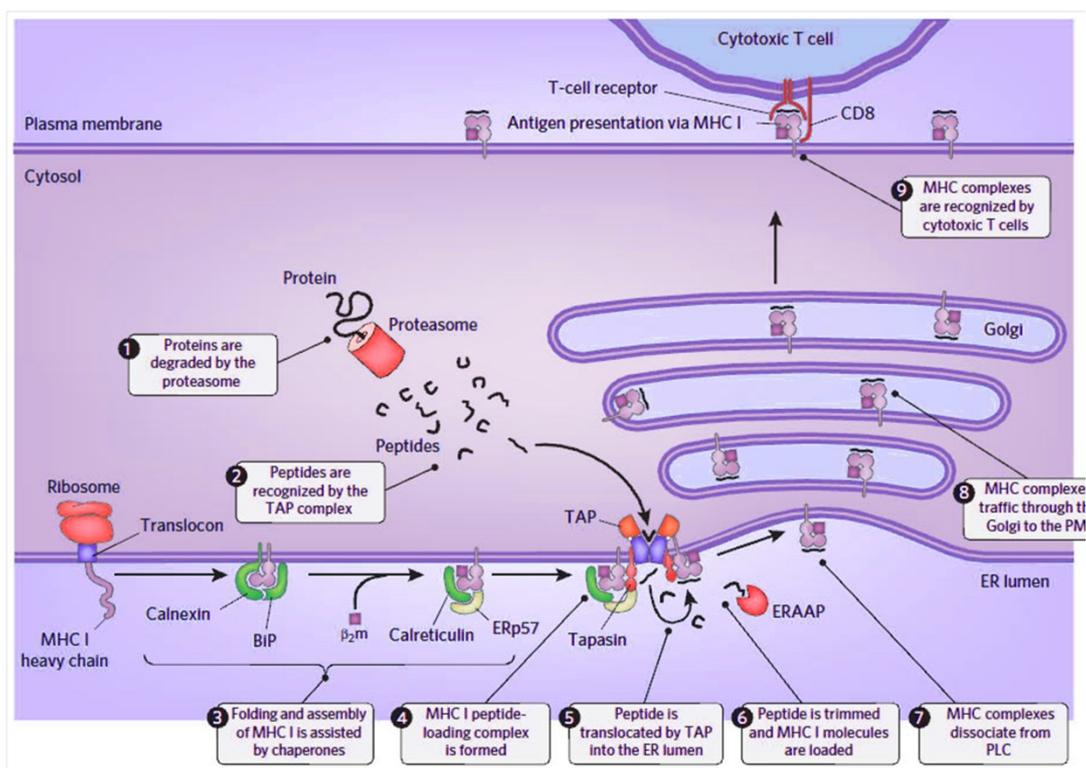


Abbildung 1.1: Graphische, schematische Darstellung der Antigenbeladung von MHC-Klasse-I-Molekülen modifiziert nach Parcej and Tampe (2010)

Die im Rahmen der Proteindegardierung im Proteasom entstandenen Peptide werden mittels TAP-Komplex ins Lumen des ER transferiert. Längere Peptide können dort eventuell noch durch die Peptidase ERAAP (Endoplasmatic Reticulum Aminopeptidase Associated with Antigen Processing) getrimmt werden. Unter Beteiligung der Chaperone Tapsin, Erp57 und Calreticulin erfolgt die Beladung des MHC-Moleküls mit „seinem“ Peptid. In weiteren Schritten wird der MHC-Peptid-Komplex durch den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche transportiert.

1.2.2.2 HLA-Klasse-II (HLA-DP,-DQ,-DR)

Der MHC-Klasse-II-Komplex besteht aus einer nicht kovalent-verbundenen α - und β -Kette. Diese umfassen ihrerseits jeweils zwei extrazelluläre Untereinheiten: $\alpha_{1,2}$ & $\beta_{1,2}$. Während die Untereinheiten α_1 und β_1 die Peptidbindungstasche bilden, dienen α_2 & β_2 der Verankerung des Rezeptors in der Zellmembran. Im Gegensatz zum MHC-I-Rezeptor ist die Bindungsgrube offen, wodurch wesentlich längere Sequenzen gebunden werden können. Dabei sind die i. d. R. 12–25 AA-langen Peptide weder am N- noch am C-Terminus fixiert (Stern, Brown et al. 1994). Eine gewisse Bindungsspezifität wird durch die nicht eindeutig definierten Ankerpositionen (Aminosäureseitengruppen 1, 4, 6, und 9) im Kernbereich der Bindungsgrube vermittelt. Allerdings werden diese Anker mit keiner hohen Spezifität gebunden. Dieser Umstand hat ein verhältnismäßig stark promiskuitives Bindungsverhalten der MHC-Klasse-II-Peptide zur Folge (Chicz, Urban et al. 1993, Wang, Sidney et al. 2008). Folglich gestaltet sich die Vorhersage und eindeutige HLA-Allotypannotation für MHC-Klasse-II-bindende Peptide nicht ganz einfach.

Auch für HLA-Klasse-II geht der finalen Peptidpräsentation ein mehrstufiger Prozess voraus. Nach Phago-, Pino- und Endozytose sowie anschließender Fusion der Endo- und Lysosomen erfolgt der Proteinabbau durch saure Proteasen (u. a. Cathepsinen). Die MHC-Klasse-II-Untereinheiten werden im ER synthetisiert und bilden mit der sog. invarianten Kette einen Komplex. Diese ermöglicht den Transport des Komplexes ins Endolysosom, wo die invariante Kette durch Cathepsine in sog. CLIPS gespalten wird. Nach Dissoziation der CLIPS erfolgt die MHC-Peptid-Bindung. Anschließend wird der Komplex zur Zelloberfläche transportiert (Kropshofer, Arndt et al. 1997, Jensen, Weber et al. 1999).

1.3 Tumorantigene

Im Rahmen maligner Transformationsprozesse ergeben sich Veränderungen der Struktur und Zusammensetzung intrazellulärer Proteine. Diese Modifikationen des Proteoms maligner Zellen sind mitunter auch in ihrem MHC-Peptidom abgebildet. Derartige von Tumoren produzierte Antigene werden als Tumorantigene bezeichnet.

Theoretisch dienen sie dem Immunsystem, transformierte Zellen von Normalgewebe zu unterscheiden und eine adäquate Immunantwort auszulösen. Diese Eigenschaft verleiht den Tumorantigenen eine wichtige Bedeutung für die Krebsimmuntherapie (Dalglish and Pandha 2007). Ein ideales Tumorantigen sollte Tumor-exklusiv exprimiert sein oder zumindest eine deutliche Überexpression in malignem Gewebe aufweisen. Gleichzeitig sollte es nicht – oder nur minimal – in Normalgewebe exprimiert werden. Auch über ein hohes immunogenes Potential sollte es verfügen, sowie homogen im Patientenkollektiv auftreten (Cheever, Allison et al. 2009). Unter der Perspektive von Genom- und Transkriptomanalysen, die der bisherigen Definition etablierter Tumorantigene zugrunde liegen, wird auch häufig eine tumorrelevante, pathophysiologische Funktion dieser Antigene als Voraussetzung gefordert (Cheever, Allison et al. 2009).

Bis heute wurden bereits zahlreiche (weit mehr als 2000) Tumorantigene beschrieben (Yang and Yang 2005). Diese können entsprechend ihres Expressionsmusters in vier verschiedene Klassen unterteilt werden (Stevanovic 2002). In der nachfolgenden Tabelle 1.1 ist eine Klassifikation der Tumorantigene mit ausgewählten Beispielen zusammengestellt.

Tabelle 1.1: Klassifikation der Tumorantigene mit ausgewählten Beispielen in Anlehnung an Jäger E et al. 2003, Clark RE et al. 2001);

TSA=Tumor-spezifisches Antigen; TAA= Tumor-assoziiertes Antigen

Status	Klassifikation etablierter Tumorantigene	
		ausgewählte Beispiele
TSA	tumorspezifische Antigene	p53, BCR-ABL, B-RAF
	<i>Cancer-Germline</i> Antigene	MAGE-A1, NY-ESO-1, BAGE
	virale Antigene	EBV: <i>LMP1, LMP2</i> ; HPV-16: <i>E6, E7</i>
TAA	Differenzierungsantigene	PSA, gp 100, Melan-A
	überexprimierte, Antigene	MUC1, Cyclin D1, G250

Tumor-spezifische Antigene entstehen in Folge einer Mutation (insbesondere Punktmutation, Translokation) oder durch viralen Befall einer Zelle. Da diese Antigene ausschließlich von transformierten Zellen exprimiert werden, unterliegen sie nicht der Negativselektion im Thymus. Deshalb erscheinen sie für die Immuntherapie als sehr attraktiv. Allerdings treten die meisten Mutationen in einer interindividuell sehr variablen Frequenz auf und werden nicht automatisch im HLA-Ligandom abgebildet.

Ein onkogenes Potential wird einigen Viren attribuiert. Eine direkte Assoziation konnte beispielsweise für das Humane Papilloma Virus (HPV) Typ 16 und 18 zu bestimmten Formen des Cervixkarzinoms gezeigt werden (zur Hausen, Schulte-Holthausen et al. 1974). Auch den sog. Cancer-Germline-Antigenen wird eine gewisse Tumorexklusivität zugeschrieben. Diese Antigene werden physiologisch nur von Trophoblasten und testikulären Keimzellen, die beide zu den immunprivilegierten Geweben gezählt werden, exprimiert. Nach Abschluss der Embryonalphase werden die entsprechenden Gene „stillgelegt“. In einigen Tumorentitäten werden sie reaktiviert und erneut transkribiert (Smith and Cerundolo 2001, Vigneron, Stroobant et al. 2013).

Zu den Tumor-assoziierten Antigenen werden Antigene mit veränderten Expressionsmustern gerechnet. Diese werden im Vergleich zu benignem Gewebe von transformierten Zellen über die Maßen exprimiert. Da es sich jedoch um „normale“ körpereigene Proteine handelt, bleibt eine Immunantwort nicht selten aus (Rosenberg 1999). Die sog. Differenzierungsantigene sind in der Regel Gewebs-, jedoch nicht Tumor-spezifisch. Viele Vertreter dieser Gruppe wurden im Rahmen der Melanomforschung identifiziert (Brichard, Van Pel et al. 1993, Vigneron, Stroobant et al. 2013). Die sog. überexprimierten, Tumor-assoziierten Antigene gehen aus vermehrter Expression und posttranslationaler Proteinmodifikation hervor. Die erforderliche Präsentationsfrequenz für eine selektive, T-Zell-basierte Identifikation dieser Antigene auf transformierten Zellen konnte bisher nicht bestimmt eindeutig werden (Seremet, Brasseur et al. 2011).

Die Identifikation eines geeigneten Antigens bildet die Grundlage einer erfolgreichen, gerichteten T-Zell-Therapie und stellt gleichzeitig eine der größten Herausforderungen für die Tumorummunologie dar. Tumorantigene können auf verschiedene Weise identifiziert werden. Lange Zeit bestand die Identifikation vor allem in der Analyse Zell- oder Antikörper-vermittelter, spezifischer antitumoraler Immunantworten.

Der sog. klassische Identifikationsansatz beruht auf *in vitro* Stimulationsexperimenten peripherer mononukleärer Zellen mit autologem Tumorgewebe und konsekutiver Etablierung von T-Zellklonen. Die korrespondierende immunogene Sequenz eines Antigens wird unter Verwendung einer cDNA-Datenbank, generiert aus der analysierten Zelllinie, ermittelt. Mit Hilfe geeigneter Transfektanten wird eine Zelllinie etabliert, die neben der zu untersuchenden cDNA auch das gewünschte MHC-Molekül

exprimiert. Diese wird für anschließende Analysen des zytotoxischen Potentials der etablierten Zellklone verwendet. Im Fall detektierter positiver T-Zellreaktionen erfolgen weitere Subklonierungen bis zur finalen Definition des Antigens (van der Bruggen, Traversari et al. 1991, Viatte, Alves et al. 2006).

Die Analyse Antikörper-vermittelter, Tumorantigen-spezifischer Immunantworten unter Verwendung von cDNA-Datenbanken bildet die Grundlage für die sog. SEREX-Methode (*serological identification of antigens by recombinant expression cloning*). Die Fähigkeit, eine T-Zell-vermittelte Immunantwort auszulösen, ist auf diese Weise jedoch noch nicht erwiesen.

Im Gegensatz dazu beginnt der Identifikationsprozess im Rahmen der *reversen Immunologie* mit der Auswahl des Antigens auf der Grundlage von Genom-, Transkriptom- und Proteomanalysen. Da bereits für etliche HLA-Allele sehr genaue Peptidmotive definiert werden konnten, besteht die Möglichkeit, aus vermeintlichen Tumorantigenen dank Bioinformatik anschließend gezielt MHC-Liganden vorherzusagen. Für die Vorhersage möglicher Liganden stehen verschiedene Softwaretools, beispielsweise SYFPEITHI, zur Verfügung (Hammer, Bono et al. 1994, Parker, Bednarek et al. 1994, Rammensee, Bachmann et al. 1999, Schirle, Keilholz et al. 2000). Im Anschluss werden die vermeintlichen Epitope im Rahmen von T-Zellexperimenten funktionell charakterisiert. Dies umfasst v. a. die Analyse ihres immunogenen und zytotoxischen Potentials (Schirle, Keilholz et al. 2000).

Zum Abschluss dieses Kapitels zur Immunologie soll in nachfolgender Graphik (Abb. 1.2) noch einmal schemenhaft eine vereinfachte Modellvorstellung der Entstehung und Regulation einer anti-Tumor-Immunantwort dargestellt werden.

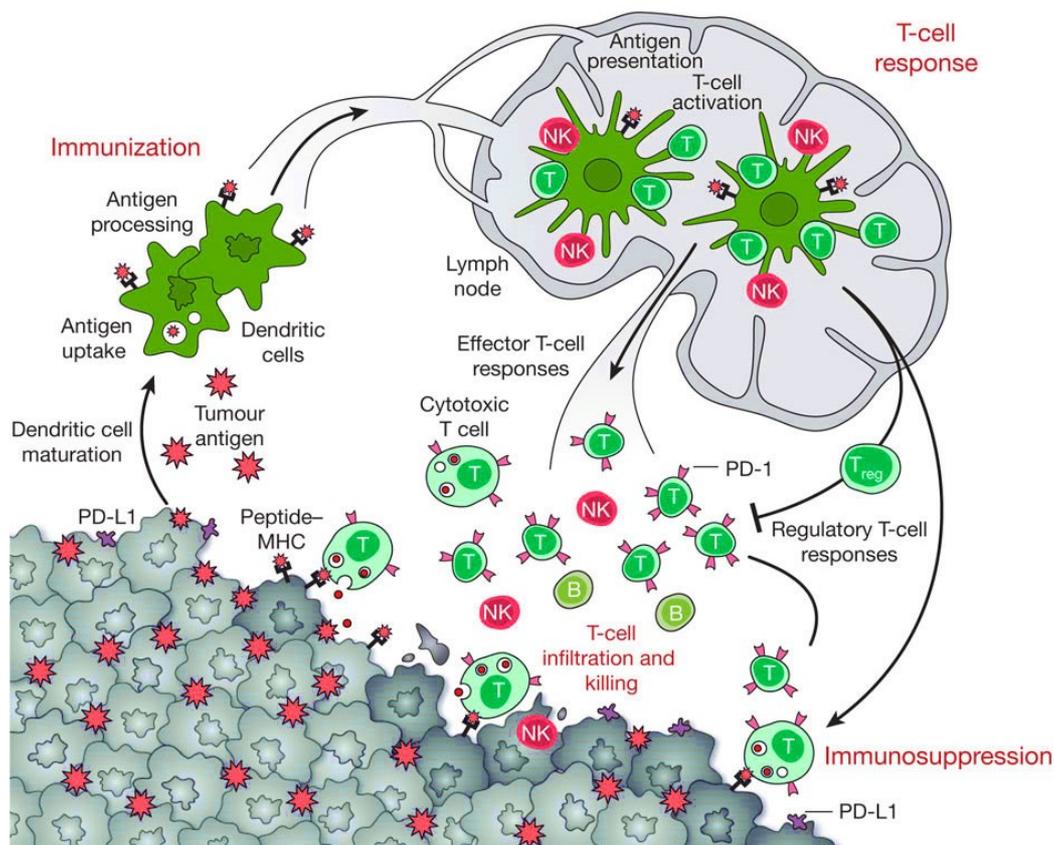


Abbildung 1.2: Modellvorstellung der Entstehung und Regulation einer anti-Tumor-Antwort modifiziert nach (Mellman, Coukos et al. 2011)

Die immunvermittelten anti-Tumor-Antworten beginnen mit der Tumorantigenaufnahme durch Antigen-präsentierende Zellen (meist sog. dendritische Zellen). Anschließend „wandern“ sie nach Antigenprozessierung und nachfolgender MHC-restringierter (Kreuz-)Präsentation in den nächstgelegenen, drainierenden Lymphknoten. Wenn die Antigenaufnahme und -präsentation bei gleichzeitig bestehendem Reifungsstimulus erfolgen, werden im Lymphknoten wahrscheinlich Effektor-T-Zell-basierte, anti-Tumor-Antworten induziert. Fehlt ein entsprechender fördernder Reiz, erfolgt stattdessen eine Deletion der T-Zellen, T-Zellenergie oder die Induktion von regulatorischen T-Zellen. Daneben ist auch die Art der Interaktion kostimulatorischer Rezeptormoleküle der T-Zellen mit ihren Pendants auf den Antigen-präsentierenden Zellen für die Art der ausgelösten Immunantwort entscheidend. Im Falle eines immunstimulierenden Reizes z. B. durch die Interaktion des T-Zell-ständigen CD28 mit CD80/86 wird wahrscheinlich eine Effektor-T-Zell-Antwort ausgelöst. In Folge eines immun-inhibierenden Stimulus wie z. B. die Interaktion des T-Zell-ständigen PD-1 mit PD-L1/L2 wird eine effektive T-Zell-Antwort unterdrückt.

1.4 Krebsimmuntherapie

Im Zuge des ständigen Wissenszuwachses über die Funktionsweise des Immunsystems entwickelten sich auch verschiedene, moderne Ansätze der Krebsimmuntherapie. Diese können zunächst in eine antigenabhängige und eine antigenunabhängige Form differenziert werden.

Im Rahmen eines antigenunabhängigen Therapiekonzepts wird eine unspezifische Aktivierung des Immunsystems angestrebt. Dieses Ziel wird beispielsweise durch die Applikation sog. Immunstimulanzien, z. B. Imiquimods erreicht (Oldfield, Keating et

al. 2005). Ihr zugrundeliegender antitumoraler Wirkmechanismus ist bisher nicht genau geklärt. Der aktuellen Lehrmeinung zur Folge erhöhen die verwendeten Immunstimulanzien die MHC-Klasse-I-Expression sowie die Antigenpräsentation (Kirkwood 2002). Darüber hinaus stimulieren sie NK- und zytotoxische T-Zellen, fördern die Apoptoseinduktion und Angiogenesehemmung (Arnaud 2002).

Die antigenabhängige Form der Immuntherapie basiert hingegen auf der gezielten Stimulation oder Inhibition spezifischer Strukturen, die im Verlauf der Kanzerogenese erstmals oder im Vergleich zu benignem Gewebe auf Krebszellen erheblich gesteigert exprimiert und deshalb vom Immunsystem als fremd erkannt werden.

Prinzipiell können grob zwei Formen unterschieden werden: die aktive und die passive Immuntherapie.

Im Rahmen einer passiven Immuntherapie erhält ein Patient „fertige, sofort-wirksame“ Therapeutika. Da die verwendeten Wirkstoffe bzw. zellulären Bestandteile dieser Behandlungsform nicht selbst vom Patientenorganismus generiert werden, wird diese Therapieart als passiv bezeichnet. Meist handelt es sich bei dieser Form der Immuntherapie um *ex vivo* hergestellte, therapeutische Antikörper. Als Zielstruktur werden in der Regel Tumor-spezifische Antigene oder Moleküle verwendet, die für die Kanzerogenese, das Tumorwachstum bzw. die Fähigkeit zur Metastasierung eine große Rolle spielen. Zu den bekanntesten Beispielen zählt der Antikörper Bevacizumab (Avastin^R), der gegen den *vascular endothelium growth factor (VEGF)* gerichtet ist. VEGF fördert die Gefäßneubildung und wird im Rahmen der Tumorangiogenese stark sezerniert. Da die Angiogenese für die Persistenz und Progression vieler Tumore eine bedeutende Rolle spielt, avancierten die Angiogenesehemmer zu wichtigen Bausteinen der modernen Tumorthherapie (Leite de Oliveira, Hamm et al. 2011). Ein weiteres wichtiges Beispiel für den Einsatz therapeutischer Antikörper in der Onkologie stellen die sog. Checkpoint-Inhibitoren dar. Für die klinische Behandlung des fortgeschrittenen Melanoms sind aus dieser Gruppe z. B. Ipilimumab (anti-CTLA-4 mAb) und Pembrolizumab (anti-PD-1 mAb) zugelassen ([FDA approves Keytruda for advanced melanoma](#), PM der FDA vom 4. September 2014, abgerufen am 9. November 2015.). CTLA-4 (Sansom 2000) und PD-1 gehören zu einer Gruppe immunmodulatorisch-wirksamer Moleküle auf der T-Zelloberfläche, deren physiologische Funktion in der Vermeidung überschießender, autoreaktiver Prozesse besteht. Im Rahmen maligner

Transformation erfolgt für viele Tumorentitäten eine deutlich erhöhte Expression dieser inhibierend wirkenden Kontrollpunkte. Dank einer erfolgreichen, gezielten Blockade dieser Checkpoints gelingt teilweise die Antagonisierung des immunsuppressiven Effektes im Tumormikromilieu, wodurch die klinische Wirksamkeit einer T-Zell-vermittelten Immuntherapie gesteigert wird (Shih, Arkenau et al. 2014, Ito, Kondo et al. 2015, Callahan, Postow et al. 2016, Hodi, O'Day et al. 2010).

Eine weitere Möglichkeit der passiven Immuntherapie besteht im Transfer bzw. Rücktransfer *ex vivo* generierter, expandierter und häufig zusätzlich modifizierter autologer bzw. allogener Immunzellen (= adoptiver Zelltransfer; ACT). Übertragen werden v. a. Tumor-spezifische zytotoxische T-Zellen, die meist *in vitro* durch Stimulation mit ausgewählten Epitopen expandiert wurden. Darüber hinaus wird mitunter auch der Transfer Zytokin-induzierter NK- sowie dendritischer Zellen durchgeführt (Topalian, Weiner et al. 2011). Die hämatologische Stammzelltransplantation (HSCT) allogener Spenderzellen kann als älteste Form dieser Therapievariante betrachtet werden. Der therapeutisch angestrebte, zytoreduktive Effekt resultiert aus unterschiedlichen Feingewebsmerkmalen, den minor antigens, zwischen Spender- und Empfängerzellen und wird als *Graft-vs-Leukemia (GvL)-Effekt* bezeichnet (Turpeinen, Ojala et al. 2013).

Im Verlauf der Zeit hat die Entwicklung genetisch modifizierter T-Zellen zunehmend an Bedeutung gewonnen. Für diese Form des T-Zell-Transfers werden autologe T-Lymphozyten *in vitro* unspezifisch stimuliert und mit einem gentechnisch modifizierten TCR (chimäre Antigenrezeptoren, CAR) transfiziert (Dudley, Wunderlich et al. 2002, Kalos, Levine et al. 2011). Nach Durchführung einer Lymphozytendepletion erfolgt die Reinfusion der Zellen. In Folge der Modifikation sind CARs in der Lage Antigene MHC-unabhängig zu erkennen. Strukturell betrachtet können CARs als ein Hybrid aus einem *single chain-Fv-Fragment (scFV)* eines Antikörpers gekoppelt an eine kostimulatorische, sowie die CD3 ζ (Signalübertragungs-)Domäne betrachtet werden (Dotti, Savoldo et al. 2009, Garfall, Maus et al. 2015, Maude and Barrett 2016). Klinische erprobt werden CAR T-Zellen aktuell vor allem bei hämatologischen Neoplasien. Erste vielversprechende Ergebnisse zeigten sich in der Behandlung von Patienten mit einem Therapie-refraktären multiplen Myelom sowie fortgeschrittenem Non-Hodgkin-Lymphom (Garfall, Maus et al. 2015, Turtle, Hanafi et al. 2016).

Dem gegenüber steht das Konzept der aktiven Immuntherapie. Diese beruht auf der Stimulation des Immunsystems, vergleichbar mit einer Impfung. Alle Varianten dieses Therapieansatzes verfolgen das Ziel, das Immunsystem im Generieren Tumorspezifischer, zytotoxischer T-Zellen zu unterstützen und auf diesem Weg eine aktive, hochselektive Tumorzelleradikation zu ermöglichen. Je nach Antigenpräsentationsform können verschiedene Strategien unterschieden werden: Vakzinierung mit 1) Peptiden, 2) Proteinen, 3) „nackter DNA“, 4) beladenen, autologen dendritischen Zellen (beladen mit Peptide/Proteine/DNA od. RNA/ Tumorlysat) 5) Tumorlysat (autolog, allogene, gemischt autolog-allogene).

Für Vakzinierungsversuche auf der Basis von HLA-restringierten Epitopen oder Proteinen werden in der Regel zusätzlich die oben bereits erwähnten Adjuvantien, z. B. das Zytokin *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) oder der Toll-like Rezeptor-Agonist Imiquimod (Walter, Schafer et al. 2013) verwendet. Diese sollen den Aktivierungs- und Reifungsprozess der antigenpräsentierenden Zellen fördern, sowie die Tumorantigenaufnahme und -präsentation unterstützen (Kavanagh, Ko et al. 2007). Für Impfversuche auf der Basis dendritischer Zellen (DCs) werden DCs aus autologen peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) durch Selektions- und Differenzierungsprozesse *in vitro* gewonnen und anschließend mit dem gewählten Antigen transfiziert (Anguille, Lion et al. 2011).

1.5 Akute myeloische Leukämie (AML)

Die akute myeloische Leukämie (AML) gehört zum Formenkreis der hämatologischen Neoplasien mit variabler Beteiligung der myeloischen Zelllinien. Pathogenetisch basiert sie auf einer Transformation und deregulierten Proliferation hämatopoetischer Vorläuferzellen (Estey and Dohner 2006). Im Erwachsenenalter stellt sie mit einem Anteil von 80 % die häufigste Form der akuten Leukämie dar. Sie betrifft alle Altersgruppen, tritt jedoch insbesondere im höheren Alter (Altersmedian liegt bei 69 Jahren) auf (SEER. Cancer Statistics Review 1975-2004. [Accessed January 2008]. <http://seer.cancer.gov>; <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2011/cancer-facts-and-figures-2011.pdf>; abgerufen am 5. Februar 2017). Die Häufigkeit dieses Krankheitsbildes liegt im Mittel bei 3,6 Erkrankungen pro 100 000 Einwohner pro Jahr. In der Gruppe der

über 70-jährigen Patienten sind hingegen aufgrund der mit zunehmendem Alter deutlich ansteigenden Inzidenz über 100 Neuerkrankungen pro 100 000 Einwohner verzeichnet. Im Schnitt scheinen Männer (58 %) häufiger als Frauen (42 %) betroffen zu sein (SEER. Cancer Statistics Review 1975-2010, Data submission Nov 2012, posted 2013; abgerufen am 11. Mai 2017).

Die Erkrankung ist biologisch heterogen und führt unbehandelt in kurzer Zeit zum Tod. Bevor wirksame Therapeutika in der AML-Behandlung zum Einsatz kamen, verstarb circa die Hälfte der Patienten innerhalb von fünf Monaten, die restlichen Neuerkrankten innerhalb eines Jahres nach Auftreten der ersten Krankheitssymptome (Southam, Craver et al. 1951). Komplette Remissionen und Langzeiterfolge wurden erst durch die Einführung der Zytostatika Daunomycin (Southam, Craver et al. 1951, 1969) und Cytarabin (Crowther, Bateman et al. 1970) erzielt. Seit den 1970er Jahren hat sich die Prognose für die AML-Patienten insgesamt kontinuierlich verbessert. Von den erzielten Behandlungsfortschritten profitierten insbesondere die jungen Patienten, für die seit den 1980er Jahren ein Anstieg des 5-Jahresüberlebens (5-JÜ) von 17 auf 34% verzeichnet wurde (Büchner, Berdel et al. 2005, Buchner, Hiddemann et al. 2001). Die Prognose der über 60-jährigen Patienten blieb dagegen fast unverändert ungünstig (Anstieg des 5-JÜ von 11 auf 15 % seit den 1980er Jahren (Büchner, Berdel et al. 2005, Buchner, Hiddemann et al. 2001).

Eine Ausnahme bildet die akute promyelozyten Leukämie (APL) mit einer Langzeit-Prognose für das Überleben von 80 %, sofern akute initiale Gerinnungsentgleisungen beherrscht werden können (Lo-Coco, Avvisati et al. 2013).

1.5.1 Ätiologie

Prinzipiell werden drei Entstehungsarten für die AML unterschieden: 1) „*de novo*“ AML, 2) sekundäre AML (sAML) und 3) Therapie-assoziierte AML (tAML). Während sich die *de novo* AML meist ohne Prodromi entwickelt, geht die sAML aus einer anderen myeloischen Neoplasie, z. B. dem myelodysplastischen Syndrom (MDS), hervor. tAMLs treten insbesondere fünf bis zehn Jahre nach einer zurückliegenden Alkylantien- (z. B. Cyclophosphamid) oder Strahlentherapie auf. Daneben resultieren auch aus einer Doxorubicin- und Etoposidbehandlung zeitverzögert genetische

Veränderungen wie z. B. balancierte Translokationen wie t(8,21) gemeinsam mit einer AML-Manifestation (Estey and Dohner 2006, Pedersen-Bjergaard, Andersen et al. 2007).

1.5.2 Pathogenese:

Gesunde hämatopoetische Zellen des Menschen erwerben im Verlauf des Lebens viele Mutationen ohne biologische Konsequenz (sog. „bystander mutations“). Erst wenn eine AML-auslösende Mutation (sog. „driver mutation“) entsteht, erfolgt die Transformation in eine Leukämiezelle. Klinisch manifest wird die Leukämie allerdings erst durch die Akkumulation sog. „kooperierender Mutationen“, die einem entstandenen Leukämieklon einen Selektionsvorteil verschaffen (Welch, Ley et al. 2012). Ausgangspunkt der pathologischen Transformation bilden meist die proliferativen Progenitorzellen (CD34⁺, CD38⁺) oder gelegentlich hämatopoetische Stammzellen (CD34⁺, CD38⁻). In Folge der abnormen Proliferation des maligne-entarteten Klons kommt es zu einer Verdrängung des gesunden Knochenmarks in deren Folge die Leukämie klinisch apparent wird.

Im Rahmen der zunehmenden und besseren genetischen Diagnostikmöglichkeiten zeigte sich, dass bei der AML verschiedene zyto-& molekulargenetische Veränderungen beobachtet werden können (Shen, Zhu et al. 2011, (Mrozek, Heerema et al. 2004, Rowley 2008) Mrozek, Marcucci et al. 2012, Patel, Gonen et al. 2012). *Next generation sequencing* (NGS) brachte die Erkenntnis, dass selbst in einem Patienten verschieden transformierte Subklone, durchaus auch zeitgleich, nebeneinander bestehen können. Ihr zahlenmäßiges Verhältnis zueinander kann sich dabei im Laufe der Erkrankung verändern. Diese klonale Heterogenität hat wahrscheinlich wesentliche Bedeutung für das Ansprechen auf die durchgeführte Behandlung, sowie die Entwicklung eines Erkrankungsrückfalls (Rezidiv).

Eine Studie aus dem Jahr 2013 berichtet von durchschnittlich circa fünf nachgewiesenen Mutationen pro Patient. Die verschiedenen identifizierten Mutationen wurden zunächst in zwei große Klassen unterschieden (Kelly and Gilliland 2002). Entsprechend des sog. „two-hit model of leukoemogenesis“ (Kelly and Gilliland 2002, Shih, Abdel-Wahab et al. 2012), etliche Jahre akzeptiertes Model der

Leukämieentstehung, treten Mutationen beider Klassen im Rahmen der Leukämieentwicklung in Verbindung miteinander auf.

Alle Mutationen, die der Klasse I zugerechnet werden, haben die Aktivierung pro-proliferativer Signale zur Folge. Sie führen u. a. zur unkontrollierten Zellproliferation, Apoptosehemmung, zur dauerhaften Aktivierung von Tyrosinkinase und der Dysregulation von down-streamsignaling Molekülen (Bacher, Schnittger et al. 2010, Kelly and Gilliland 2002, Shih, Abdel-Wahab et al. 2012). Häufig werden Mutationen dieser Klasse in folgenden Genen gefunden: z. B. FLT3 (internal tandem duplication ITD, tyrosine kinase domain mutations TKD) (in circa 28 % der Fälle), K/NRAS (in circa 12 % der Fälle), TP53 (in circa 8 % der Fälle) und c-KIT (in circa 4 % der Fälle). Die *FMS-related Tyrosinkinase 3* (FLT3) besteht aus folgenden funktionellen Bereichen: 1) die autoinhibierend-wirksame, juxtamembranäre Domäne (durch die IT-Mutation konstitutiv aktiviert) und 2) den „activation loop“ der Tyrosinkinasedomäne (TKD) (Bacher, Schnittger et al. 2010). Die Familie der RAS-Onkogene vermittelt multiple Funktionen im Bereich der ligandenabhängigen Signaltransduktion.

Genetische Veränderungen, welche die hämatopoetische Differenzierung beeinträchtigen bzw. negativ beeinflussen, werden in der zweiten Kategorie subsummiert. Als bekannte Vertreter gelten NPM1 (in circa 27 % aller Fälle detektiert) (Grisendi, Mecucci et al. 2006) und CEBPA (in circa 6 % aller Fälle detektiert) (Pabst, Mueller et al. 2001). Nukleozytoplasmatisches Transportphosphoprotein (NPM1) wirkt u. a. transkriptionsregulierend. Im Falle einer NPM1-Mutation im Exon 12 kommt es zu einer Inhibition des ARF-p53-Tumorsuppressor-Signalwegs (Grisendi, Mecucci et al. 2006). CEBPA dient als Transkriptionsfaktor der Differenzierung neutrophiler Granulozyten (Pabst, Mueller et al. 2001).

Im Verlauf etablierte sich noch eine dritte Gruppe, welche Mutationen in DNA-Methylierungsgenen, wie z. B. DNMT3A, TET2, sowie IDH-1 und IDH-2, umfasst. Diese Veränderungen finden sich bei über 40 % der AML Patienten (Reilly 2005, Patel, Gonen et al. 2012).

Im Zuge stetig verbesserter Analysemethoden und -qualität, insbesondere dank *Nextgeneration Sequencings* und anderer *Hightroughput*-Techniken, werden heute neun verschiedene Mutationsgruppen unterschieden:

1. mutationsbedingte Signaltransduktionsaktivierung (z. B. FLT3, KIT, KRAS,

- NRAS)
2. mutationsbedingte Veränderung myeloischer Transkriptionsfaktorwirkung (beispielsweise RUNX1, CEBPA)
 3. Fusionsgenentstehung mit Transkriptionsfaktorfunktion (u. a. PML-RARA, MYH11-CBFB)
 4. mutationsbedingte Veränderung von Chromatinmodifikatoren (u. a. MLL-PTD, ASXL1)
 5. mutationsbedingte Veränderungen im Kohesinkomplex (z. B. SMC1S)
 6. Spliceosommutationen
 7. Mutationsbedingter Verlust von Tumorsuppressorgenen (z. B. TP53, WT1)
 8. NPM1-Mutationen
 9. mutationsbedingte Veränderungen im DNA-Methylierungsmuster (z. B. TET1, TET2, IDH1, IDH2, DNMT3B, DNMT1, DNMT3A mit konsequenter veränderter epigentischer Regulation)

Neben der Art und Kombination genetischer Veränderungen spielen auch der Zeitpunkt und die Reihenfolge des Auftretens der „Hits“ eine wichtige Rolle für die Leukomogenese (Song, Mercer et al. 2011, Murati, Brecqueville et al. 2012). Vor diesem Hintergrund wird das *two-hit-modell* als eine potentiell zu stark vereinfachte Vorstellung der Leukämiegenese vielerseits deutlich in Frage gestellt (Reilly 2005, Patel, Gonen et al. 2012).

1.5.3 Risikofaktoren:

Die Exposition u. a. gegenüber radioaktiver Strahlung, Benzolen, Tabak (Fircanis, Merriam et al. 2014), Pestiziden, Mineralölprodukten und Zytostatika aus dem Bereich der Alkylanzien und Topoisomerase-2-Hemmer (Sill, Olipitz et al. 2011) sowie eine Erkrankung am myelodysplastischen Syndrom (Weinberg, Seetharam et al. 2009) zählen zu den bedeutenden Risikofaktoren (Reilly 2005, Patel, Gonen et al. 2012). Eine Übersicht über die aktuelle Risikogruppeneinteilung der WHO bietet Tabelle 1.2.

Tabelle 1.2: Klassifikation der AML in Anlehnung an die WHO-Klassifikation der AML und verwandter Erkrankungen (Stand: 2016) (Arber, Orazi et al. 2016)

Subgruppe	Spezifizierung
Akute myeloische Leukämie mit rekurrenten, zytogenetischen Veränderungen	<ul style="list-style-type: none"> • AML mit t(8:21) (q22;q22); RUNX1-RUNX1T1 • AML mit inv(16) (p13.1q22) od. t(16;16)(p13.1;q22); CBFβ-MYH11) • APL mit PML-RARA • AML mit t(9;11) (p21.3;q23.3); MLLT3-KMT2A ML with t(6;9) (p23;q34.1); DEK-NUP214 • AML mit inv (3) (q21.3q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2, MECOM • AML (megakaryoblastisch) mit t(1;22) (p13.3;q13.3); RBM15-MKL1 • AML mit BCR-ABL1 (provisorische Entität) • AML mit mutiertem NPM1 • AML mit biallelischen CEBPA- Mutationen • AML mit mutiertem RUNX1 (provisorische Entität)
Therapie-assoziierte hämatologische Neoplasien	<ul style="list-style-type: none"> • AML mit minimaler Differenzierung • AML ohne(Aus)reifung • AML mit Ausreifung • Akute myelomonozytäre Leukämie • Akute megakaryoblastische Leukämie • Akute erythrozytäre Leukämie • Akute megakaryoblastische Leukämie • Akute basophilie Leukämie • Akute panmyeloische Leukämie mit Myelofibrose
Myeloisches Sarkom	
Myeloische Proliferationen assoziiert mit dem Down Syndrom	<ul style="list-style-type: none"> • Transiente abnormale Myelopoese • ML associated with Down syndrome
AML mit Myelodysplasie-bedingten Veränderungen	

1.5.4 Klinik:

Infolge der progredienten hämatopoetischen Insuffizienz werden die meisten AML-Patienten durch Zeichen der Anämie (körperliche Schwäche, Blässe, reduzierte Leistungsfähigkeit), der Neutropenie (protrahiertes Fieber, Infektionen- v. a. bakteriell-bedingte Atemwegserkrankungen und systemische Mykosen) und der Thrombozytopenie (Petechien, Epistaxis, Menorrhagien) klinisch auffällig. Auch eine disseminierte intravasale Gerinnung, Hyperfibrinolyse oder Blutungsneigung zählen zu wichtigen Symptomen. Insbesondere die sog. akute Promyelozytenleukämie wird verstärkt mit Blutungsneigung als Folge von Verbrauchskoagulopathie und Fibrinolyse assoziiert (Kwaan, Wang et al. 2002).

Laborchemisch zeigen knapp zwei Drittel der Patienten eine Leukozytose. Bei einer Leukozytenzahl über 100 000/μl steigt die Gefahr vasoookklusiver Komplikationen wie z. B. Hypoxie, retinaler Einblutungen und neurologischer Ausfallsymptomaten.

Dennoch gelten auch Leukopenien keineswegs als Seltenheit. Aleukämische Verläufe bei normaler oder reduzierter Leukozytenzahl werden insbesondere im Zusammenhang mit sekundären und Therapie-assoziierten AML-Erkrankungen beobachtet. Extramedulläre Manifestationsformen (z. B. Hautinfiltrationen, Meningiosis leukemica, Gingivahyperplasie) treten selten auf (Tsimberidou, Kantarjian et al. 2008). Gehäuft werden sie bei der myelomonozytären Form beobachtet.

1.5.5 Diagnostik

Ein Anteil maligne-transformierter Vorläuferzellen (leukämische Blasten) von $\geq 20\%$ im peripheren Blut oder im Knochenmark (KM) gilt als krankheitsdefinierend. Zur Diagnosesicherung wird neben einer ausführlichen Anamnese und körperlichen Untersuchung ein (Differenzial-)Blutbild sowie eine Knochenmarkszytologie und -chemie angefertigt. Darüber hinaus erfolgen immunphänotypische, zyto- und molekulargenetische Analysen. Ergänzend werden weitere Maßnahmen zur Beurteilung des allgemeinen Gesundheitszustandes (Allgemeinzustands z. B. mittels ECOG-Score, Evaluierung der Komorbiditäten z. B. mittels HCT-CI Score) sowie Untersuchungen zur weiteren Therapievorbereitung und -planung (z. B. Röntgenthorax, Herzechokardiographie, Lungenfunktionsdiagnostik, HLA-Typisierung, CMV-Status-Bestimmung) durchgeführt.

Um im Krankheitsverlauf den Therapieerfolg beurteilen zu können, wurden u. a. folgende Remissionskriterien definiert (Tabelle 1.3):

Tabelle 1.3 Überblick über die wichtigsten Remissionsformen mit ihren jeweiligen Definitionskriterien

Remissionsart	Definitionskriterien
Morphologisch leukämiefreier Zustand	Blasten im KM $< 5\%$; Abwesenheit von Auerstäbchen oder extramedullären Manifestationen
Morphologische komplette Remission	Blasten im KM $< 5\%$; Abwesenheit von Auerstäbchen oder extramedullären Manifestationen; Neutrophile $\geq 1000 \mu\text{l}$ und / oder Thrombozyten $\geq 100\ 000 \mu\text{l}$
Molekulare /zytologisch komplette Remission	CR mit Abwesenheit der bei Erstdiagnose (ED) nachgewiesenen molekularen/ zytogenetischen Abberationen
Partielle Remission	Blasten im KM zw. 5–25 %, Neutrophile $\geq 1000 \mu\text{l}$ und / oder Thrombozyten $\geq 100\ 000 \mu\text{l}$
Minimale Resterkrankung (minimal residual disease, MRD)	morphologisch komplette Remission bei gleichzeitigem Nachweis residueller Tumorzellen mittels sensitiverer Verfahren (v. a. Polymerase chain reaction, PCR); aktuelle Nachweisgrenze unter Verwendung einer real time(RT)- PCR: 1 Tumorzelle pro 10 000–100 000 gesunder Zellen
Rezidiv aus CR	Anstieg der Blasten auf $\geq 5\%$ od. Blasten im peripheren Blut außerhalb einer möglichen reaktiven Blutbildregeneration od. extramedulläre Manifestationen

1.5.6 Therapie

1.5.6.1 Erstlinientherapie

Grundsätzlich kann die AML-Behandlung mit kurativer Therapieintention in eine Induktions- und eine Konsolidierungsphase unterschieden werden. Während der Induktionstherapie wird das Erreichen der kompletten Remission (CR) angestrebt. Die Konsolidierungstherapie verfolgt das Ziel die erreichte CR zu erhalten. Die klinische Erfahrung hat gezeigt, dass ohne fortgesetzte Therapie ein zeitnahes Rezidiv zu befürchten ist. Eine komplette Remission wird bei Patienten unter 50 Jahren in 70–80 %, bei Erkrankten zwischen dem 50 und 75 Lebensjahr in 50–60 % sowie bei über 75-Jährigen in 30–40 % der Fälle erzielt.

Nach der Diagnosestellung sollte so schnell wie möglich mit der Induktionstherapie begonnen werden (Sekeres, Elson et al. 2009). Diese umfasst in der Regel als Therapiestandard eine Kombination aus der Gabe eines Anthrazyklins (z. B. Daunorubicin) über drei sowie Cytarabin über sieben Tage (sog. 3+7 Schema). Bleibt ein Ansprechen auf maximal zwei durchgeführte Induktionszyklen aus, gelten die Patienten als primär refraktär. In diesen Fällen erfolgt die weitere Behandlung im Rahmen sog. Salvage-Chemotherapiekonzepte.

Während der Konsolidierungsphase erfolgt die Therapie entweder mit hochdosiertem Cytarabin oder in Form einer allogenen Stammzelltransplantation. Die jeweilige Therapieentscheidung wird in Abhängigkeit des Allgemeinzustands sowie des Risikoprofils eines Patienten getroffen (Dohner, Estey et al. 2017). Bei älteren Patienten sollte der Beginn einer intensiven, kurativ ausgelegten Therapie sehr sorgfältig abgewogen werden. Die Therapie-assoziierte Toxizität und Frühsterblichkeit ist hoch. Dennoch liegen die Chancen, ohne eine intensive Behandlung eine Langzeitremission zu erzielen, bei nur 10 %. Im Falle einer nicht kurativ ausgerichteten Therapie wird das mediane Überleben auf 10–12 Monate geschätzt (Serve, Krug et al. 2013, Kahl, Krahl et al. 2016).

Bei Patienten mit einem biologischen Alter über 75 Jahren und/oder relevanten Komorbiditäten (u. a. Leber- & Nierenerkrankungen, Herzinsuffizienz mit einer EF < 30 %) wird eher ein palliativ ausgelegter Therapieansatz oder eine Behandlung im

Sinne des *Best Supportive Care* (BSC) angeraten (AbuHammad and Zihlif 2013, Serve, Krug et al. 2013, Kahl, Krahl et al. 2016, Krug, Berdel et al. 2016).

Die palliative Therapie verfolgt das Ziel, die Lebenszeit für einen Patienten bei möglichst guter Lebensqualität zu verlängern. Wichtige Bestandteile dieser Therapieform stellen die zytoreduktive, lebensverlängernde Behandlungen und eine supportive Therapie (best supportive care) dar. Für die i. d. R. ambulant durchgeführte Chemotherapie wird die rein symptomatische Gabe von Hydroxyurea mit dem Ziel der Leukozytenzahlsenkung mit der Verabreichung von hypomethylierenden Substanzen (HMA) z. B. 5-Azacitidin kombiniert. Da nach Beenden dieser Therapie eine rasche Rezidiventstehung beobachtet wurde, sollte die Medikation einmal monatlich bis zum Auftreten eines Krankheitsprogresses fortgesetzt werden (Cabrero, Jabbour et al. 2015). Falls eine HMA-Therapie nicht durchgeführt werden kann oder ein Erkrankungsprogress besteht, wird alternativ häufig auch niedrig-dosiertes Cytarabin (LDAC) eingesetzt (Burnett, Milligan et al. 2007).

Prinzipiell sollte die Therapie der AML im Rahmen einer (multizentrischen) Therapiestudie durchgeführt werden, deren Konzept von randomisierten bis zu Genotyp-spezifischen Behandlungsstrategien reicht.

Besteht morphologisch oder genetisch der Verdacht auf eine akute promyelozyten Leukämie sollte umgehend mit einer All-Trans-Retinolsäure-Therapie begonnen und eine spezifische zytostatische Therapie angeschlossen werden.

1.5.6.2 Rezidivtherapie:

Nach aktueller Datenlage gilt keine der bestehenden Therapiestrategien den Übrigen als überlegen. Es besteht allgemeiner Konsens darin, dass im Rahmen der Salvagetherapie eine Remissions-induzierende Reinduktionstherapie durchgeführt werden sollte. Diese sollte Ara-C in intermediärer oder hoher Dosierung beinhalten. Bei einem Erkrankungsrückfall gilt die allogene Stammzelltransplantation als die Therapie der Wahl für die Konsolidierungsphase (Thol, Schlenk et al. 2015).

Sollten Patienten mit einem Erkrankungsrückfall für diese intensive Therapie nicht geeignet sein, kann alternativ eine Behandlung mit hypomethylierenden Substanzen begonnen werden (Ritchie, Feldman et al. 2013).

1.5.6.3 Neue Therapieansätze:

Aktuell befinden sich diverse Substanzen und neue Therapiestrategien in der Entwicklung. Im Vergleich zu den etablierten Therapien liegt bei allen ein stärkerer Fokus auf der Berücksichtigung pathophysiologischer Erkrankungskriterien. Als gezielte Angriffspunkte fungieren Prozesse des Zellzyklus, diverse Signalwege, die epigenetische Regulation und vermeintlich Leukämienstammzell-spezifische Antigene. Jedoch konnte bisher noch keines dieser neuen Medikamente zugelassen oder gar im Rahmen der Standardtherapie etabliert werden. Nachfolgend sollen kurz einige Ansätze aufgezeigt werden (Tabelle 1.4):

Tabelle 1.4 Übersicht über einige ausgewählte neue bzw. sich aktuell in der klinischen Entwicklung befindenden Therapeutika bzw. Therapiestrategien (Dohner, Weisdorf et al. 2015)

Substanzklasse	Wirkmechanismus und Substanzbeispiel
neue Zytotoxische Substanzen	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Chinolon-Derivat Vosaroxin</i>(Ravandi, Ritchie et al. 2015)
epigenetische Modifikatoren	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Hypomethylierende Substanzen</i> (Bsp.: Azacitidine) (Dombret, Seymour et al. 2015) • <i>IDH1 -Inhibitor</i>(Bsp.:AG-120) • <i>IDH2 -Inhibitor</i> (Bsp.: AG-221) • <i>Histone deacetylase Inhibitor</i> (Bsp.: Pracinostat) • <i>Bromodomain Inhibitor</i> (Bsp.: OTX015) • <i>DOT1L-Inhibitor</i> (Bsp.: EPZ 5676) • <i>LDS1</i> (Bsp.: GSK2879552)
Zellzyklus-Kinase-Inhibitoren	<ul style="list-style-type: none"> • <i>m-Tor Inhibitor</i> (Bsp.: Everolimus) • <i>PIM Kinase-Inhibitor</i> (Bsp.: LGH 447) • <i>MDM2- Inhibitoren</i> (Bsp.: Idasanutlin) • <i>PLK-Inhibitor</i> (Bsp.: Volasertib) • <i>Aurora Kinase Inhibitor</i> (Bsp.: Rigosertib) • <i>Hedgehog-pathway-Inhibitor</i> (Bsp.: Vismodegib)
Tyrosinkinaseinhibitoren	<ul style="list-style-type: none"> • <i>FLT3-Inhibitoren:</i> a) erste Generation (Bsp: Midostaurin), b) zweite Generation (Bsp: Quizartinib) • <i>KIT-Inhibitoren</i> (Bsp.: Dasatinib)
Zellkern-Export-Inhibitor	<ul style="list-style-type: none"> • <i>XPO1</i> (Bsp: Selinexor)
antikörperbasierte Therapie	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Konjugierte Antikörper</i> (Bsp: Gemtuzumab ozogamicin (anti-CD33 und Calicheamicin)) • <i>Bispezifische Antikörper</i> (Bsp.: AMG 330 (anti-CD-33 und CD3)) • <i>Stammzell-Antikörper</i> (Bsp.: CSL362 (Anti-CD123)) • <i>Anti- CXCR4-Antikörper</i> (Bsp.: BMS-936564)
andere:	<ul style="list-style-type: none"> • <i>B-Zell-CLL-Lymphoma2-Protein Inhibitor</i> (Bsp: Venetoclax) • <i>CXCR4-Antagonist</i> (Bsp: Plerixafor) • <i>CAR-T-Zellen</i> (Bsp.: CART-123 (anti-CD123 CARTs))

Aufgrund der hohen Mutationsfrequenz in Tyrosinkinase-Genen, z. B. in FLT3, und des Therapieerfolgs des Tyrosinkinaseinhibitors (TKI) Imatinib in der Behandlung der chronischen myeloischen Leukämie besteht ein großes Interesse an der Entwicklung geeigneter TKIs für die AML. Die bisherigen Ergebnisse der ersten Generation an FLT3-Inhibitoren als Monotherapie sind eher mäßig. Die Toxizität aufgrund mangelnder FLT3-Selektivität der verwendeten Substanzen, rasche Resistenzentwicklung und nur transiente Blastenreduktion zählen zu den wichtigsten Hindernissen. In einer randomisierten Studie zeigte die Kombination aus dem TKI Midostaurin mit einer Standard-Chemotherapie bei FLT3-Mutationsträgern (< 60 Jahre) zum Zeitpunkt der Datenauswertung eine Verlängerung des Ereignis-freien, Rückfall-freien sowie des Gesamtüberlebens (Stone, Fischer et al. 2012). Eine kleine Untersuchung mit dem TKI Dasatinib in Kombination mit einer Standardchemotherapie zeigte bei Patienten mit t(8,21) oder inv(16) ein Angleichen der Remissionsraten sowie des rezidivfreien Überlebens zwischen den Kohorten mit und ohne c-Kit Mutation (Ustun and Marcucci 2015). Aktuell befinden sich selektivere, sog. zweitgenerations-FLT3-TKIs, z. B. Quizartinib (AC220) in randomisierten klinischen Überprüfungen (Cortes, Kantarjian et al. 2013).

Daneben hat sich die Entwicklung epigenetischer Therapien zu einem vielversprechenden Forschungsansatz entwickelt. Als besonders interessant gelten aktuell AG-120 sowie AG-221, welche die bei circa 20 % der AML-Patienten mutierten Enzyme IDH1 (AG-120) bzw. 2 (AG-221) inhibieren (Wang, Travins et al. 2013). In einem AML-Xenograft-Modell schien der Differenzierungsblock der Leukämiezellen durch die Gabe von AG-221 überwindbar. Da Patienten mit einer IDH1- oder 2-Mutation in durchgeführten Untersuchungen ein besseres Ansprechen auf den BCL-2-Inhibitor Venetoclax zeigten, eignen sich diese Substanz eventuell für eine Kombinationstherapie.

Daneben werden auch neue Zytostatika entwickelt, wie beispielsweise Vosaroxin, ein Chinolon-Derivat, das die Topoisomerase-II inhibiert, sowie DNA-interkalierende Eigenschaften aufweist. In einer randomisierten, kontrollierten Studie zeigte die kombinierte Verabreichung von Vosaroxin und Cytarabin (intermediär dosiert) deutlich höhere CR-Raten im Vergleich zu alleiniger Cytarabin-Applikation. Den deutlichsten Nutzen der Therapie mit Vosaroxin verzeichnete die Gruppe der über 60-Jährigen

Patienten. Gemäß der Studie gab es keinen Unterschied zwischen Prüf- und Kontrollkohorte bezüglich Frühmortalität, organspezifischer Toxizität und Gesamtüberleben (Ravandi, Ritchie et al. 2015). Daneben werden derzeit u. a. das Zweitgenerations-Nukleosid-Analogon Clofarabin, das unter anderem für die Rezidivtherapie kindlicher akuter lymphatischer Leukämie zugelassen ist, und Sapacitabin als weitere neuartige, klassische Chemotherapeutika klinisch erprobt (Montalban-Bravo and Garcia-Manero 2015, Burnett, Russell et al. 2013)

Immuntherapeutisch gewinnen u. a. CD33-gerichtete Antikörper, als bispezifische Antikörper (anti-CD3 und anti-CD33), Antikörper-Zytotoxin-Konjugate wie z. B. Gemtuzumab-Ozogamicin mit Zytotoxin Calicheamicin (GO), an Aufmerksamkeit. Wegen des Verdachts signifikanter Toxizitätssteigerung bei therapeutischer Kombination mit Standard-Chemotherapien wurde GO zwar vor circa zehn Jahren vorerst vom Markt genommen. Studien, die in den darauffolgenden Jahren publiziert wurden, zeigten jedoch ein uneinheitliches Bild. In der Gesamtschau zeichnet sich der Trend einer reduzierten Rezidivrate, sowie eines verlängerten rezidivfreien Überlebens aller AML-Subgruppen ab (Hills, Castaigne et al. 2014). Insbesondere ältere Patienten mit einem günstigen bis intermediären Risikoprofil schienen von dieser Therapie zu profitieren (Petersdorf, Kopecky et al. 2013).

Auch die Entwicklung von anti-CD123- (transmembranäre alpha-Kette des IL-3-Rezeptors) Antikörpern stellt einen interessanten Ansatz dar. CD-123 wird nach derzeitigem Kenntnisstand besonders auf leukämischen Stammzellen exprimiert. Dieses Oberflächenmolekül wird aktuell neben dem Folatrezeptor- β (Wang, Zheng et al. 2000, Lynn, Poussin et al. 2015) und CD33 auch als Target für eine CAR-T-Zell-Therapie geprüft (Gill, Tasian et al. 2014). Die Verwendung von CARTs in der AML-Behandlung steht derzeit noch ganz am Anfang. Es besteht jedoch große Hoffnung, dass sie sich zukünftig zu einer sehr vielversprechenden Therapieoption insbesondere für Patienten mit Rezidiv oder refraktärer AML entwickeln könnten.

Auch der Einsatz von anti-CTLA-4- sowie anti-PD-1 gerichteten Antikörpern in der AML-Therapie wird derzeit geprüft (Sehgal, Whiteside et al. 2015).

Entsprechend der neuen pathophysiologischen Erkenntnisse befinden sich viele weitere Substanzen in Entwicklung und klinischen Erprobung. Dazu zählen u. a. **epigenetischer Modifiers**, wie z. B. die IDH1- und 2 Inhibitoren (z. B. *AG120* bzw. *AG 221*, Dohner,

Weisdorf et al. 2015) und die Histon-Deacetylase-Inhibitoren (z. B. *Vorinostat* und *Racinostat* (Montalban-Bravo and Garcia-Manero 2015)), **B-Zell-CLL-Lymphoma-2 protein-Inhibitoren** (z. B. *Venetoclax*, Dohner, Weisdorf et al. 2015), **Zell-Zyklus-Kinasen-Inhibitoren** u. a. PLK-Inhibitor (z. B. *Volasertib*) und PIK3-Inhibitor (z. B. *Rigosertib* (Montalban-Bravo and Garcia-Manero 2015)), m-TOR-Inhibitoren (z. B. *Everolimus* und *Temsirolimus*, (Dohner, Weisdorf et al. 2015) Hedghog- Inhibitoren (z. B. *Vismodegib* (Montalban-Bravo and Garcia-Manero 2015)) und **selektive Inhibitoren nukleärer Exportproteine**, beispielsweise XPO1-Inhibitor (z. B. *SINE Selinexor* (Dohner, Weisdorf et al. 2015)).

1.5.6.4 Aktive, Peptid-basierte Krebsimmuntherapie für die Behandlung der akuten myeloischen Leukämie

Auf der Grundlage der bereits dargelegten Kriterien zur Definition von Tumorantigenen wurden in der Vergangenheit auch diverse sog. Leukämie-assoziierte Antigene für die AML beschrieben. Zu den bekannten, etablierten AML-assoziierten Antigenen zählen z. B. die Leukämie-spezifischen Antigene: NPM1, FLT3-ITD, PML-RARA, die Leukämie-assoziierten-Antigene: WT1, RHAMM, PR1, MPO sowie die Cancer-Testis-Antigene: Cyclin A1, MAGE, PASD1 und PRAME (Anguille, Van Tendeloo et al. 2012). Zur Evaluation der *in vivo* Immunogenität und klinischen Wirksamkeit wurden in den vergangenen Jahren mehrere Vakzinierungsstudien gegen etablierte Leukämie-Antigene durchgeführt. Zum Einsatz kamen dabei vor allem Wilms Tumor Protein 1 (WT1), Proteinase-3 (PR1) und Receptor of hyuloronan-mediated motility (RHAMM). Einen grob-zusammenfassenden Überblick der Gesamtergebnisse bietet die nachfolgende Tabelle 1.5.

Tabelle 1.5: Überblick über bereits für Vakzinierungsstudien verwendete Leukämie-assoziierte Antigene, sowie Informationen zu deren onkogenem und immunogenem Potential

Leukämie-Antigen	Onkogenes Potential	Immunogenität-humoral	Immunogenität-MHC-Klasse/zellulär	Immunogenität-In vivo
PR-3	positiv (Greiner, Bullinger et al. 2008)	unbekannt	I (CD8) (Beatty, Smith et al. 2009)	induziert (Qazilbash MH, Wieder ED, Thall PF, Wang X, Rios RL, Lu S et al. 2007)
RHAMM	positiv (Greiner, Bullinger et al. 2008)	Positiv (Qazilbash MH, Wieder ED, Thall PF, Wang X, Rios RL, Lu S et al. 2007; Qazilbash MH, Wieder E, Rios R, Lu SJ, Kant S, Giralt S et al. 2004(Rezvani, Yong et al. 2008))	I (CD8)(Greiner, Ringhoffler et al. 2002, Greiner, Li et al. 2005, Greiner, Schmitt et al. 2006, Greiner, Bullinger et al. 2008)	induziert (Schmitt, Schmitt et al. 2008)
WT1 (Greiner, Bullinger et al. 2008)	positiv (Greiner, Bullinger et al. 2008)	positiv	I (CD8) II (CD4)	Induziert (Sugiyama 2010) natürlich ((Van Driessche, Berneman et al. 2012)

Die meisten Untersuchungen konzentrierten sich auf die Analyse des Selbstantigens Wilms Tumor Protein 1 (WT1). Dieser Transkriptionsfaktor ist u. a. an der Zellproliferation und Apoptose beteiligt (Rauscher, Morris et al. 1990, Harrington, Konicek et al. 1993, Englert, Hou et al. 1995). Die Mehrheit der akuten myeloischen Leukämien weist eine starke Expression dieses Zinkfingerproteins auf (Inoue, Sugiyama et al. 1994). Hohe Expressionslevel scheinen sowohl mit der Leukomogenese, als auch mit einem Krankheitsprogress assoziiert zu sein (Algar, Khromykh et al. 1996, Nishida, Hosen et al. 2006, Sugiyama 2010).

Im Rahmen von WT1-basierte Impfstudien (Peptid- und DC-Vakzinen) konnte die Induktion spezifischer CD8⁺-T-Zell-Antworten nachgewiesen werden (Van Driessche, Berneman et al. 2012). In den untersuchten Patienten gelang es eine Reihe immogener Peptidsequenzen zu detektieren u. a.: WT1₃₇₋₄₅ (HLA-A*02), WT1₁₂₆₋₁₃₄ (HLA-A*02) (Mailander, Scheibenbogen et al. 2004, Keilholz, Letsch et al. 2009, Maslak, Dao et al. 2010, Kuball, de Boer et al. 2011, Rezvani, Yong et al. 2011), WT1₁₈₇₋₁₉₅ (HLA-A*02) und WT1₂₃₅₋₂₄₃ (HLA-A*24) (Oka, Tsuboi et al. 2004, Yasukawa, Fujiwara et al. 2009, Tsuboi, Oka et al. 2012, Van Tendeloo, Van de Velde et al. 2010, Van Driessche, Berneman et al. 2012). Darüber hinaus wurden für WT1 außerdem verschiedene MHC-Klasse-II-restringierte Epitope beschrieben (Mailander, Scheibenbogen et al. 2004, Oka, Tsuboi et al. 2004, Asemissen, Keilholz et al. 2006, Bijker, van den Eeden et al. 2007, Maslak, Dao et al. 2010, Sugiyama 2010). In den meisten bisher durchgeführten Studien wurde ein HLA-A*02 restringiertes Peptid (insbesondere WT1₁₂₆₋₁₃₄) sowie gelegentlich auch das HLA-A*24 restringierte-WT1₂₃₅₋₂₄₃-Peptid in Kombination mit

dem Adjuvanz GM-CSF eingesetzt. In der nachfolgenden Tabelle 1.6 ist eine kleine Auswahl dieser Studien zusammengestellt.

Tabelle 1.6: Überblick über einige ausgewählte Impfstudien auf der Basis von WT1-Peptiden In Anlehnung an DiStasi et al 2015

KLH=keyhole limpet hemoyanin; mISA51= montanide ISA51, CPG7909= immunstimulatory toll like receptor 9 agonist oligodeoxynucleotide

Diagnose	Klinischer Status bei Vakzinierungsbeginn	Epitop	Vakzinierung (Anzahl und Adjuvanz)	In vivo Immunität	Klinische Bedeutung	Quelle
AML (n=4), andere Neoplasien (n=5)	Aktiver Erkrankungszustand	WT1 ₁₂₆₋₁₃₄ , PR1 ₁₆₉₋₁₇₇	6x, (CPG7909, mISA51)	-	2x stabile Erkrankung, 2x Erkrankungsprogress	(Kuball, de Boer et al. 2011)
AML (n=9)	MRD	WT1 ₁₂₆₋₁₃₄	6-12x, mISA51	+	5x CR, 4x Rezidiv	(Maslak, Dao et al. 2010)
AML (n=1)	Aktiver Erkrankungszustand	WT1 ₂₃₅₋₂₄₃	20x, mISA51	?	1x morphologische CR, 1x molekulare CR	(Yasukawa, Fujiwara et al. 2009)
AML (n=6)	6xCR	WT1 ₁₂₆₋₁₃₄ , PR1 ₁₆₉₋₁₇₇	6, mISA51	?	2x CR, 1x stabile Erkrankung, Erkrankungsprogress, 4 Rezidiv	(Rezvani, Yong et al. 2011)
AML (n=5)	4x CR, 1x refraktäre Anämie	WT1 ₁₂₆₋₁₃₄ , PR1 ₁₆₉₋₁₇₇	6x, mISA51	+	3x CR, 2x stabile Erkrankung, 2 Rezidiv	(Rezvani, Yong et al. 2008).
AML (n=3)	MRD	WT1 ₂₃₅₋₂₄₃	Mehrfach, mISA51	+	3x CR > 8 Jahre	(Tsuboi, Oka et al. 2012)
AML (n=12)	8x CR, 4x MRD	WT1 ₂₃₅₋₂₄₃	3x, mISA51	+	5x molekulare CR, 2x partielle Remission, 1x stabile Erkrankung, 2x Erkrankungsprogress	(Oka, Tsuboi et al. 2004)
AML (n=17), MDS (n=2)	13x Erkrankungsprogress, 2 partielle Remission	WT1 ₁₂₆₋₁₃₄	4-27x, KLH	?	1x CR, 13x stabiler Erkrankungszustand, 4 Erkrankungsprogress	(Keilholz, Letsch et al. 2009)
AML (n=1)	Partielle Remission	WT1 ₁₂₆₋₁₃₄	15x; KLH	+	morphologische /molekulare CR	(Mailander, Scheibenbogen et al. 2004)

In vier Studien (n=23 Patienten; Testpeptid: 3x WT1₁₂₆₋₁₃₄ (Mailander, Scheibenbogen et al. 2004, Oka, Tsuboi et al. 2004, Rezvani, Yong et al. 2008), 1x WT1₂₃₅₋₂₄₃ (Hashii, Sato-Miyashita et al. 2012)) wurde auf der Basis von Tetramer- oder Elispotanalysen von einer mindestens 2,4-fachen Expansion WT1-spezifischer T-Zellen nach durchgeführter Vakzinierung berichtet (Mailander, Scheibenbogen et al. 2004, Oka, Tsuboi et al. 2004, Hashii, Sato-Miyashita et al. 2012). Wie in obiger Tabelle dargelegt, ließ sich kein einheitliches Bild für die klinischen Ergebnisse dieser Studien zeichnen. Im Zusammenhang mit der Auswertung ihrer klinischen Ergebnisse haben Rezvani und

Kollegen jedoch eine signifikante Korrelation zwischen WT1-spezifischen T-Zellen und Normalisierung WT1-mRNA-Leveln ($P < 0,01$) detektiert. Gleichzeitig beobachteten sie einen erneuten Anstieg der WT1-Transkription bei Abnahme der entsprechenden zytotoxischen T-Zellen (Rezvani, Yong et al. 2008).

Der Receptor of hyaluronan-mediated motility, ein normalerweise zytoplasmatisch lokalisiertes Protein, steht im Ruf von myeloischen Neoplasien hochfrequent exprimiert zu werden (Greiner, Ringhoffer et al. 2002). In Verbindung mit Hyaluronsäure und CD44 soll er über Aktivierung von ERK1/2 einer Zelle invasives Verhalten/Wachstum ermöglichen (Tolg, Hamilton et al. 2006).

Schmitt und Kollegen analysierten *in vivo* das immunogene Potential des HLA-A*02 restringierten Peptids RHAMM₁₆₅₋₁₇₃ in einer Phase-I-Impfstudie nach viermaliger, subkutaner Vakzinierung von u. a. drei AML-Patienten. Zu Studienbeginn zeigten zwei der Probanden einen langsam-progredienten Krankheitsverlauf, der dritte befand sich im Rezidiv (Schmitt, Schmitt et al. 2008). Es gelang Schmitt et al., einen Frequenzanstieg RHAMM-Tetramer⁺CD8⁺-T-Zellen in zwei von drei analysierten AML-Patienten zu detektieren. Für einen dieser beiden Patienten konnte nach Abschluss der Vakzinierung zusätzlich eine Reduktion der Blastenzahl im Knochenmark beobachtet werden (Schmitt, Schmitt et al. 2008). Diese Ergebnisse ließen sich in einer zweiten Studie, die ein Kollektiv von neun Patienten mit verschiedenen myeloischen Erkrankungen umfasste und auf der Applikation höher dosierten RHAMMs₁₆₅₋₁₇₃ basierte, nicht reproduzieren (Schmitt, Schmitt et al. 2008, Greiner, Schmitt et al. 2010).

Die Arbeitsgruppe um Mellodrem vom MD Anderson Cancer Centre untersuchte unter anderem die Immunogenität von PR1 (Qazilbash MH, Wieder E, Rios R, Lu SJ, Kant S, Giralt S et al. 2004). Proteinase3-Expression gilt in vielen myeloischen Neoplasien als gesteigert (Molldrem, Dermime et al. 1996). Das verwendete HLA-A*02-restringierte, nonamere Peptid PR1₁₆₉₋₁₇₇ wurde an einem Patientenkollektiv verschiedener, myeloischer Erkrankungen getestet (AML, CML, MDS) (Qazilbash MH, Wieder E, Rios R, Lu SJ, Kant S, Giralt S et al. 2004). Etwa die Hälfte der untersuchten Kohorte zeigte in Folge der Vakzinierung einen mindestens zweifachen Anstieg der PR1-spezifischen zytotoxischen T-Zellen (Qazilbash MH, Wieder E, Rios R, Lu SJ, Kant S, Giralt S et al. 2004). Klinisch finden sich Hinweise auf einen positiven Einfluss der

Vakzin-induzierten Immunreaktion, gerichtet gegen PR1, auf das Erkrankungs-freie, sowie Gesamtüberleben von AML-Patienten (Qazilbash MH, Wieder ED, Thall PF, Wang X, Rios RL, Lu S et al. 2007).

Neben diesen Einzelpeptidimpfstudien wurde von Rezvani et al. sowie Maslak und Kollegen auch eine Peptidmischung aus PR1₁₆₉₋₁₇₇ und WT1₁₂₆₋₁₃₄ in einer Vakzinierungsstudie getestet. Dabei wurden in allen analysierten AML-Patienten (n=5) PR1-spezifische CD8⁺-Zell-Antworten in Folge der Vakzinierung beobachtet (Rezvani, Yong et al. 2008, Maslak, Dao et al. 2010, Rezvani, Yong et al. 2011). Rezvani et al. beobachteten, dass die Ausbildung hoch-avider PR1- und bzw. oder WT1-gerichteter T-Zellen für die weitere positive klinische Entwicklung bedeutsam zu sein schienen. In Folge ihrer durchgeführten Vakzinierung berichten sie über die Reduktion der detektierten WT1-mRNA-Level.

In Bezug auf die *in vivo* Immunogenität und erste Beobachtungen zur klinischen Wirkung zeigen diese Studien insgesamt aussichtsreiche Ergebnisse für eine Peptid-basierte Krebsimmuntherapie zur Behandlung der AML. Eine breite Anwendbarkeit dieser Vakzinen sowie ein stabiler, durchschlagender Erfolg blieb bisher noch aus.

1.5.7 Prognose:

Die Prognose eines Patienten wird am stärksten durch sein Alter und die individuell vorliegenden zyto- und molekulargenetischen Veränderungen beeinflusst. Im Allgemeinen sinkt die Chance auf eine komplette Remission mit zunehmendem Alter. Gleichzeitig steigt jedoch die Rezidivwahrscheinlichkeit an. Das European Leukemia NET (ELN) unterteilt die Patienten auf der Grundlage ihrer zyto- und molekulargenetischen Veränderungen bei Erstdiagnose in drei Risikogruppen: günstig, intermediär und ungünstig (Tab.1.7). Darüberhinaus gelten auch ein hoher Laktatdehydrogenasewert (LDH) sowie eine hohe Leukozytenzahl bei Erstdiagnose als prognostisch eher ungünstig (Pastore, Dufour et al. 2014).

Tabelle 1.7: Klassifikation der Risikogruppen anhand molekular- und zytogenetischer Faktoren in Anlehnung an das European Leukemia (Version 2016);

FLT3-ITD^{niederrfrequent} = Mutant-Wildtyp-Allel-Quotient <0,5; FLT3-ITD^{hochfrequent} = Mutant-Wildtyp-Allel-Quotient ≥0,5. Die Bestimmung basiert auf einer semi-quantitativen Messung des FLT3-ITD Allel-Quotienten unter Verwendung der DNA-Fragment-Analyse. ²⁾In Anwesenheit seltenerer, als ungünstig bewerteter Veränderungen gibt eine Translokation t(9;11) den Ausschlag für eine Einstufung in die intermediäre Risikogruppe ³⁾Diese Einteilung besitzt nur dann eine Gültigkeit, falls nicht gleichzeitig eine der WHO-definierten AML-typischen Veränderungen vorliegt: (→ t(8;21), inv(16) oder t(16;16), t(9;11), t(v;11)(v;q23.3), t(6;9), inv(3) oder t(3;3) und AML mit BCR-ABL1; ⁴⁾Diese Mutationen werden nur dann als ungünstig eingestuft, falls keine als günstig bewerteten Veränderungen existieren. (Dohner, Estey et al. 2017)

ELN Risikogruppe	Abberationen
günstig	<ul style="list-style-type: none"> t(8;21) (q22;q22); <i>RUNX1-iRUNX1T1</i> inv(16) (p13.1q22) oder t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB- iMYH11</i> Mutiertes <i>NPM1</i> ohne <i>FLT3-ITD</i> (normaler Karyotyp) oder mit <i>FLT3-ITD</i>^{niederrfrequent 1)} biallelisch-mutiertes <i>CEBPA</i> (normaler Karyotyp)
intermediär	<ul style="list-style-type: none"> Mutiertes <i>NPM1</i> mit <i>FLT3-ITD</i>^{hochfrequent 1)} (normaler Karyotyp) Wildtyp <i>NPM1</i> ohne <i>FLT3-ITD</i> (normaler Karyotyp) oder mit <i>FLT3-ITD</i>^{niederrfrequent 1)} (mit oder ohne ungünstige genetische Aberrationen) t(9;11) (p22;q23); <i>MLLT3-KMT2A</i>²⁾ Zytogenetische Aberrationen, die nicht als günstig oder ungünstig eingestuft wurden
ungünstig	<ul style="list-style-type: none"> t(6;9) (p23;q34); <i>DEK-NUP214</i> t(v;11) (v;q23); <i>KMT2A</i>-Genumlagerung t(9;22) (q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i> inv(3) (q21q26.2) oder t(3;3)(q21;q26.2); GATA2, MECOM (<i>EVII</i>) -5 oder del(5q); -7; -17/abnl(17p) komplexer Karyotyp (≥3 Aberrationen³⁾) monosomaler Karyotyp (eine Monosomie, assoziiert mit mindestens einer weiteren Monosomie oder anderen strukturellen, chromosomalenen Veränderungen außer CBF -AML) Wildtyp-<i>NPM1</i> mit <i>FLT3-ITD</i>^{hochfrequent 1)} Mutiertes <i>RUNX1</i>⁴⁾ Mutiertes <i>ASXL1</i>⁴⁾ Mutiertes <i>TP53</i>

1.6 Ziele der vorliegenden Arbeit

Im Verlauf der letzten zehn Jahre haben viel beachtete Forschungsergebnisse im Bereich der allogenen Stammzelltransplantation und des *graft-versus-leukemia-effects* zahlreiche Hinweise auf das immunogene Potential myeloischer Leukämiezellen erbracht (Levine, Braun et al. 2002, Kolb, Schmid et al. 2004, Dohner, Estey et al. 2017). Bestärkt durch diese Ergebnisse, sowie motiviert von den großen Fortschritten auf dem Gebiet der Tumorimmunologie der letzten Jahre, stellte sich die Frage nach dem Therapiepotential einer Peptid-basierten, spezifischen Immuntherapie für die Behandlung von Patienten mit einer akuten myeloischen Leukämie. Hämatologische Neoplasien wie die AML gelten aufgrund ihrer guten Zugängigkeit sowie des quantitativ günstigen Verhältnisses von Immuneffektorzellen zu leukämischen Zellen Blasten im Rahmen einer MRD-Situation bereits seit Längerem als ein potentiell attraktiver Bereich für die Immuntherapie.

Bisherige Peptidvakzinierungsversuche bei Leukämie-Patienten konnten leider noch nicht den erhofften Erfolg erzielen. Dies wird unter anderem dem Mangel geeigneter Leukämie-assoziiertes bzw. spezifischer Antigene zugeschrieben.

Die vorrangigen Ziele dieser Arbeit bestanden deshalb in der Beantwortung folgender Fragen:

1. Besteht eine ausreichend hohe Oberflächenexpression von HLA-Rezeptor-Molekülen auf AML-Zellen, die als Grundvoraussetzung für eine T-Zell-vermittelte Immuntherapie erachtet wird?
2. Gelingt es durch direkte massenspektrometrische Identifikationsmethoden natürlich-präsentierte HLA-Liganden als geeignetere Targets für das Design einer breit einsetzbaren Peptidvakzine zu definieren?
3. Würden derartig identifizierte Peptide über ein ausreichendes immunogenes Potential verfügen, um eine potente, spezifische, T-Zell-vermittelte Immunantwort zu induzieren?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 *Reagenzien, Verbrauchsmaterial, Geräte*

Tabelle 2.1: Übersicht über die verwendeten Reagenzien mit jeweiligem Hersteller und Sitz der Firma

Reagenz	Firma, Sitz der Firma
Acetonitril	Merck KGaA, Darmstadt, D
Acetonitril LC/MS Grade	Thermo Fisher Sciences, Waltham, (MA), USA
Ameisensäure	Merck KGaA, Darmstadt, D
Aqua Life Dead	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt, d
BCIP/NBT Tabletten	Sigma, Taufkirchen, D
BD™ Compensation Beads	BD Biosciences, Heidelberg, D
Bromcyan(BrCN)-Sephrose 4B	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK
Brefeldin A	Sigma Taufkirchen, D
CHAPS	AppliChem, Darmstadt, D
Comassie Brilliant Blue R	Sigma Taufkirchen, D
Cytoperm/Cytofix	BD Biosciences, Heidelberg, D
Essigsäure	Merck KGaA, Darmstadt, D
Ethanol, vergällt (96 %)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Ethanol, Analysezwecke (100 %)	Merck KGaA, Darmstadt, D
EDTA	Sigma, Taufkirchen, D
Extr® Avidin Alkaline Phosphatase	Sigma, Taufkirchen, D
Fetales Kälberserum (FCS)	Lonza, Verviers, B
Lymphozyten-Separationsmedium/Ficoll	Merck KGaA, Darmstadt, D
Formaldehyd	Fluka, Sigma, Taufkirchen, D
Glycin	Roth, Karlsruhe, D
Golgi-Stop	BD Biosciences, Heidelberg, D
HCL > 37%	Merck KGaA, Darmstadt, D
Human Serum	Lonza, Verviers, B
IMDM	Sigma, Taufkirchen, D
Imidazol ACS grade	Merck KGaA, Darmstadt, D
Ionomycin	Sigma, Taufkirchen, D
Isopropanol	Merck, Darmstadt, D
Methanol	Merck, Darmstadt, D
Natriumazid	Sigma, Taufkirchen, D
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, D
Natriumfluorid, > 99 % p. a.	Sigma-Aldrich, St. Louis, (MI), USA
Natriummolybdat, p. a.	Sigma-Aldrich, St. Louis, (MI), USA
Natrium- ortho- Vandat p. a.	Calbiochem, Merck, Darmstadt, D
Natriumpyrophosphat	Sigma-Aldrich, St. Louis, (MI) USA
Natriumtartrat	Sigma-Aldrich, St. Louis, (MI), USA
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	PAA, Pasching, A
Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)	Sigma, Taufkirchen, D
phosphatgepufferte Salzlösung (1fach) PBS	Gibco Life technologies GmbH, Darmstadt, D PAA, Pasching, A
Phytohämagglutinin - L	Roche, Basel, CH
Proteaseinhibitor Complete	Roche, Basel, CH
RPMI1640 Medium	Gibco, Gibco Life technologies GmbH, Darmstadt, D
Saponin	Sigma, Taufkirchen, D

Reagenz	Firma, Sitz der Firma
Trifluoressigsäure (TFA)	Agilent Technologies GmbH, Böblingen, D
Trypanblau	Merck, KGaG, Darmstadt, D
Tween 20	Serva, Heidelberg, D
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, D
Wasser Ultra LC/MS grade	Mallinckrodt Baker, Philipsburg, (PA), USA
7 ⁺ AAD (7 ⁺ Aminoactinomycin D)	BioLegend, San Diego, Ca, USA

Tabelle 2.2 Übersicht über die verwendeten Antikörper mit jeweiligem Hersteller und Sitz der Firma

Antigen	Antikörper/Farbstoff	Hersteller, Sitz der Firma
CD4	CD4-APC-Cy 7	BD Biosciences, Heidelberg, D
CD8	CD8-PE-Cy7	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, D
INF γ	INF-γ-FITC	BD Biosciences, Heidelberg, D
INF-γ	anti-human-INFγ-mAb biotinylated 7-B6-1	Mabtech, Cincinnati, (OH), USA
HLA-A,B,C	HLA-A,B,C-W6 /32	IFIZ Tübingen, Abteilung Immunologie; D
HLA-DR	HLA-DR-L 243	IFIZ Tübingen, Abteilung Immunologie; D
IgG	IgG-Isotype-control	BioLegend, San Diego, (CA), USA
Zweitantikörper/rabbit-anti-mouse	rabbit-anti- mouse (F(ab') ₂ fragments-FITC	Dako, Glostrup, Denmark
CD15	V450 mouse anti-human CD15	BioLegend, San Diego, (CA), USA
CD34	PE-Cy™7 Mouse Anti-Human CD34	BioLegend, San Diego, (CA), USA
CD45	AmCyan Mouse Anti-Human CD45	BioLegend, San Diego, (CA), USA

Tabelle 2.3 Übersicht über die verwendeten, rekombinant hergestellten Zytokine mit jeweiligem Hersteller und Sitz der Firma

Zytokin	Hersteller, Sitz der Firma
Interleukin-2 (IL-2)	R & D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, D
Interleukin-4 (IL-4)	R & D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, D
Interleukin-7 (IL-7)	Promokine GmbH, Heidelberg, D

Tabelle 2.4 Übersicht über die verwendeten Kontrollpeptide

Protein	Sequenz	HLA-Allotyp	Position im Protein	HLA-Klasse	Art der Kontrolle
HCMV_pp65	NLVPVMATV	A*02	495-503	I	Positivkontrolle
EBV_BRLF1_A*02	YVLDHLIVV	A*02	109-117	I	Positivkontrolle
Influenza A, M1	GILGFVFTL	A*02	58-66	I	Positivkontrolle
EBV_IE63	GLCTVAML	A*02	259-267	I	Positivkontrolle
HIV_1_RT	ILKEPVHGV	A*02	476-484	I	Negativkontrolle
EBV_EBNA3	RLRAEAQVK	A*03	471-479	I	Positivkontrolle
HCMV_pp65	SMENTRATK	A*03	207-215	I	Positivkontrolle
HIV_gag p17	KIRLRPGGK	A*03	18-26	I	Positivkontrolle
Influenza A, NP	ILRGSVAHK	A*03	265-274	I	Positivkontrolle
RS3A	EVVVSGLR	A*66	135-143	I	Positivkontrolle
SPIN	VVFVVGTER	A*66	53-61	I	Negativkontrolle
CMV_PP65	RPHRNGFTVL	B*07	265-275	I	Positivkontrolle
EBNA3_EBV	QPQYFDIPL	B*07	566-574	I	Positivkontrolle
EBV_EBNA3_	RPPIFIRRL	B*07	247-255	I	Positivkontrolle
HIV-1_nef_	TPGPGVRYPL	B*07	128-137	I	Negativkontrolle
EBV_BALF2	YPLREVATL	B*35	31-39	I	Positivkontrolle
HIV_nef	VPLRPMTY	B*35	77-84	I	Negativkontrolle
EBV_LMP2	IEDPPFNSL	B*40	200-208	I	Positivkontrolle
HIV_gag pol	SEGATPQDL	B*40	176-184	I	Negativkontrolle
EBV_EBNA4	VEITPYKPTW	B*44	657-666	I	Positivkontrolle
HIV_gag pol	SEGATPQDL	B*44	176-184	I	Negativkontrolle
HIV_gag pol	GELDRWEKI	B*49	11-19	I	Negativkontrolle

Protein	Sequenz	HLA-Allotyp	Position im Protein	HLA-Klasse	Art der Kontrolle
HIV1- pol	IPLTEEAEL	B*51	448-456	I	Negativkontrolle
Filamin A	ETVITVDTKAAGK GK	--	1669-1683	II	Negativkontrolle

Tabelle 2.5 Übersicht über die verwendeten Geräte mit jeweiligem Hersteller und Sitz der Firma

Geräte	Hersteller, Sitz der Firma
Analysenwaage	Sartorius, Göttingen, D
Autoklav	Belimed Sauter AT, Zug, CH
Autosampler Micro AS	ThermoFisher, Waltham, (MA), USA
Blockthermostat BT100	Kleinfeld Labortechnik, Gehrden, D
<u>Durchflusssytemeter:</u>	
BD FACS Canto II	BD Biosciences, Heidelberg, D
BD LSR Fortessa	
Einfrierbehälter Mr Frosty®	Nalgene/ThermoFisher, Waltham, (MA), USA
Einkanalpipetten	Eppendorf, Hamburg, D
ELISPOT-Reader: CTL Biospot S5™ Analyzer	CTL, Bonn, D
Flachschüttler Vibrax VXR	IKA Labortechnik, Staufen, D
Inkubator 3250	Heraeus Instruments, Hanau, D
Gefrierschrank-20°C mit Kühlschranks	Liebherr, Biberach, D
Gefrierschrank-80°C	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau, D
Kreisschüttler	IKA Labortechnik, Staufen, D
Kühlschrank	Liebherr, Biberach, D
LTQ Orbitrap XL	Thermo Fisher, Waltham, (MA), USA
Lichtmikroskop DM IL	Leica Microsystems, Wetzlar, D
Lichtmikroskop DM LS	
Magnetrührer RCT basic	IKA Labortechnik, Staufen, D
Mehrkanalpipette	Abimed, Langenfeld, D
Mini-Tischzentrifuge	Qualitron, Karachi, PK
Multipette Plus	Eppendorf, Hamburg, D
Nano-HPLC NaoLC 2D	Eksigent, Dublin, (CA), USA
Nano-HPLC Ventil VICI Cheminert	VICI, Schenkon, CH
Nano-LC Säule AcclaimPepMAP 100 (C18, 3 µm 100 Å, 75 µm I.D. x 25cm)	Dionex, Sunnyvale, (CA), USA
RSLC (C18, 3 µm 100 Å, 75 µm I.D. x 15cm)	
RSLC (C18, 3 µm 100 Å, 75 µm I.D. x 50cm)	
Nano-Trap Säule (C18, 3 µm 100 Å, 75 µm I.D. x 2cm; nano Viper)	Dionex, Sunnyvale, (CA), USA
Nano-UHPLC Uimate 3000 RSL Cnano	Dionex, Sunnyvale, (CA), USA
Neubauer Zählkammer, Tiefe 0,1mm	LO Laboroptik, Lancing, UK
Peptide Synthesizer EPS 221	Abimed, Hamburg, D
Pipettierhilfe Pipet Boy	Integra Biosciences, Zizers, CH
pH-Meter765 Calimatic	Knick, Stuttgart, D
Pipetten Discovery Comfort	Abimed, Langenfeld, D
Pneumatische Pumpe	Pharmacia / GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK
Potterglas 5ml, 25ml	Novodirect, Kehl, D
Präzisionswaage LC821 OCE	Sartorius, Göttingen, D
Quarzküvette, 10mm Schichtdicke	Hellma, Mühlheim, D
Rührwerk RZR 2020	Heidolph Instruments, Schwabach, D
Rührzelle	Millipore Schwabach, D
Spektrometer, Ultrospec 3000	Pharmacia/GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK
Schüttler IKA Vibrax VXR	IKA Labortechnik, Staufen, D
Sterilbank Technoflow 3F 150 -II-gs	Integra Biosciences, Fernwald, D
UltiMate 300RSL Cnano System	Thermo Fisher, Waltham, (MA), USA
Ultraschallbad Sonorex Super RK510H	Bandelin, Berlin, D
Ultraschall-Homogenisator	Branson Ultrasonics, Danbury, (CT), USA
Ultrazentrifuge L- 80 Ultrazentrifuge Ti45	Beckman Coulter, Brea, (CA), USA
Vakuumpumpe	Vaccubrand GmbH +Co, Wertheim, D
Vakuumentrifuge	Bachofer, Reutlingen, D
Vorsäulenkartusche Acclaim PepMap 100 (C18, 3 µm 100 Å, 300 µm I.D. x 5 mm)	Dionex, Sunnyvale, (CA), USA
<u>Vortexer:</u>	
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, New York, (NY), USA
Vortexer MS1	IKA Labortechnik, Staufen, D
Wasserbad GFL 1083	GFL-Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, D
Wasserbad Thermomix BM -S	Braun Biotech/ Sartorius, Göttingen, D
<u>Zentrifugen:</u>	
Laborfuge 400	Heraeus Instruments, Hanau, D

Geräte	Hersteller, Sitz der Firma
Megafuge 1.0R	Heraeus Instruments, Hanau, D
Eppendorf Zentrifuge 5417C	Eppendorf, Hamburg, D

Tabelle 2.6: Übersicht über die verwendeten Verbrauchsmaterialien mit jeweiligem Hersteller und Sitz der Firma

Verbrauchsmaterial	Hersteller, Sitz der Firma
0,22µm Vakuumfilter	Millipore Schwalbach, D
15ml Röhrchen	BD Biosciences, Heidelberg, D
50ml Röhrchen	BD Biosciences, Heidelberg, D
5 ml Rundbodenröhrchen	BD Biosciences, Heidelberg, D
Dreiwegehahn Discifix C3	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Filtrationseinheiten Amicon Ultra, 10kDA NMWL, 0,5ml,4ml, 15ml	Millipore, Billerica, (MA), USA
Miniatursäulchen 900µl	ThermoPierce, Fockford, (IL), USA
Nano-ESI Emitter Pico Tip 360 /20µm	New Objective, Woburn, (MA), USA
Kryoröhrchen 1,5 und 2 ml	Greiner Bio-One, Solingen, D
Eppendorfgefäße 0,5ml, 1ml und 2ml	Eppendorf, Hamburg, D
Erlenmyerkoblen 1000ml und 2000ml	Neo Lab, Heidelberg, D
Gewebe-Kulturplatten mit Deckel, F-Form 12 Well	Falcon/BD Biosciences, Heidelberg, D
Gewebe-Kulturplatte mit Deckel F-Form, 24 Well	Greiner Bio-One, Solingen, D
Gewebe-Kulturplatte mit Deckel F-Form, 96 Well	Greiner Bio-One, Solingen, D
Messbecher verschiedene Größen	Costar/Sigma, Taufkirchen, D
MultiScreen ^{HTS} Platten, Steril (ELISPOT)	Vitalab, Großostheim, D
Parafilm-Verschlußfolie	Merck, Millipore Schwalbach, D
Pipettenspitzen:	Sigma, Taufkirchen, D
10µl, 200µl	Becton Dickinson, Franklin Lakes, (NJ), USA, Starlab GmbH, Hamburg, D
1000µl	Greiner Bio-One, Solingen, D
PEG-reduziert Diamond	Gilson, Middleton, (WI), USA
ZipTip® Pippenspitzen (C18-Säulen)	Millipore Schwalbach, D
Reagenzien Reservoir	Costar/Sigma, Taufkirchen, D
Schott Flaschen verschiedene Größen	Schott Duran, Wertheim / Main, D
Serologische Pipetten: 2 ml, 5ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Falcon/BD Biosciences, Heidelberg, D
Spritzen 5ml, 10ml, 30ml, 50ml	BD, Franklin Lakes, (NJ), USA
Sterilfilter 0,20 µm	Sartorius Stedim Biotech, Franklin Lakes, (NJ), USA

2.1.2 Zusammensetzung von Puffern und Medien

2.1.2.1 Zellkulturmedien:

T- Zellmedium: IMDM, 10 % HS, 1 % Pen/Strep, 50 µM-β - Mercaptoethanol

Waschmedium: IMDM, 1 % Pen/Strep, 50 µM -β-Mercaptoethanol

Einfriermedium: FCS, 10 % DMSO

Auftaumedium: IMDM, 10 % FCS, 1 % Pen/Strep, 50 µM-β -Mercaptoethanol, 3 µg/ml DNase

2.1.2.2 verwendeter Puffer:

FACS-Puffer: PBS, 2 % FCS, 2mM EDTA, 0,01 % NaAzid

Permwasch-Puffer: PBS, 0,1 % Saponin, 0,5 % BSA, 0,02 % NaAzid

FACS/Fix Puffer: PBS, 2 % FCS, 2 mM EDTA, 0,01 % NaAzid, 1 % Formaldehyd

Coomassie Blau:	0,01 % Coomassie Brilliant Blue R350, 20 % Methanol, 10 % Essigsäure
Aufschlusspuffer:	200 ml BPS, 2,4 g CHAPS, Proteaseinhibitor (6 Tabletten)
Kopplungspuffer:	0,5 M NaCl, 0,1 M NaHCO ₃ , pH 8,3 durch entsprechende NaOH-Zugabe
Fixierungslösung	FACS-Puffer, 1 %Formaldehyd
Lösungsmittel A	H ₂ O, 2 %Acetonitril, 0,1 %Ameisensäure
Lösungsmittel B	H ₂ O, 80 %Acetonitril, 0,1 %Ameisensäure

2.2 Patienten- und Spendercharakteristiken

Alle Patienten, die in diese Studie eingeschlossen wurden, hatten ihre Teilnahmeinwilligung nach ausführlicher Aufklärung in Form eines *informed consent* gemäß des Helsinki Protokolls vor der Probenentnahme erteilt. Ein positives Votum der örtlichen Ethikkommission für dieses Projekt liegt unter der Projektnummer 373/2011 BO2 vor. Die HLA-Typisierung und die grundlegenden genetischen Analysen der Patientenproben erfolgten durch die Abteilung für Hämatologie und Onkologie der Medizinischen Klinik II des Universitätsklinikums Tübingen.

Die nachfolgenden Tabellen 2.7–2.10 bieten eine Übersicht der in die einzelnen Studienabschnitte eingeschlossenen Patienten.

Tabelle 2.7: Patientenübersicht der HLA-Quantifizierungs-Studie inklusive einer Übersicht über die bestimmten HLA-Klasse-I und -II Moleküle/Zelle (modifiziert nach Berlin et al.2015)

Die kursiv gedruckten Patienten konnten nicht in die Studie eingeschlossen werden: Die Patienten 23, 24 und 27 erfüllten nicht die geforderten Expressionsvoraussetzungen. Für die Patienten 25 und 26 konnte seitens der Klinik keine ausreichende Probenmaterialmenge für eine korrekte Durchführung der Quantifizierung zur Verfügung gestellt werden.

≥ 3 chromosomale Veränderungen wurden als komplexer Karyotyp bewertet (Swerdlow et. al. 2008, komplexer Karyotyp);

AML-Patientennummer	FAB	Immunphänotyp	Molekulargenetik	Zytogenetik	HLA-Klasse-I (Moleküle/Zelle)		HLA-Klasse-II (Moleküle/Zelle)	
					AML-Blasten	Monozyten/Granulozyten	AML-Blasten	Monozyten/Granulozyten
18	M2	CD45 ⁺ , CD34 ⁺ , CD15 ⁻ CD33 ⁺ , CD117 ⁺ , MPO ⁻	unbekannt.	45XX -7	112672	82553	9086	433
19	M5	CD45 ⁺ CD34 ⁺ , CD15 ⁻ CD61 ⁺ , CD117 ⁺ , MPO ⁻	RUNX1	komplexer Karyotyp	78042	75344	9818	3525
20	M4	CD45 ⁺ , CD13 ⁺ , CD33 ⁺ , CD15 ⁻ , CD34 ⁺ , HLADR ⁺ , CD117 ⁺	FLT3-TKD	46, XX	261647	239496	45150	0
21	M2	CD34 ⁺ , CD33 ⁺ , CD65 ⁺ , CD117 ⁺ , HLA-DR ⁻	unbekannt.	komplexer Karyotyp	45189	44648	1476	955
22	M4eo	CD45 ⁺ , CD34 ⁺ , HLA-DR ⁺ , CD13 ⁺ CD14 ⁺ CD15 ⁻ CD65 ⁺ CD117 ⁺ , MPO ⁺	CBFB/MYH11	47, XY, inv (16) (p13.1q22)	84677	31574	19986	0
23		<i>CD13⁺, CD14⁺, CD33⁺, CD34⁺, CD117⁺ MPO⁻</i>	<i>partielle Monosomie 7q</i>	<i>45 XY-7, t (3;8) (q26;q24)</i>	--	--	--	--
24		<i>CD34⁺ HLA-DR neg Blasten.</i>	<i>Keine Mutation</i>	<i>46 XY</i>	--	--	--	--
25		<i>CD34⁺, CD117⁺</i>	<i>unbekannt</i>	<i>46, XX, +8</i>	--	--	--	--
26		<i>Unbekannt</i>	<i>unbekannt.</i>	<i>komplexer Karyotyp</i>	--	--	--	--
27		<i>CD117⁺, CD34⁻</i>	<i>NPM1 Typ D pos.</i>	<i>46XX</i>	--	--	--	--

Tabelle 2.8: Patientenübersicht der HLA-Klasse-I und -II Ligandomkartierungsstudie (modifiziert nach Berlin et al. 2015)

Die Patienten 1, 8 und 11 wurden erst bei Auftritt eines Rezidivs bzw. bei Entwicklung einer sekundären AML aus MDS in die Studie eingeschlossen. Für die Patienten 5,6,11,14 und 16 konnte nur das HLA-Klasse-I Ligandom erfolgreich kartiert werden. Für die Patienten 2 und 10 konnte hingegen nur eine Kartierung des HLA-Klasse-II-Ligandoms erfolgen. Für alle übrigen AML-Patienten erfolgte eine Ligandomvermessung beider HLA-Klassen.

≥ 3 chromosomale Veränderungen wurden als komplexer Karyotyp bewertet (Swerdlow et. al. 2008, komplexer Karyotyp)

AML	FAB	Molekulargenetik	Zytogenetik	Therapie-status	HLA-Typisierung	WBC/µl [% Blasten]	Isolierte PBMCs [Zellen x 10 ⁶]
1	M1	keine Mutation	46, XX	therapiert (AML aus MDS)	A*02, A*11, B*35, B*44	11,000 [80]	900
2	M5	keine Mutation	komplexer Karyotyp	untherapiert	A*02, A*31, B*27, B*44	140,900 [94]	11000
3	M1	JAK2	komplexer Karyotyp	untherapiert	A*23:01, A*66:01, B*49:01	29,150 [83]	500
4	M2	FLT3-ITD, NPM1_A	46, XX	untherapiert	A*03:01, B*39:01, B*51:01	248,100 [80]	1000
5	M1	FLT3-ITD	46, XX	untherapiert	A*02:01, B*0702, B*40:01	83,000 [90]	400
6	M5	NPM1_A	46, XX	untherapiert	A*02, A*03, B*44:25, B*52:15	50,000 [84]	1600
7	M5	FLT3-ITD, NPM1_A	46, XX	untherapiert	A*02:01, A*03:01, B*38:01, B*44:02	38,000 [84]	2800
8	M0	keine Mutation	komplexer Karyotyp	therapiert (AML aus MDS)	A*03:01, A*26:01, B*35:01, B*38:01	47,460 [90]	1700
9	M4	FLT3-ITD	46, XY	untherapiert	A*0201, A*6601, B*4001, B*1501	187,400 [80]	8400
10	M4eo	CBFB/MYH11	47, XY, inv(16) (p13.1q22)	untherapiert	A*0201, B*5101, B*3901	27,000 [80]	350
11	M7	FLT3-ITD, NPM1_A	46, XY	Rezidiv (therapiert)	A*0201, A*2301, B*4402, B*4901, A*0201, B*1302, B*5101	163,800 [90]	400
12	M2	FLT3-ITD	46, XY	untherapiert	A*0201, A*0301, B*1801	24,500 [80]	200
13	M2	keine Mutation	45, XY, -7, +13, -21	untherapiert	A*0201, A*2601, B*2705, B*5101	39,200 [84]	2600
14	M1	FLT3-ITD, NPM1_A	46, XX	untherapiert	A*2901, A*3201, B*4002, B*4403	150,000 [96]	4900
15	M0	keine Mutation	komplexer Karyotyp	untherapiert	A*02, A*24, B*44, B*50	222,600 [93]	3500
16	M5	FLT3-ITD	46, XY	untherapiert	A*26, A*32, B*15, B*38	250,000 [92]	19000
17	M2	keine Mutation	45, XY, -7	untherapiert		260,000 [80]	7600

Tabelle 2.9: Tabellarische Übersicht der Patienten-Kohorte 1, verwendet für die funktionelle Charakterisierung ausgewählter LiTAPs der HLA-Klassen-I und -II

Das Ligandom der Patientenkohorte 1 wurde im Rahmen der LC-MS/MS basierten Analysen kartiert; ≥ 3 chromosomale Veränderungen wurden als komplexer Karyotyp bewertet (Swerdlow et. al. 2008, komplexer Karyotyp); Z.v. = Zustand vor; Z. n. = Zustand nach, Z. v. = Zustand vor; n.k.: nicht klassifiziert;

Kohorte	AML	FAB	Molekular-genetik	Zytogenetik	Materialentnahme in Bezug auf Therapiestatus	HLA-Typisierung	WBC/ μ l
Kohorte 1 (K 1)	1	M1	keine Mutation	46, XX	Z.v. Induktions-therapiebeginn bei AML aus MDS	A*02, A*11, B*35, B*44	7000 [65]
	3	M1	JAK2	komplexer Karyotyp	1) Z.v. Induktions-therapiebeginn 2) Z.n. allogener Stammzelltransplantation (SZT)	A*23:01, A*66:01, B*49:01	1)29,150 [83] 2) unbekannt [0]
	4	M2	FLT3-ITD, NPM1_A	46, XX	1) Z.v. Induktions-therapiebeginn 2) Z.n. allogener Stammzelltransplantation	A*03:01, B*39:01, B*51:01	1)248,100 [80] 2) unbekannt [0]
	5	M1	FLT3-ITD	46, XX	Z.v. Induktions-therapiebeginn	A*02:01, B*07:02, B*40:01	83,000 [90]
	6	M5	NPM1_A	46, XX	1) Z.n Induktions-therapiebeginn 2) Z.v. allogener Stammzelltransplantation	A*02, A*03, B*44:25, B*52:15	1)1860 [0] 2) unbekannt [0]
	7	M5	FLT3-ITD, NPM1_A	46, XX	Z.v. Induktions-therapiebeginn	A*02:01, A*03:01, B*38:01, B*44:02	38,000 [84]
	11	M7	FLT3-ITD, NPM1_A	46, XY	Rezidiv, Z.v. Induktionstherapie	A*02:01, A*23:01, B*44:02, B*49:01, B*51:01	163,800 [90]
	12	M2	FLT3-ITD	46, XY	Z.v. Induktions-therapiebeginn	A*02:01, B*13:02, B*51:01	24,500 [80]
	13	M2	keine Mutation	45, XY, -7, +13, -21	Z.v. Induktions-therapiebeginn	A*02:01, A*03:01, B*18:01	39,200 [84]

Tabelle 2.10: Tabellarische Übersicht der Patienten-Kohorte 2, verwendet für die funktionelle Charakterisierung ausgewählter LiTAPs der HLA-Klassen-I und -II

Alle aufgelisteten Patienten wurden im Rahmen der T-Zellexperimente für HLA-Klasse-I verwendet. Die ausgewählten HLA-Klasse-Peptide wurden nur in Proben der kursiv-gedruckten AML-Patienten funktionell charakterisiert. Alle eingeschlossenen Patienten dieser Kohorte hatten zuvor eine allogene Stammzelltransplantation erhalten. Das Ligandom dieser Patienten wurde nicht im Rahmen der LC-MS/MS basierten Analysen kartiert. ≥ 3 chromosomale Veränderungen wurden als komplexer Karyotyp bewertet (Swerdlow et. al. 2008), komplexer Karyotyp); Z. n. = Zustand nach, Z. v. = Zustand vor; n.k.: nicht klassifiziert;

Kohorte	AML	FAB	Molekulargenetik	Zytogenetik	Therapiestatus bei Materialgewinnung	HLA-Typisierung	WBC/ μ l
Kohorte 2 (K 2)	28	M2	keine Mutation	46, XY	<i>Z.n allogener Stammzelltransplantation</i>	A*02:01, A*03:01; B*13:02, B*18:01;	11620 [0]
	29	M: n.k.	FLT3-ITD	46, XX	<i>Z.n allogener Stammzelltransplantation</i>	A*03, A*24; B*51, B*27;	2800 [0]
	30	M: n.k.	keine Mutation	46, XY	<i>Z.n allogener Stammzelltransplantation</i>	A*02:01, A*24:02; B*15:01, B*35:02	4660 [0]
	31	M: n.k.	FLT3-ITD	komplexer Karyotyp	<i>Z.n allogener Stammzelltransplantation</i>	A*68:01; B*35:03, B*44:02	3840 [0]
	32	M0	unbekannt	46, XY	<i>Z.n allogener Stammzelltransplantation</i>	A*11:01, A*24:02, B*37:01, B*51:01	10 260 [0]
	33	M1	keine Mutation	46, XX	<i>Z.n allogener Stammzelltransplantation</i>	A*01:01, A*03:01, B*08:01, B*35:01	6930 [0]
	34	M: n.k.	FLT3-ITD, NPM1_A	46, XX	<i>Z.n allogener Stammzelltransplantation</i>	A*02:01, A*03:01; B*07:02, B*18:01	7930[0]
	35	M: n.k.	FLT3-ITD	komplexer Karyotyp	<i>Z.n allogener Stammzelltransplantation</i>	A*03:01, A*24:02; B*07:02, B*40:01;	5980 [80]
	36	M5a	keine Mutation	46XX	<i>Z.n allogener Stammzelltransplantation</i>	A*01:01, A*24:02; B*08:01, B*37:01	5390 [0]
	37	M5	unbekannt	komplexer Karyotyp	<i>Z.n allogener Stammzelltransplantation</i>	A*01:01, A*02:01, B*08:01, B*15:01	4610 [0]
	38	M4	FLT3-ITD, NPM1	unbekannt	<i>Z.n allogener Stammzelltransplantation</i>	A*24:02; B*13:02, B*35:03	1950 [0]
	39	M5	FLT3 TKD	46, XY	<i>Z.n allogener Stammzelltransplantation</i>	A*01:01, A*03:01; B*35:03, B*55:01	4430 [0]
	40	M: n.k.	FLT3-ITD	46, XY	<i>Z.n allogener Stammzelltransplantation</i>	A*33:01, A*66:01, B*14:01, B*27:02	9230 [0]
	41	M: n.k.	FLT3-ITD, NPM1_D	46, XX	<i>Z.n allogener Stammzelltransplantation</i>	A*02:01, A*24:02 B*27:05, B*51:01	6340 [0]
	42	M2	FLT3-ITD	46, YX	<i>Z.n allogener Stammzelltransplantation</i>	A*31, B*15, B*40	--
43	M: n.k.	keine Mutation	46, XY	<i>Z.n allogener Stammzelltransplantation</i>	A*02, A*24 B*13, B*38	4530 [0]	
44	M: n.k.	FLT3-ITD	46, XX	<i>Z.n allogener Stammzelltransplantation</i>	A*01:01, A*02:01 B*08:01, B*40:02	4710 [0]	
45	M: n.k.	unbekannt	unbekannt	<i>Z.n allogener Stammzelltransplantation</i>	A*02, A*68, B*08, B*18	7960 [0]	

Kohorte	AML	FAB	Molekulargenetik	Zytogenetik	Therapiestatus bei Materialgewinnung	HLA-Typisierung	WBC/ μ l
46	M: n.k		FLT3-ITD, NPM1	46, XY	Z.n allogener Stammzelltransplantation	A*02, A*03; B*07, B*40:01	6690 [0]
47	M: n.k		<i>RUNX1</i>	46, XX	Z.n allogener Stammzelltransplantation	A*24:02, A*32:01, B*08:01, B*35:01	5690 [0]
48	M: n.k		<i>CEBPA</i>	46, XY	Z.n allogener Stammzelltransplantation	A*24:02, A*02:01, B*52:01, B*57:01	5390 [0]
49	M5		keine Mutation	46, XX t(9,11)	Z.n allogener Stammzelltransplantation	A*11:01, A*24:02, B*27:05, B*51:01	10640 [0]
50	M: n.k		<i>NPM1_A</i>	46, XX <i>inv 16</i>	Z.n allogener Stammzelltransplantation	A*01:01, A*02:01, B*37:01, B*38:01	13020 [0]
51	M: n.k		unbekannt	46, XY	Z.n allogener Stammzelltransplantation	A*69:01, A*03:01, B*49:01, B*07:02	3360 [0]
52	M: 4eo		<i>CBFB-MYH11- positiv</i>	komplexer Karyotyp	Z.n allogener Stammzelltransplantation	A*02:05, A*11:01; B*27:02, B*35:01	3590 [0]
53	M5		keine Mutation	46, XX	Z.n allogener Stammzelltransplantation	A*01:01, A*32:01, B*08:01, B*35:01	9000 [0]
54	M: n.k		keine Mutation	46, XX	Z.n allogener Stammzelltransplantation	A*11:01, A*01:01; B*35:01, B*08:01	5380 [0]
55	M5		MLL-AF6-Fusion	komplexer Karyotyp	Z.n allogener Stammzelltransplantation	A*02:01, A*26:01, B*18:01, B*07:02	7060 [0]
56	M: n.k		FLT3-ITD, NPM1	46, XX	Z.n allogener Stammzelltransplantation	A*02, A*31, B*27, B*44	8600 [0]

Im Rahmen einer Kooperation mit dem *Institut für Klinische und Experimentelle Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Tübingen* konnten Vollblutproben HLA-typisierter, freiwilliger gesunder Spender akquiriert werden. Diese Blutprodukte wurden nach Aufklärung und schriftlicher Einwilligung der Spender anonymisiert.

Tabelle 2.11: Übersicht über die für die HLA-Ligandomkartierung analysierten, gesunden, Spender (PBMC (PB) und BMNC (KM)-Spender) inkl. Informationen zu den jeweiligen Peptid- & Quellproteinidentifikationszahlen (modifiziert nach Berlin et al. 2015)

Die Daten der BMNC-Spender (fett-kursiv gedruckt) wurden freundlicherweise von Simon Walz zur Verfügung gestellt. Der angelegte Schwellenwert für den Einschluss einer Probe in die Untersuchung lag bei ≥ 500 (HLA Klasse I: AML & PB), ≥ 200 (HLA-Klasse-I: KM) und ≥ 100 (HLA-Klasse-II) verschiedener Peptididentifikationen. u.S.=unterhalb des Schwellenwerts;

PBMC/BMNC-Spender	HLA - Typisierung	isolierte PBMCs/BMNCs [Zellen x 10 ⁹]	Identifizierte Peptide		Identifizierte Quellproteine	
			HLA-Klasse-I	HLA-Klasse-II	HLA-Klasse-I	HLA-Klasse-II
PB 01	A*02, A*28, B*07, B*38	1.3	810	169	795	180
PB 02	A*02, A*24, B*35, B*62	1.4	u. S.	177	--	175
PB 03	A*11, A*32, B*35, B*50	1.8	873	267	931	230
PB 04	A*03, A*24, B*07, B*51	0.9	1481	u. S.	1438	--
PB 05	A*02, A*03, B*35, B*39	0.8	1074	u.S.	1115	--
PB 06	A*28, A*32, B*52, B*71	1.4	927	u.S.	860	--
PB 07	A*02, A*32, B*13, B*60	0.6	1016	u.S.	1058	--
PB 08	A*02, A*31, B*27, B*60	0.7	1421	141	1389	166
PB 09	A*02, A*03, B*07, B*39	0.8	1605	159	1476	189
PB 10	A*11, A*31, B*27, B*52	0.6	1372	u.S.	1311	--
PB 11	A*01, A*03, B*07, B*51	1.0	1733	u.S.	1514	--
PB 12	A*02, A*24, B*35, B*39	1.5	1523	u.S.	1372	--
PB 13	A*02, A*11, B*27, B*39	1.0	1327	u.S.	1287	--
PB 14	A*03, B*51	1.0	u.S.	284	--	207
PB 15	A*02, A*31, B*27, B*60	1.2	1402	141	1337	161
PB 16	A*02, A*29, B*44, B*60	0.7	u.S.	203	--	2
PB 17	A*03, A*68, B*49, B*51	0.7	1373	u.S.	1304	--
PB 18	A*24, A*31, B*27, B*62	0.3	839	204	901	273
PB 19	A*02, A*25, B*27, B*60	2.0	524	u.S.	629	--
PB 20	A*02, A*11, B*44, B*60	0.8	948	222	967	128
PB 21	A*02, A*11, B*35	1.5	u. S	210	--	137
PB 22	A*01, A*28, B*08, B*38	0.5	661	u.S.	698	--
PB 23	A*02, A*32, B*44, B*56	1.3	648	u.S.	727	--
PB 24	A*23, A*28, B*35, B*39	1.2	1010	u.S.	1044	--
PB 25	A*02, A*30, B*13, B*50	0.6	684	u.S.	750	--

PBM/ BMNC- Spender	HLA - Typisierung	isolierte PBMCs/BMNCs [Zellen x 10 ⁹]	Identifizierte Peptide		Identifizierte Quellproteine	
PB 26	A*25, A*30, B*13, B*51	1.3	1579	u.S.	1534	--
PB 27	A*25, A*29, B*08, B*45	0.6	1346	612	1343	350
PB 28	A*03, A*25, B*53, B*55	0.7	920	u.S.	948	--
PB29	A*01, B*35, B*55	0.8	741	u.S.	793	--
PB 30	A*01, B*08, B*62	0.5	811	u.S.	809	--
PB 31	A*01, A*26, B*61, B*62	0.7	1062	u.S.	1026	--
PB 32	A*02, A*11, B*44, B*55	0.7	1827	u.S.	1559	--
PB 33	A*02, A*24, B*57, B*62	0.8	1007	u.S.	1140	--
PB 34	A*02, A*33, B*44, B*58	4.9	2163	322	1919	235
KM 01	A*02, A*24, B*07, B*50	0.7	781	u.S.	676	--
KM 02	A*03, A*30, B*13, B*18	0.5	479	230	488	149
KM 03	A*23, A*25, B*44, B*49	0.5	223	u.S.	225	--
KM 04	A*03, A*11, B*35, B*38	1.6	238	122	242	76
KM 05	A*03, A*68, B*27, B*44	0.9	377	u.S.	443	--

Methoden

2.2.1 Allgemeine zellbiologische Methoden

Isolation, Einfrieren und Auftauen mononukleärer Zellen des peripheren Blutes

Die Isolation der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (*Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMCs*) wurde mittels Dichtegradientenzentrifugation unter Verwendung des Lymphozytenseparationsmediums Ficoll nach etabliertem Protokoll durchgeführt. Mithilfe eines hydrophilen Polysaccharids hoher Dichte (einem Copolymer aus Sacchaorse-Epichlorhydrins) gelingt die Trennung der PBMCs von Erythro-, Granulo- und Thrombozyten.

Vor Beginn der Zellseparation wurden die Patientenproben 1:2, die Buffy Coat-Spenden gesunder, freiwilliger Spender (healthy donors, HD), bereitgestellt von der Transfusionsmedizin, 1:4 mit PBS verdünnt. Die verdünnten Blutproben wurden mit Ficoll überschichtet. Nach Zentrifugations- und Waschschritten folgte eine Zellzahlbestimmung mittels Trypanblaufärbung. Anschließend wurden die isolierten PBMCs entweder in flüssigem Stickstoff schockgefroren (*snap frozen pellets*) oder für

die spätere funktionelle Charakterisierung kryokonserviert. Diese Kryokonservierung erfolgte nach Zugabe von Einfriermedium bei -80°C in einer mit Isopropanol gefüllten, speziellen Einfrierbox („Mr.Frosty“). Das im Einfriermedium enthaltene DMSO verhindert die Ausbildung von Eiskristallen und somit eine potentielle Zytolyse. Isopropanol ermöglicht ein langsames Abkühlen der Zellen mit Diffusion von Wasser und Elektrolyten in den Extrazellularraum, wodurch die Zellen schrumpfen.

Nach zügigem Auftauen der Zellen im Wasserbad bei 37°C wurden die Zellen zügig in das sog. Auftaumedium überführt. Da im Rahmen des Auftauprozesses Zellen zu Grunde gehen, enthält das Auftaumedium zusätzlich DNase für den Abbau freigewordener DNA.

2.2.2 Quantifizierung der HLA-Oberflächenmolekülexpression

Um die HLA-Expressionsrate der AML-Blasten und autologer benigner Granulo- und Monozyten miteinander vergleichen zu können, erfolgte eine quantitative Durchflusszytometrie-basierte Analyse der HLA-Oberflächenexpression mittels QUIFIKT®. Als Voraussetzung für den Probeneinschluss in diese Analyse galt die Existenz einer CD15^{-} AML-Blastenpopulation, sowie eines Anteils von mind. fünf Prozent autologer, benigner CD15^{+} granulo- und monozytärer Zellen.

Die Quantifizierung basierte auf dem Vergleich gemessener Fluoreszenzintensitäten der untersuchten Zellen und sog. Kalibrierungsbeads. Diese Kunststoffkügelchen (Durchmesser $10\ \mu\text{m}$) sind vom Hersteller mit einer definierten Menge an Antikörpern (QUIFIKIT: murine Antikörper) beladen. Diese wurden im Laufe des Experiments mit einem sog. Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper gefärbt. Dieser Sekundärantikörper kam in der gleichen Verdünnung anschließend ebenso für die Färbung der mit Primärantikörper (W6/32 mAb, L243mAb) inkubierten Zellen zur Anwendung.

Auf der Grundlage der jeweiligen, detektierten mittleren Fluoreszenzintensität konnte für eine Mischung aus fünf unterschiedlich stark beladenen Beadpopulationen (B-F; 1800-530 000 Ab/Bead) unter Verwendung der Herstellerangaben eine Eichgerade erstellt werden. Da sich die gemessene Fluoreszenzintensität direkt proportional zur Antigenmenge verhält, konnte mit Hilfe dieser Referenzgerade die mittlere

Fluoreszenzintensität einer Probe ermittelt werden. Damit die gemessene mittlere Fluoreszenz um die individuelle Eigenfluoreszenz der analysierten Proben korrigiert werden konnte, wurden ebenfalls mit Isotypkontrollen gefärbte Zellen angefertigt.

Die Analyse jeder Probe erfolgte in Form von Triplikatansätzen. Eingesetzt wurden jeweils 10^6 Zellen/well. Die Färbung erfolgte bei 4°C mit $10\ \mu\text{g/ml}$ mAb (monoklonaler Antikörper in Sättigungskonzentration) pro Ansatz. Die verwendeten Antikörper wurden zuvor titriert um die Sättigungskonzentration zu bestimmen.

Zunächst erfolgte eine Färbung mit dem für HLA-Klasse-I pan-spezifischen mAb W6/32, dem HLA-DR-spezifischen mAb L243 bzw. einem IgG_{2a} isotypischen Kontrollantikörper. In einem zweiten Färbeschritt wurden Leukozyten, Kalibrierungsbeads sowie sog. Setup-Beads (verwendet zur späteren Fluoreszenzeinstellung am Durchflusszytometer) mit FITC-konjugierten Kaninchen-anti-Maus $\text{F(ab}')_2$ Fragmenten (Sekundärantikörper; für alle in gleicher Verdünnungsstufe verwendet) inkubiert. In einem abschließenden Färbeschritt erfolgte dann die direkte Färbung der Oberflächenmarker CD15, CD34 und CD45 mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern. Kurz vor der durchflusszytometrischen Messung (mit dem LSR Fortessa (BD)) wurde der vital-reaktive Farbstoff 7-AAD als Differenzierungsmarker für die zelluläre Viabilität zu den einzelnen Ansätzen hinzupipettiert. Für die Messung jedes Ansatzes wurden 250 000 Events aufgenommen.

2.2.3 Methoden zur qualitativen HLA-Ligandomanalyse

2.2.3.1 Immunpräzipitation basierte HLA-Ligandenisolation aus primären AML-Proben

Die HLA-Klasse-I- und -II-Moleküle wurden im Rahmen der etablierten Immunpräzipitation isoliert (Falk, Rotzschke et al. 1991, Kowalewski, Schuster et al. 2015).

Dabei werden schockgefrorene Zellpellets mittels Lysepuffer (0,02 % CHAPS/PBS-Lösung), der auch einen Mix unterschiedlicher Proteaseinhibitoren enthält, bei 4°C aufgespalten. In einem mehrstufigen Verfahren werden die Zellen unter Verwendung eines Potter-Elvehjem homogenisators, eines Magnetrührers und eines Ultraschallstabs

homogenisiert. Zur Abtrennung des generierten Detritus erfolgen Zentrifugations- und Filterschritte (Filterporengröße: 0,2 μm). Die Isolation der HLA-Molekül-Peptid-Komplexe erfolgte mittels Immunaффinitätschromatographie durch den HLA-Klasse-I pan-spezifischen mAb W6/32 (IgG_{2a}), bzw. den HLA-Klasse-II-pan-spezifischen mAb Tü 39 (Barnstable, Jones et al. 1978). Diese Antikörper waren kovalent an BrCN-aktivierte Sepharose gebunden und dienen als stationäre Phase der Affinitätschromatographie (Kohn and Wilchek 1978). Über zwölf Stunden wird das gewonnene Filtrat in einem zyklisierten System bei einer Laufrate von 2 ml/min über die Affinitätssäulen geleitet. Die Trennung der Peptid-MHC-Komplexe von den immobilisierten Antikörpern erfolgt durch wiederholte Zugabe von 0,2 % Trifluoressigsäure (TFA). In Folge der starken pH-Absenkung werden die nichtkovalenten Bindungen zwischen Antikörpern, MHC-Komplexen und Peptiden gelöst. Die Elutionsfraktionen E₁₋₈ wurden gepoolt. Eine anschließende Ultrafiltration unter Verwendung eines Größenausschlussfilters (<10kDa) ermöglichte die gezielte Isolation der MHC-Peptide. Anschließend wurden die MHC-Peptide mittels ZipTiP₁₈ Pipettenspitzen extrahiert, entsalzt und angereichert. Die nominale Bindekapazität der verwendeten C₁₈-Matrix von 2 μg definiert die maximal eingesetzte Peptidmenge für die LC-MS/MS-Analytik, wodurch eine Überladung des Systems verhindert werden kann. Die extrahierten Peptide wurden in 35 μl einer 80 %-Acetonitril (ACN)/0,2% TFA-Lösung eluiert und durch Vakuumzentrifugation getrocknet. Anschließend erfolgte eine Resuspension in 25 μl einer 1 % ACN/0,05 % FA-Lösung. Die Proben wurden bis zur massenspektrometrischen Analyse bei -20°C gelagert.

2.2.3.2 LC-MS/MS-basierte HLA-Ligandenidentifikation

Die generierten Peptidproben wurden mittels high performance liquid chromatography (HPLC) auf einem nano UHPLC-Gerät (Ultimate 3000 RSLCNano, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) aufgetrennt und anschließend in einem on-line gekoppelten LTQ Orbitrap XL Hybridmassenspektrometer (Thermo Fisher) analysiert. Die UHPLC ist hierbei direkt über eine Kapillare mit der Elektrosprayionisationsquelle (ESI) des Massenspektrometers verknüpft. Für jede Probe wurde die Analyse in fünf technischen Replikaten durchgeführt. Es wurden jeweils 5 μl Probenvolumen für 5,75 min. mit einer Flussrate von 4 $\mu\text{l}/\text{min}$ auf eine 75 μm x 2 cm große Vorsäule (Acclaim PepMAP,

RSLC, Thermo Fisher) geladen. Bei einer Flussrate von 175 nl/min erfolgte über 140 min. bei 50°C die Auftrennung der Peptide auf einer Trennsäule (50 µm x 50 cm; Acclaim PepMAP, RSLC, Thermo Fisher) unter Verwendung eines Acetonitrilgradienten von 2,4–32 %. Die eluierenden Peptide wurden mittels Nanosprayionisation ionisiert und anschließend im Massenspektrometer analysiert. Die Analyse der generierten Peptidionen erfolgte in einem sog. datenabhängigen Modus. Dabei wird zunächst mit hoher Auflösung (60 000) in jedem Scanzzyklus (< 2,5 Sek.) ein Übersichtspektrum aller Ionen im Orbitrap-Analyzer aufgenommen. Anschließend wurden die fünf häufigsten bzw. intensivsten Peptidionen nacheinander mittels Kollisions-induziertem Zerfall (*collision induced dissociation*, CID) fragmentiert (*TOP 5 CID Methode*). Diese entstandenen Fragmentationen wurden in der linearen Ionenfalle (*linear trap quadrupole*, LTQ) analysiert. Für HLA-Klasse-I-Liganden wurden die zur Fragmentierung zugelassenen Ionen auf nur zwei- bis dreifach positiv geladene Peptide mit einem Masse- /Ladungsquotienten zwischen 400–600 m/z beschränkt. Als Voraussetzung für eine potentielle Fragmentierung für HLA-Klasse-II-Peptide galt eine mindestens zweifach positive Ladung bei einem Masse/Ladungsverhältnis zwischen 300–1500 m/z.

Die analytische Massenspektrometrie wurde freundlicherweise hauptsächlich von Dipl.-Biol. Daniel Kowalewski (Abteilung für Immunologie, Universität Tübingen) durchgeführt.

2.2.3.3 Datenbanksuche und Spektralannotation

Die Proteome Discoverer (v1.3. ThermoFisher) Software wurde zur Datenprozessierung verwendet. Als Suchmaschine für die aufgenommenen Fragmentspektren diente die Mascot Software (Mascot 2.2.04; Matrix Science, London, UK). Als Suchraum wurde das humane Proteom aus der SwissProt Datenbank (www.uniprot.org; freigegeben am 27. September 2013; 20 279 geprüfte Proteinsequenzen umfassend) definiert. Diese Zuordnung und Auswertung ermöglichte nur die Identifikation nicht-mutierter humaner Selbstpeptide. Im Gegensatz zur Proteomik kann für die HLA-Ligandomik keine Beschränkung des Suchraums durch eine enzymatische Spezifität erfolgen. Für die Vorläufermassentoleranz wurden 5 ppm, für die Fragmentmassentoleranz 0,5 Da als

Suchparameter festgelegt. Oxidiertes Methionin wurde als dynamische Modifikation zugelassen. Die Bestimmung der Falsch-Positiv-Rate (false discovery rate, FDR) basierte auf einer ebenfalls durchgeführten Suche der Peptidspektren in einer „Köderdatenbank“. Diese besteht aus einer invertierten Targetdatenbank und sollte theoretisch bei ausreichend guter Spektrenqualität keine positiven Suchergebnisse hervorbringen. Zusätzlich wurden die Ergebnisse mit Hilfe des Perkolator-Algorithmus (Kall, Canterbury et al. 2007) anhand der Eigenschaften der konfidentesten Peptidfindungen nachträglich neu geordnet. Die FDR wurde auf $q < 0,05$ (5 % FDR) beschränkt. Peptid-Spektrum-Übereinstimmungen (peptide spectrum match, PSM) mit $q < 0,05$ wurden nach zusätzlichen, orthogonalen Parametern weiter gefiltert, um die Spektralqualität und -validität zu gewährleisten. Mascot-Scores wurden bis zu einem Wert von ≥ 20 gefiltert. Für HLA-Klasse-I-Peptide wurde eine Sequenzlänge zwischen 8–12 Aminosäuren festgelegt. Für HLA-Klasse-II wurde eine Peptidlänge von 12–25 Aminosäuren bestimmt. Die Voreinstellung zur Bündelung der Proteine in Gruppen wurde deaktiviert, wodurch eine Mehrfachzuordnung der Peptide ermöglicht wurde, beispielsweise für konservierte Sequenzen, die in diversen Proteinen beinhaltet sind. Als letzte Stufe der Qualitätskontrolle wurde ein Schwellenwert für die Einzelpeptididentifikation (IDs) je untersuchter Probe festgelegt: ≥ 500 IDs für HLA-Klasse-I und ≥ 100 IDs für HLA-Klasse-II. Die HLA-Annotation erfolgte mittels *in silico* Motivmapping unter Verwendung von SYFPEITHI (www.syfpeithi.de) und einer erweiterten hauseigenen Datenbank für seltenere Allotypen. Die experimentelle Validierung der vorhergesagten HLA-Restriktion wurde mittels Peptidsynthese und funktioneller Charakterisierung einer kleinen Ligandengruppe erzielt.

2.2.4 Peptidsynthese

Die Festphasensynthese generierter Peptide erfolgte nach der 9-fluorenylmethyloxycarbonyl/tert-butyl (Fmoc/tBu) Methode unter Verwendung eines automatisierten *Peptidsynthesizer* EPS221 (Applied Biosystems Foster City California (Sturm, Leinders-Zufall et al. 2013)). Mittels *Umkehrphasen-Chromatographie* und *MALDI-TOF Massenspektrometrie* (ThermoFischer, Fremont, CA, USA) wurde die Identität und Reinheit der synthetischen Peptide ermittelt und validiert. Die Synthese wurde von Prof.

S. Stevanovic, Frau N. Zutschke, Frau P. Hristic und Frau K. Graf durchgeführt. Diese synthetischen Peptide wurden sowohl zur Validierung massenspektrometrisch identifizierter Sequenzen als auch zur funktionellen Charakterisierung von T-Zellen verwendet.

2.2.5 Methoden der T-Zellkultivierung und funktionellen Charakterisierung

2.2.5.1 Amplifikation Peptid-spezifischer T-Zellen

PBMCs der AML-Patienten und gesunden Spender wurden für 12 Tage bei 37°C und 5 % CO₂ in T-Zellmedium kultiviert. Für die Amplifikation CD8⁺-T-Zellen wurden die aufgetauten PBMCs (5–6 x 10⁶ Zellen/ml) mit jeweils 1 µg/ml je HLA-Klasse-I-Peptid stimuliert. Das Zellkulturmedium wurde an Tag 0 und 1 mit 5 ng/ml IL-4 sowie 5 ng/ml IL-7 supplementiert. Eine Zugabe von 2 ng/ml IL-2 erfolgte an Tag 3, 5, 7 und 9. Die funktionelle Charakterisierung der mit Peptid stimulierten T-Zellen erfolgte in der Regel an Tag 12 mittels INF-γ-ELISpot bzw. an Tag 13 mittels intrazellulärer Zytokinfärbung (ICS).

Die Stimulation der CD4⁺T-Zellen wurde leicht modifiziert nach demselben Prinzip durchgeführt: Für die Stimulation wurde eine HLA-Klasse-II- Peptidkonzentration von 10 µg/ml verwendet. Auf eine Zugabe von IL-4 und IL-7 an Tag 0 und 1 wurde verzichtet.

2.2.5.2 INF-γ-ELISPOT assay

Das Prinzip dieses Testverfahrens basiert auf der Detektion des sezernierten Zytokins INF-γ durch Antikörper, die auf einer Membran immobilisiert wurden. Die Anzahl und Größe der Spots ermöglicht eine Aussage über die Menge der Zytokinsekretion. Im Gegensatz zur intrazellulären Zytokinfärbung werden in diesem Testverfahren nur biologisch wirksame Zytokine berücksichtigt.

INF-γ-ELISpot Assays wurden nach einem etablierten Protokoll ausgeführt (Widenmeyer, Griesemann et al. 2012). Eine spezielle 96-Well-Nitrozelluloseplatte wurde mit 1mg/ml INF-γ-mAb (1-D1K, 1 mg/ml) beschichtet und über Nacht bei 4°C

inkubiert. Nach Waschschritten wurden die Platten am Folgetag für zwei Stunden mit IMDM, supplementiert mit 10 % Humanserum, bei 37°C blockiert. Zwischen 2,5 und 5 x 10⁵ präsensitivierte PBMCs/Well wurden mit 1 µg/ml Peptidlösung (HLA-Klasse-I) bzw. 2,5 µg/ml Peptidlösung (HLA-Klasse-II) stimuliert und für 24–26 Stunden bei 37°C inkubiert. Alle Peptide bzw. Peptidmixe wurden immer als Duplikatansätze getestet.

Eine Stimulation mit 10 µg/ml Phytohämagglutinin (PHA) erfolgte u. a. als Positivkontrolle. Das verwendete PHA-L ist durch eine hohe Affinität zu Oberflächenrezeptoren der Lymphozyten gekennzeichnet. Es induziert die Agglutination sowie unspezifische Aktivierung der Lymphozyten im Testansatz. Daneben wurden Peptid-spezifische Negativ- und Positivkontrollen angelegt.

Nach diversen Waschschritten und Inkubationsphasen mit biotinyliertem anti-*INF-γ*-Zweitantikörper und Streptavidin-gebundener alkalischer Phosphatase konnten potentiell entstandene Spots nach einer 5–10-minütigen Inkubation mit der Substratlösung BCIP/NBT visualisiert werden.

Die entwickelten ELISpot-Platten wurden nach Herstelleranleitung an einem ImmunoSpot S5 Analyzer ausgelesen. Entsprechend der Leitlinien des *Cancer Immunoguiding Programs* (CIP) wurden T-Zellantworten als positiv betrachtet, sofern mindestens 15 Spots/Well gezählt werden konnten (Britten, Gouttefangeas et al. 2008). Außerdem wurde vorausgesetzt, dass die mittlere Spotanzahl des Wells im Verhältnis zur Negativkontrolle einen mindestens dreifach höheren Spotcountwert aufwies. Die Stärke einer detektierten T-Zell-Antwort wurde nach folgenden Kriterien klassifiziert (unter Bezug auf 2,5 x 10⁵ Zellen/well): schwach (21–50 spots), mäßig (51–100 spots), stark (101–200 spots) und sehr stark (>200 spots).

2.2.5.3 Intrazelluläre Zytokinfärbung (INF-γ und TNF-α)

Die Frequenz und Funktionalität Peptid-spezifischer CD8⁺T-Zellen wurde auch durch eine intrazelluläre INF-γ- und TNF-α-Färbung nach etabliertem Protokoll analysiert. Die Zytokinsekretion der analysierten Zellen wird hierfür gehemmt. Die intrazellulären Zytokine werden mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Als Positivkontrolle wird PMA in Kombination mit

Ionomycin verwendet, die eine Proteinkinase-C-vermittelte unspezifische T-Zellaktivierung induzieren (Chatila, Silverman et al. 1989).

Die PBMCs wurden mit 1 µg/ml HLA-Klasse-I-Peptid stimuliert und unter Zugabe von Brefeldin A (10 µg/ml) und Golgi-Stop (10 µg/ml) für sechs bis acht Stunden inkubiert. Golgi-Stop blockiert durch das Ionen-selektive Ionophor Monensin intrazelluläre Transportprozesse, woraus eine Zytokinakkumulation im Golgi-Apparat und in den Transportvesikeln resultiert (Mollenhauer, Morre et al. 1990). Das Lacton-Antibiotikum Brefeldin A führt zur Unterbrechung des Transportes vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) zum Golgiapparat und sekundärer Anreicherung der Zytokine im ER (Lippincott-Schwartz, Yuan et al. 1989).

Die Zellen wurden zunächst mit Cytofix/Cytoperm fixiert und permeabilisiert, sowie anschließend mit CD8-PE-Cy7, CD4-APC, TNF-α-PE und INF-γ-FITC gefärbt. Für die spätere Identifikation lebender Zellen erfolgte eine Färbung mit dem Aqua-Life-Dead-Reagenz®, das nur die Zytomembran nekrotischer Zellen permeieren kann. Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte an einem FACS CantoII.

Die zur Auswertung verwendete Gating-Strategie findet sich unter Abb. 3.17 im Ergebnisteil. Eine Zytokinantwort gilt als positiv, sofern die detektierte Sekretion mindestens das Doppelte des Negativkontrollwerts beträgt. Außerdem wurde vorausgesetzt, dass mindestens 0,05 % der jeweiligen T-Zell-Population *INF-γ* bzw. *TNF-α* produzierten. Die *INF-γ*-Produktion ist das entscheidende Kriterium für die Bewertung eines positiven Ergebnisses. Im Falle schwacher Reaktionen wurde ergänzend die *TNF-α*-Produktion, sowie die mittlere Fluoreszenzintensität der *INF-γ*-Produktion für die Beurteilung berücksichtigt. Die Stärke einer *INF-γ*-Reaktion wurde unter Bezug auf die CD4⁻ bzw. CD8⁻ Population folgendermaßen beurteilt: schwach (>0,05%-0,1%), mäßig (>0,1-0,5 %), stark (0,5-2%) und sehr stark (>2%).

2.2.6 Software und statistische Analyse

Für die Bestimmung des Spearman's Rangkoeffizienten (*Spearman's rank correlation coefficient*) wurde GraphPad Prism 6.0 an entsprechenden Stellen verwendet. Für die Analysen zur Teilmengenbestimmung wurde das Bio Venn SoftwareTool (www.cmbi.ru.nl/biovenn) eingesetzt.

Die durchflusszytometrische Analyse wurde mit der Hilfe von FlowJo 7.2 (Treestar, Ahland, OR, USA) durchgeführt.

2.2.7 Quantitative Bestimmung der WT-mRNA Expression

Die Bestimmung der relativen WT-1-mRNA Expressionsrate mittels RT-qPCR (normalisiert auf ABL mRNA Level) wurde vom Münchner Leukämie Labor (MLL GmbH) durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Quantitative HLA-Ligandomanalyse

Das Maß der MHC-Oberflächenexpression stellt eine Grundlage für den Erfolg einer T-Zell-vermittelten Krebsimmuntherapie dar. Eine deutlich verminderte Oberflächenexpression oder gar ihr kompletter Verlust auf Tumorzellen, sowie die damit einhergehende reduzierte Erkennung durch T-Zellen gilt in der Tumorbilogie seit langem als eine klassische Form der Immunevasion. Aus diesem Grund erfolgte zu Beginn der Arbeit zunächst eine quantitative Analyse der HLA-Oberflächenexpression in einer kleinen Patientengruppe.

Im Rahmen dieser Versuchsreihe wurden insgesamt Proben von zehn AML-Patienten untersucht. Davon erreichte jedoch nur die Hälfte des Kollektivs die zugrunde gelegten Anforderungen für die weitere Auswertung: 1) Anteil benigner, granulo- und monozytärer Zellen im analysierten Probenmaterial von $\geq 5\%$ und 2) Identifikation einer Blastenpopulation mit folgendem, definiertem Oberflächenexpressionsmuster: $CD15^-$, $CD34^+$, $CD45^{\text{intermed}}$. Als Kontrolle wurden ausgereifte, autologe $CD15^+$, $CD34^-$, $CD45^+$ Granulo- und Monozyten verwendet.

Einen Überblick über die analysierten Oberflächenmarker und die dafür verwendeten Antikörper-Farbstoff-Konjugate bietet Tabelle 2.2.

Die Studienpatienten dieser Versuchsreihe sind in Tabelle 2.7 tabellarisch aufgeführt. Die fünf in die Analyse eingeschlossenen Patienten wurden optisch hervorgehoben.

Neben den Patientenzellen wurden im Rahmen dieser Experimente auch sog. Kalibrierungsbeads unter gleichen Bedingungen analysiert. Da ihre Oberfläche mit einer definierten, vom Hersteller ermittelten Antikörpermenge beschichtet ist, konnten sie als Bezugsgröße für die weitere Versuchsauswertung verwendet werden (vgl. 2.3.2).

Die Bestimmung der Sättigungskonzentration der verwendeten Primärantikörper gegen HLA-A,-B,-C (W6/32) und HLA-DR (243) erfolgte durch Dr. Heiko Schuster (Abteilung für Immunologie, Universität Tübingen). Seine Ergebnisse stellte er freundlicherweise für dieses Projekt zur Verfügung.

Die Quantifizierung der Kalibrierungsbeads ist exemplarisch in Abbildung 3.1 dargestellt. In Abhängigkeit des Grades ihrer Antikörperbeladung sind die Beads in die Subpopulationen B–F unterteilt. Für jede dieser Untergruppen wurde der Median der

zugehörigen Fluoreszenzintensität ermittelt. Dank der Zuordnung der medianen Fluoreszenzintensität zur entsprechenden gekoppelten Antikörpermenge einer Beadpopulation konnte eine Eichgerade ermittelt werden. Diese diente im weiteren Verlauf als Bezugsgröße für die Berechnung der Anzahl markierter Oberflächenmoleküle pro Zelle aus den Daten der ermittelten Fluoreszenzsignale (Abbildung 3.1).

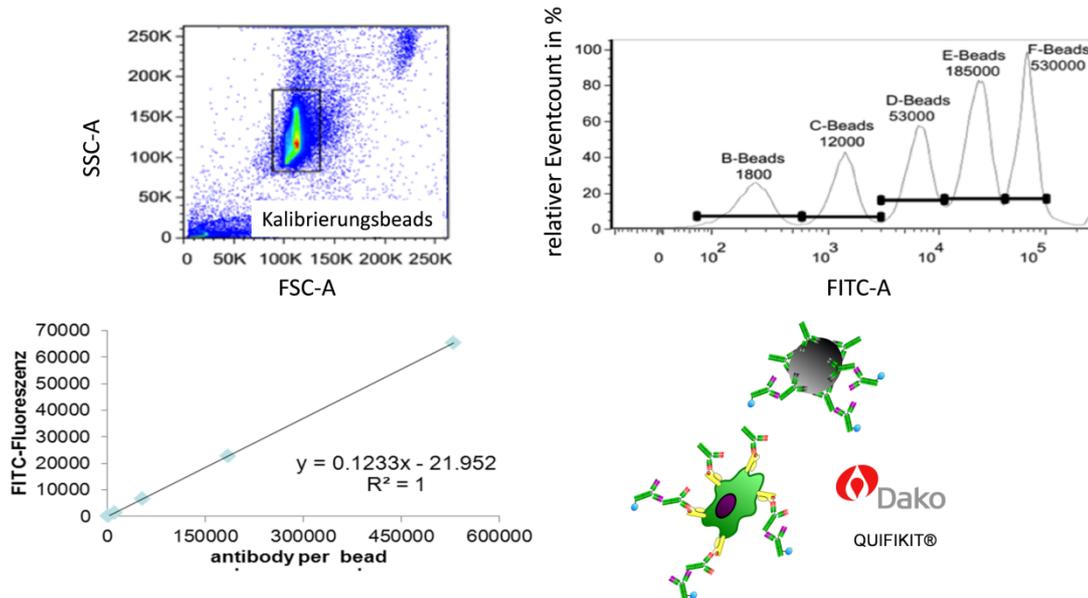


Abbildung 3.1: Durchflusszytometrie-basierte Quantifizierungsergebnisse für Kalibrierungsbeads (modifiziert nach Schuster, 2011)

Den grünen Beads (DAKO QUIFIKIT®) am rechten Bildunterrand entspricht die im Scatterplot hervorgehobene Population. Im nebenstehenden Histogramm sind die Kalibrierungsbeads entsprechend des Grades ihrer Antikörperbeladung in Beadsubpopulationen B-F unterteilt. Aus den Informationen zur Antikörperbeladung pro Bead und medianer Fluoreszenzintensität lässt sich eine Eichgerade ermitteln.

Um die unspezifische Hintergrundbildung der verwendeten Antikörper an die Zellen zu ermitteln, wurden für jedes Experiment sog. Isotypkontrollen angefertigt. Für diese Form der Negativkontrollen werden Testantikörper des gleichen Isotyps verwendet, die keine Kreuzreaktivität zu bekannten humanen Antigenen besitzen. Auf diese Weise kann das Maß des Hintergrundsignals verwendeter Primärantikörper aufgezeigt werden. Im Rahmen der quantitativen Analyse wurde zunächst die mediane Fluoreszenz im FITC-Kanal bestimmt. Anschließend wurden die ermittelten medianen Fluoreszenzwerte der HLA-A,-B,-C- und der HLA-DR-Bestimmung um das Ergebnis der Isotypkontrolle korrigiert. Aus diesen berichtigten Werten wurde abschließend unter Verwendung der Eichgerade die mittlere Anzahl der Oberflächenmoleküle pro Zelle berechnet (Abb.3.2).

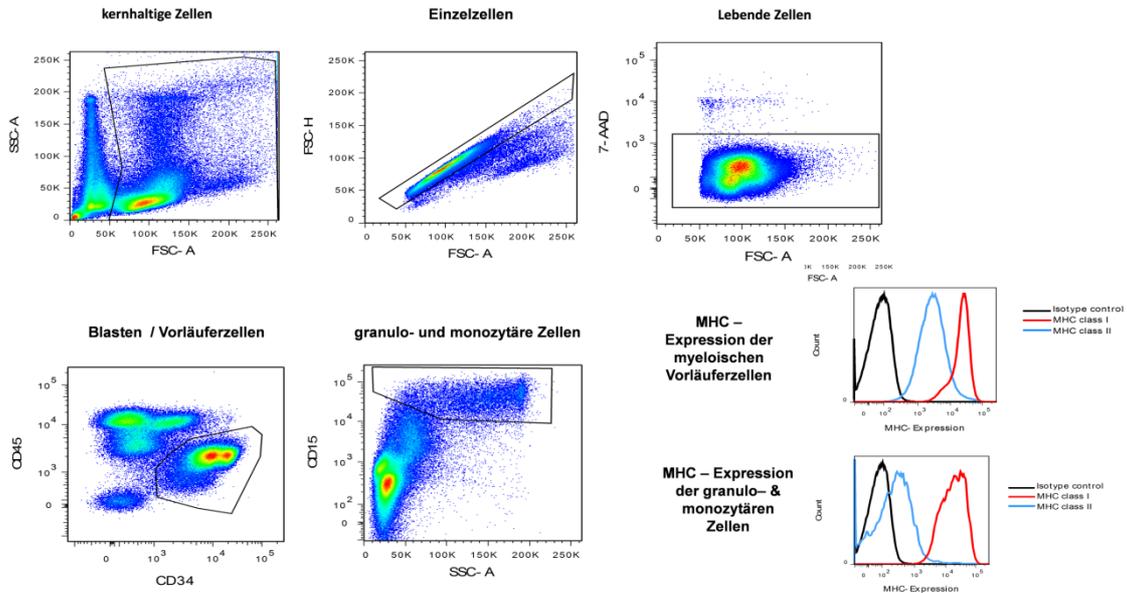


Abbildung 3.2: FACS-basierte quantitative Analyse der HLA-Klasse-I & II Molekülexpression/Zelle für maligne myeloische Vorläuferzellen sowie autologe benigne, ausgereifte granulo- und monozytäre Zellen für AML 18. Die Analyse erfolgte *ex vivo* in Form unter Verwendung von QUIFIKIT. Gating-Strategie für die durchflusszytometrische Darstellung: Zunächst Auswahl der kernhaltigen Zellen, dann der Einzelzellen, daraufhin der lebenden Zellen und schließlich der $CD15^-$, $CD34^+$, $CD45^{\text{intermed}}$ Zellen bzw. der $CD15^+$ $CD34^-$ -Zellen ausgeprägter Granularität (\rightarrow Side Scatter A, Seitwärtsstreuung); Für Auswertung der FACS-Analyse wurde das Software-Programm FlowJo 7.2 (TreeStar, Ashland, OR, USA) verwendet.

Zunächst wurde die HLA-Oberflächen-Expression auf den blastären sowie den autologen, gesunden Zellen der Patienten bestimmt und verglichen.

Entsprechend der Gating-Strategie wurde die $CD34^+$, $CD15^-$ und $CD45^{\text{intermediäre}}$ Zellpopulation als Blasten definiert. Dem gegenüber standen die ausgereiften, autologen $CD15^+$ Granulozyten und Monozyten. Die Expressionslevel der HLA-Klasse-I-Moleküle variierten zum Teil deutlich zwischen den einzelnen Spendern. Dies galt gleichermaßen für die benignen sowie die malignen Zellen. Die HLA-Expression der AML-Blasten schwankte zwischen 45 189–261 647 Molekülen pro Zelle. Bedingt durch die Spenderinterindividualität rangierten die HLA-Expressionslevel der granulo- und monozytären Zellpopulationen zwischen 75 344–239 496 Molekülen pro Zelle auf. Für drei Patienten zeigte der Vergleich benigner und maligner Zellen eine signifikant höhere HLA-Klasse-I-Expression der blastären Zellen (unpaired student t-test, $p \leq 0,001$). Eine zusammenfassende Übersicht über die HLA-Klasse-I-Oberflächenexpression der fünf AML-Patienten bietet die nachfolgende Abbildung 3.3.

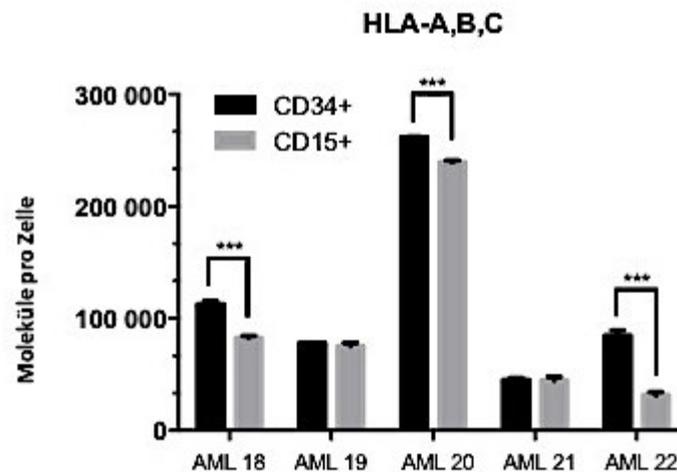


Abbildung 3.3: Quantitative Analyse der HLA-Klasse-I-Oberflächenexpression für fünf AML-Patienten basierend auf der HLA-Klasse-I-Expression (W6/32 mAb) für AML-Blasten (CD34⁺) und autologe, benigne Zellen (CD15⁺) (modifiziert nach Berlin et al. 2015)

Die Experimente wurden ex vivo für jeden Patienten individuell in Form von Triplikate-Ansätzen mittels QUIFIKIT® durchgeführt. Die erzielten Ergebnisse sind als Mittelwert der jeweiligen Triplikate \pm Standardabweichung (SD) dargestellt.

Auch die HLA-DR-Expression der verschiedenen Proben erwies sich als äußerst heterogen. Sie rangierte zwischen 1 476 und 45 150 Molekülen pro Zelle auf der Oberfläche der blastären Zellen bzw. zwischen 0 und 3 252 Molekülen pro Zelle für die autologe, benigne Vergleichspopulation. Der Ergebnisvergleich der analysierten Zellpopulationen ergab für alle Patienten eine deutliche, signifikant höhere Expression der CD34⁺, malignen Vorläuferzellen (*unpaired student t-test*, $p \leq 0,001$). In Abbildung 3.4 sind diese Ergebnisse noch einmal graphisch zusammengefasst dargestellt.

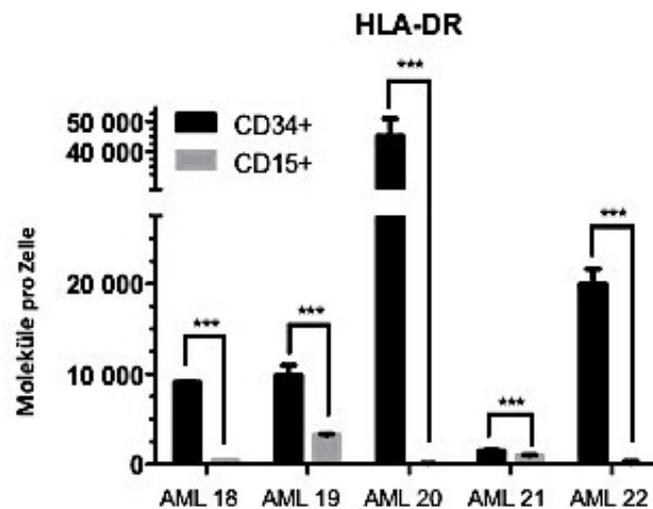


Abbildung 3.4: Quantitative Analyse der HLA-Klasse-II-Oberflächenexpression für fünf AML-Patienten basierend auf der HLA-Klasse-DR-Expression (L243 mAb) für AML-Blasten (CD34⁺) und autologe, benigne Zellen (CD15⁺) (modifiziert nach Berlin et al. 2015)

Die Experimente wurden *ex vivo* für jeden Patienten individuell, in Form von Triplikate-Ansätzen unter Verwendung von QUIFIKIT[®] durchgeführt. Die erzielten Ergebnisse sind als Mittelwert der jeweiligen Triplikate \pm Standardabweichung (SD) dargestellt.

Die durchschnittliche HLA-Klasse-I und-II-Expression der AML-Blasten erwies sich im Vergleich mit autologen, benignen Zellen nicht als verringert (Abb. 3.5).

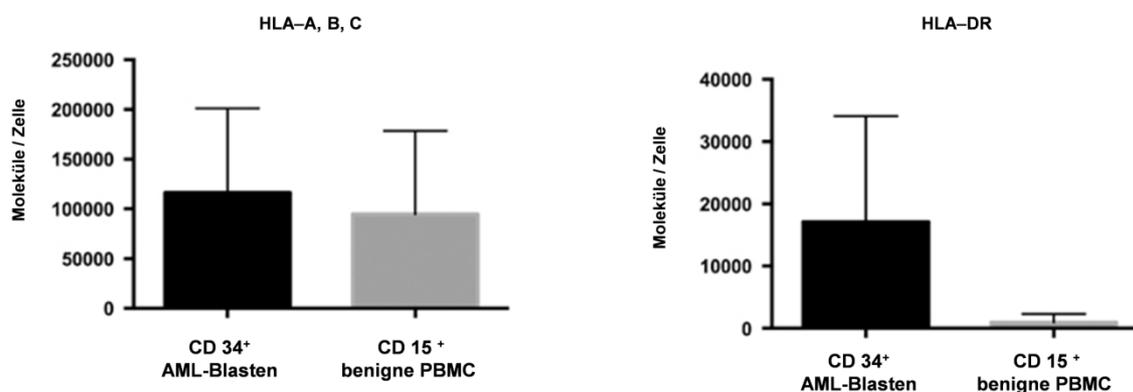


Abbildung 3.5: Darstellung der mittleren HLA-Klasse-I-Expression (links) und HLA-Klasse-II-Expression (rechts) für CD34⁺ AML-Blasten im Vergleich zu CD15⁺ autologen, benignen Zellen (modifiziert nach Berlin et al. 2015)

Die Experimente wurden *ex vivo* für jeden der fünf analysierten Patienten individuell, in Form von Triplikate-Ansätzen unter Verwendung von QUIFIKIT[®] durchgeführt.

Hämatopoetische Stammzellen (HSZ) stehen den maligne-transformierten Zellen der akuten Leukämie im Reifezyklus deutlich näher als die benignen, ausgereiften CD15⁺ Leukozyten. Ein quantitativer Vergleich der HLA-Expression benignen und malignen hämatopoetischer Vorläuferzellen könnte daher ergänzend zu den bereits erhobenen Daten eine noch genauere komparative Aussage ermöglichen.

Die vorliegenden Ethik- und Projektanträge beinhalteten leider nicht die Analyse von Knochenmarkgewebeproben. Freundlicherweise stellte jedoch Simon Walz (Abteilung für Immunologie, Universität Tübingen) seine erhobenen Expressionsdaten mononukleärer Zellen aus dem Knochenmark (sog. bone marrow nucleated cells BMNCs; $CD34^+CD38^-$), die hämatopoetische Vorläuferzellen beinhalten, von fünf gesunden Knochenmarkspendern als zusätzliches, gesundes Referenzgewebe für das vorliegende Projekt zur Verfügung (Walz, Stickel et al. 2015).

Im Vergleich der durchschnittlichen HLA-Klasse-I und -II-Expression benigner und maligner Vorläuferzellpopulationen ergab sich kein signifikanter quantitativer Unterschied. Die HLA-Klasse-I-Expression belief sich auf $248\,587 \pm 35\,351$ Moleküle/Zelle für die BMNCs. Dem gegenüber stand eine Oberflächenexpression von $116\,445 \pm 37\,855$ Molekülen/Zelle der AML-Blasten. Die durchschnittliche HLA-Klasse-II-Expression der gesunden HSZ lag bei $38\,373 \pm 5\,159$ Molekülen/Zelle. Im Durchschnitt konnte die der AML-Blasten mit $17\,103 \pm 7\,604$ Molekülen/Zelle berechnet werden. Eine Visualisierung dieser Ergebnisse findet sich in Abbildung 3.6.

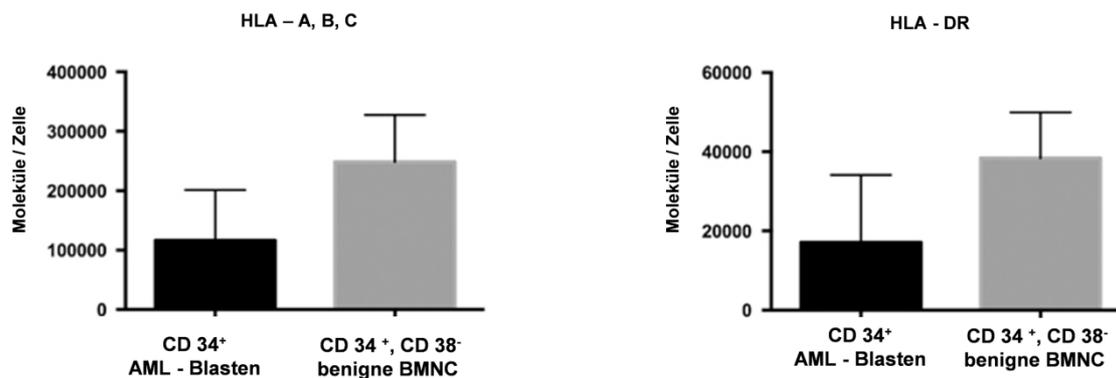


Abbildung 3.6: Vergleich der mittleren HLA-Klasse-I-Expression (links; W6/32mAb) und HLA-Klasse-II-Expression (rechts; L243mAb) von $CD34^+$ AML-Blasten und benignen, hämatopoetischen Vorläuferzellen ($CD34^+$, $CD38^-$) freiwilliger gesunder Spender (modifiziert nach Berlin et al. 2015)

Die Experimente wurden *ex vivo* für jeden der fünf analysierten Patienten individuell, in Form von Triplikat-Ansätzen unter Verwendung von QUIFIKIT[®] durchgeführt. Die verwendeten Daten der $CD34^+ CD38^-$ BMNC wurden freundlicherweise von Simon Walz zur Verfügung gestellt (Walz, Stickel et al. 2015).

In der Zusammenschau aller Ergebnisse zeigte diese quantitative, komparative Analyse weder einen Verlust noch eine verminderte HLA-Molekülexpression der primären AML-Zellen im Vergleich mit autologen, benignen Leukozyten sowie mit allogenen, benignen hämatopoetischen Progenitorzellen.

3.2 Qualitative HLA-Ligandomanalyse

3.2.1 *LC-MS/MS basierte Identifikation natürlich präsentierte HLA-Klasse-I- & -II-Liganden maligner und benigner granulo- und monozytärer Zellen*

3.2.1.1 HLA-Klasse-I

Für diese Analyse wurde das HLA-Klasse-I-Ligandom von 17 AML-Patienten und 45 gesunden PBMC-Spendern untersucht.

Aufgrund technischer Komplikationen erfüllten leider nur 15 der 17 analysierten Patienten sowie 30 der 45 Spenderproben die zugrunde gelegten Qualitätsanforderungen für die weitere Auswertung. Als Einschlusskriterium für diese Analyse wurde für jedes ausgeführte Experiment eine Mindestzuordnung, sog. Mindest-ID-Zahl (ID=Identifikation), von 500 Peptidsequenzen definiert.

Im Rahmen der Kartierung des HLA-Klasse-I-Ligandoms der 15 Patienten wurden insgesamt 13 238 verschiedene Peptide identifiziert. Diese repräsentieren ein Kollektiv von 6104 Quellproteinen.

Die Anzahl der eindeutigen Peptididentifikationen pro Patient variierte zwischen den einzelnen Messungen, insbesondere in Abhängigkeit der Menge und individuellen Beschaffenheit des Probenmaterials (Abb. 3.7). Je nach Experiment lag die Identifikationsrate zwischen 563–2733 Peptiden pro Patient. Dies bedeutet im Mittel eine Detektionsrate von 1 299 Peptide pro Patient.

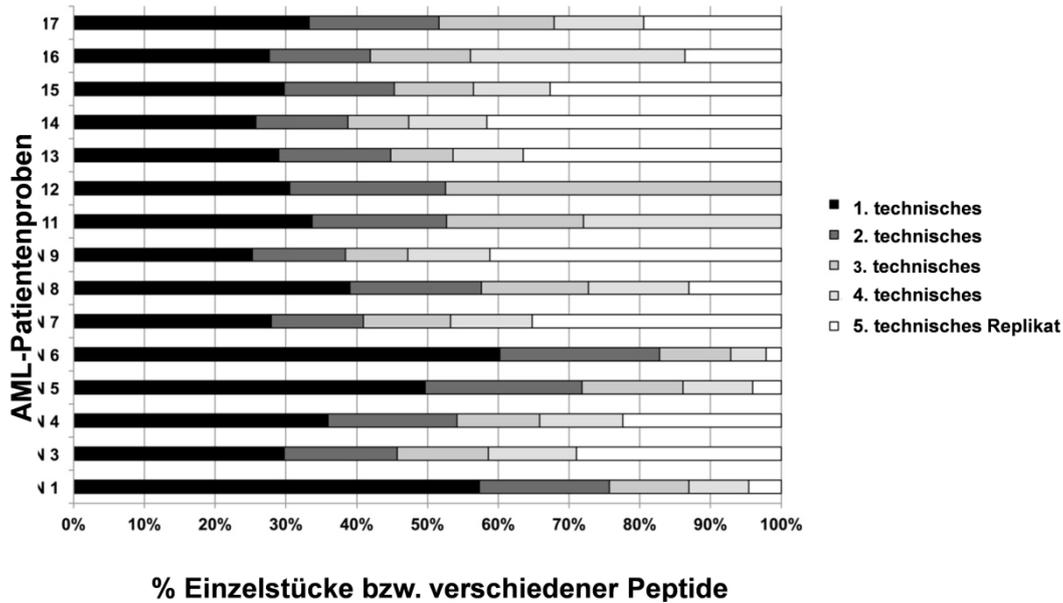


Abbildung 3.7: Visualisierung der Reproduzierbarkeit und Variationsbreite der einzelnen, angefertigten technischen Replikate der LC-MS/MS-Experimente (modifiziert nach Berlin et al. 2015)
Darstellung der relativen Menge identifizierter Peptide für die technischen Replikate 1-5.

Eine graphische Darstellung der Anzahl verschiedener Einzelpeptididentifikationen (IDs) und ihrer korrespondierenden Quellproteine aus der LC-MS/MS-Analyse für HLA-Klasse-I (W6/32) und -II (Tü39) der 15 AML-Patientenproben findet sich in Abbildung 3.8.

Um das HLA-Ligandom benigner und maligner granulo- und monozytärer Leukozyten vergleichend betrachten zu können, wurden auch PBMCs gesunder Spender (=Kontrollkohorte) kartiert. Diese Ergebnisse legten den Grundstein für den Aufbau einer Haus-internen Normalgewebsdatenbank. Zunächst zur Verwaltung der Ergebnisse der Ligandomkartierung benigner PBMCs angelegt, wurde sie im Verlauf um Informationen diverser anderer Projekte der Abteilung erweitert (u. a. Analysen gesunder Knochenmarkszellen). Heute dient sie als hausinterne Referenz des „Normalgewebsligandoms“ und unterliegt ständiger Erweiterung, Kontrolle und Überarbeitung.

Für die weitere Datenauswertung und -interpretation dieser Arbeit diente vor allem das Ergebnis der Ligandomkartierung der oben bereits erwähnten 30 PBMC-Spender als Normalgewebsreferenz. Um eine noch bessere und präzisere Vergleichbarkeit beider Ligandome zu erzielen, wurde die Normalkohorte jedoch dank Simon Walz um die Kartierungsergebnisse von fünf Knochenmarkspendern (BMNC-Spender) erweitert (Walz, Stickel et al. 2015).

Insgesamt umfasste die Normalgewebsdatenbank (30 PBMC- & 5 BMNC-Spender) 17 940 eindeutige Peptidzuordnungen. Im Rahmen der PBMC-Kartierung wurden 17 322 verschiedene Peptide identifiziert. Diese leiteten sich von 7207 Ursprungsproteinen ab. Die Massenspektrometrie-basierte Ligandomvermessung der fünf BMNC-Spender lieferte 1738 verschiedene Peptide, die 1384 Quellproteine repräsentieren.

Eine Übersicht über die analysierten AML-Patienten und freiwilligen, gesunden Spender dieser Experimente finden sich in Tab. 2.8 und Tab. 2.11. Diese Tabellen geben außerdem Aufschluss über die Anzahl der verschiedenen, detektierten Einzelpeptide beider HLA-Klassen sowie über deren korrespondierende Quellproteine.

3.2.1.2 HLA-Klasse-II

Daneben wurde auch das HLA-Klasse-II-Ligandom der 15 AML-Proben analysiert. Aufgrund technischer Komplikationen erfüllten nur 12 der 15 ausgeführten Experimente die zugrunde gelegte Qualitätsanforderung von mindestens 100 IDs je untersuchter Probe. Insgesamt ergab die Kartierung des HLA-Klasse-II-Ligandoms 2816 eindeutige Peptididentifikationen, die ein Kollektiv von 885 Quellproteinen repräsentieren. Je nach Experiment wurden pro Patient zwischen 104 und 753 Peptididentifikationen detektiert. Dies bedeutet im Mittel eine Detektion von 332 Peptiden pro Patient. Die Abbildung 3.8 bietet eine Übersicht über die Anzahl der verschiedenen, identifizierten HLA-Liganden jeder untersuchten AML-Probe.

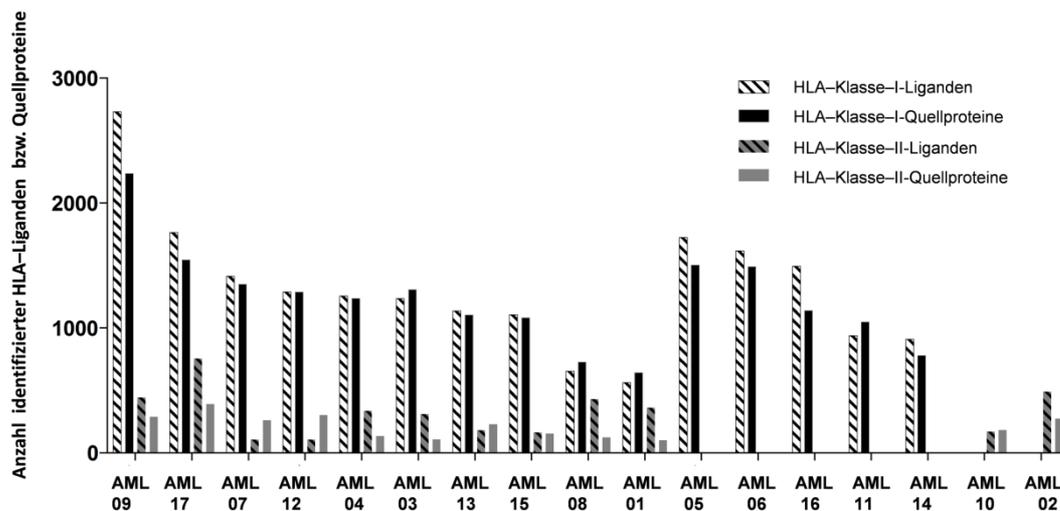


Abbildung 3.8: Anzahl verschiedener Einzelpeptididentifikationen und ihrer korrespondierenden Quellproteine aus der LC-MS/MS-Analyse für HLA-Klasse-I(W6/32) und -II(Tü39) von primären 15 AML-Proben (modifiziert nach Berlin et al. 2015)

In diese Studie wurden nur die Proben eingeschlossen, die den Schwellenwert von mind. 500 IDs (HLA-Klasse-I) bzw. mind. 100 IDs (HLA-Klasse-II) erreichten.

Die Kontrollkohorte umfasste 13 PBMC-Proben gesunder Spender. Dank der freundlicherweise zur Verfügung gestellten Daten ermöglichte Simon Walz die Erweiterung dieses Kollektivs um 2 BMNC-Proben. Insgesamt lieferte die Analyse dieser 15 Proben 2 202 verschiedene Peptide. Im Rahmen der Kartierung der PBMC-Proben wurden 2 046 Peptide identifiziert. Diese leiteten sich von 756 verschiedenen Quellproteinen ab. Die Analyse der beiden BMNC-Proben ergab 317 Peptide, die 164 Ursursungsproteine repräsentieren.

Die Annahme, dass die Anzahl analysierter Zellen direkt mit der später detektierten Peptidmenge korrelieren könnte, ist weit verbreitet. Auf der Grundlage der erhobenen Daten konnte ein direkter Zusammenhang zwischen der eingesetzten Zellzahl pro Experiment und der Anzahl der Peptididentifikation statistisch mittels Rangkorrelation sowohl für HLA-Klasse-I (Spearman $r=0,27$; $p=0,33$) als auch für HLA-Klasse-II (Spearman $r=0,31$, $p=0,33$) widerlegt werden.

Die LC-MS/MS-basierte Analyse ermöglichte die Identifikation eines großen Spektrums natürlich präsentierter HLA-Klasse-I und -II-Liganden benigner sowie maligner Zellen.

3.2.2 Vergleichende Analysen des HLA-Klasse-I-Ligandoms

Zur Identifikation neuer potentieller AML-assoziiierter Antigene wurden das HLA-Ligandom bzw. korrespondierende Quellproteom der AML-Patienten und gesunden Spender (PBMC und BMNC) miteinander verglichen.

Diese komparative Analyse offenbarte 1 435 AML-exklusive Proteine. Das entspricht einem 23,6 %-igen Anteil des gesamten, für diese Arbeit kartierten AML-Quellproteoms. Dem gegenüber standen 4 588 Proteine, die sich sowohl im Quellproteom der AML- als auch der PBMC-Kohorte detektieren ließen. Die gemeinsame Schnittmenge betrug somit 75,5 % des AML-Quellproteoms. Die gemeinsame Teilmenge des Patienten- und BMNC-Ligandoms umfasste 1 173 Proteine (=19,3 %) des AML-Quellproteoms.

Zur Similaritätsbestimmung beider Kontrollkohorten wurden die jeweiligen Quellproteome einander gegenübergestellt. Das BMNC-Quellproteom zeigte eine Überschneidung von 89,9 % mit seinem PBMC-Pendant (=1 173 gemeinsamen Proteine) (Abbildung 3.9).

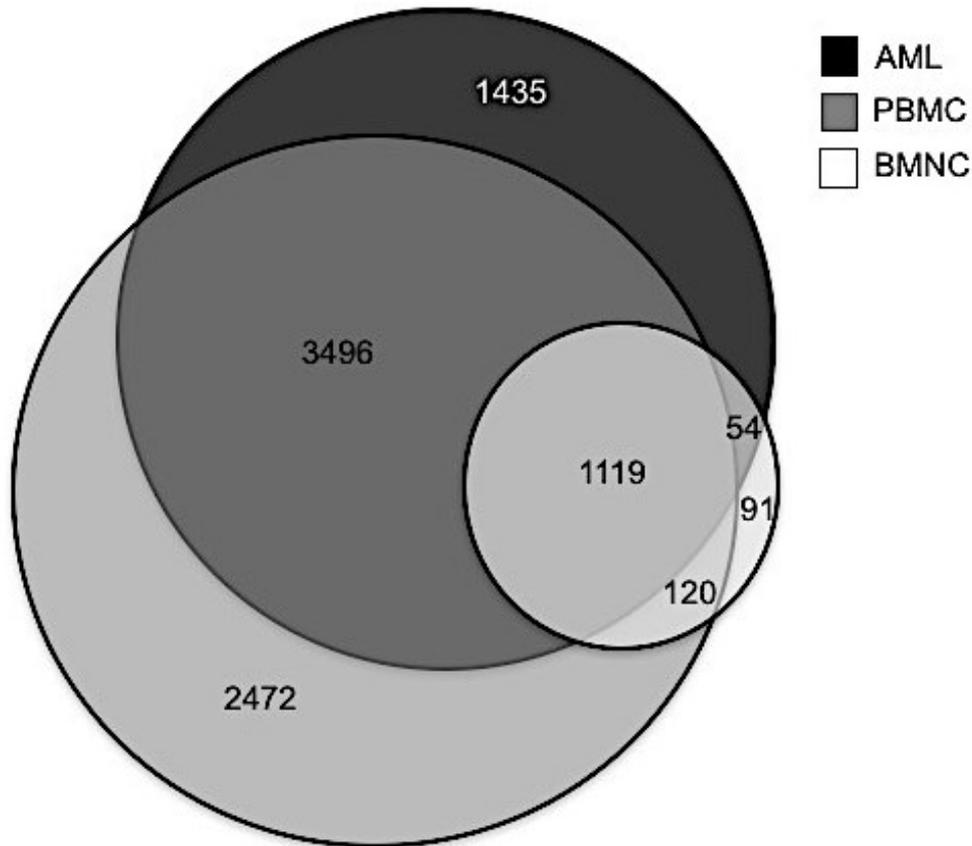


Abbildung 3.9: Ergebnisse der vergleichenden Analyse des Quellproteoms von 15 AML-Patienten, 30 gesunden PBMC- und sowie 5 gesunden BMNC-Spendern (modifiziert nach Berlin et al. 2015)
Quantitative Darstellung der jeweiligen, anteiligen Quellproteomschnittmenge, sowie der AML-, PBMC- und BMNC-exklusiven Teilmengen. Die verwendeten Daten der BMNC wurden freundlicherweise von Simon Walz zur Verfügung gestellt (Walz, Stickel et al. 2015).

Anschließend mussten aus diesem großen Spektrum potentieller Zielstrukturen die relevantesten und am vielfältigsten verwendbaren Peptidkandidaten für die folgenden Analyseschritte ausgewählt werden. Für diese Selektion wurden im Verlauf die folgenden Hauptkriterien definiert: 1) AML-Exklusivität des gewählten Quellproteins (und somit des zugehörigen Liganden) 2) hohe Präsentationsfrequenz des gewählten Proteins sowie des Peptids im gesamten AML-Ligandom. In diesem Sinne wurden alle detektierten Quellproteine im Rahmen eines Quellproteomvergleichs der Patienten- und Kontrollkohorte sortiert.

Zur besseren Übersicht folgt eine Darstellung der Ergebnisse dieser vergleichenden Ligandom- bzw. Quellproteom-Analyse in der Form eines sog. Wasserfall-Diagramms (bzw. waterfall plots). Dieses bietet unter anderem die Möglichkeit jedes einzelne detektierte Peptid bzw. korrespondierende Quellprotein in Bezug auf seine Repräsentationsfrequenz im analysierten Gewebe darzustellen (Abbildung 3.10).

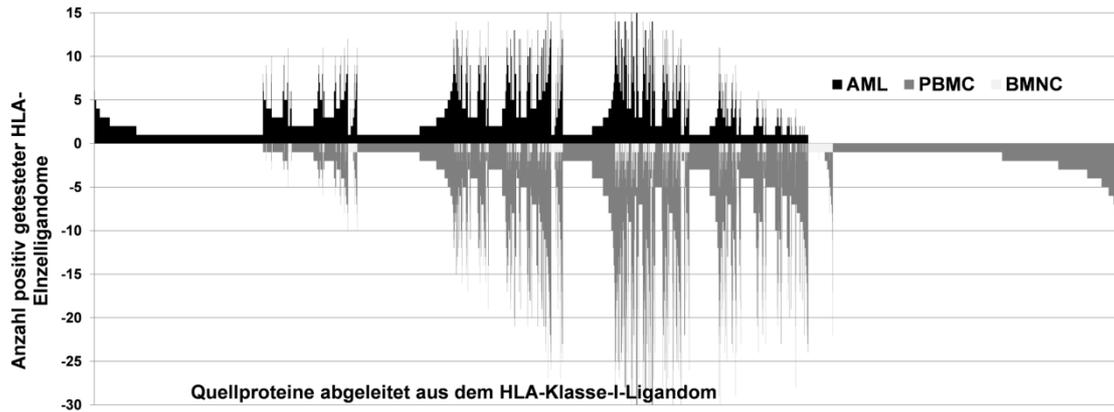


Abbildung 3.10: Vergleichende Analyse des HLA-Klasse-I-Quellproteoms der Patienten (n=15)- und Spenderkohorte (PBMC: n=30; BMNC: n=5) auf der Basis der HLA-restringierten Repräsentationsfrequenz (modifiziert nach Berlin et al. 2015)

Entlang der X-Achse sind die einzelnen, detektierten Proteine entsprechend ihrer Präsentation in den jeweiligen Ligandomen aufgetragen. Im linken Abschnitt der Abszisse werden die AML-exklusiven Proteine, in der Mitte die „gemeinsamen“ Quellproteine beider Subgruppen und im rechten Anteil die Normalgewebe-exklusiven Proteine abgebildet. Zur besseren Übersicht wurden die jeweiligen Quellproteine innerhalb der drei genannten Gruppen noch einmal entsprechend ihrer individuellen Repräsentationsfrequenz sortiert. Die absolute Anzahl der Einzeliggandome (= Patienten bzw. Spender), die für ein auf der X-Achse-aufgetragenes Quellprotein positiv getestet wurden, ist auf der Ordinate aufgetragen. Die gestrichelte Linie der Abbildung dient als optische Marke für eine 100 %-ige Präsentation eines HLA-restringiertes entsprechenden Quellproteins in der jeweiligen Kohorte. Die Box auf der linken Seite des Diagramms hebt die AML-exklusiven Quellproteine vor, die mindestens eine Präsentationsfrequenz von 20% aufwiesen. Die verwendeten Daten der BMNC wurden freundlicherweise von Simon Walz zur Verfügung gestellt (Walz, Stickel et al. 2015).

In Folge dieses Quellproteomvergleichs wurden für die AML-exklusiven Quellproteine eine Präsentationsfrequenz-basierte Rangordnung ermittelt. In diesem Zusammenhang offenbarte sich eine Gruppe von 132 Proteinen, repräsentiert durch 341 HLA-Liganden 19 verschiedener HLA-Allotypen, deren Präsentationsfrequenz mindestens 20 % beträgt. Diese Teilgruppe entspricht 2,2 % des gesamten AML-Quellproteoms.

Diese Proteine werden fortan als „aus dem Ligandom-abgeleitete Tumor-assoziierte Antigene“ bzw. „*ligandome-derived tumor-associated antigens (LiTAAs)*“ bezeichnet. Die korrespondierenden HLA-Liganden dieser Quellproteine werden von nun an als „aus dem Ligandom-abgeleitete Tumor-assoziierte Peptide“ bzw. „*ligandome-derived tumor-associated peptides (LiTAPs)*“ bezeichnet. Die HLA-Annotation erfolgte auf dem Prinzip der *in silico* Vorhersage wie unter 2.3.3.3 beschrieben.

Der *FAS associated factor 1* (FAF1) nimmt im LiTAA-Ranking die Spitzenposition ein. Er wurde in 8 von 15 (53,3%) Patientenligandomen detektiert. Repräsentiert wurde FAF1 durch sechs verschiedene HLA-Liganden: AEQFRLEQI (B*44), FTAEFSSRY (A*03), HHDESVLTNVF (B*38:01), REQDEAYRL (B*44:25), RPYMPSRQI (B*07), VQREYNLNF (B*15).

Tabelle 3.1 bietet eine Übersicht über die Top 15 LiTAAs, die in mindestens 33 % aller AML Ligandome (n=15) detektiert wurden.

Diese Zusammenstellung beinhaltet darüber hinaus die jeweilig korrespondierenden LiTAPs, sowie Informationen bzgl. deren HLA-Allotyps und Präsentationsfrequenz.

Tabelle 3.1: Tabellarische Übersicht der TOP 15 HLA-Klasse-I-LiTAAs und ihre korrespondierenden LiTAPs (modifiziert nach Berlin et al. 2015)

Diese 15 Quellproteine weisen eine Repräsentationsfrequenz von mindestens $\geq 33\%$ unter allen analysierten AML-Patienten (n=15) auf. Die HLA-Annotation erfolgte durch *in silico* Motivvorhersage unter Verwendung von SYFPEiTHI sowie einer internen Datenbank.

Protein/Peptide	Anzahl positiv-getesteter AML-Patienten [Anzahl in %]	PSM	HLA-Typ
FAF1 Fas (TNFRSF6) associated factor 1	8 [53.3%]	41	
AEQFRLEQI	1	4	B*44
FTAEFSSRY	2	7	A*03
HHDESVLTNVF	3	21	B*38:01
REQDEAYRL	1	1	B*44:25
RPVMPSRQI	1	1	B*07
VQREYNLNF	1	7	B*15
PLXND1 plexin D1	7 [46.7%]	25	
GQLPITIQV	1	13	B*13:02
RAYADEVAV	1	2	B*51:01
REDKPPPLAV	1	1	B*49:01
RVKDLDETEKY	2	5	B*15
SEQEMNAHL	1	2	B*44:25
YVLPVHSL	1	2	A*02
LPLRFWVNI	1	1	B*51:01
GMNN geminin, DNA replication inhibitor	6 [40.0%]	20	
EVAEHVQYM	3	14	A*26:01
YMAELIERL	3	6	A*02
CPQ carboxypeptidase Q	6 [40.0%]	28	
ALASLIRSV	5	27	A*02
TVAEITGSKY	1	1	A*26:01
ATP5L ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial Fo complex, subunit G	5 [33.3%]	68	
EIIGKRGIIQY	4	67	A*26, A*03:01
NLVEKTPAL	1	1	A*02
ITGA5 integrin, alpha 5	5 [33.3%]	67	
IEDKAQILL	3	55	B*49:01/ B*40
SIYDDSYLGY	1	11	A*26:01
TTNHPINPK	1	1	A*11
SKP1 S-phase kinase-associated protein 1	5 [33.3%]	8	
NAAILKKV	2	2	B*51:01
NYLDIKGLL	1	1	A*24
YLDIKGLLDV	2	5	A*02
CHD1L chromodomain helicase DNA binding protein 1-like	5 [33.3%]	70	
EEVGDFIQRY	1	2	B*44:03
EVGDFIQRY	4	67	A*26:01, A*03
MKDLSLGGVL	1	1	--
TGFBRAPI transforming growth factor, beta receptor associated protein 1	5 [33.3%]	18	
DEFITVHSM	1	5	B*18:01
EFITVHSM	2	6	A*23:01
GQLDVRELI	1	1	B*13:02
TQYIIHNY	1	6	B*15
NGLY1 N-glycanase 1	5 [33.3%]	39	
EVVDVTWRY	4	37	A*26, A*03:01
KEALLRDTI	1	2	B*49:01
APLP2 amyloid beta (A4) precursor-like protein 2	5 [33.3%]	94	
HGYENPTYK	4	92	A*03
SLLYKVPYV	1	2	A*02
KIF2C kinesin family member 2C	5 [33.3%]	52	
AEIPLRMV	1	14	B*49:01
EVVYRFTAR	1	2	A*66
FPGLAIKI	2	10	B*51:01
IYNGKLFDL	1	1	A*24
IYNGKLFLL	1	7	A*24
KEIDVISI	1	2	B*49:01
LEEQASROI	1	13	B*49:01
TRMSTVSEL	1	3	B*39:01
ELP3 elongator acetyltransferase complex subunit 3	5 [33.3%]	6	
SEETFRFEL	1	4	B*40
KLYPTLVIR	4	2	A*03
DGKZ diacylglycerol kinase, zeta	5 [33.3%]	48	
ALRNQATMVQK	2	1	A*03:01
LLDHAPPEI	3	47	A*02
MTCH2 mitochondrial carrier 2	5 [33.3%]	29	
GVLGTVVHGK	4	11	A*03:01
VQFIGRESKY	1	18	B*15

Insgesamt liefern die 132 häufigsten LiTAAs allein bereits ein Panel von 341 verschiedenen LiTAPs, repräsentiert durch mehr als 25 HLA-Allotypen. Bei gegebener Immunogenität wären prinzipiell alle 341 LiTAPs für die Entwicklung einer breit einsetzbaren AML-spezifischen Peptidvakzine geeignet. Eine Gesamtübersicht dieser Gruppe findet sich im Anhang in Tabelle 5.1.

Dennoch sollten die weiteren 1 389 AML-exklusiven Quellproteine, deren Repräsentationsfrequenz unter 20 % lag, ebenfalls weiter analysiert werden. Diese 1 727 Liganden könnten als Peptidpool für potentielle Ergänzungen bzw. die weitere Individualisierung einer Vakzine dienen.

Eine orientierend durchgeführte, funktionelle Clusteranalyse zeigt keine eindeutigen, pathophysiologisch verbindenden Charakteristika neben der AML-Exklusivität auf. Diese LiTAAs entstammen diversen Signalwegen und Stoffwechselprozessen. Es scheinen sich tendenziell vermehrt Strukturproteine, sowie Proteine aus dem Bereich der zellulären Basisprozesse (u. a. Translation, molekularer Transport) in dieser Gruppe zu finden (Uniprot.org, david -d.ncifcrf.gov; jeweils abgerufen am 21.4.2017).

In der Zusammenschau der dargestellten Ergebnisse zeigen die vergleichenden Analysen des HLA-Klasse-I-Ligandoms eine Vielzahl AML-assoziiierter Antigene bzw. Peptide auf.

3.2.3 Identifikation natürlich präsentierter HLA-Klasse-I-Liganden etablierter AML-assoziiierter Antigene

Neben der Identifikation neuer Leukämie-assoziiierter Antigene bestand im Rahmen dieser Arbeit auch Interesse an der potentiellen Detektion natürlich präsentierter, HLA-Klasse-I-Liganden bereits etablierter AML-assoziiierter Antigene. Diese Antigene wurden im Rahmen von Genom- und Transkriptomanalysen unter Berücksichtigung üblicher TAA-Kriterien sowie ihrer pathophysiologischen Relevanz definiert. Eine Zusammenstellung der wichtigsten Antigene findet sich in der Übersichtsarbeit von Anguille, S. und Kollegen (Anguille, Van Tendeloo et al. 2012). Diese diente als Grundlage für die weiteren, durchgeführten Untersuchungen. Es gelang in dieser Arbeit 122 verschiedene HLA-Klasse-I-Liganden zu identifizieren, die 29 dieser publizierten Antigene repräsentieren. Keines dieser Antigene rangiert unter den TOP 130 LiTAAs.

Eine Übersicht über der 29 LAAs und ihre korrespondierenden HLA-Liganden bietet Tabelle 3.2.

Der vorgenommene Quellproteomvergleich der Patienten- und Normalgewebeskohorte, der ausschließlich diese 29 Antigene berücksichtigte, zeigte lediglich für fünf Antigene (<20%) eine AML-Exklusivität auf: FLT3 (SELKMMTQL, B*40), PASD1 (LLGHLPAEI, C*01:02), HOXA9 (DAADELSVGRY, A*26:01), AURKA (REVEIQSHL, B*49:01) und CCNA1 (LEADPFLKY, B*18:01; EPPAVLLL, B*51:01).

3. Ergebnisse

Tabelle 3.2: Übersicht über die Detektion natürlich präsentierte HLA-Klasse-I-Liganden abgeleitet aus etablierten AML-Antigenen in der Patientenkohorte (n=15) sowie der Spenderkohorte (BMNC: n=5; PBMC: n=30) (modifiziert nach Berlin et al. 2015)

Die Tabelle gibt zudem Aufschluss über den jeweiligen (möglichen) HLA-Allotyp der aufgeführten Peptide, sowie deren Präsentationshäufigkeit in der jeweiligen (Sub)kohorte.

Quellprotein bzw. LAA/Peptid	Anzahl positiv- getesteter Spender (PBMC/BMNC) [prozentualer Anteil %]	positiv- gesunder Anteil %	Anzahl positiv- getesteter Patienten [prozentualer Anteil %]	positiv- AML- Anteil %	HLA-Allotyp
NPM1 nucleophosmin	17[56.7] / 1[20.0]		9[60.0]		
DENEQLSL	1/0		3		B*18, B*40, B*44, B*44:25
EITPPVVL	5/1		0		A*68, A*28, A*32
GFEITPPVVL	4/1		0		A*68, A*28
HQLSLRTV	2/0		0		B*13, B*52
MSVQPTVSL	0/0		1		C*03
SIRDTPAKN	0/0		1		n.a.
SIRDTPAKNAQK	1/0		1		A*11
SPIKVTLATL	3/0		0		B*07
TPPVVLRL	6/0		2		B*51
VEAKFINY	0/0		1		B*18:01
YEGSPIKV	0/0		1		B*49:01
YEGSPIKVTL	3/0		3		B*40:01
FLT3, fms-related tyrosine kinase 3	0[0.0]/0 0.0]		1[6.7]		
SELKMMTQL	0/0		1		B*40
PRAM1 PML-RARA regulated adaptor molecule 1	4[13.3] / 1[20.0]		3[20.0]		
EKDPQPQL	1/0		0		n.a.
GYVPRTAL	1/0		0		A*24
KEKDPQPQL	0/0		1		B*44:25
LPKKPSKLEL	1/0		1		B*07
RPSAASIDL	0/1		1		B*07
SRHPLSPGF	0/0		1		B*27:05
BCL2 B-cell CLL/lymphoma 2	1 [3.3] / 1[20.0]		2 [13.3]		
TPRSQPPEL	0/1		1		B*07
GRIVAFEF	0/0		1		B*27:05
HTPHPAASR	1/0		0		A*33
BRAP BRCA1 associated protein	1[3.3] / 1[20.0]		4 [26.7]		
NPDELKTTV	1/0		0		n.a.
PSKQLPDQI	0/1		0		n.a.
VYVERAEVL	3/0		1		A*24
NUDCD1 NudC domain containing 1	6[20.0] / 0[0.0]		4 [26.7]		
DPFIIHSI	5/0		2		B*51
EHSIATLLL	1/0		2		B*38, B*39
CYP1B1 cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1	6[20.0] / 1[20.0]		1 [6.7]		
FLDPRPLTV	6/1		1		A*02
SAFADRPAP	1/0		0		n.a.
HMMR hyaluronan-mediated motility receptor (RHAMM)	1[3.3] / 0[0.0]		2 [13.3]		
DTTLPASAR	0/0		1		A*66
KLLEYIEEI	0/0		1		A*02
LEKQIEL	1/0		0		n.a.
TERT telomerase reverse transcriptase	2[6.6] / 0[0.0]		0[0.0]		
LmSVYVVEL	2/0				A*02
MCL1 myeloid cell leukemia sequence 1	15[50] / 0[0.0]		5[33.3]		
ESITDVLVR	3/0		2		A*66
ETAFQGLMR	0/0		1		A*66
EVPDVTATPARL	1/0		0		n.a.
GRIVTLISF	3/0		1		B*27
HVFSDBGVTNW	2/0		0		A*25
REIGGGEAGAVI	1/0		0		B*49
RGWDGFVEF	0/0		1		A*32
RPAVLPLL	1/0		0		B*07
VEFFHVEDL	3/0		2		B*40, B*52, B*60
VQRNHETAF	3/0		2		B*15, B*62
DNAJC2 DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 2	1[3.3] / 0[0.0]		0[0.0]		
AELEAARL	1/0		0		B*44
NUSAP1 nucleolar and spindle associated protein 1	2[6.6] / 2[40.0]		5[33.3]		
ATQTPVSNK	0/1		1		A*11
ESIDQYIER	1/1		2		A*33, A*66, A*68
FEEHNSMNEL	1/0		1		B*40
SVASTPISQR	0/1		1		A*68
VASTPISQR	0/1		0		A*68
PRTN3 proteinase 3	2[6.6] / 4[80.0]		2[13.3]		
AEIVGGHEA	2/2		1		B*50, B*49
RPPSPALASV	0/1		0		B*07
SVAQVFLNNY	0/1		0		A*03
TQEPTQQHF	0/1		1		B*15

Quellprotein bzw. LAA/Peptid	Anzahl positiv- getesteter Spender (PBM/CM/BNMNC) [prozentualer Anteil %]	Anzahl positiv- getesteter Patienten [prozentualer Anteil %]	HLA-Allotyp
RGS5 regulator of G-protein signaling 5	1[3.3] / 0[0.0]	2[13.3]	
KDITmKNLV	1/0	0	n.a.
mAEKAKQIY	0/0	2	n.a.
SSX2IP synovial sarcoma, X breakpoint 2 interacting protein	8[26.7] / 0[0.0]	0 [0.0]	
KLDNQVSKV	6/0	0	A*02
SENVKLFSA	1/0	0	n.a.
VQKLQNII	1/0	0	B*13
WT1 Wilms tumor 1	10[33.3] / 0[0.0]	3[20.0]	
AFTVHFSGQF	0/0	2	A*23
GVFRGIQDV	0/0	1	A*02:01
QRNMTKLQL	1/0	0	--
RmFPNAPYL	9/0	1	A*02:01, E
MAGED1 melanoma antigen family D, 1	15[50.0] / 3[60.0]	6[40.0]	
EAAAEAKAR	1/0	1	A*66
IIKEYTDVY	1/0	0	B*15:01
KEIDKNDHL	1/0	0	B*40:01
KVSKASGVSK	2/0	1	A*03
MPATETKKV	1/0	0	B*07
NADPQAVTm	5/0	0	A*02
RSDmLKDII	0/0	1	--
SESGAGLTRF	0/0	1	B*44:25
SMMQTLTIV	1/0	0	A*02
TEVSKTPEA	4/2	3	B*49:01
VEVPETPKA	2/1	1	B*50
DVYPEIHER	6/1	2	A*66, A*68
AURKA aurora kinase A	0[0.0] / 0[0.0]	1[6.7]	
REVEIQSHL	0/0	1	B*49:01
CCNA1 cyclin A1	0[0.0] / 0[0.0]	2[13.3]	
EPPAVLLL	0/0	1	B*51:01
LEADPFLKY	0/0	1	B*18:01
MUC1 mucin 1, cell surface associated	1[3.3] / 0[0.0]	0 [0.0]	
TTQGQDVTLA	1/0	0	--
MPO myeloperoxidase	0[0.0] / 3[60.0]	6[40.0]	
AEYEDGFSIP	0/1	0	B*50
AQISLPRI	0/1	0	B*13
DFTPEPAAR	0/0	2	A*66
DNTGITVSK	0/1	0	A*68
EEAKQLVDKAY	0/0	1	B*44
ERRESIKQ	0/0	1	--
ETVGQLGTVLR	0/1	1	A*66, A*68
FEQVMRIGL	0/0	1	B*40
FSMQQRQAL	0/0	1	C*03
GVPFSSLR	0/1	1	A*66, A*68
IVRFPTDQL	0/1	1	A*02
KQPVAARTAV	0/0	1	B*15
LGASNRAFV	0/1	0	--
NPRWDGERL	0/0	1	B*07
NVFTNAFRY	0/0	1	A*29
QPmEPNPRVPL	0/0	1	B*07
QPVAARTAV	0/1	0	B*07
RLFEQVMRI	0/0	2	A*02
SEEP LARNL	0/0	1	B*40
TIRNQINAL	0/0	1	A*02
VLGPTAMRK	0/1	0	A*03
RUNX1 runt-related transcription factor 1	2[6.6] / 0[0.0]	4[26.7]	
AELRNATAA	1/0	0	--
DVPDGLVTVm	1/0	3	A*26
LPIAFKVV	1/0	1	B*51
SAMGSATRY	0/0	1	A*32
NUP214 nucleoporin 214kDa	2[6.6] / 0[0.0]	3[20.0]	
AEKQGHQW	1/0	0	B*44
GEQKPTGTF	0/0	1	B*44:25
GQFSKPFSF	1/0	0	B*15:01
IAFFDVRTF	0/0	1	C*12:03
LSAGKTSFSF	0/0	1	C*03
VSNKYGLVF	1/0	0	B*58
CCNB1 Cyclin B1	2[6.6] / 0[0.0]	3[20.0]	
GEVDVEQHTL	2/0	2	B*40:01
VDVEQHTL	0/0	1	B*40:01
HOXA9 Homeobox A9	0[0.0] / 0[0.0]	1[6.6]	
DAADELSVGRY	0/0	1	A*26:01
MSLN mesothelin	0[0.0] / 0[0.0]	1[6.6]	
LSEADVRA	0/0	1	--

Quellprotein bzw. LAA/Peptid	Anzahl positiv- getesteter Spender (PBMC/BMNC) [prozentualer Anteil %]	Anzahl positiv- getesteter Patienten [prozentualer Anteil %]	HLA-Allotyp
BIRC5 survivin	2[6.6] / 0[0.0]	3[20.0]	
ELTLGEFLK	2/0	2	A*68
ELTLGEFLKL	1/0	2	A*02
LTLGEFLK	1/0	1	--
LTLGEFLKL	1/0	1	A*02
TLGEFLKL	1/0	2	A*02
KLF2 kruppel like factor 2	5[16.7] / 0[0.0]	4[26.7]	
KTYTKSSHLK	5/0	4	A*03
PRAME preferentially expressed antigen in melanoma	1[3.3] / 0[0.0]	0[0.0]	
SQLTLSFY	1/0	0	B*15
PASD1 pas domain containing 1	0[0.0] / 0[0.0]	2[13.3]	
KMQEKKKLQ	0/0	1	--
LLGHLPAEI	0/0	1	B*51

Für über 80 % untersuchten, etablierten Leukämie-Antigene (24/29) konnte eine Repräsentation im HLA-Ligandom gesunder Spender (PBMC, BMNC) nachgewiesen werden.

Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, dass fünf etablierte AML-assoziierte Antigene ausschließlich im Ligandom gesunder PBMC-Spender repräsentiert wurden: TERT, MUC1, SSX2IP, DNAJC2 und PRAME.

Die Myeloperoxidase (MPO), bedeutender Marker der Myelopoese, ist im vorliegenden Datensatz durch insgesamt 19 verschiedene HLA-Liganden repräsentiert. Sie wurde in 6 von 15 AML-Proben (40 %), jedoch in keinem der 30 analysierten PBMC-Ligandome (0 %) detektiert. Im Rahmen der Kartierung des Ligandoms der gesunden BMNC-Spender wurden Peptide dieses Proteins jedoch in 60 % der analysierten Proben (3/5) identifiziert. Dieser Umstand unterstreicht die Bedeutung der ergänzend durchgeführten HLA-Ligandomkartierung benigner BMNC-Proben für diese Arbeit. Abbildung 3.11 bietet eine graphische Übersicht über die Repräsentation etablierter AML-Antigene durch natürlich präsentierte HLA-Klasse-I-Peptide im HLA-Ligandom der Patienten- und Kontrollproben.

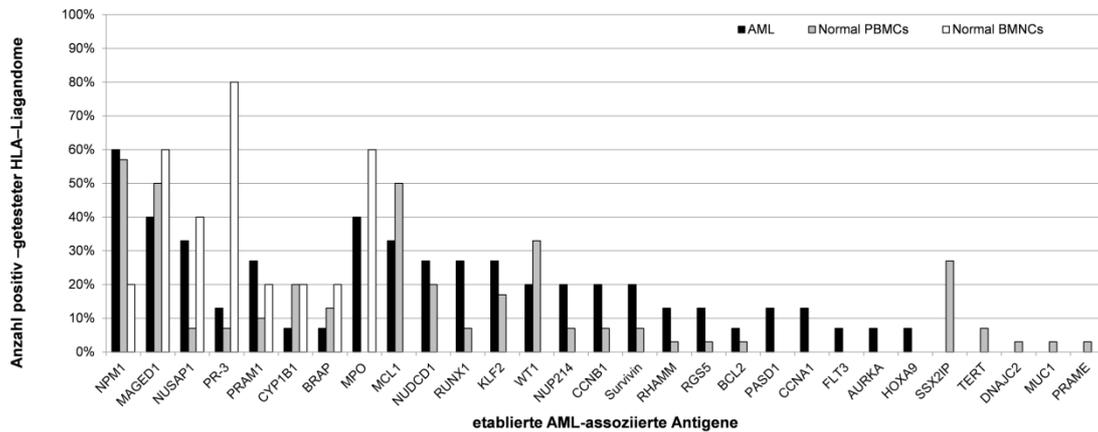


Abbildung 3.11: Repräsentation etablierter AML-Antigene durch natürlich präsentierte HLA-Klasse-I-Peptide im HLA-Ligandom von 15 AML-, 30 PBMC- und 5 BMNC-Proben (modifiziert nach Berlin et al 2015)

Die Säulen zeigen die jeweilige, relative Präsentation eines Antigens im entsprechenden HLA-Ligandom an. Die verwendeten Daten der CD34⁺ CD38⁻ BMNC wurden freundlicherweise von Simon Walz zur Verfügung gestellt (Walz, Stickel et al. 2015).

Wie bereits in der Einleitung dargelegt, kodiert das Wilms-Tumor-Suppressor-Gene (*WT-1*) für einen Transkriptionsfaktor, der u. a. an der Regulation vieler zellulärer Prozesse u. a. an der Proliferation, Differenzierung, mRNA-Prozessierung und Apoptose beteiligt ist. *WT-1* ist in vielen Tumorentitäten, beispielsweise in akuten Leukämien, häufig überexprimiert. Vor diesem Hintergrund wurde anhand einer orientierend durchgeführten Analyse an vier AML-Proben geprüft, ob eine direkte Korrelation der *WT-1*-Transkription mit der HLA-Präsentation besteht. Die mRNA-Transkriptions-Analysen wurden freundlicherweise vom Münchner Leukämie Labor durchgeführt. Diese detektierten *WT-1*-mRNA in allen vier untersuchten Proben. Die HLA-Ligandomanalyse dieser Proben konnte für *WT-1* keine direkte Korrelation zwischen der relativen *WT-1*-Expression und der Präsentationsfrequenz im HLA-Ligandom zeigen. Ein WT-1 Peptid (RMFPNAPYL; 15 PSMs) konnte lediglich in einer einzigen der vier analysierten Proben detektiert werden.

Tabelle 3.3: Analyse der WT-1-mRNA-Expression und HLA-restringierten WT-1-Peptidpräsentation (modifiziert nach Berlin et al. 2015)

In dieser Tabelle sind Ergebnisse der relativen WT-1 und ABL-Expression zusammengestellt; die Expression des „house-keeping“ Gens ABL diente der WT-1-Expressionsbestimmung als Bezugsgröße. Daneben gibt diese Tabelle Aufschluss über die Ergebnisse der zugehörigen HLA-Liganden-Analyse jeder untersuchten Probe. *PSM = peptide spectrum matches*

AML-Patient	<i>WT-1</i> mRNA Expression [% of <i>ABL</i> RNA Expression]	<i>ABL</i> mRNA Expression	WT-1 HLA-Klasse-I-Liganden
4	122,581	4176	neg.
8	4739,195	55022	neg.
7	651,66	97173	15 PSMs (RMFPNAPYL)
9	10270,27	222	neg.

Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung der direkten HLA-Ligandom Kartierung für die Definition AML-assoziiierter Antigene.

3.2.4 Subgruppen-spezifischer Vergleich des HLA-Ligandoms von *FLT3-ITD* Mutationsträgern und *FLT3*-wildtypischen Patienten

Das Ziel dieser Arbeit besteht insbesondere in der Identifikation von HLA-Liganden, die eine Vakzinierungstherapie für ein breitgefächertes Patientenkollektiv ermöglichen. Die AML ist jedoch eine biologisch sehr heterogene und variable Erkrankung. In Folge zunehmender Definition und Etablierung von AML-Subgruppen wird die aktuelle Therapie immer stärker nach (molekular)genetischen Risikogruppen und pathophysiologischen Kriterien ausgerichtet. Um eine mögliche, Subgruppen-übergreifende Verwendbarkeit der LiTAAs orientierend zu prüfen, wurde exemplarisch anhand der *FLT3-ITD*-Mutation mit einer Subgruppenanalyse des AML-Ligandoms begonnen (*FLT3-ITD*, n=8; *FLT3-WT*, n=7). Daneben stand jedoch auch die Frage eines potentiell existenten, Subgruppen-spezifischen Quellproteoms im Raum.

Zur Beurteilung der internen Heterogenität des AML-HLA-Klasse-I-Ligandoms wurde eine semiquantitative Proximitätsanalyse basierend auf den PSMs (spectral counts) für beide Subgruppen durchgeführt. Um eine Vergleichbarkeit und Beurteilung der Ligandome verschiedener HLA-Allotypen gewährleisten zu können, erfolgte dieser Vergleich auf der Ebene der jeweiligen korrespondierenden Quellproteome. Als Maß für die Ähnlichkeit bzw. die Verschiedenheit gebildeter Probenpaare wurden euklidische Distanzen bestimmt. Kleine Distanzen entsprechen einer großen

Ähnlichkeit, große Abstandswerte zeigen starke Verschiedenheit an. Euklidische Distanzen wurden für alle möglichen Probenpaar-Kombinationen innerhalb der jeweiligen Kohorte (FLT3-Mutationsträger, FLT3-wildtypische Patienten) ermittelt. Die Berechnung der euklidischen Abstände erfolgte mittels Haus-eigenen Python-Scripts (*Python v3.3.3, Python Software Foundation*) unter Verwendung der jeweilig detektierten PSM-Counts. Um die Vergleichbarkeit der Einzelproben für jede Probenpaarbildung gewährleisten zu können, erfolgte stets die Normalisierung der niedriger- auf die höher-gewichtete Probe eines Paares auf der Basis der totalen PSM-Counts. Die Liste der Quellproteine wurde kombiniert. Die absolute Differenz zwischen den PSM-Counts, welche die entsprechenden Quellproteine repräsentieren, wurden aufsummiert. Daraus ergab sich die Euklidische Distanz (unpaired t-test $p < 0,001$). Die Programmierung des verwendeten Python-Scripts, sowie die Bestimmung der euklidischen Distanzen erfolgte freundlicherweise durch Daniel Kowalewski in Zusammenarbeit mit der Abteilung für Bioinformatik der Universität Tübingen.

Die durchgeführte Proximitätsanalyse ergab für die FLT3-WT-Gruppe (Durchschnittswert: $916 \pm 70,6$; $n=21$) im Vergleich zur FLT3-ITD-Gruppe (Durchschnittswert: $1687 \pm 156,5$; $n=21$) eine signifikant geringere interne Heterogenität ($P < 0,0001$). Diese Beobachtung wird in Abbildung 3.12 visualisiert.

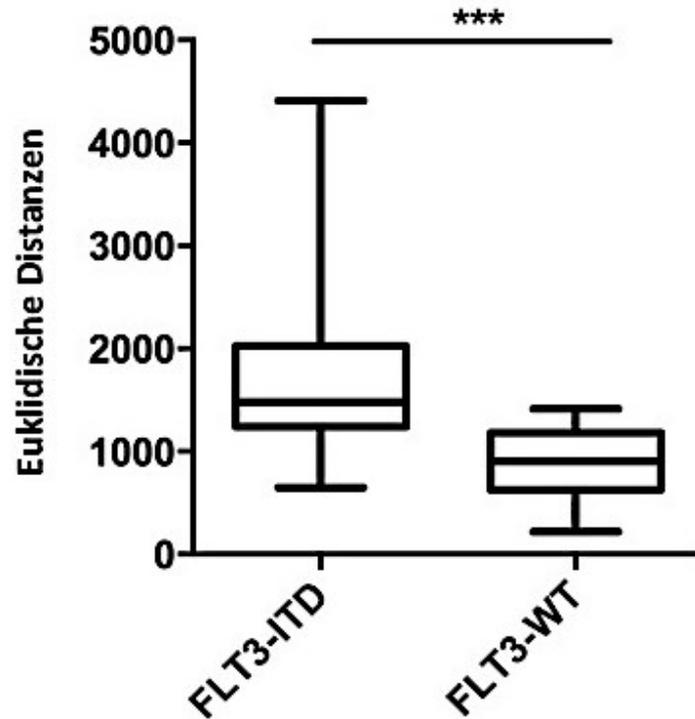


Abbildung 3.12: Proximitätsanalyse zur Ermittlung der internen Heterogenität beider Subgruppen anhand der Bestimmung euklidischer Distanzen für die FLT3-ITD (n=8) und FLT3-WT (n=7)-Subgruppen (modifiziert nach Berlin et al. 2015)

(*** $p < 0,001$, unpaired t- test); verwendete Software: Python v3.3.3, Python Software Foundation)

Des Weiteren wurde die Übereinstimmung des Quellproteoms beider Gruppen für die AML-exklusiven Quellproteine (FLT3-ITD: n=926 Protein; FLT3-WT: n=748 Proteine) untersucht (Abbildung 3.13). Im Rahmen dieser Analyse wurden 239 gemeinsame Proteine detektiert. Dies entspricht einer Überschneidung des wildtypischen Quellproteoms mit dem Pendant der Mutationsträger von 32 %.

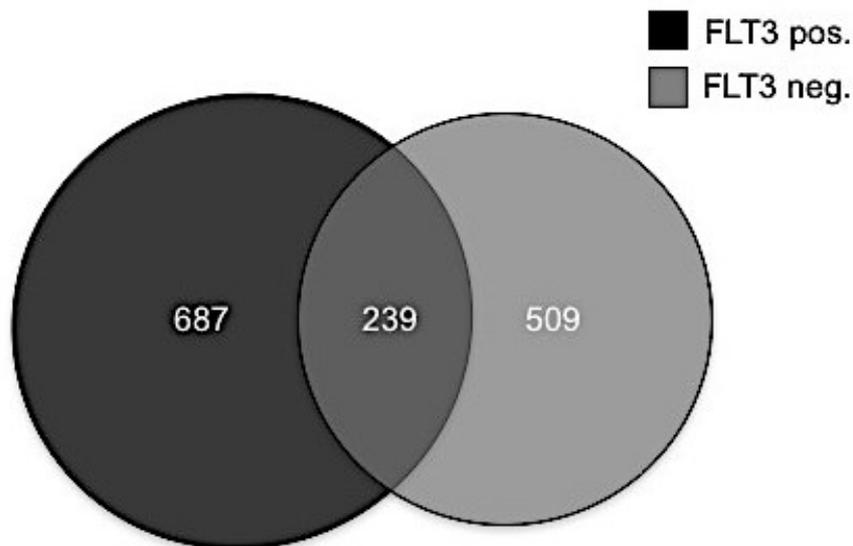


Abbildung 3.13: Vergleichende Analyse des Quellproteoms FLT3-WT (n=7) und FLT3-ITD (n=8) - Subgruppenquellproteome (modifiziert nach Berlin et al. 2015)
Quantitative Darstellung der Quellproteomschnittmenge, sowie der jeweiligen FLT3-WT- und FLT3-ITD-exklusiven Teilmengen

Anschließend erfolgte im Rahmen dieser Subgruppen-spezifischen Analyse ebenfalls ein Vergleich des AML-exklusiven Quellproteoms für die FLT3-ITD- und FLT3-WT-Patientengruppen (Abbildung 3.14). Besondere Aufmerksamkeit galt den Proteinen der gemeinsamen Schnittmenge.

Dabei fällt auf, dass 42 der 46 hochrangigen LiTAAs in beiden Teilgruppen repräsentiert wurden. Dies entspricht 91,3% der in dieser Analyse definierten LiTAAs.

Die Untersuchung zeigte drei FLT3-ITD-exklusive Quellproteine mit einer Repräsentationsfrequenz von mindestens 50% auf: S-phase kinase-associated protein 1 *SKP1* (5/8), Methyltransferase like 26 *METTL26/C16orf13* (5/8) und Erlin-1 *ERLIN1* (5/8).

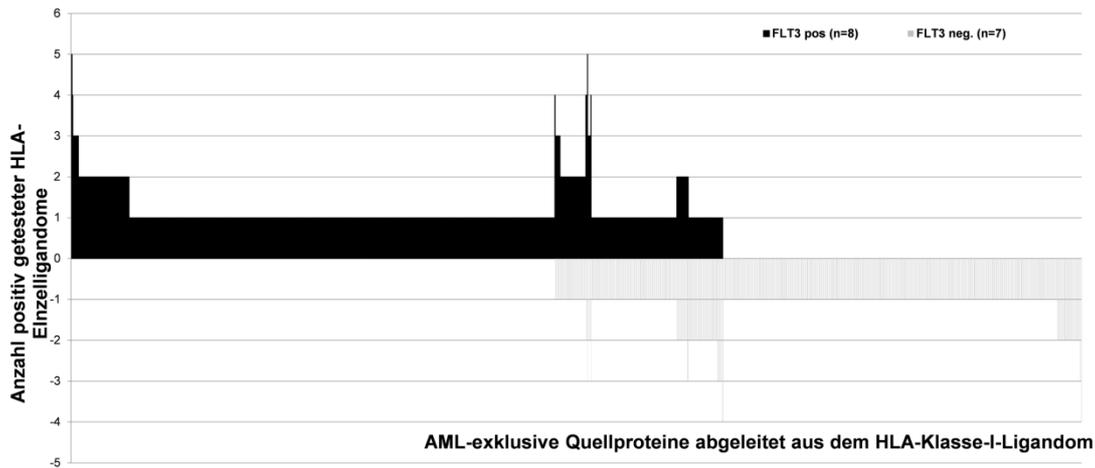


Abbildung 3.14: Vergleichende Analyse des HLA-Klasse-I-AML-exklusiven Quellproteoms für die FLT3-ITD-Mutationsträger und FLT3-wildtypischen Patienten auf der Basis der HLA-restringierten Repräsentationsfrequenz (modifiziert nach Berlin et al. 2015)

Entlang der X-Achse sind die einzelnen, detektierten Proteine entsprechend ihrer Präsentation in den jeweiligen Liganden aufgetragen. Im linken Abschnitt der Abszisse werden die FLT3-ITD-exklusiven Proteine, in der Mitte die „gemeinsamen“ Quellproteine beider Subgruppen und im rechten Anteil die FLT3-WT-exklusiven Proteine abgebildet. Zur besseren Übersicht wurden die jeweiligen Quellproteine innerhalb der drei genannten Gruppen noch einmal entsprechend ihrer individuellen Repräsentationsfrequenz sortiert. Die absolute Anzahl der AML-Patienten, die für ein auf der X-Achse-aufgetragenes Quellprotein positiv getestet wurden, ist auf der Ordinate aufgetragen.

In der Zusammenschau aller Ergebnisse zeigt diese Analyse eine beachtliche Gruppe hochrangiger LiTAAs auf, die in beiden Untergruppen repräsentiert sind. Darüber hinaus wurde jedoch auch eine kleine Teilgruppe Subgruppen-spezifischer Zielstrukturen identifiziert.

3.3 Funktionelle T-Zell-Analysen zur orientierenden Charakterisierung des immunogenen Potentials exemplarisch ausgewählter HLA-Klasse-I-LiTAPs

Für den Erfolg einer peptid-basierten Immuntherapie ist neben der Tumor-Assoziation bzw. -Spezifität, auch das immunogene Potential der ausgewählten Kandidaten von elementarer Bedeutung. Deshalb wurde abschließend im Rahmen von T-Zellexperimenten mit ersten orientierenden Untersuchungen zur Immunogenität der „neuen LAA-Generation“ begonnen. Die durchgeführten Versuche zielten auf den Nachweis einer LiTAP-spezifischen Gedächtniszellpopulation ab. Für diese Analysen wurden 80 LiTAPs aus den Top-gelisteten LiTAAs auf der Basis der folgenden Kriterien ausgewählt: 1) der Anzahl der *Peptide-Spectrum-Matches* (PSMs), 2) der Häufigkeit der HLA-Allotys in der Bevölkerung, 3) der Höhe der Bindungswahrscheinlichkeit (0,6x Syfpeithi-Maximalbindungsscore) und ggf. 4) Literaturstudium bzw. -recherche. Zusätzlich wurden einige AML-exklusive Liganden (Kenntnisstand 2013) etablierter LAA getestet. Tabelle 3.4 bietet einen Überblick über die finale Peptidauswahl.

Tabelle 3.4 Übersicht über die für die Analyse ausgewählten HLA-Klasse-I-LiTAPs und zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der funktionellen Charakterisierungsexperimente der Peptide in gesunden Spendern sowie den beiden Patientenkohorten K1 und K2

LiTAPs, die eine positive T-Zellantwort induzieren konnten, sind in der Graphik optisch hervorgehoben

HLA	Protein	Sequenz	Position im Protein	Positive/getestete gesunde Spender	Positive/getestete Patienten (Kohorte 1)	Positive/getestete Patienten (Kohorte 2)	Bemerkung
A*02	O14777, NDC80, Kinetochores protein NDC80 homolog	ALNEQIARL	274-282	0/8	--	0/14	--
	O14777, NDC80, Kinetochores protein NDC80 homolog	VYVPLKELL	457-465	0/8	--	0/14	--
	O14777, NDC80, Kinetochores protein NDC80 homolog	GLNEEIARV	330-338	0/8	--	0/14	--
	O75330, HMMR hyaluronan-mediated motility receptor (RHAMM)	KLLEYIEEI	232-240	0/8	--	0/14	--
	O75330, HMMR hyaluronan-mediated motility receptor (RHAMM)	IAQLEGKLV	207-217	0/8	--	0/14	--
	O75676, RPS6KA4, Ribosomal protein S6 kinase alpha-4, (KS6A4)	GAYGKVFVLV	42-50	0/8	0/1	0/14	--
	P05120, SERPINB2 serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 2; PAI2,	YLLESVNKL	121-129	0/8	0/3	0/14	--
	P05164, MPO myeloperoxidase, PERM	IVRFPTDQL	234-242	0/8	--	0/14	--
	P05164, MPO myeloperoxidase, PERM	TIRNQINAL	325-333	0/8	--	0/14	--
	P05164, MPO myeloperoxidase, PERM	GLmATPAKL	549-557	0/8	--	0/14	--
	P05164, MPO myeloperoxidase, PERM	RLFQVMRI	571-579	0/8	--	0/14	--
	P05164, MPO myeloperoxidase, PERM	FSMQQRQAL	686-694	0/8	--	0/14	--
	P07686, HEXB, Beta-hexosaminidase subunit beta,	ALVVQVAEA	34-42	0/8	--	0/14	--
	P07686, HEXB, Beta-hexosaminidase subunit beta,	LIDTSRHYL	206-214	0/8	0/1	0/14	--
				0/8		0/14	--
	P10253, LYAG, Lysosomal alpha-glucosidase, (GAA)	ALLPHLYTL	704-712		0/2		--
	P11308, ERG v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog	ILLSHLHYL	194-202	0/8	0/2	0/14	--
	P43360, MAGA6, melanoma antigen family A, 6;	VTKAEMLGSVV	130-140	0/8	--	0/14	--
	P51692, STAT5B, Signal transducer and activator of transcription 5B;	FIIKQPPQV	332-341	0/8	--	0/14	--
	Q13395, TARBP1 TAR (HIV-1) RNA binding protein 1	YLLQRAVEV	286-294	0/8	0/2	0/14	--
Q6UW56, All-trans retinoic acid-induced differentiation factor, ARAID, Apoptosis-related prot 3	CLNQKGTIL	65-73	0/8	--	0/14	--	
Q961J6, GMPPA GDP-mannose pyrophosphorylase A	ALYASRLYL	254-262	0/8	--	0/14	--	
Q96S19, CP0 13, UPF0585 protein C16orf13	YLDPAQRGV	21-29	0/8	0/4	0/14	--	
Q9BXX0, EMILIN2 elastin microfibril interfacier 2,	TLDQKIERV	411-419	0/8	0/3	0/14	--	

3. Ergebnisse

HLA	Protein	Sequenz	Position Protein	im	Positive/getestete gesunde Spender	Positive/getestete Patienten (Kohorte 1)	Positive /getestete Patienten (Kohorte 2)	Bemerkung
	EMIL 2,							
	Q9HBR0, SLC38A10, Putative sodium-coupled neutral amino acid transporter 10, S38AA	RLGEAEGLMKV	413-423		0/8	0/1	0/14	--
	Q9Y646, CBPQ, CPQ carboxypeptidase Q,	ALASLIRSV	119-207		0/8	0/5	0/14	--
	Q13574 DGKZ Diacylglycerol kinase zeta	LLDHAPPEI	1031-1039		0/8	0/3	0/14	---
A*03	O15432, SLC31A2 solute carrier family 31 (copper transporters), member 2; COPT2,	VLYEGIKVVGK	38-47		0/8	0/4	0/6	--
	P26639, TARS threonyl-tRNA synthetase	ALIEFIRSEY	388-397		0/8	0/2	0/6	--
	P33897, ABCD1, ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 1;	RLYFSQQTY	172-180		0/8	--	0/6	--
	P84101, SERF2 small EDRK-rich factor 2	KQSDSVKGGK	17-25		0/8	--	0/6	--
	P84101, SERF2 small EDRK-rich factor 2	KQRDSEIMQQK	37-47		0/8	--	0/6	--
	Q06481, APLP2 amyloid beta (A4) precursor-like protein 2	HGYENPTYK	748-756		0/8	0/2	2/6	Poolstimulation
	Q13574 DGKZ Diacylglycerol kinase zeta	ALRNQATMVQK	803-813		0/8	0/2	2/6	Poolstimulation
	Q5MNZ6, WIPI 3, WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 3/ WDR45L WDR45-like;	RVYNTDPLKEK	34 - 44		0/8	0/2	2/6	Poolstimulation
	Q86YD1, PTOV1 prostate tumor overexpressed 1	AVSEHRLSNK	82-91		0/8	--	0/6	--
	Q96JH7, VCIPI1, Deubiquitinating protein VCIPI135,	ASAAASGGLLK	28-38		0/8	0/2	2/6	Poolstimulation
	Q9BXS6, NUSAP1 nucleolar and spindle associated protein 1	SVASTPISQR	240-249		0/8	--	0/6	--
	Q9BY42, RTFDC1 replication termination factor 2 domain containing 1, CTO 43,	KSAEKALGK	69-77		0/8	0/1	0/6	--
	Q9H8H3, METTL7A methyltransferase like 7A	VIYNEQMASK	45-54		0/8	0/3	2/6	Poolstimulation
	Q9UNN5, FAF1, FAS-associated factor 1	FTAEFSSRY	337-345		0/8	0/5	2/6	Poolstimulation
	Q9Y5W3, KLF2 Kruppel-like factor 2	KTYTKSSHLLK	281-290		0/8	0/3	2/6	Poolstimulation
Q9Y6C9, MTCH2 mitochondrial carrier 2	GVLGTVVHGK	81-90		0/8	0/4	2/6	Poolstimulation	
A*66	O75330, HMMR hyaluronan-mediated motility receptor (RHAMM)	DDTLPASAR	59-67		--	--	0/2	--
	P05164, MPO myeloperoxidase, PERM	ETVQQLGTVLR	612-622		--	--	0/2	--
	P05164, MPO myeloperoxidase, PERM	GVPFFSLR	2-10		--	--	0/2	--
	P05164, MPO myeloperoxidase, PERM	DFTPEPAAR	264-272		--	--	0/2	--
	P11309, PIM1, Serine/threonine-protein kinase pim-1, pim-1 oncogene;	YTDFDGTRVY	289-298		--	--	0/2	--
	Q07820, MCL1 myeloid cell leukemia sequence 1	ESITDVLVR	292-300		--	--	0/2	--
	Q07820, MCL1 myeloid cell leukemia sequence 1	ETAFQGMLR	225-233		--	--	0/2	--
	Q9BXS6, NUSAP1 nucleolar and spindle associated protein 1	ESIDQYIER	195-205		--	--	0/2	--

3. Ergebnisse

HLA	Protein	Sequenz	Position Protein	im	Positive/getestete gesunde Spender	Positive/getestete Patienten (Kohorte 1)	Positive /getestete Patienten (Kohorte 2)	Bemerkung
	Q9BXX0, EMILIN2, elastin microfibril interfacier 2, EMIL_2	DSISGNLQR	717-725	--	0/1	0/2	--	
	Q9UNF1, MAGD2, Melanoma-associated antigen D2	DVYPEIIER	315-323	--	--	0/2	--	
B*07	O00418, EEF2K eukaryotic elongation factor-2 kinase	YPSEKRGEL	509 -517	0/8	0/1	0/4	--	
	P05164, MPO myeloperoxidase, PERM	QPmEPNPRVPL	517-527	0/8	--	0/4	--	
	P05164, MPO myeloperoxidase, PERM	NPRWDGERL	434-442	0/8	--	0/4	--	
	P06748, NPM1, nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin)	SPIKVTLATL	70-79	0/8	--	0/4	--	
	P11309, PIM1, Serine/threonine-protein kinase pim-1, pim-1 oncogene;	LPNGTRVPM	171-179	0/8	--	0/4	--	
	P57727, TMPRSS3 transmembrane protease, serine 3	LPDDKVITAL	176-184	0/8	0/1	0/4	--	
B*35	Q6UW56, ARAID, All-trans retinoic acid-induced differentiation factor, Apoptosis-related prot 3	NPLKGDLANTF	103-113	0/2	--	0/7	--	
B* 40	O43681, ASNA1, arsA arsenite transporter, ATP-binding, homolog 1	YEDFHIVKL	310-318	0/2	0/2	0/3	--	
	O75330, HMMR hyaluronan-mediated motility receptor (RHAMM)	LEKQLIEL	136-143	--	--	0/3	--	
	O75330, HMMR hyaluronan-mediated motility receptor (RHAMM)	AEDVQHQIL	491-499	--	--	0/3	--	
	O75676, (RPS6KA4, Ribosomal protein S6 kinase alpha-4, (KS6A4)	YELDLREPAL	408-417	--	0/1	0/3	--	
	P05164, MPO myeloperoxidase, PERM	SEEPLARNL	345 - 353	--	--	0/3	--	
	P05164, MPO myeloperoxidase, PERM	FEQVMRIGL	573-581	--	--	0/3	--	
	P08648, ITGA5 integrin, alpha 5 (fibronectin receptor, alpha polypeptide)	IEDKAQILL	635-643	--	0/1	0/3	--	
	P36888, FLT3, fms-related tyrosine kinase 3	SELKMMTQL	660-668	--	--	0/3	--	
Q9BXS6, NUSAP1 nucleolar and spindle associated protein 1	FEEHNSMNEL	210-219	--	--	0/3	--		
B*44	P49902, NT5C2, Cytosolic purine 5'-nucleotidase,5'-nucleotidase, cytosolic II;	SEIKPPNLF	863 - 871	0/2	--	0/2	--	
	Q96Q89; KIF20B, Kinesin-like protein KIF20B/Cancer/testis antigen 90	AEIEDIRVL	871-880	0/2	0/1	0/2	--	
B*49	P05120, SERPINB2 serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 2; PAI2,	IEDLKAQIL	246-254	0/1	0/1	0/2	--	
	P11309; PIM1, Serine /threonine-protein kinase pim-1, pim-1 oncogene	GELPNGTRV	169-177	0/1	--	0/2	--	
	P51692, STAT5B, Signal transducer and activator of transcription 5B;	GEDGFLLK	77-84	0/1	--	0/2	--	
	P51692, STAT5B, Signal transducer and activator of transcription 5B;	SEQQAKSLL	375-383	0/1	--	0/2	--	
	P51692, STAT5B, Signal transducer and activator of	AEVQSNRGL	517-525	0/1	--	0/2	--	

3. Ergebnisse

HLA	Protein	Sequenz	Position im Protein	Positive/getestete gesunde Spender	Positive/getestete Patienten (Kohorte 1)	Positive /getestete Patienten (Kohorte 2)	Bemerkung
	transcription 5B; Q96Q89; KIF20B, Kinesin-like protein KIF20B/Cancer/testis antigen 90	READFKETL	616-624	0/1	0/1	0/2	--
	Q9Y6M1, IF2B2, Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 2	HETGTKITI	302-310	0/1	--	0/2	--
	P04637, p53, Cellular tumor antigen p53	RPILTITL	117-125	0/8	--	0/4	--
B*51	P06748, NPM1, nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin)	TPPVVLR	95-102	0/8	--	0/4	--
	Q86V86, Pim3, Serine/threonine-protein kinase pim-3	RPDGFLLVL	115-123	0/8	--	0/4	--

Diese ausgewählten Peptide wurden wie unter 2.3.4 beschrieben für die weiteren Analysen synthetisiert.

Aufgrund des immunsuppressiven Tumormikromilieus wurde nur eine geringe Frequenz Antigen-spezifischer T-Gedächtniszellen in den Patientenproben vermutet. Um die Intensität einer potentiellen T-Zell-Antwort zu steigern, wurden die zu analysierenden Zellen deshalb vor der eigentlichen funktionellen Charakterisierung stets 12 Tage mit den jeweiligen Testpeptiden *in vitro* prästimuliert.

Zur Erkennung sowie semiquantitativen und funktionalen Analyse der T-Zellen wurde ein zweistufiges Verfahren angewandt: 1) INF- γ -ELISPOT Assays und 2) Intrazelluläre Zytokinfärbung (ICS). Eine intrazelluläre Zytokinfärbung erfolgte nur zur Bestätigung eines positiven Ergebnisses im Immunospot und ermöglichte zudem eine genauere Charakterisierung der Zytokin-produzierenden Zellen. Um eine möglichst hohe Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erzielen, wurden die im Immunospot positiv getesteten Zellen sofern möglich, direkt nach einer Kreuzstimulationsphase von zwei Tagen für die ICS verwendet. Sofern ausreichend Material zur Verfügung stand, sollten fragliche und positive Testergebnisse durch einen erneut durchgeführten Test validiert werden. Bevorzugt sollte in diesen Fällen Material des gleichen Entnahmezeitpunktes zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse verwendet werden.

Für die Auswertung der Experimente wurden die in Kapitel 2.3.5.3 definierten Kriterien zu Grunde gelegt.

Im Rahmen der durchgeführten T-Zell-Experimente wurden in dieser Arbeit die ausgewählten Peptide HLA-kompatibel in 37 AML-Patienten sowie 35 gesunden Spendern auf Immunogenität untersucht.

Die Gruppe der Patienten lässt sich in zwei verschiedene Kohorten (K1, K2) unterteilen. Dabei umfasst K1 neun der 15 Patienten, deren Ligandom massenspektrometrisch kartiert werden konnte. Von drei Patienten dieser Kohorte konnte sowohl prä- als auch posttherapeutisch (1x Z. n. Chemotherapie, 2x Z.n. Knochenmarkstransplantation) gewonnenes Material untersucht werden. Für die restlichen sechs Patienten, deren Ligandom ebenfalls qualitativ analysiert worden war, stand kein Material für T-Zell-Experimente zur Verfügung.

K2 beinhaltet 29 gesondert rekrutierte, allogene Stammzell-transplantierte AML-Patienten. Von drei dieser Patienten konnten Zellproben von mehr als einem

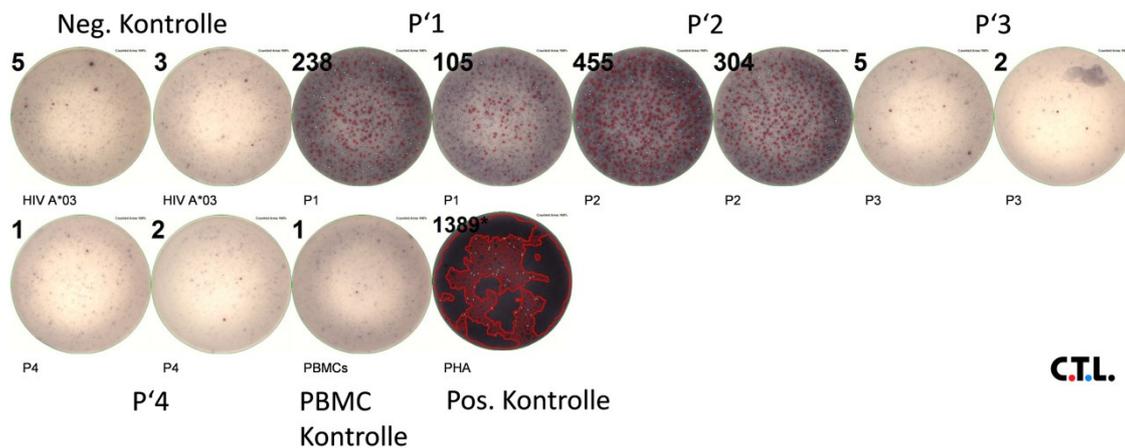
Entnahmezeitpunkt analysiert werden. Einen Überblick über die Patienten, die in diese Studie eingeschlossen wurden, bieten die Tabellen 2.9 und 2.10.

Die funktionelle Charakterisierung der ausgewählten Peptide erfolgte für die Kohorte 1 Patienten-spezifisch, entsprechend der jeweiligen individuellen Ergebnisse der Ligandomkartierung. Die Patienten der Kohorte K2 wurden hingegen Allotyp-spezifisch mit allen jeweils individuell geeigneten LiTAPs stimuliert und funktionell analysiert. Eine zusammenfassende Darstellung der Charakterisierungsergebnisse beider Kohorten findet sich in Tabelle 3.4.

Von den meisten Patienten standen für diese Experimente leider nur sehr wenige Zellen zur Verfügung. Dies galt insbesondere für die Patienten der Kohorte 2. Deshalb wurde die Immunogenität der LiTAPs zunächst in Form von Peptidpools in den Patientenproben untersucht. Falls eine positive T-Zellantwort detektiert werden konnte, schlossen sich bei ausreichend verfügbarem Zellmaterial weitere, genauer differenzierende Analysen an. Zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse würden für die Einzelpeptidanalysen bevorzugt jeweils Zellen desselben Entnahmezeitpunktes verwendet werden.

Um unspezifische, Tumor-unabhängig ausgelöste T-Zell-Antworten nach Kontakt mit einem der ausgewählten LiTAPs auszuschließen, wurden alle Peptide auch hinsichtlich ihrer Wirkung auf T-Zellen HLA-kompatibler, gesunder Spender untersucht. Ein besonderes Maß an Aufmerksamkeit galt den Sequenzen, die eine Interferon- γ -Sekretion im Immunospot induzieren konnten. In der Regel wurden für diese Experimente acht verschiedene, gesunde PBMC-Spender analysiert. Diese Testanzahl konnte für Peptide der HLA-Allotypen A*66, B*35, B*49 und B*51 aufgrund mangelnder Spenderzahl leider nicht realisiert werden.

Für die Kohorte der Patienten mit Zustand nach allogener Stammzelltransplantation zeigte die Stimulation mit zwei HLA-A*03 Peptid-Mixen (P'1, P'2) eine eindeutig signifikante, reproduzierbare INF- γ -Sekretion in 2 von 6 getesteten Patienten. Die detektierten T- Zellantworten im INF- γ -Elispot sind unter Abbildung 3.15 exemplarisch anhand von AML 29 dargestellt. In den übrigen für K1 und K2 durchgeführten Stimulationsexperimenten konnte leider keine weitere, signifikante T-Zell-Antwort detektiert werden.



	Peptid	Gensymbol		Peptid	Gensymbol
P1	HGYENPTYK	APLP2	P3	SVASTPISQR	NUSAP
	ALRNQATMVQK	DGKZ		KQSDSVKVK	SERF2
	FTAEFSSRY	FAF1		RLYFSQQTY	ABCD1
	GVLGTVVHGK	MTCH2		VLYEGIKVVK	COPT
P2	KTYTKSSHLK	KLF2	P4	KSAEKALGK	CTO43
	VYNEQMASK	METTL7A		VLYEGIKVVK	SERF2
	ASAAASGGLLK	VCPIP1		AVSEHRLSNK	PTOV1
	RVYNTDPLKEK	WDR45L			

Abbildung 3.15: Exemplarische Darstellung der T-Zellreaktion im INF- γ -ELISPOT Assay der Patienten-PBMCs nach 12-Tage-Stimulation mit 4 verschiedenen, HLA-A*03-restringierten AML-LiTAP-Pools P'1-P'4 anhand von AML 29 (modifiziert nach Berlin et al. 2015)

Als Positivkontrolle wurde PHA verwendet. Die Stimulation mit HIV GAG 18-26 A*03 Peptiden diente als Negativkontrolle. Es wurden 250 000 Zellen/Well verwendet.

Die T-Zellstimulationsexperimente mit P'1 und P'2 gesunder Spenderzellen zeigte keine relevante INF- γ -Sekretion. Nachfolgend ist in Abbildung 3.16 ein solcher INF- γ -ELISPOT Assay exemplarisch für die HLA-A*03-Peptid-Mix P'1 und P'2 aus Abb. 3.15 abgebildet.

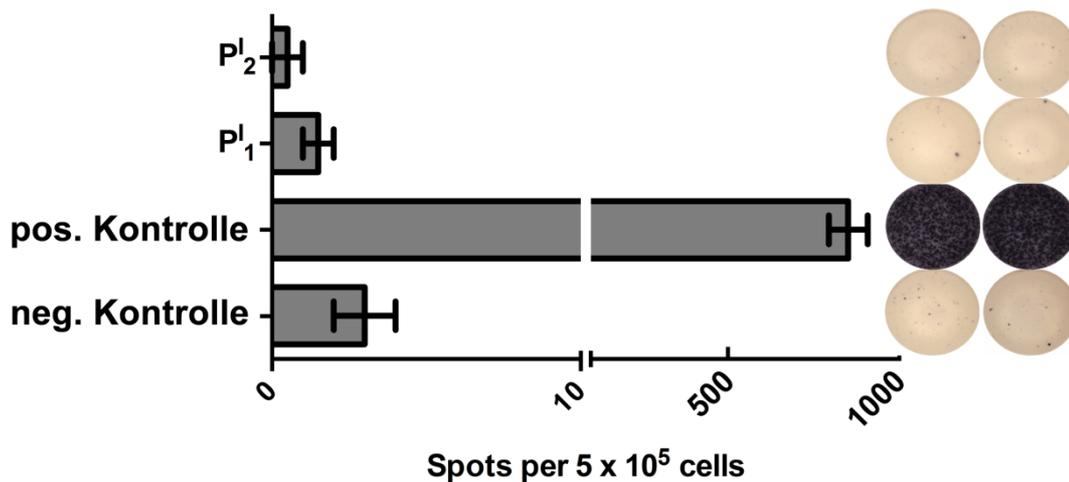


Abbildung 3.16: Exemplarische Darstellung der funktionellen Charakterisierung präsensitiver Kontrollspender-PBMCs nach Stimulation mit zwei HLA-A*03-restringierten AML-LiTAP-Pools P'1 und P'2 im INF- γ -ELISPOT Assay (modifiziert nach Berlin et al. 2015)

Eine Übersicht über P'1 & P'2 findet sich in Graphik 3.15. Als Positivkontrolle wurde PHA verwendet. Die Stimulation mit HIV GAG 18-26 A*03 Peptiden diente als Negativkontrolle. Es wurden 500 000 Zellen/Well verwendet. Daneben findet sich eine exemplarische Darstellung der INF γ - Sekretion für P'1 & P'2, dargestellt in Spots pro Zellen.

Entsprechend der in Kapitel 2.3.5.3 definierten Kriterien kann die detektierte Zytokinproduktion als Beleg für eine starke T-Zell-Antwort interpretiert werden. Dies mag als Hinweis für einen potentiell multifunktionellen Charakter der analysierten T-Zellen gewertet werden. Für diese Intensitätsstufe der detektierten Immunantwort könnten unter Umständen jedoch auch synergistische Effekte im Rahmen der durchgeführten Poolstimulation verantwortlich sein. Für eine weitere Differenzierung stand kein Material zur Verfügung.

Zur Bestätigung und weiteren funktionellen Charakterisierung der detektierten T-Zell-Antworten erfolgte nach einer Kreuzstimulation direkt die Durchführung einer ICS.

Aufgrund zu geringer Zellzahlen ließ sich das Experiment für AML 35 letztlich nicht auswerten.

Die Messung der Zytokinproduktion mittels Durchflusszytometrie bestätigte jedoch die Ergebnisse des Immunospots für AML 29. In der FACS-Analyse konnte sowohl für INF- γ (P'1: 1,6 %, P'2: 1,7 % der CD8⁺-T-Zellen) als auch für TNF- α (P'1: 2,6 %, P'2: 2,4 % der CD8⁺-T-Zellen) eine Sekretion gezeigt werden (Abb.3.17).

Da keine Gegenüberstellung der jeweiligen Zytokinproduktion in einem Dotplot-Diagramm erfolgte, kann an diesem Punkt leider keine Aussage über eine potentielle Multifunktionalität der analysierten T-Zellen getroffen werden. Multifunktionalität,

definiert als Fähigkeit der simultanen Produktion verschiedener Zytokine, könnte mit einer potenteren Immunantwort einhergehen.

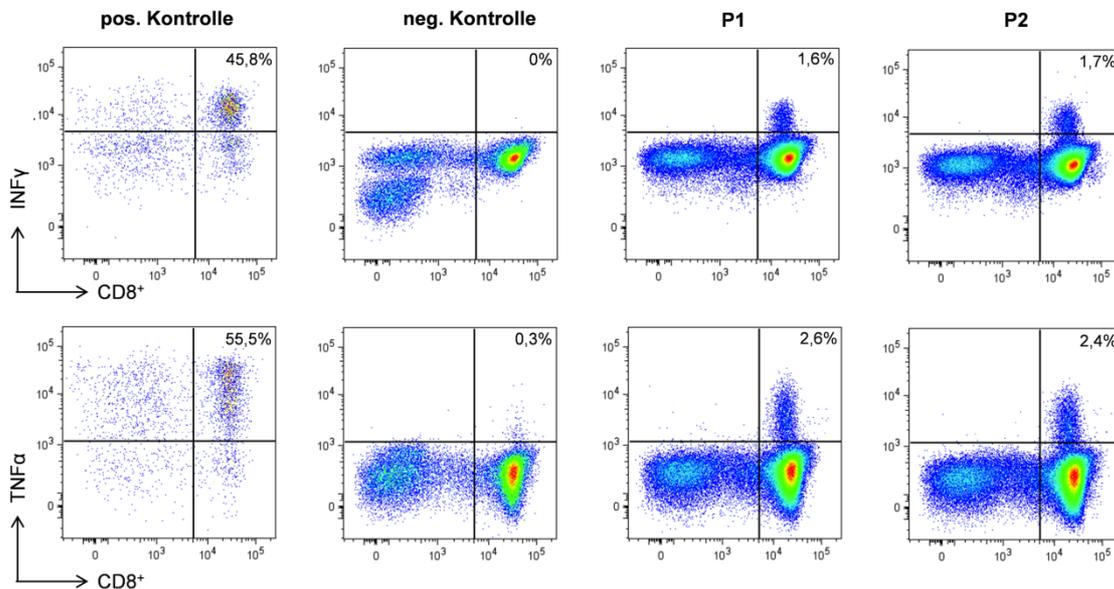


Abbildung 3.17: Darstellung durchflusszytometrisch-erhobener Messergebnisse für AML 29 im Anschluss an die intrazelluläre Zytokinfärbung nach Kreuzstimulation der PBMCs mit Peptidpools P'1 und P'2) (modifiziert nach Berlin et al. 2015)

Als Positivkontrolle wurde PMA/Ionomycin, als Negativkontrolle das HIV-A*03 Peptid (HIV GAG₁₈₋₂₆) verwendet. Zur Auswertung der Durchflusszytometrie-basierten Analyse wurde im Allgemeinen folgende Gating-Strategie für T-Zellen angewendet (hier nicht abgebildet): Zunächst wurden die Einzelzellen isoliert und darunter der Anteil der lebenden Zellen bestimmt. Stufenweise wurden durch weitere Eingrenzungen die Lymphozytenpopulation und schließlich die CD4 & CD8 negativen/positiven Subsets bestimmt und selektiert.

Da die Patientin an Folgen ihrer Therapie verstarb und leider nicht ausreichend Material für weitere Untersuchungen zur Verfügung stand, konnte keine Differenzierung und weitere funktionelle Charakterisierung der detektierten T-Zell-Antwort durchgeführt werden.

Das Ausbleiben einer weiteren Untersuchung sowie potentieller Differenzierung der beobachteten Immunantwort im INF- γ -Elispot für AML 35 war ebenfalls dem Mangel an verfügbarem Probenmaterial geschuldet.

Für die Sequenzen dieser acht Einzelpeptide aus den Peptidpools P'1 und P'2 wurden allerdings mit Hilfe des Protein-Blast-Tools des *National Technology Centre of Information*, (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>, abgerufen am 21.April.2017) ein Sequenzvergleich mit bekannten Pathogenen vorgenommen.

Im Rahmen dieser Datenanalysen ergaben sich jedoch keine Hinweise auf mögliche Übereinstimmungen mit bekannten Strukturen.

Diese Ergebnisse können als ein Hinweis für den immunogenen Charakter der AML-spezifischen-Antigen-Gruppe bzw. deren LiTAPs bewertet werden.

3.4 Qualitative HLA-Analyse des HLA-Klasse-II-Ligandoms

Um die therapeutische Wirksamkeit einer Vakzine zu erhöhen, scheint es ratsam die PeptidAuswahl für einen optimalen Impfstoff um HLA-Klasse-II-Epitope zu ergänzen. Aus diesem Grund wurde auch das HLA-Klasse-II-Ligandom nach dem bereits beschriebenen Ansatz analysiert und kartiert.

Um potentiell AML-exklusive bzw. assoziierte LiTAAs identifizieren zu können, wurden die Quellproteome sowie die zugehörigen HLA-Klasse-II-Ligandome von 12 AML-Patienten und 15 gesunden Spendern (13 PBMC- und 2 BMNC-Proben) verglichen. Diese Analysen ergaben 396 Proteine, repräsentiert durch 1 079 verschiedene HLA-Liganden, die ausschließlich auf das AML-Ligandom entfielen. Das entspricht 44,7 % der detektierten Quellproteine aus der gesamten, analysierten AML-Kohorte. Im Vergleich zeigte das Quellproteom gesunder PBMC-Spender und AML-Patienten 472 „gemeinsame“ Proteine auf. Die Überschneidung des AML-Quellproteoms mit seinem Normalgewebespendant betrug so 53,3 %. Die gemeinsame Schnittmenge der Patienten und Knochenmarkspender umfasste 134 Proteine (=15,1 %) des AML-Quellproteoms.

Die Gegenüberstellung der Quellproteome beider Kontrolluntergruppen ergab für die BMNC-Kohorte (Walz, Stickel et al. 2015) eine hohe Überstimmung von über 85 % (= 127 gemeinsame Proteine). Diese Ergebnisse sind noch einmal in den Abbildungen 3.18 und 3.19 zusammengefasst dargestellt.

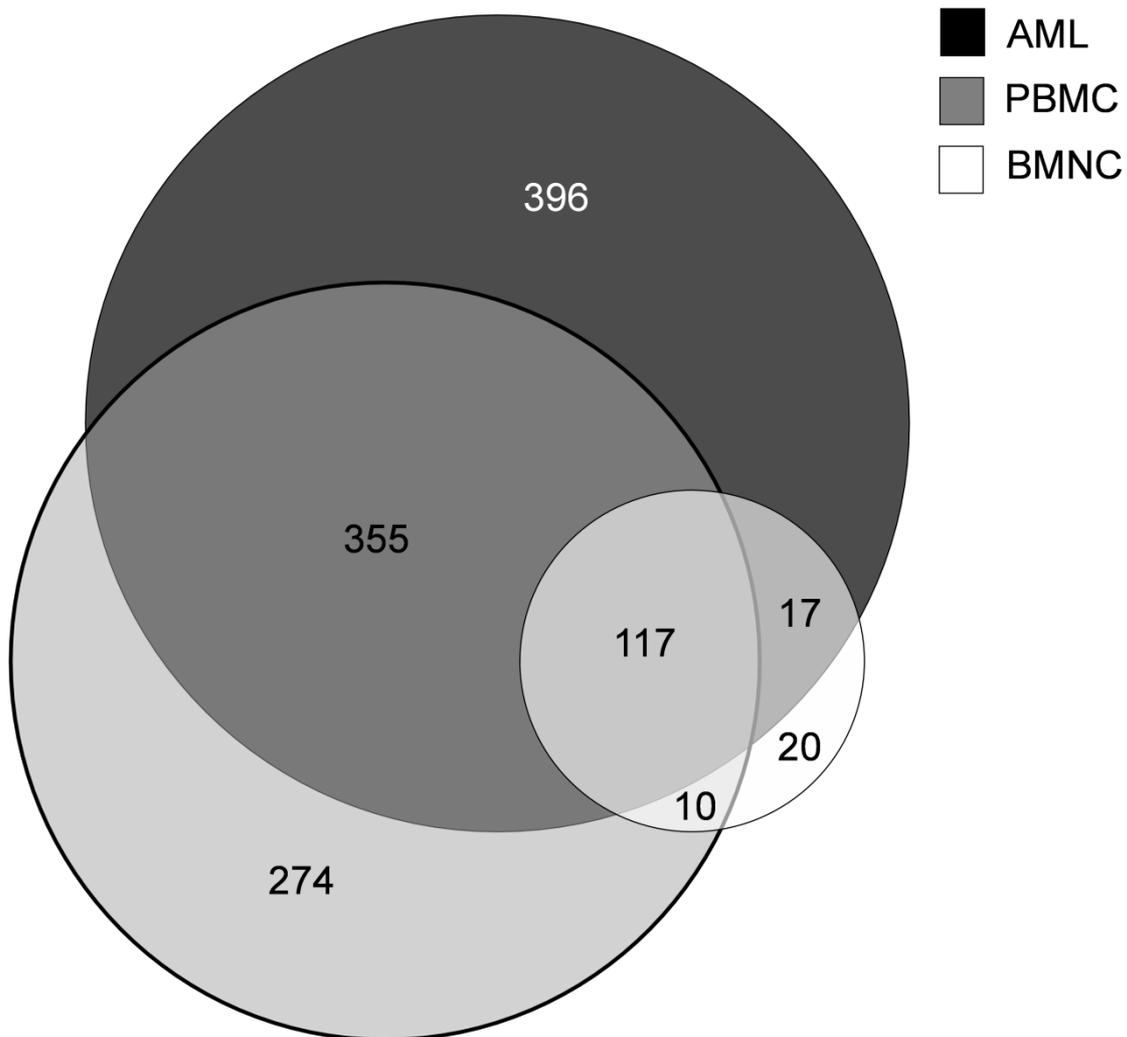


Abbildung 3.18: Vergleichende Analyse des Quellproteoms von 12 AML-Patienten, 13 gesunden PBMC- und sowie 2 gesunden BMNC-Spendern (modifiziert nach Berlin et al. 2015)
 Quantitative Darstellung der jeweiligen anteiligen Quellproteomschnittmenge, sowie der AML-, PBMC- und BMNC-exklusiven Teilmengen
 Die verwendeten BMNC-Daten wurden freundlicherweise von Simon Walz zur Verfügung gestellt (Walz, Stickel et al. 2015)

Im Rahmen dieser vergleichenden Analyse konnten 36 AML-exklusive LiTAAs, repräsentiert durch 152 HLA-Liganden, mit einer Repräsentationsfrequenz von mindestens 20 % ermittelt werden. Dieses LiTAA-Kollektiv entspricht 4,1 % des gesamten AML-bzw. 9,1 % des AML-exklusiven Quellproteoms.

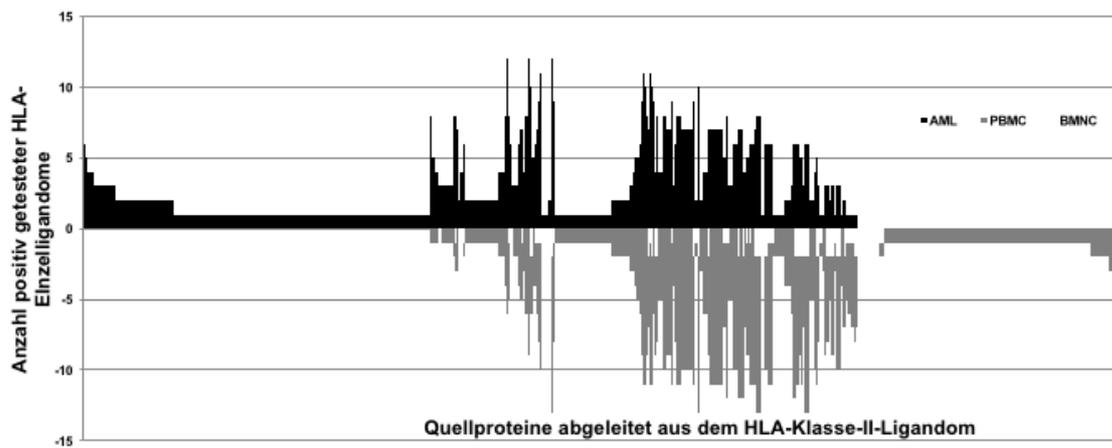


Abbildung 3.19: Vergleichende Analyse des HLA-Klasse-II-Ligandoms bzw. des respektiven Quellproteoms der Patienten (n=12) - und Spenderkohorte (PBMC n=13, BMNC n=2)) auf der Basis der HLA-restringierten Repräsentationsfrequenz (modifiziert nach Berlin et al. 2015)

Die absolute Anzahl an Einzelantigenen (Patienten bzw. Spender), die für ein auf der X-Achse-aufgetragenes Quellprotein positiv getestet wurden, ist auf der Ordinate aufgetragen. Die gestrichelte Linie der Abbildung dient als optische Marke für eine 100 %-ige Präsentation eines HLA-restringierten entsprechenden Quellproteins in der jeweiligen Kohorte. Die verwendeten BMNC-Daten wurden freundlicherweise von Simon Walz zur Verfügung gestellt (Walz, Stickel et al. 2015).

Eine Übersicht über die entsprechenden 36 Quellproteine und ihre korrespondierenden HLA-Liganden bietet Tabelle 3.5.

Tabelle 3.5: Übersicht über die best-platzierten 36 HLA- Klasse-II-LiTAAAs (inkl. Korrespondierender LiTAPs), die in mindestens 20 % aller analysierten AML-Patienten (n=12) detektiert wurden (modifiziert nach Berlin et al. 2015)
PSM = peptide spectrum matches.

Protein/Peptides	Anzahl pos. getesteter AMLs [Anzahl in %]	PSM
A1BG alpha-1-B glycoprotein	6 [50%]	11
APVELLSDETLPAPE	3	3
ETPDFQLFKNGVAQEPV	1	2
LAPLEGARFALVRED	2	2
SPDRIFHLNAVALGD	1	1
SPDRIFHLNAVALGDG	2	3
CORO1A coronin, actin binding protein, 1A	5 [41.7%]	11
EEMRKLQATVQELQKR	1	1
EEPLSLQELDTSSG	4	5
EMRKLQATVQELQKR	1	1
HLEEPLSLQELDTSSG	1	1
LEEPLSLQELDTSSG	2	3
RPS5 ribosomal protein S5	5 [41.7%]	14
AGTVRRQAVDVSPLR	5	6
IGRAGTVRRQAVDVSPLR	1	1
RAGTVRRQAVDVSPLR	4	5
TVRRQAVDVSPLR	1	2
C19orf10 chromosome 19 open reading frame 10	5 [41.7%]	18
GVVHSFSHNVGPGDK	2	3
GVVHSFSHNVGPGDKY	1	2
GVVHSFSHNVGPGDKYT	1	2
KTEEFVTKTAVAHRP	1	2
KTEEFVTKTAVAHRPG	3	5
VRPGGVVHSFSHNVGPGDK	1	2
VRPGGVVHSFSHNVGPGDKYT	1	2
PLIN3 perilipin 3	4 [33.3%]	8
AEKGVRTLTA AAVSGAQ	1	1
AQPILSKLEPQIASASE	1	1
EKGVRTLTA AAVSGAQ	3	3
EKGVRTLTA AAVSGAQP	1	1
GVRTLTA AAVSGAQ	1	1
KGVRTLTA AAVSGAQ	1	1
CLSTN1 calyntenin 1	4 [33.3%]	8
DVNEYAPVFKEKESYK	1	2
HRSFVDSLGHNLA	1	1
HRSFVDSLGHNLANPH	1	1
HRSFVDSLGHNLANPHP	3	4
HSP90B1 heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member 1	4 [33.3%]	19
ALPEFDGKRFQNVAKEG	1	1
DSNEFSVIADPRG	1	2
DSNEFSVIADPRGN	1	2
DSNEFSVIADPRGNT	1	2
DSNEFSVIADPRGNTL	1	2
DSNEFSVIADPRGNTLG	1	2
PEFDGKRFQNVAK	1	1
SDSNEFSVIADPRGNTLG	1	2
SQKKTFEINPRHPLIR	1	1
ALPEFDGKRFQNVAKEG	1	1
PEFDGKRFQNVAK	2	2
PEFDGKRFQNVAKE	1	1
B4GALT1 UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4- galactosyltransferase, polypeptide 1	4 [33.3%]	11
LNSLTYQVLDVQRYYP	1	1
LPQLVGVSTPLQG	2	3
LPQLVGVSTPLQGG	1	1
LPQLVGVSTPLQGGG	3	4
RLPQLVGVSTPLQGGG	1	1
SDVDLIPMNDHNAYR	1	1
SPN sialophorin	4 [33.3%]	10
GRRKSRQGS LAMEELK	1	2
RKSRQGS LAMEELK	3	6
SGPSLKGEE EPLVASEDGAVD	1	1
SGSGPSLKGEE EPLVASEDGAVD	1	1
METAP1 methionyl aminopeptidase 1	4 [33.3%]	9
IKPGVTTEEIDHAVH	4	5
KPGVTTEEIDHAVH	3	4
HSPG2 heparan sulfate proteoglycan 2	4 [33.3%]	11
DGVLRIQNLDQS	4	5
GAYFHDDGFLAFPG	1	2
TPYSFLPLPTIKDAYR	1	2
YPTPDISWSKLDGSLPP	1	1
YPTPDISWSKLDGSLPPD	1	1
QSOX1 quiescin Q6 sulfhydryl oxidase 1	3 [25.0%]	6

Protein/Peptides	Anzahl pos. getesteter AMLs [Anzahl in %]	PSM
ASHFEQMAAASMR	3	6
MANBA mannosidase, beta A, lysosomal	3 [25.0%]	8
GGQVIVAIPKLQTQQ	1	2
GQVIVAIPKLQTQ	1	2
GQVIVAIPKLQTQQ	1	2
IESTFDVSSKPVG	2	2
CREG1 cellular repressor of E1A-stimulated genes 1	3 [25.0%]	7
DWGALATISTLEAVRG	1	1
GRPFADVLSLSDGPPG	1	1
WGALATISTLEAVR	2	2
WGALATISTLEAVRG	2	2
LDHA lactate dehydrogenase A	3 [25.0%]	6
ADELALVDVIEDK	1	2
GVSLKTLHPDLGTDK	2	3
IVSGKDYNVNTANSKL	1	1
CP ceruloplasmin (ferroxidase)	3 [25.0%]	6
DDNIKTYS DHPEK	1	1
DKVYVHLKNLASRPY	1	1
GDKVYVHLKNLASRPY	1	1
LDDNIKTYS DHPEK	1	1
TGDKVYVHLKNLASRPY	1	1
VYVHLKNLASRPY	1	1
COL1A1 collagen, type I, alpha 1	3 [25.0%]	13
KTSRLPIIDVAPLDVGAPD	1	1
KTSRLPIIDVAPLDVGAPDQE	1	1
LPIIDVAPLDVGAPD	1	1
RLPIIDVAPLDVGAPD	3	4
RLPIIDVAPLDVGAPDQE	2	2
SRLPIIDVAPLDVGAPD	1	1
SRLPIIDVAPLDVGAPDQE	1	1
TSRLPIIDVAPLDVGAPD	1	1
TSRLPIIDVAPLDVGAPDQE	1	1
CRP C-reactive protein, pentraxin-related	3 [25.0%]	15
DTSYVSLKAPLT	2	2
DTSYVSLKAPLTKP	1	1
DTSYVSLKAPLTKPL	1	1
ESDTSYVSLKAPLT	2	2
ESDTSYVSLKAPLTKPL	1	1
SDTSYVSLKAPLT	3	4
SDTSYVSLKAPLTKP	2	2
SDTSYVSLKAPLTKPL	2	2
APRT adenine phosphoribosyltransferase	3 [25.0%]	4
DPASFRAAIGLLARH	3	4
MBL2 mannose-binding lectin 2	3 [25.0%]	3
TEGQFVDLTGNRLTYT	3	3
IFI30 interferon, gamma-inducible protein 30	3 [25.0%]	9
ALDFFGNGPPVNYK	1	1
ALDFFGNGPPVNYKTG	1	1
DFFGNGPPVNYKTG	2	3
LDFFGNGPPVNYK	1	2
LDFFGNGPPVNYKTG	1	1
QALDFFGNGPPVNYKTG	1	1
LBP lipopolysaccharide binding protein	3 [25.0%]	10
AISDYVFNTASLVYH	1	1
AISDYVFNTASLVYHEE	2	3
ISDYVFNTASLVYH	1	1
ISDYVFNTASLVYHEE	3	4
YVFNTASLVYHEE	1	1
RAB5A RAB5A, member RAS oncogene family	3 [25.0%]	6
IVIALSGNKADLA	1	1
SPNIVIALSGNKADL	1	1
SPNIVIALSGNKADLA	3	4
ICAM3 intercellular adhesion molecule 3	3 [25.0%]	8
TPPRLVAPRFLEVE	1	1
TPPRLVAPRFLEVET	1	2
TPPRLVAPRFLEVETS	3	5
MAN1A1 mannosidase, alpha, class 1A, member 1	3 [25.0%]	17
EIQRDILLEKKKVAQDQ	1	2
FGAIFFLPDSSK	1	2
IQRDILLEKKKVAQ	1	2
IQRDILLEKKKVAQD	1	2
IQRDILLEKKKVAQDQ	1	2
LSGVLFHSSPALQPA	1	2
RDILLEKKKVAQDQ	1	2
SKLLSGVLFHSSPA	1	2
SSPALQPAADHKPGPG	1	1

Protein/Peptides	Anzahl pos. getesteter AMLs [Anzahl in %]	PSM
RBMX RNA binding motif protein, X-linked	3 [25.0%]	5
APPTRGPPPSYGGS	1	1
GNSRSAPPTRGPPPSYGSSRY	1	2
RDYGHSSRDDYPS	1	1
SPRDDGYSTKDSY	1	1
PBX2 pre-B-cell leukemia homeobox 2	3 [25.0%]	4
GGSAAAAAAAAAASGG	1	1
DNMLLAEGVSGPEK	2	3
YARS tyrosyl-tRNA synthetase	3 [25.0%]	5
ADSLYVEKIDVGEAEPR	3	5
TPM4 tropomyosin 4	3 [25.0%]	2
RIQLVEELDRAQER	2	1
RRIQLVEELDRAQER	1	1
RPL36A ribosomal protein L36a	3 [25.0%]	2
HQPHKVTQYKKGKDSLY	2	1
RKKAKTTKKIVL	1	1
GANAB glucosidase, alpha; neutral AB	3 [25.0%]	4
DVFRQYASLTGTQALPP	1	1
GTAQGELFLDDGHT	1	2
VFRQYASLTGTQALPP	1	1
HSP90B2P heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member 2, pseudogene	3 [25.0%]	3
PEFDGKRQNVAK	1	1
PEFDGKRQNVAKE	2	1
ALPEFDGKRQNVAKEG	1	1
LAIR1 leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor 1	3 [25.0%]	15
ASPESEARFRIDSVSEGNAGPY	1	1
EARFRIDSVSEGNAGP	1	1
ESEARFRIDSVSEGNAGP	1	1
ESEARFRIDSVSEGNAGPY	1	1
FRIDSVSEGNAGP	1	2
FRIDSVSEGNAGPY	1	2
SEARFRIDSVSEGNAGPY	3	5
SPSESEARFRIDSVSEGNAGPY	1	2
GALNT7 UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 7 (GalNAc-T7)	3 [25.0%]	9
GNQLFRINEANQL	1	2
GNQLFRINEANQLMQ	2	3
SPAMAGGLFAIERE	1	4
ARRDC1 arrestin domain containing 1	3 [25.0%]	9
FIGNIAVNHAPVSPR	1	2
FIGNIAVNHAPVSPRPG	1	2
IGNIAVNHAPVSPRP	3	4
IGNIAVNHAPVSPRPG	1	1
ERGIC1 endoplasmic reticulum-golgi intermediate compartment (ERGIC) 1	3 [25.0%]	10
FEGQFSINKVPGNFH	3	4
FEGQFSINKVPGNFHVS	2	3
RFEGQFSINKVPGNFH	2	3

Eine orientierend durchgeführte funktionelle Clusteranalyse legt die Vermutung nahe, dass diese Proteine wahrscheinlich vor allem zellulären Basisprozessen sowie Struktur- und Transportproteinen zuzuordnen sind (David-d.ncifcrf.gov.; abgerufen am 21. April 2017).

Bei näherer Betrachtung der erzielten Ergebnisse wurden auch im HLA-Klasse-II-Ligandom Peptide etablierter Leukämie-assoziiierter Antigene identifiziert. Auch in diesen Analysen wurden Peptide der Myeloperoxidase (MPO) und Nucleophosmin 1 (NPM1) in Proben der Kontroll- sowie Patientenkohorte detektiert. Es wurden 34 verschiedene Liganden der Myeloperoxidase identifiziert. 30 MPO-Liganden wurden zum Zeitpunkt der Auswertung ausschließlich im Ligandom von 4 der 12 AML-Patienten detektiert. Für Nucleophosmin 1 (NPM1) wurden hingegen nur vier Liganden

identifiziert. Davon wurden zwei Peptide lediglich im Ligandom gesunder Spender, sowie eines AML-exklusiv präsentiert. Diese Ergebnisse bekräftigen die für HLA-Klasse-I beschriebenen Beobachtungen einer mangelnden Tumorexklusivität bzw. -assoziation einiger in der Literatur bereits etablierter LAA.

Abschließend wurde das gesamte AML-exklusive Quellproteom in Hinblick auf die Frage analysiert, ob eventuell „gemeinsame“ LiTAAs für beide HLA-Klassen existieren. Im Rahmen dieser Datenauswertung konnten lediglich 43 gemeinsame Quellproteine identifiziert werden (Abbildung 3.20). Dies entspricht einer Überlappung des HLA- Klasse-II-Ligandoms mit seinem Pendant für Klasse-I von 10,4 % (bzw. eine 3,0 %-ige Überschneidung des Klasse-I-Ligandoms mit seinem Klasse-II Gegenstück).

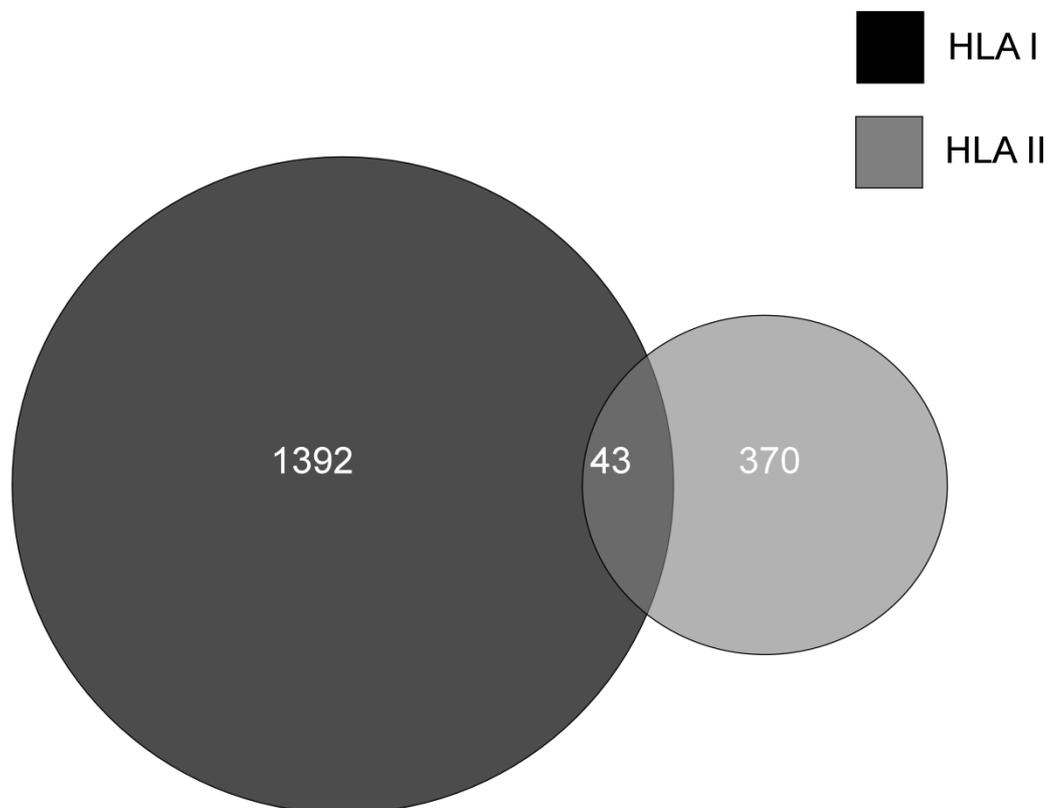


Abbildung 3.20: vergleichende Analyse des AML-HLA-Klasse-I- & -II-Quellproteoms (modifiziert nach Berlin et al. 2015)

Quantitative Darstellung der gemeinsamen Quellproteomschnittmenge, sowie jeweiliger exklusiver Teilmenge

Eine Übersicht über diese gemeinsamen Quellproteine bietet die Tabelle 3.6. Eine orientierend durchgeführte funktionelle Clusteranalyse legt die Vermutung nahe, dass diese Proteine wahrscheinlich vor allem zellulären Basisprozessen sowie Struktur- und Transportproteinen zuzuordnen sind (David-d.ncifcrf.gov; abgerufen am 21. April 2017).

Tabelle 3.6: Tabellarische Übersicht der LiTAAs, die im Rahmen der LC-MS/MS-basierten vergleichenden Analyse sowohl im HLA-Klasse-I-Ligandom (n= 15) als auch in HLA-Klasse-II-Ligandom (n=12) detektiert wurden (modifiziert nach Berlin et al. 2015) sog. nested Peptides sind rot markiert

Quellprotein	HLA-Klasse-I-Peptid	Identifikation/ Patienten	HLA-Klasse-II-Peptid	Identifikation/ Patienten
E3 ubiquitin-protein ligase (NEURL1B); A8MQ27	<i>RLVAVRPGW</i>	1	<i>DPGVLRPNELPADPD</i> <i>DPGVLRPNELPADPDA</i>	2 2
Maltase-glucoamylase, intestinal (MGAM), O43451	<i>TEGVTVVRP</i>	16	<i>VTQQYTELIGRPVM</i>	1
Potassium voltage-gated channel subfamily KQT member 3 (KCNQ3), O43525	<i>DVKDVIEQY</i>	1	<i>LKFARKPLCmLDIFVLI</i>	1
ATP Synthase subunit g, mitochondrial (ATP5L), O75964	<i>EIIGKRGIGY</i> <i>NLVEKTPAL</i>	67 1	<i>YVGEIIGKRGHIGYDV</i>	1
Erlin -2, (ERLIN2), O94905	<i>AEITYGQKV</i> <i>IEAEKVAQV</i>	2 2	<i>FGLEDEPLETATKEN</i>	1 1
Mitochondrial import receptor subunit TOM40 homolog (TOMM40), O96008	<i>GQAGMHATYY</i>	1	<i>ASSPPAGPPPPAPALVG</i> <i>LEDEPLETATKEN</i>	1
Carbonic anhydrase 1 (CA1), P00915	<i>KGRTVRASF</i> <i>SYNPATAKEI</i> <i>SYNPATAKEII</i>	1 3 4	<i>SVSYNPATAKEII</i>	1
Apolipoprotein C-II (APO2), P02655	<i>GIFTDQVLS</i>	1	<i>NLYEKTYLPAVDEK</i>	1
Integrin alpha-5 (ITGA5), P08648	<i>IEDKAQILL</i> <i>SIYDDSYLGY</i> <i>TTNHPINPK</i>	55 11 1	<i>SGEQmASYFGYVAAT</i> <i>YPDLLVGSFGVDKA</i>	4 2
DNA polymerase alpha catalytic subunit (POLA1), P09884	<i>FPYAFKEV</i>	3	<i>TVQLSNKLIImDI</i>	1
Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1 (SLC2A1), P11166	<i>FHPLGADSQV</i>	31	<i>GSLQFGYNTGVINAPQ</i> <i>IAQVFGLDSDIMGNKD</i>	2 1
Leukosialin (SPN), P16150	<i>FPYAFKEV</i>	2	<i>GRRRSRQGLAMEELK</i> <i>RKSRQGLAMEELK</i> <i>SGPSLKGEEPLVASEDGAV</i> <i>D</i> <i>SGSGPSLKGEEPLVASEDG</i> <i>AVD</i>	2 6 1 1
Phosphoglycerate mutase 1, (PGAM), P18669	<i>AVAAQ GKAKK</i>	1	<i>EGKRVLIAAHGNSLRG</i> <i>GKRVLIAAHGNSLR</i> <i>GKRVLIAAHGNSLRG</i> <i>KRVLIAAHGNSLRG</i>	2 1 1 1
Transcobalamin (TCN2), P20062	<i>MRHLGAF LF</i>	25	<i>MAGLAFTCLKRSNF</i>	1
Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 5 (SLC2A5), P22732	<i>LLITEIFLQ</i>	1	<i>FQYGYNVA AVNSPA</i> <i>GSSFQYGYNVA AVNSPA</i> <i>SSFQYGYNVA AVNSPA</i>	2 2 2
Receptor-type tyrosine-protein kinase FLT3, (FLT3), P36888	<i>SELKMMTQL</i>	2	<i>KPQVLA EASASQAS</i> <i>RKPQVLA EASASQAS</i>	1 1
PMS1 protein homolog 1, (PMS1), P54277	<i>GENIEPVKI</i>	2	<i>ELWKTLS EEEKLK</i>	1
Branched-chain-amino-acid aminotransferase, cytosolic (BCAT1), P54687	<i>GETIHIPTm</i> <i>ILSKLTDIQY</i> <i>LSKLTDIQY</i>	29 3 1	<i>ILSKLTDIQYGREE</i>	2
Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein (HSPG2), P98160	<i>IHDGAAPISL</i>	1	<i>DGVLRIQNLDQS</i> <i>GAYFHDDGFLA FPG</i> <i>TPYSFLPLPTIKDAYR</i> <i>YPTPDISWSKLDGSLPP</i> <i>YPTPDISWSKLDGSLPPD</i>	5 2 2 1 1
Dihydropyrimidinase-related protein 1 (CRMP1), Q14194	<i>AQKAVGKDNF</i>	4	<i>DENQFVA VTSTNAAK</i>	1
High mobility group nucleosome-binding domain-containing protein 3, (HMGN3) Q15651	<i>RSARLSAKP</i>	2	<i>AEEAQKTESVDNEGE</i>	2

Quellprotein	HLA-Klasse-I-Peptid	Identifikation/ Patienten	HLA-Klasse-II-Peptid	Identifikation/ Patienten
Plexin D1 (PLXND1) Q9Y4D7	<i>GQLPITIQV</i>	13	<i>DYGNNIRTVARVPGPA</i>	2
	<i>RAYADEVAV</i>	2	<i>GNNIRTVARVPGP</i>	2
	<i>REDKPPLAV</i>	1	<i>GNNIRTVARVPGPA</i>	2
	<i>RVKDLDTKEY</i>	5	<i>NNIRTVARVPGPA</i>	2
	<i>SEQEMNAHL</i>	1	<i>YGNNIRTVARVPGPA</i>	2
Tryptase alpha/beta-1 (TPSAB1), Q15661	<i>YYLDWIHHY</i>	1	<i>ALQRVGIVGGQEAPR</i>	1
	<i>EELQRNLSL</i>	1	<i>VDNIINSSAWVIR</i>	1
C-type lectin domain family 12 member A (CLEC12A), Q5QGZ9	<i>RPAALFLTL</i>	1		
	<i>SEELQRNLSL</i>	3		
Type-1 angiotensin II receptor-associated protein (AGTRAP), Q6RW13	<i>GELLVHTGF</i>	2	<i>DRSAYQTIDSAEAPADPF</i>	2
Tripartite motif-containing protein 67, (TRIM67), Q6ZTA4	<i>QLKNILOQ</i>	1	<i>VARASVVKDmmL</i>	1
Xylosyltransferase 1 (XYLT1), Q86Y38	<i>KFLVAPLTF</i>	1	<i>GKEAISALSRASKH</i>	1
CD302 antigen (CD302), Q8IX05	<i>KTAIPYKRK</i>	3	<i>SIEDVRNQCTDHGADm</i>	2
			<i>ISGKEAISALSRASKH</i>	2
Chromosome transmission fidelity protein 18 (CHTF18), Q8WVB6	<i>DPMAPGVQGSLL</i>	1	<i>SPPGLELLGGI</i>	1
	<i>GLDPSQRPK</i>	2		
High affinity immunoglobulin gamma Fc receptor 1B (FCGR1B), Q92637	<i>SQYTVKGL</i>	1	<i>VYNVLYYRNGKAFKF</i>	1
			<i>DSGHEKKVISSLQEDRH</i>	2
Envoplakin (EVPL), Q92817	<i>EVIEKFDYV</i>	2	<i>SGHEKKVISSLQEDRH</i>	1
			<i>FRNGmLNISPIGRSCT</i>	1
Phosphomannomutase 1 (PMM1), Q92871	<i>EVIEKFDYV</i>	1	<i>FRNGmLNISPIGRSCT</i>	1
			<i>FRNGmLNISPIGRSCT</i>	1
RNA-binding protein with multiple splicing (RBPM5), Q93062	<i>KQPVGFVSF</i>	1	<i>RPFKGYEGSLIKL</i>	1
Endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment protein 1 (ERGIC1), Q969X5	<i>DLSPITVKY</i>	20	<i>FEGQFSINKVPGNFH</i>	4
			<i>FEGQFSINKVPGNFHVS</i>	3
			<i>RFEGQFSINKVPGNFH</i>	3
Tumor necrosis factor receptor superfamily member 19L (RELTL), Q969Z4	<i>IGVLVRLI</i>	2	<i>GSRTKWLKPAPENKAE</i>	1
Gamma-secretase subunit APH-1A (APH1A), Q96B13	<i>DPLRVILV</i>	9	<i>SVINILADALGPG</i>	1
Peptide-N(4)-(N-acetyl-beta-glucosaminyl) asparagine amidase (NGLY1), Q96IV0	<i>EVVDVTWRY</i>	37	<i>GDNSLHSYADFSGATE</i>	1
Inosine triphosphate pyrophosphatase (ITPA), Q9BY32	<i>AQKIDLPEY</i>	4	<i>IDLPEYQGEPEDEISIQK</i>	3
Myoferlin (MYOF), Q9NZM1	<i>MPPLVIKV</i>	2	<i>EHSIRVYNHSLR</i>	2
			<i>IHSIRVYNHSLR</i>	
Cathepsin F (CTSF), Q9UBX1	<i>VTKFSDLTE</i>	1	<i>LPSNAYSIAKNLGGLE</i>	2
Malignant T-cell-amplified sequence 1, (MCTS1), Q9ULC4	<i>IQLKTSVI</i>	1	<i>GIGIENIHYLNDG</i>	2

Die im Rahmen der Vergleichsanalyse durchgeführte Gegenüberstellung der korrespondierenden HLA-Klasse-I- und -II-Liganden der 43 Quellproteine zeigte drei HLA-Klasse-I-LiTAPs auf, deren Sequenz vollständig im HLA-Klasse-II-Ligand des entsprechenden LiTAAs enthalten war. Derartige Peptide werden als „nested peptides“ bezeichnet. Da sie möglicherweise gleichermaßen als Epitop für CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen fungieren könnten, gilt ihnen bei entsprechender Immunogenität ein besonderes Interesse im Prozess der Vakzinentwicklung.

Die LiTAAs und ihre korrespondierenden HLA-Liganden sind nachfolgend tabellarisch aufgeführt (Tab. 3.7). Die Sequenzen der entsprechenden, eingebetteten HLA-Klasse-I-Peptide sind optisch hervorgehoben.

Tabelle 3.7: Übersicht der drei detektierten nested Peptides für HLA-Klasse-I- und -II-Sequenzen sowie ihrer jeweiligen korrespondierenden Quellproteine (modifiziert nach Berlin et al. 2015)

Quellprotein	HLA-Klasse-I	Patient	HLA-Klasse-II	Patient
Carboanhydrase (CA 1)	<i>SYNPATAKEI</i>	AML 14	<i>SVSYNPATAKEII</i>	AML 10
	<i>SYNPATAKEII</i>	AML 14		
branched-chain amino acid transaminase 1 (BCAT1)	<i>ILSKLTDIQY</i>	AML 17	<i>ILSKLTDIOYGREE</i>	AML 8
	<i>LSKLTDIQY</i>	AML 17		
ATP-Synthase (ATP5L)	<i>EIIGKRGIIGY</i>	AML 8	<i>YVGEIIGKRGIIGYDV</i>	AML 02
		AML 13		
		AML 14		
		AML 17		

3.5 Funktionelle T-Zell-Analysen zur orientierenden Charakterisierung des immunogenen Potentials exemplarisch ausgewählter HLA-Klasse-II-LiTAPs

Um erste Erkenntnisse über das immunogene Potential der identifizierten HLA-Klasse-II-Peptide zu gewinnen, wurden auch für diese orientierende, funktionelle T-Zell-Analysen durchgeführt. Der Fokus der Untersuchung lag auf der Identifikation einer potentiell durch LiTAPs *in vivo* induzierte CD4⁺-Gedächtniszellbildung. Für dieses Ziel wurden für sechs exemplarisch ausgewählte, top-gerankte Liganden INF- γ -ELISpots durchgeführt. Die analysierten LiTAAs, sowie die korrespondierenden Peptidsequenzen sind in der nachfolgenden Tabelle 3.8 aufgeführt.

Tabelle 3.8: Übersicht der Ergebnisse der funktionellen Charakterisierung sechs ausgewählter HLA-Klasse-II-Peptidsequenzen im Interferon- γ -Elispot (modifiziert nach Berlin et al. 2015)

Quellprotein	Peptid	Position im Protein	positive / getestete Kontrollspender	positive / getestete Patienten
Calsyntenin 1 (CLSTN1)	HRSFVDLSGHNLANPHP	835-852	0/8	4/15
member RAS oncogene family (RAB 5A)	SPNIVIALSGNKADLA	123-138	0/8	3/15
manose binding lectin 2 (MBL2)	TEGQFVDLTGNRLTYT	191-206	0/8	2/15
quiescin sulfhydryl oxidase 1 (QSOX1)	ASHFEQMAAASMHR	459-472	0/8	0/15
adenine phosphoribosyltransferase (APRT)	DPASFRAAIGLLARH	35-49	0/8	0/15
C-reaktives Protein (CRP)	ESDTSYVSLKAPLTKPL	32-48	0/8	0/15

Für drei der getesteten Sequenzen konnte in Folge der durchgeführten Einzelpeptidstimulation eine signifikante INF- γ -Sekretion in AML-Patientenproben detektiert werden.

Die Stimulation mit P''1 (CLSTN1₈₃₅₋₈₅₂) induzierte in 4/15 (26,7%), mit P''2 (RAB5A₁₂₃₋₁₃₈) in 3/15 (20%) und mit P''3 (MBL2₁₉₁₋₂₀₆) 2/15 (13,3%) der 15 getesteten AML-Patienten eine signifikante T-Zell-Antwort (Abb. 3.21).

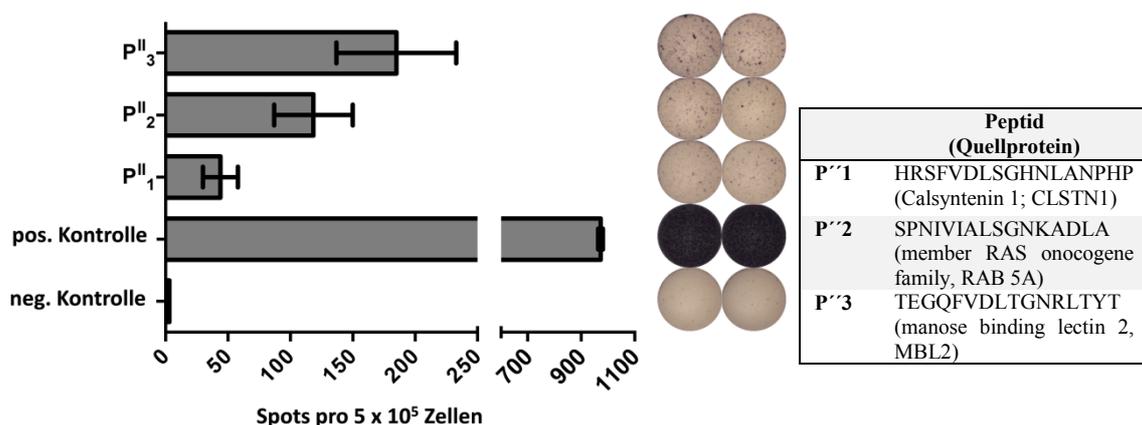


Abbildung 3.21: Exemplarische Darstellung detektierte positiver T-Zellreaktionen für P''1-P''3 anhand des Experiments für AML 32 (modifiziert nach Berlin et al. 2015)

Als Positivkontrolle wurde PHA verwendet. Die Ergebnisse der Zellstimulation mit Peptiden von FLNA₁₆₆₉₋₁₆₈₃ – HLA-DR-Peptiden diente als Negativkontrolle. Es wurden 250 000 Zellen/Well verwendet. Darüber hinaus findet sich in der linken Bildhälfte eine statistische Darstellung der beobachteten T-Zellantwortfrequenz.

Um eine unspezifische, AML-unabhängige Interferon- γ -Produktion mit hoher Wahrscheinlichkeit ausschließen zu können, wurden zur Gegenprobe PBMCs gesunder

Kontrollspender mit den sieben LiTAPs stimuliert und anschließend im Immunospot untersucht. Ein besonderes Interesse galt bei diesen Versuchen den T-Zellreaktionen auf P''1, P''2 und P''3. In keinem der zuverlässig auswertbaren Experimente konnte in Folge der Stimulation eine signifikante INF- γ -Sekretion detektiert werden.

Die HLA-Klasse-II-Ligandomanalyse liefert zusätzliche, potentielle Ansatzpunkte und zeigt eventuell synergistisch wirkende Liganden auf. Die ersten Ergebnisse der orientierend angelegten funktionellen Charakterisierung liefern ermutigende Hinweise auf ein signifikant immunogenes Potential der neu definierten Gruppe AML-spezifischer HLA-Klasse-II-Liganden.

4 Diskussion

Lange blieb die Krebsimmuntherapie klinisch weit hinter ihrem Potential zurück und spielte im klinischen Alltag für viele Entitäten nur eine untergeordnete Rolle.

In der jüngeren Vergangenheit gelang es jedoch, eine beachtliche Wirksamkeit dieser Therapieform für eine Vielzahl von Erkrankungen zu beweisen (Mellman, Coukos et al. 2011) und sie als fünfte Säule in der Tumorbehandlung neben der Chirurgie, Zytostatika- und Strahlentherapie sowie *zielgerichteten* Behandlungsformen zu etablieren (Couzin-Frankel 2013, McDermott, Drake et al. 2015). Insbesondere die gezielte pharmakologische Regulierung wichtiger Kontrollpunkte des Immunsystems (Immuncheckpoints) entwickelt sich aktuell zu einer hoch-effektiven Behandlungsstrategie in der Onkologie, allen voran für die soliden Tumoren.

Auch die Behandlung maligner Hämoblastosen umfasst mit der Stammzelltransplantation bereits seit langem eine immuntherapeutische Komponente (Weiden, Flournoy et al. 1979). In Form der alloimmunvermittelten *Transplantat-gegen-Leukämie-Reaktion (graft-vs-leukemia, GvL)* trägt sie maßgeblich zu einem Therapieerfolg bei. In der jüngeren Vergangenheit zeigten auch die Donor-Lymphozyten-Infusion (DLI) (Schmid, Labopin et al. 2007) und die CAR-Technologie vielversprechende Erfolge in der Leukämiebehandlung (Maude and Barrett 2016). Die Kehrseite der Medaille sind jedoch massive unerwünschte Nebenwirkungen (u.a. die allo-immun vermittelte Graft-vs-Host-Reaktion und Knochenmarkaplasie mit konsekutiver Immunsuppression sowie eine massive Zytokinfreisetzung als sog. Zytokinsturm (Luznik, L., and E. J. Fuchs. 2002), sporadische Effektivität und ein Mangel an geeigneten Targets (Schmid, Labopin et al. 2007).

Einen nahezu nebenwirkungsfreien, ebenfalls vielversprechenden immuntherapeutischen Ansatz stellt die Peptid-basierte Vakzinierung dar. Bislang wurden für die meisten Vakzinierungsversuche Impfkandidaten mittels *in silico* Vorhersage auf der Basis von Genom- und Transkriptomdaten, insbesondere gewonnen aus Expressions- & Mutationsanalysen, ermittelt. Bei diesen Therapieversuchen konnten mitunter *in vitro* und z.T. *in vivo* spezifische T-Zell-Antworten detektiert werden. In diesem Rahmen war die klinische Effektivität jedoch recht begrenzt (Mellman, Coukos et al. 2011) (Oka, Tsuboi et al. 2004, Keilholz, Letsch et al. 2009,

Anguille, Lion et al. 2011). Dies wurde unter anderem vor allem der Targetauswahl bzw. den Auswahlkriterien der verwendeten Peptide zugeschrieben.

In Folge einer Vakzinierung mit natürlich-präsentierten, immunogenen HLA-Peptiden im Rahmen der Phase-2-Studie IMA901 gelang es Walter und Kollegen jedoch impfspezifische Immunreaktionen in Kombination mit einem signifikant verbesserten klinischen Überleben zu detektieren (Walter, Weinschenk et al. 2012).

Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung der direkten, differentiellen Ligandomessung für die zukünftige Definition (und Auswahl) physiologisch relevanter Targets.

Zu Beginn dieser Dissertation war das Wissen über klinisch-relevante LAAs, die im HLA-Ligandom der AML durch immunogene Peptide abgebildet sind, noch sehr begrenzt. Mit dem Blick auf das langfristige Ziel, eine Multipeptidvakzine für die Behandlung der akuten myeloischen Leukämie zu entwickeln, wurde deshalb im Rahmen dieser Arbeit ein besonderes Augenmerk auf das Auswahlverfahren und die Identifikation geeigneter Targets gelegt. Für alle T-Zell-basierten Krebsimmuntherapieformen ist die Erkennung Tumor-assoziiertes/spezifischer Epitope durch das adaptive Immunsystem eine unverzichtbare Grundvoraussetzung. Deshalb könnte sich die potentielle Identifikation neuer Epitope eventuell z. B. auch für den adoptiven T-Zelltransfer oder die CAR-Technologie als attraktiv erweisen.

4.1 Diskussion der HLA-Klasse-I-Ligandomanalyse

4.1.1 *Diskussion der Ergebnisse der quantitativen HLA-Ligandomanalyse*

Eine „ausreichende“ Expression von HLA-Rezeptormolekülen auf der Zelloberfläche potentieller Zielzellen stellt eine grundlegende Voraussetzung für das erfolgreiche Gelingen einer effektiven Peptid-basierten Immuntherapie dar. Eine stark verminderte MHC-Expression auf Tumorzellen gilt als eine klassische Strategie von Tumoren sich der Kontrolle durch das Immunsystem zu entziehen (Campoli and Ferrone 2008). Eine erforderliche Mindestanzahl von Peptid-MHC-Komplexen pro Zelle für eine T-Zellaktivierung ist allerdings bisher nicht eindeutig definiert.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte in orientierend durchgeführten Untersuchungen anhand einer kleinen Patientengruppe keine deutliche

Herunterregulierung der HLA-Rezeptor-Moleküle auf der Oberfläche der Tumorzellen beobachtet werden. Im Gegenteil gelang es eine suffiziente Expression für MHC-Klasse-I und -II Moleküle auf primären AML-Zellen von fünf verschiedenen Patienten nachzuweisen. In Bezug auf die HLA-Expressionsraten mononukleärer Knochenmarkszellen (bone marrow nucleated cells, BMNC) gesunder Spender, publiziert von S. Walz et al. 2015 in Blood, wiesen die analysierten AML-Blasten dieser Arbeit eine vergleichsweise geringere Rezeptorexpression beider MHC-Molekülklassen auf. Betrachtet man jedoch die HLA-Expression der maligne transformierten Zellen im Vergleich zu den jeweiligen autologen, benignen granulö- und monozytären Zellen so zeigt sich keineswegs eine bedeutende Herunterregulierung der MHC-Rezeptorexpression, wie in der Vergangenheit mitunter vermutet wurde (Brouwer, van der Heiden et al. 2002). In Rahmen dieser vergleichenden Betrachtung konnte sogar eine signifikant verstärkte Expression für HLA-Klasse-I-Moleküle für drei der fünf untersuchten Patienten gezeigt werden. Noch deutlicher fielen die Ergebnisse für die HLA-Klasse-II-Expressionsraten aus, die sich für alle fünf Patienten signifikant erhöht zeigten. Diese beobachtete Überexpression lässt sich, insbesondere für HLA-Klasse-II-Moleküle, unter anderem durch die erhöhte Interferon- γ -Konzentration in Folge einer Tumor-begleitenden Inflammationsreaktion erklären.

Diese Daten decken sich mit den Ergebnissen anderer Projekte unserer Arbeitsgruppe (u. a. Kowalewski et al., PNAS 2015) sowie in der Vergangenheit veröffentlichten AML-Studien (Wetzler, Baer et al. 2001, Vollmer, Li et al. 2003).

Die analysierte Patientenkohorte ist vergleichsweise klein. Die erzielten Ergebnisse sind deshalb vor allem als Produkt einer primär orientierenden Untersuchung zu bewerten. Zukünftige Analysen, die größere Patientenkohorten umfassen sollten, könnten eine noch robustere Datengrundlage schaffen. Darüberhinaus könnten weitere Analysen Erkenntnisse der quantitativen HLA-Expression verschiedener Zeitpunkte im Krankheitsverlauf ermöglichen. Ferner könnten sie potentielle, Therapie-assoziierte und für den weiteren Behandlungsverlauf relevante Veränderungen der Expressionsraten aufdecken.

Dennoch ist an dieser Stelle eindeutig zu betonen, dass dank der signifikanten Ergebnisse dieser Analyse AML-Blasten als mögliche Targets für eine T-Zell-basierte Immuntherapie validiert werden konnten. Die erforderliche Voraussetzung für weitere

Analysen bzw. Arbeitsschritte auf dem Weg zur Entwicklung einer Peptidvakzine für AML-Patienten werden dank dieser Ergebnisse als erfüllt betrachtet.

4.1.2 Diskussion der Ergebnisse qualitativen Ligandom-Analyse

Auf dem Weg zur Kartierung des HLA-Ligandoms benigner und transformierter granulo- und monozytärer Zellen wurden in dieser Arbeit Blutproben von 15 neu-diagnostizierten AML-Patienten sowie von 30 gesunden Spendern (PBMC-Spender) untersucht und ausgewertet.

Diese qualitativen Analysen ermöglichten die Identifikation von mehr als 20 000 verschiedenen HLA-Liganden. Für einige Fragestellungen wurden auch die Ergebnisse qualitativer Ligandomuntersuchungen benigner BMNCs, publiziert von Simon Walz 2015 in *Blood*, berücksichtigt, so dass die angefertigten Auswertungen auf einer Datengrundlage von mehr als 25 000 verschiedenen, identifizierten HLA-Liganden basierten. Dies ermöglichte eine bisher verhältnismäßig umfangreiche Analyse sowie vergleichende Betrachtung der einzelnen Kohorten.

An dieser Stelle muss jedoch darauf hingewiesen, dass vor Beginn der qualitativen Immunpeptidomanalyse keine Zellsortierung anhand eines gängigen Separationsverfahren durchgeführt wurde. Ein Anteil von mindestens 80 % leukämischer Blasten an der Gesamtleukozytenfraktion galt als Voraussetzung für den Einschluss einer Patientenprobe in diese Studie (siehe Material und Methoden). Dieser wurde sowohl durch die immunphänotypischen Analysen des hämatologischen Diagnostiklabors am UKT, als auch im Rahmen der quantitativen HLA-Analysen bestätigt. Die maligne transformierten Zellen wurden durch die Dichte-basierte Gradientenauftrennung des Blutes mittels Ficoll im sog. *Buffy Coat* konzentriert angesammelt. Da für die Analysen verhältnismäßig geringe Probenmaterialmengen eines Patienten zur Verfügung standen und die quantitativen Voraussetzungen für eine exakte Zellseparation (z. B. mittels magnetischer Beads) nicht erfüllt wurden, musste auf eine Zellsortierung verzichtet werden.

Dieser Umstand stellt die Aussagekraft und Qualität der vorliegenden Ergebnisse jedoch nicht in Frage. Ebenso wenig mindert er deren Wert.

Die Gefahr einer „Verunreinigung“ des zu analysierenden Materials durch nicht-transformierte, autologe Zellen ist keineswegs mit der Situation solider Tumoren vergleichbar. Im Probenmaterial solcher Tumorentitäten finden sich neben benignen

Zellen meist auch Zellen des Binde- und Stützgewebes sowie häufig Leukozyten (u. a. Tumor-infiltrierende T-Zellen, TILs).

Dennoch kann nicht zu 100 % ausgeschlossen werden, dass einige bisher als Tumor-exklusiv beschriebene Liganden eigentlich dem Ligandom benigner PBMCs zuzuordnen sind.

Die hochfrequente Detektion einiger HLA-Liganden aus Proteinen mit proapoptotischer Funktion könnte somit u. a. eventuell auf eine potentielle Verunreinigung zurückzuführen sein.

Bei ausreichend zur Verfügung stehender Materialmenge scheint die Durchführung einer Zellseparation für zukünftige Analysen daher sehr empfehlenswert.

An dieser Stelle muss ebenfalls erwähnt werden, dass prinzipiell alle Peptide, die aktuell als AML-exklusiv bzw. als stark-assoziiert betrachtet werden, diesen Status im Verlauf der Zeit durch die progrediente Erweiterung der Normalgewebsdatenbank eventuell verlieren könnten.

Vermeintlich interessante und somit eventuell potentielle Impfpeptidkandidaten wurden in der vorliegenden Arbeit nach einem bisher vergleichsweise neuartigen Ansatz ausgewählt.

Das Hauptaugenmerk für die Auswahl potentiell geeigneter Targets lag neben der Gewebsspezifität vor allem auf den folgenden Kriterien: 1) Grad und Frequenz der Peptidpräsentation auf der Zelloberfläche der AML-Blasten respektive der Anzahl der analysierten Patienten sowie 2) der Immunogenität (*in vitro* und *in vivo*) eines Peptids.

Auf diese Weise wurde im Rahmen der hier durchgeführten Immunpeptidomanalyse eine neue Gruppe Leukämie-assoziiierter Antigene definiert. Diese sind prinzipiell durch ihre AML-Exklusivität, hohe Präsentationsfrequenz im Patientenkollektiv, ihre (sehr) starke Präsentation auf der Tumorzelle sowie ihr starkes immunogenes Potential charakterisiert.

Diese Strategie ermöglicht es bevorzugt solche Zielantigene auszuwählen, die für eine Therapie möglichst vieler Patienten in einem relativ breitangelegten Impfcocktail verwendet werden könnten.

Für die weitergehenden und spezifischeren Analysen konnte auf diese Weise aus einem Pool von 1 483 AML-exklusiven Quellproteinen eine Gruppe von 132 Tumorantigenen (LiTAAs) ausgewählt werden, die hochfrequent von mindestens 20% der analysierten

AML-Patienten präsentiert wurden. Daraus leitete sich ein Set von korrespondierenden 341 HLA-Liganden (LiTAPs) ab.

Vor dem Hintergrund der deutlich zunehmenden Verfügbarkeit möglicher Peptide für ein Vakzindesign ergibt sich auch die Frage, wie viele Peptide ein Impfcocktail umfassen sollte. Für die meisten bisher durchgeführten Vakzinierungsversuche für AML-Patienten wurde nur ein einziges Peptid verwendet (Anguille, Van Tendeloo et al. 2012). Dies ist einerseits wahrscheinlich der begrenzten Auswahl an Impfkandidaten, andererseits der sehr Kosten- und Zeit-intensiven Produktion unter „*good-manufacturing practice*“ (GMP)-Bedingungen geschuldet. Ob ein (zu) großer Peptidpool einzelne Peptide aufgrund unterschiedlicher Bindungsaffinitäten in ihrer Wirkung behindert oder im Gegenteil synergistische Effekte bedingt, konnte bisher nicht abschließend geklärt werden.

Die Individualität und Heterogenität von Tumoren sowie das interindividuell durchaus variable immunogene Potential eines Peptids stellen die breite Anwendbarkeit eines nicht-personalisierten Einzelpeptidimpfstoffs deutlich in Frage. Darüber hinaus besteht die Gefahr, dass durch die Fokussierung auf ein Target in Folge „immunologischen Drucks“ die Selektion von Tumorzellklonen mit ausgeprägten Überlebensvorteilen begünstigt würde (Aguirre-Ghiso 2007, Schreiber, Old et al. 2011). Durch ein simultanes Attackieren mehrerer Antigene könnte solche „*Escapevarianten*“ eventuell längerfristig vorgebeugt werden. Diese Argumente plädieren deutlich für die Entwicklung eines Multipeptidimpfstoffs.

Prinzipiell bestehen für ein solches Designvorhaben verschiedene Optionen mit einem variablen Grad an Personalisierung. Die einfachste Variante wäre „ein Impfstoff für alle“. Dieser würde LiTAPs der häufigsten HLA-Typen beinhalten und wäre somit quasi HLA-unabhängig verabreichbar. Ein solcher Cocktail könnte Peptide der HLA-Allotypen A*01, A*02, A*24, B*07, B*08 und B*18 umfassen um eine circa 95 %-ige Abdeckung der Bevölkerung zu erzielen (Schipper, D'Amaro et al. 1997). Da diese Variante weder der Patienten- noch der Tumorindividualität Rechnung trägt, vergibt sie höchst wahrscheinlich die Möglichkeit individuelle, Tumor-spezifische T-Zell-Antworten zu generieren.

Dem gegenüber steht die Variante, die von vielen als ideale Vakzine betrachtet wird. Diese wäre spezifisch auf jeden Patienten zugeschnitten. Neben einer

Patientenstratifizierung nach HLA-Allotypen und Tumorentität würde sie auch die jeweilige Tumorheterogenität und -individualität berücksichtigen. Zum heutigen Zeitpunkt ist ein solcher Ansatz jedoch noch äußerst aufwändig, Zeit- und Kostenintensiv und somit für eine breite klinische Anwendung (eher) ungeeignet.

Aktuell gilt der sog. *Warehouse-approach* als ein akzeptabler und realisierbarer Kompromiss. Für diesen Ansatz werden entsprechend immunogene, hochfrequent präsentierte LiTAPs der häufigsten Allotypen entsprechend der gängigen GMP-Auflagen synthetisiert und auf Lager vorgehalten. Nach individueller Immunpeptidomanalyse kann aus diesem Repertoire eine personalisierte Vakzine für jeden Patienten zusammengestellt und unter Umständen noch um zusätzliche neue, individuelle Impfkandidaten ergänzt werden (GAP-VAC-Studie: NCT02149225; iVAC-L-CLL01-Studie: NCT02802943).

Für die Entwicklung eines solchen Peptidrepertoires für AML-Patienten lag der Fokus der vorliegenden Arbeit auf der Identifikation verschiedener, stark präsentierte LiTAAs unterschiedlicher HLA-Allotypen, um statistisch eine breite Abdeckung des AML-Patientenkollektivs zu erreichen.

Unter diesen Quellproteinen scheinen sich tendenziell vermehrt Strukturproteine sowie Proteine grundlegender zellulärer Prozesse zu finden. Dieser Eindruck deckt sich mit der Beobachtung von Bassani-Sternberg et al., die über eine deutliche Korrelation zwischen Proteinabundanz, -halbwertszeit und -umsatz mit einer effizienten HLA-Klasse-I-Präsentation (Bassani-Sternberg, Pletscher-Frankild et al. 2015) berichten. Auf der Annahme eines beschleunigten Abbaus (und somit einer deutlich verkürzten Halbwertszeit) proapoptotisch fungierender Proteine gründet sich auch ein Erklärungsansatz für die deutliche Repräsentation einiger Proteine, wie beispielsweise FAF1 und KLF-2 im AML-HLA-Ligandom. Auch über die Existenz einer bisher noch nicht bekannten bzw. aufgeklärten biologischen Funktion dieser Proteine im (Tumor-)Zellstoffwechsel, ggf. in Kombination mit anderen Tumor-bedingten Modifikationen, kann spekuliert werden. Daneben steht die Hypothese im Raum, die betreffenden Quellproteine könnten das Produkt einer *missense* oder *nonsense* Mutation darstellen. In diesem Fall hätten die betroffenen Proteine ihre bekannte biologische Funktion verloren und würden aufgrund molekularer Veränderungen bevorzugt degradiert. Die

korrespondierenden, hochfrequent detektierten Peptidsequenzen resultierten jedoch aus einem nicht-mutierten Anteil des Proteins. Die pathophysiologischen Ursachen dieser Beobachtung und ihre Bedeutung gilt es in Zukunft in weiteren Untersuchungen aufzuklären.

Eine deutliche Hochregulation eines bestimmten bzw. mehrerer bestimmter Signalwege mit vermeintlich eindeutigem Tumor- oder gar AML-Bezug ließ sich aus den vorliegenden erhobenen Daten auf HLA-Ligandom-Ebene nicht ableiten. Allerdings ist eine funktionelle Relevanz zwar wünschenswert (Cheever, Allison et al. 2009), jedoch für die Definition eines LiTAAs bzw. LiTAPs nicht zwingend notwendig.

Allerdings konnten so aus den vorliegenden Daten keine exakten übergeordneten, gemeinsamen Merkmale für diese neuen LiTAAs definiert werden, die zukünftig korrekte und zuverlässige Computer-gestützte Vorhersagen ermöglichen könnten. Eben diese wären jedoch für die Anpassung der aktuell noch sehr kosten- und zeitaufwändigen Prozesse an die Anforderungen und Gegebenheiten des klinischen Alltags erforderlich.

Die AML ist eine biologisch und klinisch sehr heterogene Erkrankung. Die klinische Erfahrung hat in diesem Zusammenhang die Bedeutung der Patientenstratifizierung in verschiedene Therapie- bzw. Risikosubgruppen deutlich belegt. In der aktuellen, erneuerten WHO- Klassifikation sowie in der Entwicklung neuer Therapien wird diesem Umstand Rechnung getragen. Vor diesem Hintergrund wurde das AML-exklusive Quellproteom in dieser Arbeit auch in Bezug auf potentielle Charakteristika verschiedener genetischer Subtypen betrachtet. Eine vertiefte, umfassendere Analyse wurde zunächst exemplarisch für die Gruppe der Träger einer FLT3 (FMS-related Tyrosine kinase 3)-ITD (internal tandem duplication)-Mutation durchgeführt.

FLT3 codiert für einen Tyrosinkinase-Rezeptor. Dieser ist in die Differenzierung und Proliferation der hämatopoetischen Stammzelle involviert. Die FLT3-ITD Mutationsträger bilden eine der häufigsten genetischen Untergruppen. Wegen des aktuell geringfügigen Behandlungserfolgs im Rahmen etablierter Therapien sowie der aggressiven Tumorbiologie ist diese genetische Veränderung mit einer schlechten Prognose assoziiert (Bacher, Schnittger et al. 2010). Eine effektive, personalisierte Immuntherapie könnte eine Säule einer zukünftig erfolgreichen Behandlung dieses Patientenkollektivs darstellen.

Es zeigte sich, dass unabhängig vom FLT3-Mutations(träger)status über 90 % der LiTAAS, die in dieser Arbeit beschrieben wurden, im Ligandom aller untersuchten AML Patienten präsentiert wurden. Somit bekräftigen diese Ergebnisse prinzipiell die Annahme einer breiten und Subtyp-unspezifischen Abdeckung des Immunpeptidoms durch Antigene/Peptide, die im Rahmen des „neuen“ Targetselektionsverfahrens beschrieben und ausgewählt wurden.

Diese Erkenntnisse können zum jetzigen Zeitpunkt jedoch lediglich als vorsichtiger Trend interpretiert werden. Abgeleitet aus einer grob-orientierenden Analyse können sie sicher keinesfalls als repräsentativ betrachtet werden.

Die erhobenen Ergebnisse resultieren aktuell nur aus der Betrachtung eines einzigen AML-Subtyps. Daneben umfasste die untersuchte Patientenkohorte, entsprechend des Konzepts eines Vorversuchs, verhältnismäßig wenige Patienten. Ein weiterer kritischer Punkt besteht in der ausgewählten Datengrundlage dieser Untersuchung. Diese basiert ausschließlich auf AML-exklusiven TAA, wodurch logischerweise ein nicht zu vernachlässigender Verzerrungseffekt bzw. eine Tendenzbildung für die nachfolgende Auswertung resultiert.

Ein ebenfalls wichtiger Punkt sollte jedoch keinesfalls außer Acht gelassen werden: Als das Ligandom beider Gruppen hinsichtlich Gleichartigkeit bzw. Übereinstimmung verglichen wurde, offenbarte sich eine eindeutig höhere Biodiversivität des Immunpeptidoms der Mutationsträger. Dieser Umstand unterstützt neben der Identifikation eines kleinen Anteils Subgruppen-spezifischer Targets die Bestrebung ergänzend zum Subtyp-übergreifenden „Basisdesignkonzept“ auch Risikogruppen-adaptierte, spezifische Antigene für einen potentiellen Impfstoff zu berücksichtigen.

Vor dem Hintergrund der Variabilität des HLA-Ligandoms der Mutationsträger, der starken biologischen Heterogenität der AML als pathologische Entität sowie der Massenspektrometrie als verwendeter Analysetechnik sollte auch ein weiterer Aspekt für zukünftige Analysen und Überlegungen beachtet werden. Die im Rahmen dieser Arbeit gewählte Sensitivitätsgrenze des Massenspektrometers verhindert die Detektion niedrig abundanter(er) Peptide. Sollte die Leukämie gleichzeitig aus mehreren Subklonen bestehen, die nicht alle eine Mutation z. B. im FLT3-Gen aufweisen, könnten Mutations-bedingte Veränderungen des HLA-Ligandoms im

„Gesamtpeptidom“ vergleichsweise unterrepräsentiert sein. Auf diese Weise könnten sich entsprechend Subtyp-spezifische bzw. -assoziierte Peptide unterhalb des aktuellen MS-Detektionslimits befinden und im Rahmen der Analyse nicht berücksichtigt worden sein. Es wäre daher denkbar, dass sich das Immunpeptidom verschiedener Subtypen unter Umständen deutlich stärker unterscheidet als es die vorliegenden Daten andeuten. Eine Daten-unabhängige Messtechnik (Data-Independent-acquisition, DIA) könnte die Detektion niedrig abundanter Peptide mit geringer Kopienzahl pro Zelle begünstigen (Crowgey, E. L., A. Matlock, V. Venkatraman, J. Fert-Bober, and J. E. Van Eyk. 2017). Bedenkt man die pathophysiologische Bedeutung Therapie-resistenter, maligner Klone für die klinische Prognose eines Patienten scheint eine derartige Analyse jedoch attraktiv und lohnenswert.

Es sei an dieser Stelle auch noch einmal daraufhin gewiesen, dass die Höhe der Präsentationsfrequenz nicht automatisch positiv mit dem immunogenen Potential eines Peptids korreliert. Die Frage ab welcher Anzahl von Peptid-MHC-Komplexen eine T-Zell-Antwort ausgelöst wird, ist nicht abschließend geklärt. Der T-Zell-Rezeptor gilt jedoch als außerordentlich sensitiv (Purbhoo, Irvine et al. 2004). Er scheint in der Lage zu sein, HLA-Peptidkomplexe in sehr geringer Anzahl, eventuell sogar ab einem einzelnen Molekül pro Zelle, zu detektieren (Sykulev, Joo et al. 1996)

Unter der Berücksichtigung der oben genannten Aspekte sollte dem vorsichtig abgelesenen Trend sowie einer AML-Subtypen-spezifischen Analyse des Immunpeptidoms in Zukunft in umfassenderen, tiefergehenden Untersuchungen weiter nachgegangen werden.

Neben der Identifikation neuer, natürlich präsentierter AML-assoziiierter Antigene galt die Aufmerksamkeit u. a. auch der Frage, ob etablierte Leukämie-assoziierte Antigene (LAA) (Anguille, Van Tendeloo et al. 2012), tatsächlich im Immunpeptidom der AML präsentiert werden. Diese Antigene wurden in der Regel auf der Basis von Genom- & Transkriptomanalysen definiert. Nach aktuellem Kenntnisstand der Autorin wurden bislang von keiner anderen Arbeitsgruppe natürlich präsentierte HLA-Liganden dieser LAAs durch Massenspektrometrie identifiziert und validiert. In Impfstudien verwendete Peptide dieser LAA wurden bisher im Rahmen der *reversen* Immunologie ermittelt (Anguille, Van Tendeloo et al. 2012).

Im Rahmen der direkten Evaluation auf HLA-Ligandenebene zeigte sich für etliche

etablierte LAA keine Tumorexklusivität bzw. kein starkes Maß an Tumorassoziation sowie keine hohe Präsentationsfrequenz. Die Mehrheit dieser Antigene (>80%), u. a. Myeloperoxidase (MPO), Telomerase reverse Transcriptase (TERT), Mucin 1 (MUC1) und Wilms Tumor Protein (WT-1), konnte auch im Ligandom gesunder, Kontrollspender nachgewiesen werden. Somit wurde das Kriterium der AML-Exklusivität als Grundvoraussetzung für weitere, intensivere Charakterisierungen im Rahmen dieser Arbeit von der Mehrzahl der etablierten LiTAAs nicht erfüllt. Diese Beobachtungen stimmen auch mit Erkenntnissen einer Studie aus dem Jahr 2014 überein, die vermeintliche AML-assoziierte Antigene auf Transkriptom-Ebene untersuchte (Goswami, Hensel et al. 2014).

Ähnliche Ergebnisse auf HLA-Ligandenebene wurden auch für die chronisch lymphatische Leukämie beschrieben (Kowalewski, Schuster et al. 2015).

Aus den vorliegenden Daten konnten jedoch AML-exklusive HLA-Liganden u. a. aus den folgenden Quellproteinen detektiert werden: PASD1, HOXA 9, FLT3, AURKA und CCNA 1.

Der Pas domain containing repressor 1 (PASD1) gilt als Cancer-Testis-Antigen. Dieses Gen kodiert wahrscheinlich für ein Protein, das als Transkriptionsfaktor fungiert. 2010 haben Joseph-Pietras et al im Leukemia über eine Zell-vermittelte *anti-PASD1*-Immunität in Folge einer DNS-basierten Vakzinierung bei Myelom-Patienten berichtet (Joseph-Pietras, Gao et al. 2010).

Homeobox A9 (HOXA9) ist ein Transkriptionsfaktor, der mit der Expansion hämatopoetischer Stammzellen assoziiert ist. Er scheint im Rahmen der akuten myeloischen Leukämie häufig dereguliert und überexprimiert. Daneben wird ihm eine wichtige Rolle für das Fortbestehen der leukämischen Transformation zugeschrieben (Collins and Hess 2016).

Die Zellzyklus-Kinase Aurora Kinase A (AURKA) ist eine Serin/Threonin-Kinase. Sie ist an verschiedenen Prozessen rund um die Mitose u. a. am Aufbau des Spindelapparats beteiligt (www.genecards.org/cgi-bin/carddips.pl?gene=AURKA; abgerufen am 29.3.2017).

Das Cyclin A1 (CCNA1) gehört zu Familie der Cycline. Diese fungieren als Regulatoren der Cyklin-abhängigen Kinasen, welche ihrerseits sowohl bei Transkriptionsprozessen als auch der Kontrolle des Zellzyklus eine Rolle spielen. Cyclin A 1 wird insbesondere von Hoden- und Hirngewebe, sowie einigen

leukämischen Zelllinien exprimiert (www.genecards.org/cgi-bin/carddips.pl?gene=CCNA1 abgerufen am 29.3.2017).

Aufgrund ihres besonderen Status als Tumor-exklusive LiTAPs etablierter LAA wurden erste grob-orientierende, funktionelle Charakterisierungen für einige dieser Peptide durchgeführt. Die bisherigen Analysen lieferten jedoch keinen Hinweis auf ein immuntherapeutisch relevantes, immunogenes Potential.

Diese Beobachtungen unterstützen den Verdacht einer suboptimalen Targetauswahl der vergangenen Impfstudien, welche als ein Faktor des bisher mäßigen klinischen Erfolgs aktiver Immuntherapie der akuten myeloischen Leukämie diskutiert wird.

4.1.3 Diskussion der Ergebnisse der Analysen zum immunogenen Potential ausgewählter Peptide

Die Massenspektrometrie-basierte Analyse lieferte erste tiefere Einblicke in das HLA-Ligandom der AML-Patienten. Ob die identifizierten LiTAPs auch in der Lage sind, spezifische robuste und reproduzierbare T-Zell-Antworten auslösen, ist damit allerdings noch nicht beantwortet. Die Immunogenität der Impfkandidaten bildet jedoch die grundlegende Voraussetzung für eine effiziente T-Zell-vermittelte Krebsimmuntherapie (Cheever, Allison et al. 2009).

Dabei korreliert das immunogene Potential eines Peptids weder mit der Anzahl der präsentierten Peptid-HLA-Komplexe, noch mit der bioinformatisch bestimmbaren Bindungsaffinität eines Peptids zum HLA-Molekül. Die Immunogenität muss somit empirisch getestet werden. Als robuster Marker gilt die Anzahl induzierbarer T-Zellklone bzw. detektierbarer T-Zell-Antworten.

Erste orientierende Untersuchungen des immunogenen Potentials wurden im Rahmen dieser Arbeit für eine Gruppe ausgewählter Peptide durchgeführt. Diese Analysen konzentrierten sich auf den *in vitro*-Nachweis von Gedächtniszellantworten, sog. memory cell responses. Für keines der getesteten Peptide ließ sich in den Analysen des Probenmaterials gesunder Spender eine memory-T-Zell-Antwort nachweisen.

Im Falle der Detektion einer positiven T-Zellreaktion wäre ein betreffendes Peptid zunächst aus den weiteren Experimenten ausgeschlossen worden. In weiteren Analysen wäre es hinsichtlich potentieller Sequenzhomologien mit bekannten, pathogenen Strukturen untersucht und anschließend neu bewertet worden. Insbesondere

Homologien zu Antigenen weitverbreiteter viraler und bakterieller Pathogene, z.B. Epstein-Barr- oder Cytomegalie-Virus, könnten sich für die weiteren Vakzinentwicklungsprozess als interessant und nützlich herausstellen.

Im Gegensatz dazu gelang es jedoch für eine kleine Gruppe HLA-A*03 restringierter Sequenzen, getestet als Peptidmix, in 33 % der diesbezüglich untersuchten AML-Patienten ohne vorherige Vakzinierung eine CD8⁺ T-Zellreaktion zu zeigen.

Nachfolgend sollen die Quellproteine dieser AML-LiTAP-Pools P'1 und P'2 kurz beleuchtet werden.

Das *Amyloid-Precursor-like Protein 2* (APLP2), Mitglied der Amyloid-Precursor Proteinfamilie, ist ein hochkonserviertes Typ-1 transmembranäres Glykoprotein. Eine APLP2 Überexpression wurde für diverse Tumore, u. a. Pankreas- (Peters, Tuli et al. 2012, Pandey, Rachagani et al. 2015) und Kolonkarzinom (Moss, Doran et al. 2007), beschrieben. In diesem Zusammenhang wurde APLP2 auch mit abnormalem Tumorwachstum, Zellmigration sowie invasivem Verhalten in Verbindung gebracht. Das Amyloid-Precursor-Protein (APP) wird darüber hinaus mit einer erhöhten Zellmigration sowie extramedullärer Infiltration assoziiert (Jiang, Yu et al. 2013). Über welche Signalwege APP und APLP2 ihre Effekte in Tumorzellen vermitteln ist aktuell noch unklar (Pandey, Sliker et al. 2016). Die pathophysiologische und klinische Bedeutung des APLP2 für die AML ist bisher noch ungeklärt und bedarf in Zukunft genauerer Untersuchung.

Die *Diacylglycerol Kinase ζ* (DGKZ) ist an verschiedenen Regulations- und Aktivierungsprozessen von Immunzellen beteiligt. Sie spielt u. a. eine wichtige Rolle in der Entwicklung, Aktivierung und Anergie-Induktion von Effektor-T-Zellen, der Gedächtniszellbildung sowie in der Entwicklung regulatorischer T-Zellen (Olenchock, Guo et al. 2006). Verschiedene Studien haben die Bedeutung dieser Kinase für die CD8⁺T-Zell-vermittelte Antitumorreaktion untersucht. Dabei zeichnete sich bisher jedoch der Trend einer immunsuppressiven Wirkung in Folge hoher DGKZ-Spiegel ab (Riese, Grewal et al. 2011, Riese, Wang et al. 2013). Dem gegenüber erschienen DGKZ-defiziente Mäuse aufgrund reduzierterer Sensitivität gegenüber TGF-β zu deutlich potenteren T-Zellreaktionen in der Lage. Die Bedeutung des DGKZ für die Pathogenese, Therapie und Klinik der AML ist bisher noch ungeklärt und verbleibt ein Forschungsgegenstand zukünftiger Untersuchungen.

Der FAS-assoziierte Faktor 1 (FAF1) interagiert mit FAS, einem Mitglied der Tumornekrose-Rezeptor-Familie. FAS und sein Ligand vermitteln den programmierten Zelltod (Menges, Altomare et al. 2009). So wird FAF1 bisher eine pro-apoptotische Funktion zu geschrieben (Ryu, Chae et al. 1999). Eine Herunterregulation bzw. ein Verlust von FAF1 wird hingegen in einigen Studien mit Tumorentwicklung und -förderung in Verbindung gebracht (Bjorling-Poulsen, Seitz et al. 2003, Hidalgo, Baudis et al. 2005, Bea, Salaverria et al. 2009). NFkB- und Ubitquitin-vermittelte proteasomale Signalwege werden beide negativ durch eine FAF1-Überexpression reguliert (Song, Yim et al. 2005, Park, Moon et al. 2007). NFkB reguliert diverse normale biologische Prozesse wie z. B. Immunantworten, Entzündung, Proliferation und Zellüberleben (Baud and Karin 2009). Etliche Tumore mit erniedrigtem FAF1 Level, z. B. Magenkarzinom, Zervixkarzinom, Multiples Myelom, weisen eine deutlich gesteigerte Aktivität des NFkB-Signalwegs auf (Yeh, Chuang et al. 2003, Lee, Lee et al. 2005, Sartore-Bianchi, Gasparri et al. 2007). Die pathophysiologische und klinische Bedeutung des FAF1 für die AML ist bisher noch ungeklärt. Für ein besseres Verständnis dieser Beobachtungen bedarf es in Zukunft genauerer Untersuchung.

WD repeat-containing protein 45-like (WDR45), auch bekannt als WIPI3, (*WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 3*) gehört zur Familie der *WD 40 repeat Proteine*. *WD 40 repeat Proteine* bilden Schlüsselkomponenten vieler biologischer Prozesse, da sie die Bildung von Multiproteinkomplexen sowie Proteininteraktionen regulieren (Proikas-Cezanne, Waddell et al. 2004). WIPI 3 ist vor allem im Bereich der Proteininteraktion beteiligt. T.Proikas-Cezanne et al. haben 2004 eine erhöhte WIPI 3 mRNA-Konzentration in 60 % ihrer Ovarial- sowie in 70 % ihrer Uteruskarzinomproben beobachtet (Proikas-Cezanne, Waddell et al. 2004). Die pathophysiologische und klinische Bedeutung von WIPI3 für die AML ist bisher noch nicht aufgeklärt und bedarf weiterer Analysen.

Der Krüppel-like Factor 2 (KLF2) gehört zu den Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren. Die Krüppel-like Factor Familie ist an diversen zellulären Prozessen beteiligt, beispielsweise an der Lungenentwicklung, der Regulation der T-Zell-Funktions- und Lebensfähigkeit und der embryonalen Erythropoese. Bei reduziertem KLF2-Spiegeln scheinen T-Zellen verstärkt Apoptoseprozessen zu unterliegen. Dies legt die Vermutung nahe, das KLF2 an der Regulation der T-Zell-Inaktivität bzw. deren Überleben beteiligt

ist (Pearson, Fleetwood et al. 2008). In der Vergangenheit wurde in einigen Studien von einer tendenziell eher tumorsuppressiven Wirkung im Falle einer KLF2-Überexpression berichtet (Yin, Wang et al. 2015, Zhang, Levi et al. 2015, Mao, Chen et al. 2016). Daneben wurde von anderen Gruppen im Rahmen von Genom- und Transkriptomanalysen eine Tumor-fördernde Wirkung eines KLF2-Verlusts beobachtet (Humbert, Halter et al. 2011, Clipson, Wang et al. 2015). Ein besseres Verständnis dieser Eindrücke steht jedoch aktuell noch aus. Die pathophysiologische und klinische Bedeutung von KLF2 für die AML ist bisher noch ungeklärt und bedarf in Zukunft genauerer Analysen.

Diese detektierten positiven T-Zellantworten werden als Hinweis dafür interpretiert, dass die getesteten Peptide *in vivo* spezifische T-Zellantworten auslösen und eine Gedächtniszellantwort in AML-Patienten induzieren konnten. Es muss jedoch an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass eine synergistische Wirkung der Peptide auf die PBMCs in Folge einer Peptidpool-Stimulation als Ursache für die detektierten Antworten nicht ausgeschlossen werden kann. Aufgrund der geringen verfügbaren Materialmenge konnte eine differenziertere und genauere Untersuchung der detektierten Antwort leider nicht vorgenommen werden. Dieser Umstand sollte jedoch in nachfolgenden Untersuchungen berücksichtigt werden.

Bisher konnten die Gedächtniszellantworten nur in einem kleinen Kollektiv, mäßig ausgeprägt detektiert werden. Allerdings darf nicht vergessen werden, dass in diesen Fällen die Erzeugung der primären Immunantwort (priming) in einem immunsupprimierten Organismus ohne Vakzinierung erfolgte. Ein zusätzlicher, möglicher Erklärungsansatz für den fehlenden Nachweis einer T-Zellreaktion in K1 (Kohorte der massenspektrometrisch-analysierten AML-Patienten) könnte in der hohen Antigenlast bzw. -exposition mit nachfolgender Aktivierungs-induzierter Apoptose bestehen (Arens and Schoenberger et al. 2010, Wherry et al. 2011). Transiente LiTAP-spezifische T-Zellantworten könnten auf diese Weise unter Umständen nicht erfasst worden sein.

Der erfolgreiche Nachweis einer spezifischen Gedächtniszellantwort trotz beeinträchtigter, reduzierter Funktion des Abwehrsystems (in Folge immunsuppressiver Therapie bzw. Tumor-vermittelter peripherer Toleranz) kann als Hinweis dafür

aufgefasst werden, dass eine bestehende T-Zellantwort durch eine Vakzinierung verstärkt bzw. unter veränderten immunologischen/klinischen Rahmenbedingungen (für K1 z. B. ein optimiertes Effektor-Ziel-Zell-Verhältnis) in AML-Patienten sogar induziert werden könnte.

Vor dem Hintergrund einer Tumor-vermittelten peripheren Toleranz (→T-Zellanergie) bzw. einer therapeutisch induzierten Immunsuppression kann ein ausbleibendes *in vivo* priming bzw. ein fehlender Nachweis einer Gedächtniszellreaktivierung jedoch nicht automatisch mit einem Mangel immunogenen Potentials der getesteten Peptide gleichgesetzt werden. Zukünftig sollten deshalb klassische Untersuchungen bezüglich der Immunogenität der getesteten Peptide durchgeführt werden. Diese erfolgen normalerweise in Form von *in vitro* assays aus dem Blut freiwilliger, gesunder Spender und sollten u. a. TCR-Repertoireanalysen, *in vitro* Priming-Versuche naiver, allogener T-Zellen und funktionelle Charakterisierungen (u. a. bzgl. Zytokinproduktion und zytotoxischen Potentials) umfassen.

Darüber hinaus gilt es außerdem zu beachten, dass für die meisten Patienten, deren Proben im Rahmen dieser Untersuchung analysiert wurden, eingangs leider keine Immunozeptidomanalysen durchgeführt werden konnten. Ein erfolgloser Versuch nach Peptidstimulation eine Gedächtniszellreaktivierung nachzuweisen, könnte somit auch durch fehlende Präsentation der getesteten LiTAPs im Immunzeptidom der entsprechend untersuchten Patienten begründet sein.

Insgesamt sind die durchgeführten Tests daher eher als prinzipielles Screening zu verstehen.

Obwohl auch nicht-mutierten Selbst-Peptiden seit langem das Potential zugeschrieben wird T-Zell-vermittelte-Anti-Tumorreaktionen auslösen zu können (van der Bruggen, Traversari et al. 1991), sind die zu Grunde liegenden immunologischen Mechanismen bisher nicht wirklich aufgeklärt. Die Erkennung von Selbstantigenen durch T-Zellen beruht vermutlich vor allem auf dem Prinzip der Kreuzreaktivität und einer unvollständigen, negativen Selektion während der T-Zellreifung im Thymus. Eine Ursache für eine unzureichende Negativselektion könnte durch eine Tumor-bedingte, veränderte zelluläre Proteinprozession sowie -degradierung mit nachfolgend verändertem HLA-Präsentationsmuster begründet sein. Dieser Hypothese sollte in zukünftigen Experimenten nachgegangen werden. Neben T-Zellrezeptor-Repertoires

sollten auch die Affinitäten der Rezeptoren zu den getesteten Selbstpeptiden im Vergleich zu mutierten Peptiden analysiert werden. Darüber hinaus sollten die zellulären Prozesse näher untersucht werden, die zu einer Tumor-exklusiven Antigenpräsentation im AML-Immunpeptidom führen. Außerdem sollte die Frage geklärt werden, ob im Thymus von AML-Patienten eine Tumor-spezifische Antigenprozessierung erfolgt. Anderenfalls könnte nicht-mutierten Selbstpeptiden eventuell eine annähernd vergleichbare Immunogenität wie Neoantigenen attribuiert werden. Die mehrfach aufgestellte Hypothese einer reduzierten TCR-Affinität zu diesen nicht mutierten Selbst-Peptiden (Klein, Kyewski et al. 2014) wäre dann wahrscheinlich hinfällig.

Die präsentierten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sowie der Kartierung des Immunpeptidoms von Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie (CLL) unterstützen die These, dass hochfrequent präsentierte LiTAPs (mitunter vielfach) von T-Zellen erkannt werden (Kowalewski et al. 2015). Der Nachweis spezifischer, T-Zell-vermittelter anti-Tumor-Antworten ohne zuvor stattgehabte Vakzinierung kann eindeutig als Beleg eines *in vivo* erfolgten T-Zell-Primings interpretiert werden. Im Fall der 2015 veröffentlichten CLL-Studie von Kowalewski et al (Kowalewski et al. 2015) trugen diese detektierten T-Zellreaktionen nachweislich zur Krankheitskontrolle bei. Auch die Ergebnisse der Phase-II-Impf-Studie für das klarzellige Nierenzellkarzinom mit dem Peptidcocktail IMA 901 (Walter, Weinschenk et al. 2012) unterstreichen die Bedeutung und Effektivität dieser Art von Antigenen. Walter und Kollegen gelang es zudem, eine positive Korrelation zwischen der Anzahl an Vakzinierungen mit der Zahl detektierter spezifischer T-Zell-Antworten sowie dem Gesamtüberleben nachzuweisen. An dieser Stelle sollte jedoch nicht unerwähnt bleiben, dass die Kombination des Cocktails mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Sunitinib (First-Line-Treatment für das klarzellige Nierenzellkarzinom) keinen signifikant-positiven Effekt auf das Gesamtüberleben der Patienten in der durchgeführten Phase-III-Studie zeigte (Rini et al. 2016). Eine mögliche Erklärung für diesen Umstand besteht in der mangelnden Spezifität des verwendeten Tyrosin-Kinase-Inhibitors. Sunitinib könnte somit neben Tumorgenese-relevanten Rezeptor-Tyrosinkinasen, wie z.B. VEGFR, PDGFR/β, RET und c-Kit (Mannavola and Coco et al. 2007), auch diverse an der T-Zellaktivierung beteiligte Kinasen (z.B. die SRC-Kinasen ICK und FYN) inhibiert bzw.

in ihrer Funktionalität beeinträchtigt haben. Genauere Untersuchungen zu dieser Hypothese stehen derzeit jedoch noch aus.

4.2 Diskussion der HLA-Klasse II-Ligandomanalysen

In der Vergangenheit wurde im Rahmen diverser Arbeiten wiederholt auf die Bedeutung der CD4⁺-T-Zellen für die Induktion, Aufrechterhaltung sowie Unterstützung einer zellulären Antitumorantwort hingewiesen (Schoenberger, Toes et al. 1998, Perez-Diez, Joncker et al. 2007, Greiner, Ono et al. 2012). Dem zur Folge sollte eine Multipeptidvakzine idealerweise auch HLA-Klasse-II-Peptide beinhalten. Dank ihres promiskuitiven Bindungsverhaltens könnte bereits eine vergleichsweise kleine Anzahl entsprechend immunogener HLA-Klasse-II-Peptide zur effektiven Ergänzung des Designs einer breit-angelegten, therapeutischen Vakzine ausreichen.

Aus diesem Grund wurden die beschriebenen Analysen des Immunpeptidoms auch auf die HLA-Klasse-II-Peptide ausgedehnt.

Im Verlauf dieser Arbeit wurde eine Datenbank aufgebaut mit deren Hilfe 396 AML-Quellproteine identifiziert werden konnten. Aus diesen Ergebnissen ist ein Panel von 36 LiTAAs hervorzuheben, welche ihrerseits durch 152 verschiedene LiTAPs repräsentiert werden. Das α -1-B Glycoprotein (A1BG), repräsentiert durch fünf verschiedene Liganden, ist mit einer Repräsentationsfrequenz von 50% das hochrangigste LiTAA dieses erstellten Rankings. Die Funktion dieses Plasmaproteins ist bisher noch ungeklärt. Es weist bestimmte Sequenzähnlichkeiten mit der variablen Region einer Immunglobulin-Supergenfamilie auf (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=A1BG; EST Profile-Hs.529161>".UniGene. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. Retrieved 2013-05-11; abgerufen am 12. April 2017). Insbesondere hepatisches Gewebe scheint hohe α -1-B Glycoprotein-Expressionsraten aufzuweisen. Als Hinweise auf eine potentielle onkologische Relevanz könnten Berichte über eine erhöhte Expression von α -1-B Glycoprotein im Serum bei nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (NSCLC) sowie im Pankreassaft bei Patienten mit duktalem Pankreas-Adenokarzinom betrachtet werden (Tian, Cui et al. 2008, Liu, Luo et al. 2012).

Aus diesem Pool der TOP 36 LiTAAs wurden entsprechend des oben beschriebenen Verfahrens sieben Peptide für erste orientierende T-Zellanalysen ausgewählt. Für drei der getesteten Peptide konnten *in vitro* in 13,3 %, 20,0 % bzw. 26,7 % der analysierten

AML-Patienten CD4⁺-T-Zell-vermittelte Reaktionen/anti-Tumor-Antworten detektiert werden.

Nachfolgend sollen die Quellproteine dieser drei Sequenzen kurz beleuchtet werden:

Das Transmembranprotein Calsyntenin 1 gehört zur Familie der Cadherine. Es scheint besonders auf der postsynaptischen Membran exzitatorischer Neurone exprimiert zu werden. Funktionell soll es am anterograden Transport bestimmter Vesikeltypen beteiligt sein (Vogt, Schrimpf et al. 2001, Konecna, Frischknecht et al. 2006). Klinisch wurde es bislang vor allem mit Morbus Alzheimer in Verbindung gebracht (Fagerberg, Hallstrom et al. 2014).

RAB5A gehört zur RAS Superfamilie und zählt zu den bedeutenden Regulatoren des intrazellulären Membrantransports. Es ist insbesondere am endosomalen Reifungsprozess beteiligt (Huotari and Helenius 2011). Eine erhöhte Expression könnte mit Malignomen assoziiert sein. Geng D. und Kollegen berichten von einer Überexpression von RAB5A in Zellen des Hepatozellulären Karzinoms sowie entsprechender Zelllinien. Sie beschreiben einen Zusammenhang zwischen dem vorliegenden TMN-Status sowie dieser Überexpression. In dieser Studie wird eine RAB5A Überexpression mit einer erleichterten Zellproliferation sowie einer hochregulierten Cyclin D und E Expression in Verbindung gebracht (Geng, Zhao et al. 2016). Johnson IR et al. berichten hingegen von einer verringerten RAB5A-Expression bei Patienten mit metastasiertem Prostatakarzinom (Fagerberg, Hallstrom et al. 2014).

Das Mannose-bindende Lektin 2 gehört zu den akut-Phase-Proteinen und ist an der Antikörper-unabhängigen Aktivierung des Komplementsystems beteiligt (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4153>; abgerufen am 13. April 2017). Als medizinisch relevant gilt bisher vor allem ein Mangel an MBL2 aufgrund erhöhter Infektanfälligkeit (Fagerberg, Hallstrom et al. 2014).

Die vertiefte Analyse der HLA-Klasse-II-LiTAPs ergab darüber hinaus drei Peptide in deren Sequenz jeweils ein vollständiges HLA-Klasse-I-LiTAP enthalten ist (sog. nested peptides).

Diese Sequenzen leiten sich aus den folgenden Ursprungsproteinen ab: Carboanhydrase 1, verzweigt-kettigen Aminosäure-Transaminase 1 und mitochondriale ATP-Synthase 5L. Die Carbonanhydrase 1 (CA1) gehört zur Familie der Zink-Metalloenzyme. Sie

katalysiert die reversible Hydratation von Carbondioxid und ist somit an diversen biologischen Prozessen, wie z. B. der Atmung beteiligt (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/759>; abgerufen am 12. April 2017).

Vereinzelt wurde von einer potentiellen onkologischen Assoziation berichtet. So schreiben z. B. Zheng, Y. et al. der Carboanhydrase eine mögliche Tumorgenesefördernde Rolle zu (Zheng, Xu et al. 2015).

Der zytosolisch-lokalisierten, verzweigt-kettigen Aminosäure-Transaminase 1 (*branched-chain amino acid transaminase 1 (BCAT1)*) kommt eine essentielle Bedeutung für das Zellwachstum zu (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/58> abgerufen am 12. April 2017). Über eine verstärkte Expression wurde unter anderem im Rahmen von urogenitalen Tumoren, Mamma- sowie nasopharyngealem (Wang, Lu et al. 2016) Karzinom berichtet (Zhou, Feng et al. 2013, Chang, Wu et al. 2016, Oktyabri, Ishimura et al. 2016).

Für die zur Energiegewinnung prinzipiell wichtigen mitochondrialen ATP-Synthasen (ATP5L) ist bisher keine onkologische Assoziation beschrieben (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/10632> abgerufen am 12. April 2017).

Nested peptides stellen bei ausreichender Immunogenität der jeweiligen Einzelliganden dank synergistischer Effekte wahrscheinlich besonders interessante Peptidkandidaten für das Design eines Impfstoffs dar (Melief 2013). Allerdings ist bisher nicht vollständig geklärt, in welchem Umfang und mit welcher Kontinuität die Aktivierung der CD8⁺-Zellen durch nested peptides gewährleistet wird. Dieser Frage sollte in zukünftigen Untersuchungen nachgegangen werden.

4.3 Auf dem Weg zur therapeutischen Anwendung und Ausblick

Beim Blick in die Zukunft sind an dieser Stelle noch viele Fragen offen. Zu den wichtigen und spannenden Aspekten für zukünftige Forschungsprojekte zählen unter anderem:

4.3.1 *Interaktion einer Zytostatikabehandlung mit dem Immunpeptidom*

In Studien der letzten zehn Jahre wurde neben Therapie-assoziierten bzw. -induzierten Genom- und Transkriptomveränderungen (Galmarini, Thomas et al. 2002, Gartel and Tyner 2002, Burgess, Doles et al. 2008, AbuHammad and Zihlif 2013, Hackl, Astanina et al. 2017) auch wiederholt von einer verstärkten MHC-Rezeptor- sowie TAA-Expression in Folge einer zytostatischen Tumorbehandlung berichtet (Gelbard, Garnett et al. 2006, Ramakrishnan, Assudani et al. 2010, Kaneno, Shurin et al. 2011).

Da die Chemotherapie-induzierte Remission (complete remission) aufgrund ihres quantitativ günstigen Verhältnisses von Immuneffektor- zu Zielzellen derzeit als ein guter potentieller Vakzinierungszeitpunkt betrachtet wird, ergibt sich die Frage, welchen qualitativen (und quantitativen) Einfluss die aktuelle (Standard-)Therapie auf das Immunpeptidom der AML-Patienten ausübt. In zukünftigen Analysen sollte das AML-Ligandom unter Verwendung von PB- und KM-Proben auch zusätzlich intensiv im Therapieverlauf sowie nach Abschluss der zytostatischen Behandlung untersucht werden. Vergleichende Betrachtungen solcher Daten mit den vorliegenden Ergebnissen des AML-Immunpeptidoms hinsichtlich der LiTAA/LiTAP-Präsentationsfrequenz sowie -muster und peptidomaler, biochemischer Modifikationen könnten unter Umständen die Peptidselektion für das Design einer Multipeptidvakzine beeinflussen bzw. sinnvoll ergänzen. Im Idealfall könnte auf diese Weise der Entwicklung eines Rezidivs vorgebeugt werden, das sich auf dem Boden zunächst noch kleiner therapieresistenter Zellpopulationen während CR entwickelt. Ferner könnte auch das HLA-Ligandom von Patienten im Rezidiv genauer analysiert werden. Auf diese Weise könnten möglicherweise ergänzende Targets für eine Vakzinierung nach erneutem Erreichen einer Remission identifiziert werden. Insbesondere eine Vakzinierung nach erfolgreich durchgeführter hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSZT) scheint in diesem Fall eine sehr interessante Option.

Dank minimaler Tumorlast und Therapie-induzierter Lymphopenie, die eine schnelle Expansion zytotoxischer T-Zellen ermöglicht, sowie dank „unverbrauchter“ Spender-T-Zellen und einer geringen Anzahl an T_{regs} (in Folge ihrer verzögert stattfindenden Rekonstitution) könnte auf diese Weise bei geschickter Targetauswahl der therapeutisch angestrebte Graft-versus-Leukemia-Effekt durch eine Vakzinierung gezielt und effektiv verstärkt werden (Mackall, Hakim et al. 1997, Ghiringhelli, Menard et al. 2007,

Gameiro, Caballero et al. 2011). In Folge der post-allo-HSZT-induzierten Lymphopenie scheint der Schwellenwert für die T-Zell-Aktivierung abgesenkt und eine Thymus-unabhängige T-Zellproliferation erleichtert (Mackall, Bare et al. 1996, Goldrath and Bevan 1999, Cho, Rao et al. 2000, Clarke and Rudensky 2000, Williams, Hakim et al. 2007).

Eine korrekte Targetauswahl ist in diesem Fall jedoch nicht nur für das Ausnutzen des Potentials einer alloimmun-Reaktion der Spenderzellen gegenüber der Leukämie/MRD unabdingbar; denn es gilt in einer solchen Situation gleichzeitig die Reaktivierung gegenüber miHAs, die zur Auslösung oder Verstärkung einer Graft-versus-Host-Reaktion führen können, zu verhindern (Smits, Berneman et al. 2009).

Geeignete Eptiope könnten sich darüber hinaus zusätzlich zur Generierung und Expansion LiTAP-spezifischer zytotoxischer T-Zellen für eine potentielle Donor-Lymphozyten-Infusions-Therapie als attraktiv erweisen.

4.3.2 Kartierung des Immunopeptidom der Leukämie-Stammzellen

Die Hypothese der sog. Leukämie-Stammzellen (LCS) als Ausgangspunkt der Entwicklung und Aufrechterhaltung der akuten myeloischen Leukämie findet heute in der Fachwelt breite Akzeptanz. Vergleichbar mit der hierarchisch-strukturierten benignen Hämatopoese besteht auch die AML aus hierarchisch-organisierten, malignen Subpopulationen verschiedener Differenzierungsstufen. An der Spitze dieser Hierarchie sollen die LCS stehen. Als wichtiges Charakteristikum dieser Zellen gilt die Fähigkeit der uneingeschränkten Selbsterneuerung. Wahrscheinlich stammen sie nicht nur von den hämatopoetischen Stammzellen (HSZ), sondern auch von determinierten myeloischen Progenitorzellen ab, die eine abnormale Fähigkeit zur Selbsterneuerung erworben haben (Lapidot, Sirard et al. 1994).

Bei der Zellteilung entstehen aus einer Leukämienstammzelle entweder zwei neue Stammzellen (symmetrische Teilung) oder im Rahmen der asymmetrischen Teilung eine Stammzelle und eine differenziertere Progenitorzelle. In-Folge letzterer scheint sich vor allem die große Masse „normaler“ leukämischer Blasten zu entwickeln. Diese haben jedoch die Fähigkeit der Selbsterneuerung verloren (Lapidot, Sirard et al. 1994, Ishikawa, Yoshida et al. 2007, Ayala, Dewar et al. 2009, Wiseman, Greystoke et al.

2014, Zagozdzon and Golab 2015, Ye, Adane et al. 2016, Zhou, Carter et al. 2016, Dohner, Estey et al. 2017).

Leukämienstammzellen sind wahrscheinlich ebenso wie HSCs im Knochenmark ansässig. Bisher kann ihre Häufigkeit nur auf der Grundlage experimenteller Daten geschätzt werden. Aktuell variieren die Schätzungen zwischen 1 LSC auf 500 bis 1 LCS auf 10^7 Zellen. Eine Interaktion mit den Stromazellen der Knochenmarksnische soll ihren Übergang in einen Ruhezustand unterstützen und wahrscheinlich eine reduzierte Empfindlichkeit gegenüber Zytostatika begünstigen (Ishikawa, Yoshida et al. 2007, Ayala, Dewar et al. 2009, Wiseman, Greystoke et al. 2014, Zagozdzon and Golab 2015, Ye, Adane et al. 2016, Zhou, Carter et al. 2016, Dohner, Estey et al. 2017).

In der Fachwelt besteht heute ein weitgehender Konsens über die Resistenz leukämischer Stammzellen gegenüber den konventionellen Therapien. In diesem Zusammenhang wird ihnen auch eine wichtige Bedeutung im Rahmen der minimalen residuellen Resterkrankung (MRD) und Rezidiventwicklung zugeschrieben (Ishikawa, Yoshida et al. 2007).

Deshalb müssen zukünftige Therapien mit dem Ziel eine langfristige Remission oder Heilung zu erreichen, gezielt auch diese Zellpopulation ins Visier nehmen. Die etablierten Behandlungsstrategien sind derzeit v. a. auf die Eliminierung bzw. Reduktion der Tumormasse und kaum/nicht auf die Eradikation der Tumorstammzellen ausgerichtet.

Eine effiziente Elimination der LSCs und somit eine dauerhafte Remission gelingt aktuell für viele Patienten nur durch eine T-Zell-vermittelte Zytotoxizität v. a. im Rahmen einer Stammzelltransplantation (GvL). Aufgrund der hohen Therapieassoziierten Toxizität in Folge der Übertragung eines kompletten T-Zell-Repertoires ist die Stammzelltransplantation jedoch auch durch eine hohe Morbidität und Mortalität gekennzeichnet. Durch gezielte Expansion einiger T-Zellen definierter Spezifität könnte eine Peptidvakzinierung einen anti-LSC-Effekt ohne begleitende Alloimmunphänomene ermöglichen (Ishikawa, Yoshida et al. 2007, Ayala, Dewar et al. 2009, Wiseman, Greystoke et al. 2014, Zagozdzon and Golab 2015, Ye, Adane et al. 2016, Zhou, Carter et al. 2016, Dohner, Estey et al. 2017). Dies setzt jedoch eine selektive Epitop-Expression voraus (d.h. eine hohe Expression auf den LSCs und keine bzw. minimale in gesundem Gewebe, insbesondere der hämatopoetischen Stammzellen). Die

Untersuchung der Tumorstammzellen hat sich zu einem wichtigen Bereich der Krebsforschung entwickelt. Dennoch fehlt es bislang an geeigneten, LSC-exklusiven Epitopen. Die Integration der Ligandomdaten benigner hämatopoetischer Vorläuferzellen aus den BMNC-Proben gesunder Knochenmarkspender (Walz, Stickel et al. 2015) in die Auswertungen und Analysen dieser Arbeit kann als Teilschritt für die Identifikation derartiger, hoch-selektiver LiTAPs betrachtet werden. In zukünftigen Projekten sollte der Kartierung des LSC-Immunpeptidoms große Bedeutung beigemessen sowie das Ziel verfolgt werden, entsprechend geeignete Sequenzen für das Design einer Multipeptidvakzine bevorzugt zu berücksichtigen. Die Identifikation geeigneter Epitope könnte neben der Peptidvakzinierung zusätzlich auch den Einsatz monoklonaler Antikörper und CARs zur LSC-Eliminierung ermöglichen.

4.3.3 Neoantigene

Im Rahmen dieser Arbeit lag der Fokus auf der Identifikation sog. „nicht-mutierter Selbst-Peptide“. Die verwendete Strategie erweist sich als ungeeignet für die Identifikation von HLA-Liganden mutierter, AML-spezifischer Genprodukte geeignet. Solche sog. Neoantigene müssten jedoch vom Immunsystem als eindeutig fremd erkannt werden, weshalb ihnen, zumindest theoretisch, ein sehr hohes immunogenes Potential zugeschrieben wird (Robbins, Lu et al. 2013, van Rooij, van Buuren et al. 2013). Trotz intensiver Anstrengung stehen die Bemühungen Peptide solcher Neoantigene als natürlich präsentierte HLA-Liganden im Rahmen direkter, Massenspektrometrie-basierter Immunpeptidomanalysen zu identifizieren noch relativ am Anfang. Bassani-Sternberg und Kollegen berichten jedoch 2016 in *Nature Communications* in einer Melanomstudie (n=25 Patienten) über erste, erfolgreiche Identifikationen natürlich präsentierte HLA-Klasse-I- und -II Peptide, die eine Mutation im Immunpeptidom abbilden (Bassani-Sternberg, Braunlein et al. 2016). Allerdings basieren auch diese bisherigen Versuche noch auf vergleichsweise immens Zeit- und Kosten-intensiven Prozessen (Wang and Riviere 2015, Bassani-Sternberg, Braunlein et al. 2016, Walker and Johnson 2016).

Abgesehen von allen vermeintlichen Vorteilen bergen Neoantigene jedoch auch etliche Herausforderungen. Aus diesem Grund sind sie für einen generellen Einsatz im Rahmen von Vakzinierungen (aktuell) vermutlich nur eingeschränkt verwendbar (Wang and Riviere 2015, Walker and Johnson 2016).

In Hinblick auf die Auftretsfrequenz der Neoantigene besteht zwischen den verschiedenen Tumorentitäten eine große Variationsbreite. Das maligne Melanom ist zum Beispiel durch vergleichsweise hohe Mutationsraten charakterisiert (1000-fach erhöht) (Lawrence, Stojanov et al. 2013). Andere Tumore, u. a. die AML, weisen entsprechend der jeweiligen Tumorbiologie verhältnismäßig niedrige bis sehr niedrige Mutationsfrequenzen auf. Die mediane Mutationsfrequenz wurde mit 0,37/Megabasen veranschlagt (Lawrence, Stojanov et al. 2013, Hackl, Astanina et al. 2017). Darüber hinaus resultieren aus einer Mutation ganz allgemein betrachtet nur verhältnismäßig wenige T-Zell-Epitope. Die Präsentationswahrscheinlichkeit einer Mutation im AML-Immuneptidom erscheint daher relativ gering.

Ferner sind die meisten Tumore durch eine hohe inter- und intraindividuelle biologische Heterogenität und Variabilität gekennzeichnet. Häufig besteht die Leukämie eines Patienten aus verschiedenen Subklonen, deren jeweiliger Anteil sich im Krankheitsverlauf ändern kann (= hohe intraindividuelle Heterogenität und Variabilität) (Shen, Zhu et al. 2011, Mrozek, Marcucci et al. 2012, Lawrence, Stojanov et al. 2013, Hackl, Astanina et al. 2017). Dieser Aspekt wurde bereits für die qualitative HLA-Subtypanalyse beleuchtet.

Neben der starken Tumorindividualität gilt es auch den Patienten-spezifischen HLA-Allotyp zu berücksichtigen. Er stellt einen wichtigen Faktor für die Individualität des Immuneptidoms dar. Er determiniert einerseits biologische und biochemische Eigenschaften der präsentierten Peptide. Andererseits beeinflusst er nicht unerheblich das jeweilige Quellproteom. Bei Abteilungs-internen Betrachtungen der bisherigen Ergebnisse der qualitativen Analyse eines bestimmten Gewebetyps z. B. von Leukozyten unterschiedlicher Spender mit verschiedenen HLA-Allotypen zeigten sich nur geringgradige Überlappungen (10–20 %). Dieser Eindruck wurde von Untersuchungen anderer Gewebearten (z. B. Niere, Leber, Ovar) der Arbeitsgruppe bestätigt.

Mit zunehmender Übereinstimmung der individuellen HLA-Merkmale ließ sich die Überlappung der jeweiligen einzelnen Quellproteome jedoch deutlich steigern. Vor diesem Hintergrund einer scheinbar HLA-Allotyp-restringierten Präsentation scheint die vielfache Detektion individuell gefundener Neoantigene im Immuneptidom verschiedener Patienten zusätzlich deutlich erschwert.

In der Zusammenschau unterstreichen diese Punkte die Bedeutung der in dieser Arbeit verfolgten Analyse von Selbstpeptiden für das Design einer Multipeptidvakzine.

Aufgrund ihres vermeintlich beträchtlichen Potentials sollten dennoch zukünftig die Bemühungen um die Neoantigenidentifikation auf Ligandom-Ebene durch direkte MS-basierte Analysen konsequent weiterverfolgt werden. Insbesondere vermeintliche Epitope, die sich aus Produkten sog. *Drivermutationen* ableiten, würden wahrscheinlich aufgrund ihrer besonderen pathophysiologischen Bedeutung interessante Targets darstellen. Die Arbeiten von Bassani-Sternberg et al. stärken die Hoffnung, dass zukünftig im Zuge umfangreicherer Kenntnisse des Immunpeptidoms, verbesserter technischer und bioinformatischer Möglichkeiten sowie verbesserter Ansätze zur Targetidentifikation und -auswahl eine direkte Identifikation mutierter, immunogener Peptide technisch und klinisch realistisch erreichbar sein wird. Multipeptidvakzinen, konzipiert auf der Basis des jeweiligen HLA-Typs im Sinne eines Warehouse-Approaches, könnten auf diese Weise individuell um entsprechend geeignete Peptide ergänzt und optimiert werden.

4.3.4 Tumormikromilieu: Immunsuppression und -evasion

Eine suboptimale Auswahl der richtigen Impfpeptidkandidaten bisheriger Vakzinierungsversuche ist wahrscheinlich nur ein Grund für die eher mäßig-erfolgreichen klinischen Ergebnisse der Vergangenheit (Anguille et al., Leukemia 2012). Daneben gelten die eng mit einander verknüpften Mechanismen der Immunsuppression und -evasion im Tumormikromilieu als weitere wichtige Aspekte (Dunn et al.; Schreiber et al.). Wie bereits zu Beginn der vorliegenden Arbeit dargelegt, kreieren viele Tumore ein immunsuppressives Milieu (TME). Wichtige Mechanismen stellen hierbei z. B. 1) die vermehrte bzw. dauerhafte Expression inhibitorischer Moleküle wie z. B. PD1 oder TIM3 (Zhou, Munger et al. 2011, Romero 2016) durch T-Zellen und 2) eine deutlich vermehrte Sekretion immunsuppressiver Zytokine wie TGF- β und IL-10 bei einem erhöhten Anteil an regulatorischen T-Zellen (u. a. stimuliert durch Tumor-assoziierte Makrophagen, TAM) dar.

Da das Tumormikromilieu (TME) ein wesentliches Hindernis für den Erfolg immuntherapeutischer Behandlungsformen darstellt, umfasst die moderne

Krebsimmuntherapie neben der Aktivierung und Unterstützung des Abwehrsystems der Patienten noch eine zweite Säule: Zahlreiche neue Behandlungsansätze konzentrieren sich auf die Wiederherstellung einer effektiven anti-Tumor-Antwort durch gezielte Adressierung bzw. Antagonisierung immunsuppressiver Mechanismen.

Eine theoretisch denkbare Option besteht in der Depletion regulatorischer T-Zellen. Immunphänotypisch sind diese vor allem als CD4⁺, CD25⁺, FOXP3⁺ Zellen charakterisiert. Versuche der Tumor-bedingten Immunsuppression auf diesem Wege beizukommen, basierten bisher vor allem auf dem Einsatz monoklonaler anti-CD25 Antikörper, z. B. Daclizumab. CD25 ist jedoch Bestandteil des Interleukin-2-Rezeptors, der konstitutiv auf T_{regs} sowie nach Aktivierung auch auf T-Effektorlymphozyten exprimiert wird. Der klinische Einsatz eines Treg-selektiven Antikörper steht zur Zeit noch aus.

Daneben scheint auch die pharmakologische TGF- β -Antagonisierung ein attraktiver Ansatz. Der TGF- β mAB Fresolimumab wurde bereits in der Therapie des klarzelliges Nierenzellkarzinoms sowie Melanoms eingesetzt. Vorläufige Daten weisen auf eine effektive Antitumorwirkung hin.

Eine effektive, potente Immunreaktion erfordert die Anwesenheit kostimulatorischer Reize. Gleichzeitig müssen koinhibitorische Signale, wie beispielsweise CTLA-4, PD-1 und TIM3 abwesend sein. Die physiologische Aufgabe solcher inhibitorischen Moleküle besteht im Schutz des Organismus vor überschießenden Immun- bzw. Autoimmunreaktionen. Ihre Überexpression durch Tumore ermöglicht jedoch die Ausbildung eines immunsupprimierenden Milieus. Eine gezielte therapeutische Blockade koinhibitorischer Signale mittels monoklonaler Antikörper hebt die erzeugte Immunsuppression teilweise auf. Insbesondere der PD-1/PD-L1 sowie der TIM3-Signalweg scheinen diesbezüglich für die AML-Therapie relevant.

Während PD-L1 von Stroma-, Tumor- und Antigen-präsentierenden Zellen exprimiert wird, findet sich der Oberflächenmarker PD-1 auf T-Lymphozyten. Die Ligand-Rezeptorbindung führt zur T-Zellanergie, woraus eine verminderte Effektor-T-Zellaktivität resultiert. Beide Komponenten können gezielt durch monoklonale Antikörper antagonisiert werden. In der Melanomtherapie werden z. B. bereits die anti-PD-1-AK Pembrolizumab und Nivolumab erfolgreich eingesetzt. Darüberhinaus

scheinen PD1/PD-L1-Inhibitoren auch die Anzahl und Aktivität regulatorischer T-Zellen im TME zu reduzieren.

TIM3 wird physiologisch auf den Th₁ und CD8⁺-Zellen als negativer, bremsender Regulator immunologischer Reaktionen exprimiert. TIM3 und PD-1 scheinen gehäuft koexprimiert zu werden. Eine kombinierte Blockade zeigte in Tiermodellen bereits eine stärkere anti-Tumor-Antwort bzw. Tumorunterdrückung als eine jeweilige Monotherapie. Derzeit ist noch kein therapeutischer Inhibitor dieser beiden Signalwege für die Behandlung von AML-Patienten zu gelassen. Systemische Nebenwirkungen bereits zugelassener Medikamente stellen auch noch deutliche Herausforderungen für die Zukunft dar. Dennoch liegen die Vorteile einer Kombination von Checkpoint-Inhibitoren und Peptidvakzinierung für eine effektive Immuntherapie auf der Hand. Ferner könnte durch ihre Verwendung die klinische Effektivität potentiell präexistenter, AML-spezifischer T-Zellen deutlich gesteigert werden.

Deshalb sollte für potentielle spätere Impfstudien diese Verknüpfungsmöglichkeit zusätzlich neben dem Einsatz etablierter Immunadjuvanzen, wie beispielsweise GM-CSF oder Montanide, als Maßnahme zur Effektivitätssteigerung geprüft werden.

Mit zunehmender Erforschung der Wirkung konventioneller Therapien auf das Immunsystem mehren sich die Hinweise, dass der Radiotherapie und einigen Chemotherapeutika immunmodulierende Eigenschaften zugeschrieben werden können. Diese Effekte könnten eventuell zur Steigerung Vakzin-vermittelter, anti-Tumor-Reaktionen genutzt werden. Immunmodulierende Effekte sind jedoch wahrscheinlich Substanz- und Dosis-abhängig. Eine potentielle Synergie wird deshalb auch durch den Kombinationszeitpunkt bzw. die verwendeten, spezifischen Vakzinen beeinflusst.

Mögliche immunmodulatorische Effekte der Chemotherapeutika umfassen u. a. die gesteigerte Expression von Tumorantigenen, Adhäsions- und MHC-Molekülen, wodurch Krebszellen eine erhöhte Sensibilität gegenüber immunologischer Reaktionen aufweisen (Gelbard, Garnett et al. 2006).

Daneben steigern einige Zytostatika, wie beispielsweise die in der AML-Therapie verwendeten Anthrazykline, in Folge des verursachten immunogenen Zelltods (ICD) prinzipiell die Antigenpräsentation (Zitvogel, Kepp et al. 2011, Galluzzi, Buque et al. 2015). Im Rahmen der Freisetzung sog. Danger-Signale (DAMPs) erfolgt eine IL-12 vermittelte Aktivierung dendritischer Zellen. Nachfolgend können dank *Cross-priming*

Tumor-spezifische, zytotoxische T-Zellen generiert werden. Diese ließen sich unter Umständen für eine spätere Vakzinierung therapeutisch nutzen.

B. Moshaver und Kollegen schrieben 2008 dem ebenfalls in der AML-Therapie verwendeten Cytarabin die Fähigkeit zu, den leukämieprotektiven Effekt der Knochenmarksstromazellen in dosisabhängiger Form zu reduzieren (Moshaver, van der Pol et al. 2008).

Ferner scheinen manche zytotoxischen Substanzen, u.a. das zur Konditionierung verwendete Cyclophosphamid, einen direkten Einfluss auf immunmodulatorische Zellsubgruppen wie z. B. regulatorische T-Zellen (T_{regs}) und MDSCs zu nehmen (Machiels, Reilly et al. 2001, Lutsiak, Semnani et al. 2005, Leao, Ganesan et al. 2008). Dabei erweckt Cyclophosphamid den Eindruck einen stärkeren klinischen Effekt auf regulatorische, als Effektor-T-Zellen ausüben. Ghiringhelli et al. berichten von einer Depletion zirkulierender T_{regs} bei gleichzeitiger Rekonstitution der Effektorzellfunktion. Diese Beobachtung ist vermutlich durch die schnellere Regeneration der Effektor-T-Zellen begründet. Dies würde eine immunologische Tumorantwort begünstigen und ein potientes zeitliches Fenster für eine effektive Immuntherapie eröffnen (Mackall, Hakim et al. 1997, Ghiringhelli, Menard et al. 2007, Gameiro, Caballero et al. 2011). Diese Daten unterstützen die Hypothese, dass eine Chemotherapie-induzierte Remission auch durch Reduktion des immunsuppressiven Tumormikromilieus zu einem verstärkten Effekt nachfolgender Vakzinierungen beitragen könnte.

Um die Heilungschancen bzw. die therapeutisch verlängerte Lebenszeit sowie die erzielte Lebensqualität für die Patienten weiter deutlich zu verbessern, scheint in der Zusammenschau aller Aspekte ein multimodaler Therapieansatz eine realistische Option. Neben der Zytoreduktion und Weiterentwicklung der zielgerichteten Therapeutika unter Berücksichtigung der Tumorbiologie sollte diese Kombination auch das therapeutische Überwinden der Tumor-bedingten Immunsuppression sowie den aktiven Einsatz des Immunsystems gegen Krebs beinhalten.

Die bisher erzielten Ergebnisse auf dem Weg zur Entwicklung einer Multipeptidvakzine für AML-Patienten können als ermutigend betrachtet werden. Die begonnenen Analysen sollten deshalb unter stetiger, kritischer Überprüfung und notwendiger Optimierung fortgeführt sowie u. a. um die aufgezeigten Aspekte erweitert werden. Die Identifikation klinisch relevanter Tumorantigene, die Spezifitätserhöhung, die

Frequenzsteigerung sowie die Verstärkung bestehender und induzierter anti-Tumor-Antworten zählen dabei sicher weiterhin zu den größten Herausforderungen.

Letztlich werden jedoch prospektive klinische Studien benötigt werden, um das Potential und die Grenzen dieser neuen Targets sowie ein optimales Therapieprotokoll zu identifizieren.

Trotz der aktuell noch vielen offenen Fragen sowie der ungelösten Probleme scheint dank des massiven, rasanten Wissens- und Erfahrungszuwachses der Onkologie in den letzten Jahr(zehnt)en die Integration weiterer immuntherapeutischer Behandlungsansätze in die klinische Therapie, im Sinne einer Translation von „bench to bedside“, greifbar nah.

5 Zusammenfassung

Bahnbrechende Entwicklungen im Bereich der Immuntherapie (u.a. Checkpoint-Inhibitoren, CAR-T-Zellen) haben das (klinische) Potential einer T-Zell-basierten Therapie für eine effektive Malignombehandlung deutlich herausgestellt. Vor dem Hintergrund mäßiger 5-Jahresüberlebensraten im Rahmen der akuten Therapieoptionen, der erwiesenen Immunogenität dieser Erkrankung (u.a. im Rahmen der HSCT in Form des Graft-vs-Leukemia-Effekts), sowie des quantitativ günstigen Verhältnisses von Immuneffektor- zu Zielzellen nach Erreichen einer klinischen Remission erscheint eine Peptidvaksinierung ein attraktiver alternativer Behandlungsansatz für dieses Krankheitsbild.

Auf der Grundlage genomischer Analysen und reverser Immunologie wurden bisher einige wenige AML-assoziierte Peptide beschrieben, deren klinische Effektivität jedoch bis dato nicht eindeutig gezeigt werden konnte.

Für die Identifikation physiologisch relevanter Vakzinkandidaten wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals ein direkter Massenspektrometrie-basierter Analyseansatz des natürlich präsentierten HLA-Ligandoms gewählt. Die Kartierung des HLA-Klasse-I-Ligandomes von 15 AML Patienten und 35 gesunden Spendern ergab mehr als 25 000 verschiedene, natürlich präsentierte HLA-Peptide. Die Priorisierung der potentiellen Kandidaten erfolgte v. a. auf der Basis der AML-Exklusivität und einer hohen Präsentationsfrequenz in der AML-Kohorte. Eine Präsentation dieser Peptide konnte Subgruppen-übergreifend in mehr als 20 % der einzelnen AML-Patientenligandome nachgewiesen werden. Darüberhinaus konnten auch einige natürlich präsentierte HLA-Liganden bereits etablierter AML-assoziiierter Antigene identifiziert werden. 80 % dieser Antigene wurden jedoch auch im HLA-Ligandom gesunder Spender detektiert. Im Zuge der HLA-Klasse-II-Ligandom-Kartierung von 12 AML-Patienten und 13 PBMC-Spendern wurden über 1 000 verschiedene Quellproteine identifiziert. Ein Vergleich des HLA-exklusiven Quellproteoms beider Klassen ergab 43 gemeinsame Proteine, sowie drei HLA-Klasse-I-Liganden, deren Sequenz vollständig in ihren Klasse-II-Pendants enthalten war.

Eine grob-orientierend durchgeführte, funktionelle Charakterisierung ausgewählter Peptidkandidaten beider HLA-Klassen lieferte erste Hinweise auf eine AML-spezifische Immunogenität einiger im Rahmen dieser Arbeit definierter Antigene.

6 Anhang

Tabelle 6.1 Übersicht über die Top 132 HLA-Klasse-I-LiTAAAs und ihre korrespondierenden LiTAPs. Diese 132 Quellproteine weisen eine Repräsentationsfrequenz von mindestens $\geq 20\%$ unter allen analysierten AML Patienten (n=15) auf. Die HLA-Annotation erfolgte durch *in silico* Motivvorhersage unter Verwendung von SYFPEiTHI sowie einer internen Datenbank.

Protein/Peptide	Anzahl positive getesteter AML - Patienten [Anzahl in %]	PSM	HLA -Typ
FAF1 Fas (TNFRSF6) associated factor 1	8 [53.3%]	41	
AEQFRLEQI	1	4	B*44
FTAEFSSRY	2	7	A*03
HHDESVLTNVF	3	21	B*38:01
REQDEAYRL	1	1	B*44:25
RPVMPSRQI	1	1	B*07
VQREYNLNF	1	7	B*15
PLXND1 plexin D1	7 [46.7%]	25	
GQLPITIQQ	1	13	B*13:02
RAYADEVAV	1	2	B*51:01
REDKPPLAV	1	1	B*49:01
RVKDLDTKEY	2	5	B*15
SEQEMNAHL	1	2	B*44:25
YVLPVHSL	1	2	A*02
LPLRFWVNI	1	1	B*51:01
GMNN geminin, DNA replication inhibitor	6 [40.0%]	20	
EVAEHVQYM	3	14	A*26:01
YMAELIERL	3	6	A*02
CPQ carboxypeptidase Q	6 [40.0%]	28	
ALASLIRSV	5	27	A*02
TVAEITGSKY	1	1	A*26:01
ATP5L ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial Fo complex, subunit G	5 [33.3%]	68	
EIIGKRGIIQY	4	67	A*26, A*03:01
NLVEKTPAL	1	1	A*02
ITGA5 integrin, alpha 5	5 [33.3%]	67	
IEDKAQILL	3	55	B*49:01/ B*40
SIYDDSYLGY	1	11	A*26:01
TTNHPINPK	1	1	A*11
SKP1 S-phase kinase-associated protein 1	5 [33.3%]	8	
NAAILKKV	2	2	B*51:01
NYLDIKGLL	1	1	A*24
YLDIKGLLDV	2	5	A*02
CHD1L chromodomain helicase DNA binding protein 1-like	5 [33.3%]	70	
EEVGDFIQRY	1	2	B*44:03
EVGDFIQRY	4	67	A*26:01, A*03
MKDLSLGGVL	1	1	--
TGFBRAP1 transforming growth factor, beta receptor associated protein 1	5 [33.3%]	18	
DEFITVHSM	1	5	B*18:01
EFITVHSMI	2	6	A*23:01
QLDVRLEI	1	1	B*13:02
TQYIIHNY	1	6	B*15
NGLY1 N-glycanase 1	5 [33.3%]	39	
EVVDVTWRY	4	37	A*26, A*03:01
KEALLRDTI	1	2	B*49:01
APLP2 amyloid beta (A4) precursor-like protein 2	5 [33.3%]	94	
HGYENPTYK	4	92	A*03
SLLYKVPYV	1	2	A*02
KIF2C kinesin family member 2C	5 [33.3%]	52	
AEIPLRMV	1	14	B*49:01
EVVYRFTAR	1	2	A*66
FPGLAIKI	2	10	B*51:01
IYNGKLFDL	1	1	A*24
IYNGKLFDLL	1	7	A*24
KEIDVISI	1	2	B*49:01
LEEQASRQI	1	13	B*49:01
TRMSTVSEL	1	3	B*39:01
ELP3 elongator acetyltransferase complex subunit 3	5 [33.3%]	6	
SEETFRFEL	1	4	B*40
KLYPTLVIR	4	2	A*03
DGKZ diacylglycerol kinase, zeta	5 [33.3%]	48	

Protein/Peptide	Anzahl positive getesteter AML - Patienten [Anzahl in %]	PSM	HLA -Typ
ALRNQATMVQK	2	1	A*03:01
	3		
LLDHAPPEI	3	47	A*02
MTCH2 mitochondrial carrier 2	5 [33.3%]	29	
GVLGTVVHGK	4	11	A*03:01
VQFIGRESKY	1	18	B*15
SLC31A2 solute carrier family 31 (copper transporter), member 2	4 [26.7%]	41	
GQSLIHVI	1	2	B*52:15
VHSPAGMAL	1	12	B*38:01
VLYEGIKVGK	4	27	A*03
ERLIN1 ER lipid raft associated 1	4 [26.7%]	14	
AVIEAEKIAQV	2	10	A*02
DRIEIVNML	1	2	B*39:01
IEAEKIAQV	1	2	B*49:01
SERPINB2 serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 2	4 [26.7%]	22	
IEDLKAQIL	1	4	B*49:01
YLLESVNKL	3	18	A*02
ABHD2 abhydrolase domain containing 2	4 [26.7%]	19	
HRIYVPLML	1	1	B*39:01
KEYIPPLIW	1	1	B*44:03
MDKLVVEY	2	17	B*15
GAA glucosidase, alpha; acid	4 [26.7%]	19	
ALLGHILLH	1	3	A*03:01
ALLPHLYTL	2	6	A*02
HVAGETVAR	1	9	A*66
KVWPGSTAF	1	1	A*32
OPRL1 opiate receptor like 1	4 [26.7%]	24	
ETAVAILRF	4	24	A*26, A*03:01
WDR45B WD repeat domain 45B	4 [26.7%]	34	
RVYNTDPLKEK	4	34	A*03
TUFM Tu translation elongation factor, mitochondrial	4 [26.7%]	52	
IGVEHVVVY	4	48	C*12:03
RQIGVEHVV	1	4	B*15
MFAP1 microfibrillar-associated protein 1	4 [26.7%]	7	
DVFERPSAKK	1	2	A*66
EEFQFIKKA	2	4	B*40:02, B*50
THLVDQDTSF	1	1	B*38
ZNF543 zinc finger protein 543	4 [26.7%]	24	
ESADLIQHY	4	24	A*26, A*03:01
STK4 serine/threonine kinase 4	4 [26.7%]	115	
EIIKEISIM	3	102	A*26
SVSDIIRLR	1	13	A*66
ZKSCAN8 zinc finger with KRAB and SCAN domains 8	4 [26.7%]	5	
AVSLIREEW	2	2	A*32
GEKSESISV	1	2	B*49:01
FLTILPEEL	1	1	A*02:01
FNDC3B fibronectin type III domain containing 3B	4 [26.7%]	12	
ILWETVPSM	1	4	A*02:01
LPVRTLSI	1	1	B*51:01
RESEYKQVY	1	5	B*44:03
SESLPVRTL	1	2	B*40
TMEM164 transmembrane protein 164	4 [26.7%]	24	
RLLESVVVL	1	2	A*02:01
RPEGKESL	1	21	B*07
THGKLVILF	2	1	B*38
THOC7 THO complex 7 homolog	4 [26.7%]	52	
KELEHLSHI	1	17	B*49:01
REMENYEKI	2	31	B*49:01 B*44:25
VLLSTIHEL	2	4	A*02
KLF2 Kruppel-like factor 2	4 [26.7%]	41	
KTYTKSSHLK	4	41	A*03
TMEM126B transmembrane protein 126B	4 [26.7%]	30	
EIIKKNFDY	3	15	A*26
GTEEAPKVK	1	1	A*11
KLMAIPLVF	1	14	B*15
UFD1L ubiquitin fusion degradation 1 like	4 [26.7%]	10	
DIKRGIPN	1	1	Fragment
DIKRGIPNY	1	1	A*26
FLDITNPKA	2	8	A*02
MUL1 mitochondrial E3 ubiquitin protein ligase 1	4 [26.7%]	13	
ALYSVYRQK	2	2	A*03

Protein/Peptide	Anzahl positive getesteter AML - Patienten [Anzahl in %]	PSM	HLA -Typ
KVLALVFGF	1	6	B*15
SFTDVIHGY	1	5	A*29
VCPIP1 valosin containing protein (p97)/p47 complex interacting protein 1	4 [26.7%]	9	
ASAAASGGLLK	3	5	A*03:01
ALLGVTGAPK	1	4	A*03
FAM46A family with sequence similarity 46, member A	4 [26.7%]	11	
DEIKTLQRY	1	2	B*18:01
EAYVQKMV	1	4	B*51:01
VLHQDSGLGY	1	4	B*15
YLQNHVGL	1	1	A*02
KIF20B kinesin family member 20B	4 [26.7%]	8	
AEIEDIRVL	1	4	B*44:25
GQSRLIFTY	1	1	B*15
READFKETL	2	3	B*49:01, B*40
CSF3R colony stimulating factor 3 receptor (granulocyte)	4 [26.7%]	16	
DTMGPSQHVY	1	3	A*26
ESRGPALTR	1	9	A*66
FQLPGLGTPPIT	1	1	C*12:03
RIQGYVSW	1	3	A*32
NOC4L nucleolar complex associated 4 homolog	4 [26.7%]	25	
LLDPSVFHV	3	24	A*02
RFFHLADLF	1	1	A*23:01
EMILIN2 elastin microfibril interfacier 2	4 [26.7%]	34	
DSISGNLQR	1	15	A*66
ETEQTIQKL	1	1	--
FLYPFLSHL	1	1	A*02
TLDQKIERV	3	17	A*02:01
SHANK3 SH3 and multiple ankyrin repeat domains 3	4 [26.7%]	35	
DADSRATV	1	1	B*51:01
DHEGFGFVL	1	1	B*38:01
GEAVKLSI	1	13	B*49:01
NATDLLKVL	2	20	C*12:03
UCK2 uridine-cytidine kinase 2	4 [26.7%]	4	
KEITEGKTV	1	1	B*40:02
YRQKQVVIL	2	2	C*07
VAINLIVQH	1	1	A*03:01
PHPT1 phosphohistidine phosphatase 1	4 [26.7%]	27	
SQDKKIHVY	1	7	B*15
YHADIYDKV	3	20	B*38, B*39:01
KIF15 kinesin family member 15	4 [26.7%]	15	
DAIKVFVRI	1	1	B*51:01
LEKAFSEI	1	6	B*49:01
MEKSDKNQ	1	1	--
GQTGSGKTF	1	7	B*15
SLC12A6 solute carrier family 12 (potassium/chloride transporter), member 6	4 [26.7%]	10	
DTSPDLSSR	1	4	A*66
KLNEIVNKK	3	6	A*03
DOLK dolichol kinase	4 [26.7%]	9	
FAQIISVALI	1	2	A*02
IIFDRPLLY	3	7	A*03:01, A*29
EEF2K eukaryotic elongation factor-2 kinase	3 [20.0%]	7	
DAVNQNTKLL	1	1	A*02
HHILADVSL	1	5	B*38:01
YPSEKRGEL	1	1	B*07
PIK3R2 phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 2 (beta)	3 [20.0%]	8	
SVVDLINHY	3	8	A*26
TMEM194A transmembrane protein 194A	3 [20.0%]	10	
EIIKDTKY	2	9	A*26
ENEKLEKEL	1	1	--
CCS copper chaperone for superoxide dismutase	3 [20.0%]	4	
ILGGPGTVQGV	3	4	A*02
ZNF264 zinc finger protein 264	3 [20.0%]	11	
ESAALIHYY	2	10	A*26
YQRETPQV	1	1	B*52:15
LYRM1 LYR motif containing 1	3 [20.0%]	10	
ARIEIGLHY	1	2	B*27:05
IPYPRPIHL	2	8	B*07, B*51:01
NBN nibrin	3 [20.0%]	8	
DVSGKTALNQ	1	1	--
TEFRSLVI	1	4	B*49:01

Protein/Peptide	Anzahl positive getesteter AML - Patienten [Anzahl in %]	PSM	HLA -Typ
TLKSGDGITF	1	3	B*15
TIPRL TIP41, TOR signaling pathway regulator-like	3 [20.0%]	5	
HEADKTYML	1	1	B*40
KFFEEVLLF	1	3	A*23:01
RVMPSFFL	1	1	A*02:01
RPS6KA4 ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 4	3 [20.0%]	20	
YELDLREPAL	2	18	B*40
GAYGKVFLV	1	2	A*02:01
RCBTB2 regulator of chromosome condensation (RCC1) and BTB (POZ) domain containing protein 2	3 [20.0%]	37	
DHDLLKNF	2	21	B*38
EELQLIRQA	1	16	B*44
PAK4 p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 4	3 [20.0%]	5	
AEELLKHPF	2	4	A*32
GRVKLSDFGF	1	1	B*27:01
ERCC1 excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1 (includes overlapping antisense sequence)	3 [20.0%]	4	
KSNSIIVSPR	3	4	A*03
DMD dystrophin	3 [20.0%]	5	
ETLERLQEL	1	2	A*02:01
KDDELSRQ	1	1	--
LQQTNSEKI	1	2	B*13:02
UNG uracil-DNA glycosylase	3 [20.0%]	21	
GEFGKPYFI	1	17	B*49:01
KDVKVVL	1	2	B*40:02
RPVPPPSL	1	2	B*07
CPA3 carboxypeptidase A3	3 [20.0%]	41	
KEDIPGRHSY	1	1	B*44:02
KETKAVTNF	1	1	B*44:03
YEILHDL	3	39	B*44:02, B*44:03, B*18:01
C3AR1 complement component 3a receptor 1	3 [20.0%]	9	
FAKSQSKTF	2	5	A*03, A*32
LPFSLAHL	1	4	B*51:01
TAF9 TAF9 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor	3 [20.0%]	22	
APNYRLKSL	1	3	B*07
ILKDMGITEY	2	19	A*66, A*32
FSCN1 fascin homolog 1, actin-bundling protein	3 [20.0%]	20	
AHDDGRWSL	1	2	B*38
KYLTAEAFGF	2	18	A*23:01
ZNF805 zinc finger protein 805	3 [20.0%]	11	
ESAALIHYY	2	10	A*26
YQRETPQV	1	1	B*52:15
CLEC12A C-type lectin domain family 12, member A	3 [20.0%]	5	
EELQRNISL	1	1	B*44:25
RPAALFTL	1	1	B*07
SEELQRNISL	1	3	B*40
SLX4IP SLX4 interacting protein	3 [20.0%]	12	
ETIDSRVQEY	3	12	A*26
RLTPR RGD motif, leucine rich repeats, tropomodulin domain and proline-rich containing	3 [20.0%]	25	
EVSEQILHM	3	25	A*26
RNF19B ring finger protein 19B	3 [20.0%]	17	
GTLSSGILSSGK	1	3	A*03
GVPIMLAY	2	14	--
DDX46 DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 46	3 [20.0%]	9	
EEVKEEVKKF	2	2	B*44:25, B*44:03
KTIALLPMF	1	7	A*32
LRRC8D leucine rich repeat containing 8 family, member D	3 [20.0%]	38	
EVTNIPK _m	3	38	A*26
C16orf62 chromosome 16 open reading frame 62	3 [20.0%]	5	
IHGDTVQNQL	2	4	B*38:01
RTMVKTLEY	1	1	A*03:01
GOLGA7 golgin A7	3 [20.0%]	6	
ETVRTLNNLY	3	6	A*26
RHOT1 ras homolog family member T1	3 [20.0%]	16	
HSIDKVTSR	2	15	A*66

Protein/Peptide	Anzahl positive getesteter AML - Patienten [Anzahl in %]	PSM	HLA -Typ
VSNPKSFEY	1	1	A*32
BBS1 Bardet-Biedl syndrome 1	3 [20.0%]	10	
GLGPTFKL	1	1	A*02:01
NKGISDIKIV	1	2	--
TSTTRPVL	1	7	A*32
CEP76 centrosomal protein 76kDa	3 [20.0%]	11	
VLGGKAFLEHL	1	1	A*02
YEFERTTSI	2	10	B*49:01
GANC glucosidase, alpha; neutral C	3 [20.0%]	9	
YLDFTNPKV	3	9	A*02
ATP8B4 ATPase, class I, type 8B, member 4	3 [20.0%]	65	
IPAVARTTTL	1	1	B*07
KQQLLEDSI	1	42	B*15
KTTDTVSSF	1	22	A*32
PPIL4 peptidylprolyl isomerase (cyclophilin)-like 4	3 [20.0%]	18	
DYLDGVHTVF	2	12	A*23:01
YLDGVHTVF	1	6	B* 15:01
HPT1 choline phosphotransferase 1	3 [20.0%]	14	
TYVSGMLRF	1	2	A*23:01
DAIDGKQAR	2	12	A*66
CHTF18 CTF18, chromosome transmission fidelity factor 18 homolog	3 [20.0%]	3	
DPMAPGVQGSLL	1	1	A*26:01
GLDPSQRPK	2	2	A*03
DGCR8 DGCR8 microprocessor complex subunit	3 [20.0%]	5	
IEDSRVYEL	3	5	B*49:01, B*40
ANKS1A ankyrin repeat and sterile alpha motif domain containing 1A	3 [20.0%]	13	
YVHSFLSSGY	3	13	A*26, A*03:01
TOP1MT topoisomerase (DNA) I, mitochondrial	3 [20.0%]	8	
HEYTTKEVF	1	3	B*18:01
KLQEQLAQL	1	1	A*02:01
SIAAKILSY	1	4	A*03:01
PHACTR3 phosphatase and actin regulator 3	3 [20.0%]	5	
KELLAVKL	1	1	B*49:01
KLKQTTSALEK	2	4	A*03
CCDC115 coiled-coil domain containing 115	3 [20.0%]	4	
EVGPREGALR	2	3	A*66
SEAQEGLQKF	1	1	B*44:25
SORCS2 sortilin-related VPS10 domain containing receptor 2	3 [20.0%]	5	
DEAVLFVQV	3	5	B*18:01, B*40
ACCS 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase homolog	3 [20.0%]	18	
EVAKFLSFY	2	15	A*26
KLDQKLPEL	1	2	A*02:01
SVFEKSVGY	1	1	A*26:01
ACBD6 acyl-CoA binding domain containing 6	3 [20.0%]	15	
NEGQTALHY	1	2	B*44:03
VEFPHSPEI	2	13	B*49:01
ORAI3 ORAI calcium release-activated calcium modulator 3	3 [20.0%]	11	
RLQGELQAV	3	11	A*02
SIKE1 suppressor of IKBKE 1	3 [20.0%]	7	
KELRELLSI	1	2	B*49:01
SLVDQSAAL	1	2	A*02:01
LELIMSKY	1	3	B*18:01
C9orf156 chromosome 9 open reading frame 156	3 [20.0%]	38	
DIKPYIAEY	3	38	A*26
EDEM2 ER degradation enhancer, mannosidase alpha-like 2	3 [20.0%]	5	
KLMAMFLEY	1	1	A*03:01
YTVEKREGY	2	4	A*26
NUP85 nucleoporin 85kDa	3 [20.0%]	39	
FEFDIHQVI	2	38	B*49:01
SENPSKHDSF	1	1	B*44:25
PANK2 pantothenate kinase 2	3 [20.0%]	21	
NFLRINTI	1	1	C*02
YSGPTSVSR	1	17	A*66
DIYGGDYERF	1	3	A*26:01
SPATC1L spermatogenesis and centriole associated 1-like	3 [20.0%]	3	
SARLEKLGY	1	1	B*15
YVFPGVTRL	1	1	A*02
YYLNEIQSF	1	1	A*23:01

Protein/Peptide	Anzahl positive getesteter AML - Patienten [Anzahl in %]	PSM	HLA -Typ
IKZF4 IKAROS family zinc finger 4	3 [20.0%]	14	
YHSQDRYEF	3	14	B*39:01
DHX33 DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 33	3 [20.0%]	7	
FPPGRQVVM	2	2	C*12:03
ILDEAHERTI	1	5	A*02
METTL7A methyltransferase like 7A	3 [20.0%]	34	
VIYNEQMASK	3	34	A*03
QTRTD1 queuine tRNA-ribosyltransferase domain containing 1	3 [20.0%]	4	
EATSIKRVR	2	2	A*66
LPEDKPRLI	1	2	B*51:01
TMBIM4 transmembrane BAX inhibitor motif containing 4	3 [20.0%]	22	
KYPLNLYLL	2	20	A*23:01, A*24
VHESPALILLF	1	2	B*38
RAVER2 ribonucleoprotein, PTB-binding 2	3 [20.0%]	10	
EVTGHSKGY	2	8	A*26
RDSEELLQI	1	1	B*40
SPASKTTL	1	1	B*07
SDAD1 SDA1 domain containing 1	3 [20.0%]	20	
DAKTVNVI	1	1	B*51:01
DSNATAAKM	1	15	--
RTLNPQMLQK	1	3	A*03
RTLNPQMLQKK	1	1	A*03
UCKL1 uridine-cytidine kinase 1-like 1	3 [20.0%]	7	
LMAEMGVHSV	1	4	A*02
RLLPPVGTGR	1	1	A*03
VRIGTILIQTNQ	1	2	--
STMN3 stathmin-like 3	3 [20.0%]	35	
KELSVLSLI	1	6	B*49:01
TQPHPNTVY	2	29	B*15
CHIC2 cysteine-rich hydrophobic domain 2	3 [20.0%]	7	
ALEEQLLY	3	7	A*26:01, A*03:01
ODF2L outer dense fiber of sperm tails 2-like	3 [20.0%]	10	
DHFTGAIEKL	2	6	B*38
KILDLETEL	1	4	A*02:01
PRR12 proline rich 12	3 [20.0%]	6	
AEDIPSLKL	2	2	B*40, B*44:25
DIPSLKLAL	1	1	A*26
GLDPNKPPEL	1	3	A*02
FARSA phenylalanyl-tRNA synthetase, alpha subunit	3 [20.0%]	62	
FLRDPAEAL	1	7	A*02
GYGSQGYKY	1	5	A*29
KLLAEVTLK	1	1	A*03:01
SAADGPRVF	1	49	A*32
CTDP1 CTD (carboxy-terminal domain, RNA polymerase II, polypeptide A) phosphatase, subunit 1	3 [20.0%]	14	
KLYELHVFTF	1	10	B*15
YELHVFTF	1	2	B*18:01
YLNKEIEEA	1	2	A*02

7 Literaturverzeichnis

- (1969). "[Treatment of acute granulocytic leukemias with daunomycin]." Eur J Cancer **5**(4): 339-342.
- AbuHammad, S. and M. Zihlif (2013). "Gene expression alterations in doxorubicin resistant MCF7 breast cancer cell line." Genomics **101**(4): 213-220.
- Aguirre-Ghiso, J. A. (2007). "Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy." Nat Rev Cancer **7**(11): 834-846.
- Algar, E. M., T. Khromykh, S. I. Smith, D. M. Blackburn, G. J. Bryson and P. J. Smith (1996). "A WT1 antisense oligonucleotide inhibits proliferation and induces apoptosis in myeloid leukaemia cell lines." Oncogene **12**(5): 1005-1014.
- Anguille, S., E. Lion, E. Smits, Z. N. Berneman and V. F. van Tendeloo (2011). "Dendritic cell vaccine therapy for acute myeloid leukemia: questions and answers." Hum Vaccin **7**(5): 579-584.
- Anguille, S., V. F. Van Tendeloo and Z. N. Berneman (2012). "Leukemia-associated antigens and their relevance to the immunotherapy of acute myeloid leukemia." Leukemia **26**(10): 2186-2196.
- Appay, V., R. A. van Lier, F. Sallusto and M. Roederer (2008). "Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues." Cytometry A **73**(11): 975-983.
- Arber, D. A., A. Orazi, R. Hasserjian, J. Thiele, M. J. Borowitz, M. M. Le Beau, C. D. Bloomfield, M. Cazzola and J. W. Vardiman (2016). "The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia." Blood **127**(20): 2391-2405.
- Arnaud, P. (2002). "[The interferons: pharmacology, mechanism of action, tolerance and side effects]." Rev Med Interne **23 Suppl 4**: 449s-458s.
- Arens, R., and S. P. Schoenberger. 2010. 'Plasticity in programming of effector and memory CD8 T-cell formation', Immunol Rev, 235: 190-205.
- Asemissen, A. M., U. Keilholz, S. Tenzer, M. Muller, S. Walter, S. Stevanovic, H. Schild, A. Letsch, E. Thiel, H. G. Rammensee and C. Scheibenbogen (2006). "Identification of a highly immunogenic HLA-A*01-binding T cell epitope of WT1." Clin Cancer Res **12**(24): 7476-7482.
- Ayala, F., R. Dewar, M. Kieran and R. Kalluri (2009). "Contribution of bone microenvironment to leukemogenesis and leukemia progression." Leukemia **23**(12): 2233-2241.
- Bacher, U., S. Schnittger and T. Haferlach (2010). "Molecular genetics in acute myeloid leukemia." Curr Opin Oncol **22**(6): 646-655.
- Barnstable, C. J., E. A. Jones and M. J. Crumpton (1978). "Isolation, structure and genetics of HLA-A, -B, -C and -DRw (Ia) antigens." Br Med Bull **34**(3): 241-246.
- Bassani-Sternberg, M., E. Braunlein, R. Klar, T. Engleitner, P. Sinitcyn, S. Audehm, M. Straub, J. Weber, J. Slotta-Huspenina, K. Specht, M. E. Martignoni, A. Werner, R. Hein, H. B. D, C. Peschel, R. Rad, J. Cox, M. Mann and A. M. Krackhardt (2016). "Direct identification of clinically relevant neoepitopes presented on native human melanoma tissue by mass spectrometry." Nat Commun **7**: 13404.
- Bassani-Sternberg, M., S. Pletscher-Frankild, L. J. Jensen and M. Mann (2015). "Mass spectrometry of human leukocyte antigen class I peptidomes reveals strong effects of protein abundance and turnover on antigen presentation." Mol Cell Proteomics **14**(3): 658-673.

- Baud, V. and M. Karin (2009). "Is NF-kappaB a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls." *Nat Rev Drug Discov* **8**(1): 33-40.
- Bea, S., I. Salaverria, L. Armengol, M. Pinyol, V. Fernandez, E. M. Hartmann, P. Jares, V. Amador, L. Hernandez, A. Navarro, G. Ott, A. Rosenwald, X. Estivill and E. Campo (2009). "Uniparental disomies, homozygous deletions, amplifications, and target genes in mantle cell lymphoma revealed by integrative high-resolution whole-genome profiling." *Blood* **113**(13): 3059-3069.
- Beatty, G. L., J. S. Smith, R. Reshef, K. P. Patel, T. A. Colligon, B. A. Vance, N. V. Frey, F. B. Johnson, D. L. Porter and R. H. Vonderheide (2009). "Functional unresponsiveness and replicative senescence of myeloid leukemia antigen-specific CD8+ T cells after allogeneic stem cell transplantation." *Clin Cancer Res* **15**(15): 4944-4953.
- Beck, S. and J. Trowsdale (1999). "Sequence organisation of the class II region of the human MHC." *Immunol Rev* **167**: 201-210.
- Berlin, C., D. J. Kowalewski, H. Schuster, N. Mirza, S. Walz, M. Handel, B. Schmid-Horch, H. R. Salih, L. Kanz, H. G. Rammensee, S. Stevanovic, and J. S. Stickel. 2015. 'Mapping the HLA ligandome landscape of acute myeloid leukemia: a targeted approach toward peptide-based immunotherapy', *Leukemia*, 29: 647-59
- Bijker, M. S., S. J. van den Eeden, K. L. Franken, C. J. Melief, R. Offringa and S. H. van der Burg (2007). "CD8+ CTL priming by exact peptide epitopes in incomplete Freund's adjuvant induces a vanishing CTL response, whereas long peptides induce sustained CTL reactivity." *J Immunol* **179**(8): 5033-5040.
- Bjorling-Poulsen, M., G. Seitz, B. Guerra and O. G. Issinger (2003). "The pro-apoptotic FAS-associated factor 1 is specifically reduced in human gastric carcinomas." *Int J Oncol* **23**(4): 1015-1023.
- Boehm, U., T. Klamp, M. Groot and J. C. Howard (1997). "Cellular responses to interferon-gamma." *Annu Rev Immunol* **15**: 749-795.
- Boniface, J. J. and M. M. Davis (1995). "T-cell recognition of antigen. A process controlled by transient intermolecular interactions." *Ann N Y Acad Sci* **766**: 62-69.
- Borghans, J. A., J. B. Beltman and R. J. De Boer (2004). "MHC polymorphism under host-pathogen coevolution." *Immunogenetics* **55**(11): 732-739.
- Brichard, V., A. Van Pel, T. Wolfel, C. Wolfel, E. De Plaen, B. Lethe, P. Coulie and T. Boon (1993). "The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas." *J Exp Med* **178**(2): 489-495.
- Britten, C. M., C. Gouttefangeas, M. J. Welters, G. Pawelec, S. Koch, C. Ottensmeier, A. Mander, S. Walter, A. Paschen, J. Muller-Berghaus, I. Haas, A. Mackensen, T. Kollgaard, P. thor Straten, M. Schmitt, K. Giannopoulos, R. Maier, H. Veelken, C. Bertinetti, A. Konur, C. Huber, S. Stevanovic, T. Wolfel and S. H. van der Burg (2008). "The CIMT-monitoring panel: a two-step approach to harmonize the enumeration of antigen-specific CD8+ T lymphocytes by structural and functional assays." *Cancer Immunol Immunother* **57**(3): 289-302.
- Brouwer, R. E., P. van der Heiden, G. M. Schreuder, A. Mulder, G. Datema, J. D. Anholts, R. Willemze, F. H. Claas and J. H. Falkenburg (2002). "Loss or downregulation of HLA class I expression at the allelic level in acute leukemia is infrequent but functionally relevant, and can be restored by interferon." *Hum Immunol* **63**(3): 200-210.
- Büchner, T., W. E. Berdel, B. Wörmann, C. Schoch, T. Haferlach, S. Schnittger, W. Kern, C. Aul, E. Lengfelder, A. Schumacher, A. Reichle, P. Staib, L. Balleisen, H.

- Eimermacher, A. Grüneisen, H. Rasche, M. C. Sauerland, A. Heinecke, R. M. Mesters, H. L. Serve, J. Kienast and W. Hiddemann (2005) "Treatment of older patients with AML." Critical Reviews in Oncology / Hematology **56**(2): 247-259.
- Buchner, T., W. Hiddemann, C. Schoch, T. Haferlach, M. C. Sauerland and A. Heinecke (2001). "Acute myeloid leukaemia (AML): treatment of the older patient." Best Pract Res Clin Haematol **14**(1): 139-151.
- Burgess, D. J., J. Doles, L. Zender, W. Xue, B. Ma, W. R. McCombie, G. J. Hannon, S. W. Lowe and M. T. Hemann (2008). "Topoisomerase levels determine chemotherapy response in vitro and in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(26): 9053-9058.
- Burnet, F. M. (1967). "Immunological aspects of malignant disease." Lancet **1**(7501): 1171-1174.
- Burnet, F. M. (1970). "The concept of immunological surveillance." Prog Exp Tumor Res **13**: 1-27.
- Burnet, M. (1957). "Cancer; a biological approach. I. The processes of control." Br Med J **1**(5022): 779-786.
- Burnett, A. K., D. Milligan, A. G. Prentice, A. H. Goldstone, M. F. McMullin, R. K. Hills and K. Wheatley (2007). "A comparison of low-dose cytarabine and hydroxyurea with or without all-trans retinoic acid for acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome in patients not considered fit for intensive treatment." Cancer **109**(6): 1114-1124.
- Burnett, A. K., N. H. Russell, A. E. Hunter, D. Milligan, S. Knapper, K. Wheatley, J. Yin, M. F. McMullin, S. Ali, D. Bowen and R. K. Hills (2013). "Clofarabine doubles the response rate in older patients with acute myeloid leukemia but does not improve survival." Blood **122**(8): 1384-1394.
- Cabrero, M., E. Jabbour, F. Ravandi, Z. Bohannan, S. Pierce, H. M. Kantarjian and G. Garcia-Manero (2015). "Discontinuation of hypomethylating agent therapy in patients with myelodysplastic syndromes or acute myelogenous leukemia in complete remission or partial response: retrospective analysis of survival after long-term follow-up." Leuk Res **39**(5): 520-524.
- Callahan, M. K., M. A. Postow and J. D. Wolchok (2016). "Targeting T Cell Co-receptors for Cancer Therapy." Immunity **44**(5): 1069-1078.
- Campoli, M. and S. Ferrone (2008). "HLA antigen changes in malignant cells: epigenetic mechanisms and biologic significance." Oncogene **27**(45): 5869-5885.
- Cebinelli, G. C., D. E. S. P. N, M. M. Sena, D. E. O. CE, T. C. Fujita, D. A. R. SP, D. E. A. O. FJ, P. C. Marinello and M. A. Watanabe (2016). "Immunotherapy in Acute Leukemias: Implications and Perspectives Using Wt1 Antigen." Anticancer Res **36**(8): 3795-3802.
- Chang, I. W., W. J. Wu, Y. H. Wang, T. F. Wu, P. I. Liang, H. L. He, B. W. Yeh and C. F. Li (2016). "BCAT1 overexpression is an indicator of poor prognosis in patients with urothelial carcinomas of the upper urinary tract and urinary bladder." Histopathology **68**(4): 520-532.
- Chatila, T., L. Silverman, R. Miller and R. Geha (1989). "Mechanisms of T cell activation by the calcium ionophore ionomycin." J Immunol **143**(4): 1283-1289.
- Cheever, M. A., J. P. Allison, A. S. Ferris, O. J. Finn, B. M. Hastings, T. T. Hecht, I. Mellman, S. A. Prindiville, J. L. Viner, L. M. Weiner and L. M. Matrisian (2009). "The prioritization of cancer antigens: a national cancer institute pilot project for the acceleration of translational research." Clin Cancer Res **15**(17): 5323-5337.

- Chicz, R. M., R. G. Urban, J. C. Gorga, D. A. Vignali, W. S. Lane and J. L. Strominger (1993). "Specificity and promiscuity among naturally processed peptides bound to HLA-DR alleles." *J Exp Med* **178**(1): 27-47.
- Cho, B. K., V. P. Rao, Q. Ge, H. N. Eisen and J. Chen (2000). "Homeostasis-stimulated proliferation drives naive T cells to differentiate directly into memory T cells." *J Exp Med* **192**(4): 549-556.
- Clark, R. E., I. A. Dodi, S. C. Hill, J. R. Lill, G. Aubert, A. R. Macintyre, J. Rojas, A. Bourdon, P. L. Bonner, L. Wang, S. E. Christmas, P. J. Travers, C. S. Creaser, R. C. Rees and J. A. Madrigal (2001). "Direct evidence that leukemic cells present HLA-associated immunogenic peptides derived from the BCR-ABL b3a2 fusion protein." *Blood* **98**(10): 2887-2893.
- Clarke, S. R. and A. Y. Rudensky (2000). "Survival and homeostatic proliferation of naive peripheral CD4+ T cells in the absence of self peptide:MHC complexes." *J Immunol* **165**(5): 2458-2464.
- Clipson, A., M. Wang, L. de Leval, M. Ashton-Key, A. Wotherspoon, G. Vassiliou, N. Bolli, C. Grove, S. Moody, L. Escudero-Ibarz, G. Gundem, K. Brugger, X. Xue, E. Mi, A. Bench, M. Scott, H. Liu, G. Follows, E. F. Robles, J. A. Martinez-Climent, D. Oscier, A. J. Watkins and M. Q. Du (2015). "KLF2 mutation is the most frequent somatic change in splenic marginal zone lymphoma and identifies a subset with distinct genotype." *Leukemia* **29**(5): 1177-1185.
- Cobbold, M., H. De La Pena, A. Norris, J. M. Polefrone, J. Qian, A. M. English, K. L. Cummings, S. Penny, J. E. Turner, J. Cottine, J. G. Abelin, S. A. Malaker, A. L. Zaring, H. W. Huang, O. Goodyear, S. D. Freeman, J. Shabanowitz, G. Pratt, C. Craddock, M. E. Williams, D. F. Hunt and V. H. Engelhard (2013). "MHC class I-associated phosphopeptides are the targets of memory-like immunity in leukemia." *Sci Transl Med* **5**(203): 203ra125.
- Coley, W. B. (1891). "II. Contribution to the Knowledge of Sarcoma." *Ann Surg* **14**(3): 199-220.
- Collins, C. T. and J. L. Hess (2016). "Role of HOXA9 in leukemia: dysregulation, cofactors and essential targets." *Oncogene* **35**(9): 1090-1098.
- Cortes, J. E., H. Kantarjian, J. M. Foran, D. Ghirdaladze, M. Zodelava, G. Borthakur, G. Gammon, D. Trone, R. C. Armstrong, J. James and M. Levis (2013). "Phase I study of quizartinib administered daily to patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia irrespective of FMS-like tyrosine kinase 3-internal tandem duplication status." *J Clin Oncol* **31**(29): 3681-3687.
- Couzin-Frankel, J. (2013). "Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy." *Science* **342**(6165): 1432-1433.
- Cresswell, P., M. J. Androlewicz and B. Ortmann (1994). "Assembly and transport of class I MHC-peptide complexes." *Ciba Found Symp* **187**: 150-162; discussion 162-159.
- Crowgey, E. L., A. Matlock, V. Venkatraman, J. Fert-Bober, and J. E. Van Eyk. 2017. 'Mapping Biological Networks from Quantitative Data-Independent Acquisition Mass Spectrometry: Data to Knowledge Pipelines', *Methods Mol Biol*, 1558: 395-413.
- Crowther, D., C. J. Bateman, C. P. Vartan, J. M. Whitehouse, J. S. Malpas, G. H. Fairley and R. B. Scott (1970). "Combination chemotherapy using L-asparaginase, daunorubicin, and cytosine arabinoside in adults with acute myelogenous leukaemia." *Br Med J* **4**(5734): 513-517.

- Dalgleish, A. and H. Pandha (2007). "Tumor antigens as surrogate markers and targets for therapy and vaccines." Adv Cancer Res **96**: 175-190.
- Davidson, T. S., R. J. DiPaolo, J. Andersson and E. M. Shevach (2007). "Cutting Edge: IL-2 is essential for TGF-beta-mediated induction of Foxp3+ T regulatory cells." J Immunol **178**(7): 4022-4026.
- de Martino, M., C. Taus, I. S. Wessely, I. Lucca, S. L. Hofbauer, A. Haitel, S. F. Shariat and T. Klatter (2015). "The T309G murine double minute 2 gene polymorphism is an independent prognostic factor for patients with renal cell carcinoma." DNA Cell Biol **34**(2): 107-112.
- Dohner, H., E. Estey, D. Grimwade, S. Amadori, F. R. Appelbaum, T. Buchner, H. Dombret, B. L. Ebert, P. Fenaux, R. A. Larson, R. L. Levine, F. Lo-Coco, T. Naoe, D. Niederwieser, G. J. Ossenkoppele, M. Sanz, J. Sierra, M. S. Tallman, H. F. Tien, A. H. Wei, B. Lowenberg and C. D. Bloomfield (2017). "Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel." Blood **129**(4): 424-447.
- Dohner, H., D. J. Weisdorf and C. D. Bloomfield (2015). "Acute Myeloid Leukemia." N Engl J Med **373**(12): 1136-1152.
- Dombret, H., J. F. Seymour, A. Butrym, A. Wierzbowska, D. Selleslag, J. H. Jang, R. Kumar, J. Cavenagh, A. C. Schuh, A. Candoni, C. Recher, I. Sandhu, T. Bernal del Castillo, H. K. Al-Ali, G. Martinelli, J. Falantes, R. Noppeney, R. M. Stone, M. D. Minden, H. McIntyre, S. Songer, L. M. Lucy, C. L. Beach and H. Dohner (2015). "International phase 3 study of azacitidine vs conventional care regimens in older patients with newly diagnosed AML with >30% blasts." Blood **126**(3): 291-299.
- Dotti, G., B. Savoldo and M. Brenner (2009). "Fifteen years of gene therapy based on chimeric antigen receptors: "are we nearly there yet?"" Hum Gene Ther **20**(11): 1229-1239.
- Dudley, M. E., J. R. Wunderlich, P. F. Robbins, J. C. Yang, P. Hwu, D. J. Schwartzentruber, S. L. Topalian, R. Sherry, N. P. Restifo, A. M. Hubicki, M. R. Robinson, M. Raffeld, P. Duray, C. A. Seipp, L. Rogers-Freezer, K. E. Morton, S. A. Mavroukakis, D. E. White and S. A. Rosenberg (2002). "Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes." Science **298**(5594): 850-854.
- Dunn, G. P., A. T. Bruce, H. Ikeda, L. J. Old and R. D. Schreiber (2002). "Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape." Nat Immunol **3**(11): 991-998.
- Dunn, G. P., L. J. Old and R. D. Schreiber (2004). "The three Es of cancer immunoediting." Annu Rev Immunol **22**: 329-360.
- Englert, C., X. Hou, S. Maheswaran, P. Bennett, C. Ngwu, G. G. Re, A. J. Garvin, M. R. Rosner and D. A. Haber (1995). "WT1 suppresses synthesis of the epidermal growth factor receptor and induces apoptosis." Embo j **14**(19): 4662-4675.
- Estey, E. and H. Dohner (2006). "Acute myeloid leukaemia." Lancet **368**(9550): 1894-1907.
- Fagerberg, L., B. M. Hallstrom, P. Oksvold, C. Kampf, D. Djureinovic, J. Odeberg, M. Habuka, S. Tahmasebpoor, A. Danielsson, K. Edlund, A. Asplund, E. Sjostedt, E. Lundberg, C. A. Szgyarto, M. Skogs, J. O. Takanen, H. Berling, H. Tegel, J. Mulder, P. Nilsson, J. M. Schwenk, C. Lindskog, F. Danielsson, A. Mardinoglu, A. Sivertsson, K. von Feilitzen, M. Forsberg, M. Zwahlen, I. Olsson, S. Navani, M. Huss, J. Nielsen, F. Ponten and M. Uhlen (2014). "Analysis of the human tissue-

- specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics." *Mol Cell Proteomics* **13**(2): 397-406.
- Falk, K., O. Rotzschke, S. Stevanovic, G. Jung and H. G. Rammensee (1991). "Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules." *Nature* **351**(6324): 290-296.
- Feyerabend, S., S. Stevanovic, C. Gouttefangeas, D. Wernet, J. Hennenlotter, J. Bedke, K. Dietz, S. Pascolo, M. Kuczyk, H. G. Rammensee and A. Stenzl (2009). "Novel multi-peptide vaccination in Hla-A2+ hormone sensitive patients with biochemical relapse of prostate cancer." *Prostate* **69**(9): 917-927.
- Fircanis, S., P. Merriam, N. Khan and J. J. Castillo (2014). "The relation between cigarette smoking and risk of acute myeloid leukemia: an updated meta-analysis of epidemiological studies." *Am J Hematol* **89**(8): E125-132.
- Forbes, E. K., C. Sander, E. O. Ronan, H. McShane, A. V. Hill, P. C. Beverley and E. Z. Tchilian (2008). "Multifunctional, high-level cytokine-producing Th1 cells in the lung, but not spleen, correlate with protection against Mycobacterium tuberculosis aerosol challenge in mice." *J Immunol* **181**(7): 4955-4964.
- Galluzzi, L., A. Buque, O. Kepp, L. Zitvogel and G. Kroemer (2015). "Immunological Effects of Conventional Chemotherapy and Targeted Anticancer Agents." *Cancer Cell* **28**(6): 690-714.
- Galmarini, C. M., X. Thomas, F. Calvo, P. Rousselot, M. Rabilloud, A. El Jaffari, E. Cros and C. Dumontet (2002). "In vivo mechanisms of resistance to cytarabine in acute myeloid leukaemia." *Br J Haematol* **117**(4): 860-868.
- Gameiro, S. R., J. A. Caballero, J. P. Higgins, D. Apelian and J. W. Hodge (2011). "Exploitation of differential homeostatic proliferation of T-cell subsets following chemotherapy to enhance the efficacy of vaccine-mediated antitumor responses." *Cancer Immunol Immunother* **60**(9): 1227-1242.
- Garfall, A. L., M. V. Maus, W. T. Hwang, S. F. Lacey, Y. D. Mahnke, J. J. Melenhorst, Z. Zheng, D. T. Vogl, A. D. Cohen, B. M. Weiss, K. Dengel, N. D. Kerr, A. Bagg, B. L. Levine, C. H. June and E. A. Stadtmauer (2015). "Chimeric Antigen Receptor T Cells against CD19 for Multiple Myeloma." *N Engl J Med* **373**(11): 1040-1047.
- Gartel, A. L. and A. L. Tyner (2002). "The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis." *Mol Cancer Ther* **1**(8): 639-649.
- Geginat, J., M. Paroni, F. Facciotti, P. Guarin, I. Kastirr, F. Caprioli, M. Pagani and S. Abrignani (2013). "The CD4-centered universe of human T cell subsets." *Semin Immunol* **25**(4): 252-262.
- Gelbard, A., C. T. Garnett, S. I. Abrams, V. Patel, J. S. Gutkind, C. Palena, K. Y. Tsang, J. Schlom and J. W. Hodge (2006). "Combination chemotherapy and radiation of human squamous cell carcinoma of the head and neck augments CTL-mediated lysis." *Clin Cancer Res* **12**(6): 1897-1905.
- Geng, D., W. Zhao, Y. Feng and J. Liu (2016). "Overexpression of Rab5a promotes hepatocellular carcinoma cell proliferation and invasion via FAK signaling pathway." *Tumour Biol* **37**(3): 3341-3347.
- Ghiringhelli, F., C. Menard, P. E. Puig, S. Ladoire, S. Roux, F. Martin, E. Solary, A. Le Cesne, L. Zitvogel and B. Chauffert (2007). "Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4+CD25+ regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients." *Cancer Immunol Immunother* **56**(5): 641-648.

- Gill, S., S. K. Tasian, M. Ruella, O. Shestova, Y. Li, D. L. Porter, M. Carroll, G. Danet-Desnoyers, J. Scholler, S. A. Grupp, C. H. June and M. Kalos (2014). "Preclinical targeting of human acute myeloid leukemia and myeloablation using chimeric antigen receptor-modified T cells." *Blood* **123**(15): 2343-2354.
- Goldrath, A. W. and M. J. Bevan (1999). "Low-affinity ligands for the TCR drive proliferation of mature CD8⁺ T cells in lymphopenic hosts." *Immunity* **11**(2): 183-190.
- Goswami, M., N. Hensel, B. D. Smith, G. T. Prince, L. Qin, H. I. Levitsky, S. A. Strickland, M. Jagasia, B. N. Savani, J. W. Fraser, H. Sadrzadeh, T. Rajkhowa, S. Ito, N. A. Jain, M. Battiwalla, A. T. Fathi, M. J. Levis, A. J. Barrett and C. S. Hourigan (2014). "Expression of putative targets of immunotherapy in acute myeloid leukemia and healthy tissues." *Leukemia* **28**(5): 1167-1170.
- Greiner, J., L. Bullinger, B. A. Guinn, H. Dohner and M. Schmitt (2008). "Leukemia-associated antigens are critical for the proliferation of acute myeloid leukemia cells." *Clin Cancer Res* **14**(22): 7161-7166.
- Greiner, J., L. Li, M. Ringhoffer, T. F. Barth, K. Giannopoulos, P. Guillaume, G. Ritter, M. Wiesneth, H. Dohner and M. Schmitt (2005). "Identification and characterization of epitopes of the receptor for hyaluronic acid-mediated motility (RHAMM/CD168) recognized by CD8⁺ T cells of HLA-A2-positive patients with acute myeloid leukemia." *Blood* **106**(3): 938-945.
- Greiner, J., Y. Ono, S. Hofmann, A. Schmitt, E. Mehring, M. Gotz, P. Guillaume, K. Dohner, J. Mytilineos, H. Dohner and M. Schmitt (2012). "Mutated regions of nucleophosmin 1 elicit both CD4(+) and CD8(+) T-cell responses in patients with acute myeloid leukemia." *Blood* **120**(6): 1282-1289.
- Greiner, J., M. Ringhoffer, M. Taniguchi, A. Schmitt, D. Kirchner, G. Krahn, V. Heilmann, J. Gschwend, L. Bergmann, H. Dohner and M. Schmitt (2002). "Receptor for hyaluronan acid-mediated motility (RHAMM) is a new immunogenic leukemia-associated antigen in acute and chronic myeloid leukemia." *Exp Hematol* **30**(9): 1029-1035.
- Greiner, J., A. Schmitt, K. Giannopoulos, M. T. Rojewski, M. Gotz, I. Funk, M. Ringhoffer, D. Bunjes, S. Hofmann, G. Ritter, H. Dohner and M. Schmitt (2010). "High-dose RHAMM-R3 peptide vaccination for patients with acute myeloid leukemia, myelodysplastic syndrome and multiple myeloma." *Haematologica* **95**(7): 1191-1197.
- Greiner, J., M. Schmitt, L. Li, K. Giannopoulos, K. Bosch, A. Schmitt, K. Dohner, R. F. Schlenk, J. R. Pollack, H. Dohner and L. Bullinger (2006). "Expression of tumor-associated antigens in acute myeloid leukemia: Implications for specific immunotherapeutic approaches." *Blood* **108**(13): 4109-4117.
- Grisendi, S., C. Mecucci, B. Falini and P. P. Pandolfi (2006). "Nucleophosmin and cancer." *Nat Rev Cancer* **6**(7): 493-505.
- Gruen, J. R. and S. M. Weissman (1997). "Evolving views of the major histocompatibility complex." *Blood* **90**(11): 4252-4265.
- Guerder, S., J. Meyerhoff and R. Flavell (1994). "The role of the T cell costimulator B7-1 in autoimmunity and the induction and maintenance of tolerance to peripheral antigen." *Immunity* **1**(2): 155-166.
- Guiguet, M., F. Boue, J. Cadranet, J. M. Lang, E. Rosenthal and D. Costagliola (2009). "Effect of immunodeficiency, HIV viral load, and antiretroviral therapy on the risk

- of individual malignancies (FHDH-ANRS CO4): a prospective cohort study." Lancet Oncol **10**(12): 1152-1159.
- Haanen, J. B., A. Baars, R. Gomez, P. Weder, M. Smits, T. D. de Gruijl, B. M. von Blumberg, E. Bloemena, R. J. Scheper, S. M. van Ham, H. M. Pinedo and A. J. van den Eertwegh (2006). "Melanoma-specific tumor-infiltrating lymphocytes but not circulating melanoma-specific T cells may predict survival in resected advanced-stage melanoma patients." Cancer Immunol Immunother **55**(4): 451-458.
- Hackl, H., K. Astanina and R. Wieser (2017). "Molecular and genetic alterations associated with therapy resistance and relapse of acute myeloid leukemia." J Hematol Oncol **10**(1): 51.
- Hammer, J., E. Bono, F. Gallazzi, C. Belunis, Z. Nagy and F. Sinigaglia (1994). "Precise prediction of major histocompatibility complex class II-peptide interaction based on peptide side chain scanning." J Exp Med **180**(6): 2353-2358.
- Harrington, M. A., B. Konicek, A. Song, X. L. Xia, W. J. Fredericks and F. J. Rauscher, 3rd (1993). "Inhibition of colony-stimulating factor-1 promoter activity by the product of the Wilms' tumor locus." J Biol Chem **268**(28): 21271-21275.
- Hashii, Y., E. Sato-Miyashita, R. Matsumura, S. Kusuki, H. Yoshida, H. Ohta, N. Hosen, A. Tsuboi, Y. Oji, Y. Oka, H. Sugiyama and K. Ozono (2012). "WT1 peptide vaccination following allogeneic stem cell transplantation in pediatric leukemic patients with high risk for relapse: successful maintenance of durable remission." Leukemia **26**(3): 530-532.
- Henkart, P. A. (1994). "Lymphocyte-mediated cytotoxicity: two pathways and multiple effector molecules." Immunity **1**(5): 343-346.
- Herr, H. W. and A. Morales (2008). "History of bacillus Calmette-Guerin and bladder cancer: an immunotherapy success story." J Urol **179**(1): 53-56.
- Hidalgo, A., M. Baudis, I. Petersen, H. Arreola, P. Pina, G. Vazquez-Ortiz, D. Hernandez, J. Gonzalez, M. Lazos, R. Lopez, C. Perez, J. Garcia, K. Vazquez, B. Alatorre and M. Salcedo (2005). "Microarray comparative genomic hybridization detection of chromosomal imbalances in uterine cervix carcinoma." BMC Cancer **5**: 77.
- Hills, R. K., S. Castaigne, F. R. Appelbaum, J. Delaunay, S. Petersdorf, M. Othus, E. H. Estey, H. Dombret, S. Chevret, N. Ifrah, J. Y. Cahn, C. Recher, L. Chilton, A. V. Moorman and A. K. Burnett (2014). "Addition of gemtuzumab ozogamicin to induction chemotherapy in adult patients with acute myeloid leukaemia: a meta-analysis of individual patient data from randomised controlled trials." Lancet Oncol **15**(9): 986-996.
- Hodi, F. S., S. J. O'Day, D. F. McDermott, R. W. Weber, J. A. Sosman, J. B. Haanen, R. Gonzalez, C. Robert, D. Schadendorf, J. C. Hassel, W. Akerley, A. J. van den Eertwegh, J. Lutzky, P. Lorigan, J. M. Vaubel, G. P. Linette, D. Hogg, C. H. Ottensmeier, C. Lebbe, C. Peschel, I. Quirt, J. I. Clark, J. D. Wolchok, J. S. Weber, J. Tian, M. J. Yellin, G. M. Nichol, A. Hoos and W. J. Urba (2010). "Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma." N Engl J Med **363**(8): 711-723.
- Horton, R., L. Wilming, V. Rand, R. C. Lovering, E. A. Bruford, V. K. Khodiyar, M. J. Lush, S. Povey, C. C. Talbot, Jr., M. W. Wright, H. M. Wain, J. Trowsdale, A. Ziegler and S. Beck (2004). "Gene map of the extended human MHC." Nat Rev Genet **5**(12): 889-899.

- Hou, Y. C. and J. Y. Deng (2015). "Role of E3 ubiquitin ligases in gastric cancer." World J Gastroenterol **21**(3): 786-793.
- Huber, M. D., P. W. Vesely, K. Datta and L. Gerace (2013). "Erlins restrict SREBP activation in the ER and regulate cellular cholesterol homeostasis." J Cell Biol **203**(3): 427-436.
- Humbert, M., V. Halter, D. Shan, J. Laedrach, E. O. Leibundgut, G. M. Baerlocher, A. Tobler, M. F. Fey and M. P. Tschan (2011). "Deregulated expression of Kruppel-like factors in acute myeloid leukemia." Leuk Res **35**(7): 909-913.
- Huotari, J. and A. Helenius (2011). "Endosome maturation." Embo j **30**(17): 3481-3500.
- Inoue, K., H. Sugiyama, H. Ogawa, M. Nakagawa, T. Yamagami, H. Miwa, K. Kita, A. Hiraoka, T. Masaoka, K. Nasu and et al. (1994). "WT1 as a new prognostic factor and a new marker for the detection of minimal residual disease in acute leukemia." Blood **84**(9): 3071-3079.
- Ishikawa, F., S. Yoshida, Y. Saito, A. Hijikata, H. Kitamura, S. Tanaka, R. Nakamura, T. Tanaka, H. Tomiyama, N. Saito, M. Fukata, T. Miyamoto, B. Lyons, K. Ohshima, N. Uchida, S. Taniguchi, O. Ohara, K. Akashi, M. Harada and L. D. Shultz (2007). "Chemotherapy-resistant human AML stem cells home to and engraft within the bone-marrow endosteal region." Nat Biotechnol **25**(11): 1315-1321.
- Ito, A., S. Kondo, K. Tada and S. Kitano (2015). "Clinical Development of Immune Checkpoint Inhibitors." Biomed Res Int **2015**: 605478.
- Iwasaki, A. and R. Medzhitov (2015). "Control of adaptive immunity by the innate immune system." Nat Immunol **16**(4): 343-353.
- Jager, E., D. Jager and A. Knuth (2003). "Antigen-specific immunotherapy and cancer vaccines." Int J Cancer **106**(6): 817-820.
- Janssen, E. M., E. E. Lemmens, T. Wolfe, U. Christen, M. G. von Herrath and S. P. Schoenberger (2003). "CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes." Nature **421**(6925): 852-856.
- Jensen, P. E., D. A. Weber, W. P. Thayer, X. Chen and C. T. Dao (1999). "HLA-DM and the MHC class II antigen presentation pathway." Immunol Res **20**(3): 195-205.
- Jiang, L., G. Yu, W. Meng, Z. Wang, F. Meng and W. Ma (2013). "Overexpression of amyloid precursor protein in acute myeloid leukemia enhances extramedullary infiltration by MMP-2." Tumour Biol **34**(2): 629-636.
- Joffre, O. P., E. Segura, A. Savina and S. Amigorena (2012). "Cross-presentation by dendritic cells." Nat Rev Immunol **12**(8): 557-569.
- Joseph-Pietras, D., Y. Gao, N. Zojer, K. Ait-Tahar, A. H. Banham, K. Pulford, J. Rice, N. Savelyeva and S. S. Sahota (2010). "DNA vaccines to target the cancer testis antigen PASD1 in human multiple myeloma." Leukemia **24**(11): 1951-1959.
- Kahl, C., R. Krahl, C. Becker, H. K. Al-Ali, H. G. Sayer, A. Schulze, M. Herold, M. Hanel, S. Scholl, A. Hochhaus, L. Uharek, G. Maschmeyer, D. Haehling, C. Junghans, N. Peter, D. Kampfe, E. Kettner, T. Heinicke, T. Fischer, U. Kreibich, H. H. Wolf and D. Niederwieser (2016). "Long-term follow-up of the AML97 study for patients aged 60 years and above with acute myeloid leukaemia: a study of the East German Haematology and Oncology Study Group (OSHO)." J Cancer Res Clin Oncol **142**(1): 305-315.
- Kall, L., J. D. Canterbury, J. Weston, W. S. Noble and M. J. MacCoss (2007). "Semi-supervised learning for peptide identification from shotgun proteomics datasets." Nat Methods **4**(11): 923-925.

- Kalos, M., B. L. Levine, D. L. Porter, S. Katz, S. A. Grupp, A. Bagg and C. H. June (2011). "T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia." Sci Transl Med **3**(95): 95ra73.
- Kalyan, S. and D. Kabelitz (2013). "Defining the nature of human gammadelta T cells: a biographical sketch of the highly empathetic." Cell Mol Immunol **10**(1): 21-29.
- Kaneno, R., G. V. Shurin, F. M. Kaneno, H. Naiditch, J. Luo and M. R. Shurin (2011). "Chemotherapeutic agents in low noncytotoxic concentrations increase immunogenicity of human colon cancer cells." Cell Oncol (Dordr) **34**(2): 97-106.
- Kavanagh, B., A. Ko, A. Venook, K. Margolin, H. Zeh, M. Lotze, B. Schillinger, W. Liu, Y. Lu, P. Mitsky, M. Schilling, N. Bercovici, M. Loudovaris, R. Guillermo, S. M. Lee, J. Bender, B. Mills and L. Fong (2007). "Vaccination of metastatic colorectal cancer patients with matured dendritic cells loaded with multiple major histocompatibility complex class I peptides." J Immunother **30**(7): 762-772.
- Keilholz, U., A. Letsch, A. Busse, A. M. Aemissen, S. Bauer, I. W. Blau, W. K. Hofmann, L. Uharek, E. Thiel and C. Scheibenbogen (2009). "A clinical and immunologic phase 2 trial of Wilms tumor gene product 1 (WT1) peptide vaccination in patients with AML and MDS." Blood **113**(26): 6541-6548.
- Kelly, L. M. and D. G. Gilliland (2002). "Genetics of myeloid leukemias." Annu Rev Genomics Hum Genet **3**: 179-198.
- Kirkwood, J. (2002). "Cancer immunotherapy: the interferon-alpha experience." Semin Oncol **29**(3 Suppl 7): 18-26.
- Klein, L., B. Kyewski, P. M. Allen and K. A. Hogquist (2014). "Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see)." Nat Rev Immunol **14**(6): 377-391.
- Kohn, J. and M. Wilchek (1978). "A colorimetric method for monitoring activation of Sepharose by cyanogen bromide." Biochem Biophys Res Commun **84**(1): 7-14.
- Kolb, H. J., C. Schmid, A. J. Barrett and D. J. Schendel (2004). "Graft-versus-leukemia reactions in allogeneic chimeras." Blood **103**(3): 767-776.
- Konecna, A., R. Frischknecht, J. Kinter, A. Ludwig, M. Steuble, V. Meskenaite, M. Indermuhle, M. Engel, C. Cen, J. M. Mateos, P. Streit and P. Sonderegger (2006). "Calsyntenin-1 docks vesicular cargo to kinesin-1." Mol Biol Cell **17**(8): 3651-3663.
- Koopmann, J. O., M. Post, J. J. Neeffjes, G. J. Hammerling and F. Momburg (1996). "Translocation of long peptides by transporters associated with antigen processing (TAP)." Eur J Immunol **26**(8): 1720-1728.
- Kowalewski, D. J., H. Schuster, L. Backert, C. Berlin, S. Kahn, L. Kanz, H. R. Salih, H. G. Rammensee, S. Stevanovic and J. S. Stickel (2015). "HLA ligandome analysis identifies the underlying specificities of spontaneous antileukemia immune responses in chronic lymphocytic leukemia (CLL)." Proc Natl Acad Sci U S A **112**(2): E166-175.
- Kowalewski, D. J., S. Stevanovic, H. G. Rammensee and J. S. Stickel (2015). "Antileukemia T-cell responses in CLL - We don't need no aberration." Oncoimmunology **4**(7): e1011527.
- Kropshofer, H., S. O. Arndt, G. Moldenhauer, G. J. Hammerling and A. B. Vogt (1997). "HLA-DM acts as a molecular chaperone and rescues empty HLA-DR molecules at lysosomal pH." Immunity **6**(3): 293-302.
- Krug, U., W. E. Berdel, R. P. Gale, C. Haferlach, S. Schnittger, C. Muller-Tidow, J. Braess, K. Spiekermann, P. Staib, D. Beelen, H. Serve, C. Schliemann, M. Stelljes,

- L. Balleisen, G. Maschmeyer, A. Gruneisen, H. Eimermacher, A. Giagounidis, H. Rasche, R. Hehlmann, E. Lengfelder, E. Thiel, A. Reichle, C. Aul, W. D. Ludwig, W. Kern, T. Haferlach, W. Kopcke, D. Gorlich, M. C. Sauerland, A. Heinecke, B. J. Wormann, W. Hiddemann and T. Buchner (2016). "Increasing intensity of therapies assigned at diagnosis does not improve survival of adults with acute myeloid leukemia." Leukemia **30**(6): 1230-1236.
- Kuball, J., K. de Boer, E. Wagner, M. Wattad, E. Antunes, R. D. Weeratna, A. P. Vicari, C. Lotz, S. van Dorp, S. Hol, P. D. Greenberg, W. Heit, H. L. Davis and M. Theobald (2011). "Pitfalls of vaccinations with WT1-, Proteinase3- and MUC1-derived peptides in combination with MontanideISA51 and CpG7909." Cancer Immunol Immunother **60**(2): 161-171.
- Kwaan, H. C., J. Wang and L. N. Boggio (2002). "Abnormalities in hemostasis in acute promyelocytic leukemia." Hematol Oncol **20**(1): 33-41.
- Lapidot, T., C. Sirard, J. Vormoor, B. Murdoch, T. Hoang, J. Caceres-Cortes, M. Minden, B. Paterson, M. A. Caligiuri and J. E. Dick (1994). "A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice." Nature **367**(6464): 645-648.
- Lawrence, M. S., P. Stojanov, P. Polak, G. V. Kryukov, K. Cibulskis, A. Sivachenko, S. L. Carter, C. Stewart, C. H. Mermel, S. A. Roberts, A. Kiezun, P. S. Hammerman, A. McKenna, Y. Drier, L. Zou, A. H. Ramos, T. J. Pugh, N. Stransky, E. Helman, J. Kim, C. Sougnez, L. Ambrogio, E. Nickerson, E. Shefler, M. L. Cortes, D. Auclair, G. Saksena, D. Voet, M. Noble, D. DiCara, P. Lin, L. Lichtenstein, D. I. Heiman, T. Fennell, M. Imielinski, B. Hernandez, E. Hodis, S. Baca, A. M. Dulak, J. Lohr, D. A. Landau, C. J. Wu, J. Melendez-Zajgla, A. Hidalgo-Miranda, A. Koren, S. A. McCarroll, J. Mora, R. S. Lee, B. Crompton, R. Onofrio, M. Parkin, W. Winckler, K. Ardlie, S. B. Gabriel, C. W. Roberts, J. A. Biegel, K. Stegmaier, A. J. Bass, L. A. Garraway, M. Meyerson, T. R. Golub, D. A. Gordenin, S. Sunyaev, E. S. Lander and G. Getz (2013). "Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes." Nature **499**(7457): 214-218.
- Leao, I. C., P. Ganesan, T. D. Armstrong and E. M. Jaffee (2008). "Effective depletion of regulatory T cells allows the recruitment of mesothelin-specific CD8 T cells to the antitumor immune response against a mesothelin-expressing mouse pancreatic adenocarcinoma." Clin Transl Sci **1**(3): 228-239.
- Lee, B. L., H. S. Lee, J. Jung, S. J. Cho, H. Y. Chung, W. H. Kim, Y. W. Jin, C. S. Kim and S. Y. Nam (2005). "Nuclear factor-kappaB activation correlates with better prognosis and Akt activation in human gastric cancer." Clin Cancer Res **11**(7): 2518-2525.
- Leite de Oliveira, R., A. Hamm and M. Mazzone (2011). "Growing tumor vessels: more than one way to skin a cat - implications for angiogenesis targeted cancer therapies." Mol Aspects Med **32**(2): 71-87.
- Lenschow, D. J., T. L. Walunas and J. A. Bluestone (1996). "CD28/B7 system of T cell costimulation." Annu Rev Immunol **14**: 233-258.
- Levine, J. E., T. Braun, S. L. Penza, P. Beatty, K. Cornetta, R. Martino, W. R. Drobyski, A. J. Barrett, D. L. Porter, S. Giralt, J. Leis, H. E. Holmes, M. Johnson, M. Horowitz and R. H. Collins, Jr. (2002). "Prospective trial of chemotherapy and donor leukocyte infusions for relapse of advanced myeloid malignancies after allogeneic stem-cell transplantation." J Clin Oncol **20**(2): 405-412.

- Li, M., C. L. Brooks, F. Wu-Baer, D. Chen, R. Baer and W. Gu (2003). "Mono- versus polyubiquitination: differential control of p53 fate by Mdm2." *Science* **302**(5652): 1972-1975.
- Lippincott-Schwartz, J., L. C. Yuan, J. S. Bonifacino and R. D. Klausner (1989). "Rapid redistribution of Golgi proteins into the ER in cells treated with brefeldin A: evidence for membrane cycling from Golgi to ER." *Cell* **56**(5): 801-813.
- Liu, Y., X. Luo, H. Hu, R. Wang, Y. Sun, R. Zeng and H. Chen (2012). "Integrative proteomics and tissue microarray profiling indicate the association between overexpressed serum proteins and non-small cell lung cancer." *PLoS One* **7**(12): e51748.
- Lo-Coco, F., G. Avvisati, M. Vignetti, C. Thiede, S. M. Orlando, S. Iacobelli, F. Ferrara, P. Fazi, L. Cicconi, E. Di Bona, G. Specchia, S. Sica, M. Divona, A. Levis, W. Fiedler, E. Cerqui, M. Breccia, G. Fioritoni, H. R. Salih, M. Cazzola, L. Melillo, A. M. Carella, C. H. Brandts, E. Morra, M. von Lilienfeld-Toal, B. Hertenstein, M. Wattad, M. Lubbert, M. Hanel, N. Schmitz, H. Link, M. G. Kropp, A. Rambaldi, G. La Nasa, M. Luppi, F. Ciceri, O. Finizio, A. Venditti, F. Fabbiano, K. Dohner, M. Sauer, A. Ganser, S. Amadori, F. Mandelli, H. Dohner, G. Ehninger, R. F. Schlenk and U. Platzbecker (2013). "Retinoic acid and arsenic trioxide for acute promyelocytic leukemia." *N Engl J Med* **369**(2): 111-121.
- Lowenberg, B., J. R. Downing and A. Burnett (1999). "Acute myeloid leukemia." *N Engl J Med* **341**(14): 1051-1062.
- Lutsiak, M. E., R. T. Semnani, R. De Pascalis, S. V. Kashmiri, J. Schlom and H. Sabzevari (2005). "Inhibition of CD4(+)25+ T regulatory cell function implicated in enhanced immune response by low-dose cyclophosphamide." *Blood* **105**(7): 2862-2868.
- Luznik, L., and E. J. Fuchs. 2002. 'Donor lymphocyte infusions to treat hematologic malignancies in relapse after allogeneic blood or marrow transplantation', *Cancer Control*, 9: 123-37.
- Lynn, R. C., M. Poussin, A. Kalota, Y. Feng, P. S. Low, D. S. Dimitrov and D. J. Powell, Jr. (2015). "Targeting of folate receptor beta on acute myeloid leukemia blasts with chimeric antigen receptor-expressing T cells." *Blood* **125**(22): 3466-3476.
- Machiels, J. P., R. T. Reilly, L. A. Emens, A. M. Ercolini, R. Y. Lei, D. Weintraub, F. I. Okoye and E. M. Jaffee (2001). "Cyclophosphamide, doxorubicin, and paclitaxel enhance the antitumor immune response of granulocyte/macrophage-colony stimulating factor-secreting whole-cell vaccines in HER-2/neu tolerized mice." *Cancer Res* **61**(9): 3689-3697.
- Mackall, C. L., C. V. Bare, L. A. Granger, S. O. Sharrow, J. A. Titus and R. E. Gress (1996). "Thymic-independent T cell regeneration occurs via antigen-driven expansion of peripheral T cells resulting in a repertoire that is limited in diversity and prone to skewing." *J Immunol* **156**(12): 4609-4616.
- Mackall, C. L., F. T. Hakim and R. E. Gress (1997). "Restoration of T-cell homeostasis after T-cell depletion." *Semin Immunol* **9**(6): 339-346.
- Mailander, V., C. Scheibenbogen, E. Thiel, A. Letsch, I. W. Blau and U. Keilholz (2004). "Complete remission in a patient with recurrent acute myeloid leukemia induced by vaccination with WT1 peptide in the absence of hematological or renal toxicity." *Leukemia* **18**(1): 165-166.

- Mao, Q. Q., J. J. Chen, L. Dong, L. Zhong and X. Sun (2016). "Kruppel-like factor 2 suppresses growth and invasion of gastric cancer cells in vitro and in vivo." J Biol Regul Homeost Agents **30**(3): 703-712.
- Mapara, M. Y. and M. Sykes (2004). "Tolerance and cancer: mechanisms of tumor evasion and strategies for breaking tolerance." J Clin Oncol **22**(6): 1136-1151.
- Marshall, N. B. and S. L. Swain (2011). "Cytotoxic CD4 T cells in antiviral immunity." J Biomed Biotechnol **2011**: 954602.
- Maslak, P. G., T. Dao, L. M. Krug, S. Chanel, T. Korontsvit, V. Zakhaleva, R. Zhang, J. D. Wolchok, J. Yuan, J. Pinilla-Ibarz, E. Berman, M. Weiss, J. Jurcic, M. G. Frattini and D. A. Scheinberg (2010). "Vaccination with synthetic analog peptides derived from WT1 oncoprotein induces T-cell responses in patients with complete remission from acute myeloid leukemia." Blood **116**(2): 171-179.
- Maude, S. and D. M. Barrett (2016). "Current status of chimeric antigen receptor therapy for haematological malignancies." Br J Haematol **172**(1): 11-22.
- McDermott, D. F., C. G. Drake, M. Sznol, T. K. Choueiri, J. D. Powderly, D. C. Smith, J. R. Brahmer, R. D. Carvajal, H. J. Hammers, I. Puzanov, F. S. Hodi, H. M. Kluger, S. L. Topalian, D. M. Pardoll, J. M. Wigginton, G. D. Kollia, A. Gupta, D. McDonald, V. Sankar, J. A. Sosman and M. B. Atkins (2015). "Survival, Durable Response, and Long-Term Safety in Patients With Previously Treated Advanced Renal Cell Carcinoma Receiving Nivolumab." J Clin Oncol **33**(18): 2013-2020.
- Melief, C. J. (2013). ""License to kill" reflects joint action of CD4 and CD8 T cells." Clin Cancer Res **19**(16): 4295-4296.
- Mellman, I., G. Coukos and G. Dranoff (2011). "Cancer immunotherapy comes of age." Nature **480**(7378): 480-489.
- Menges, C. W., D. A. Altomare and J. R. Testa (2009). "FAS-associated factor 1 (FAF1): diverse functions and implications for oncogenesis." Cell Cycle **8**(16): 2528-2534.
- Mester, G., V. Hoffmann and S. Stevanovic (2011). "Insights into MHC class I antigen processing gained from large-scale analysis of class I ligands." Cell Mol Life Sci **68**(9): 1521-1532.
- Molldrem, J., S. Dermime, K. Parker, Y. Z. Jiang, D. Mavroudis, N. Hensel, P. Fukushima and A. J. Barrett (1996). "Targeted T-cell therapy for human leukemia: cytotoxic T lymphocytes specific for a peptide derived from proteinase 3 preferentially lyse human myeloid leukemia cells." Blood **88**(7): 2450-2457.
- Mollenhauer, H. H., D. J. Morre and L. D. Rowe (1990). "Alteration of intracellular traffic by monensin; mechanism, specificity and relationship to toxicity." Biochim Biophys Acta **1031**(2): 225-246.
- Montalban-Bravo, G. and G. Garcia-Manero (2015). "Novel drugs for older patients with acute myeloid leukemia." Leukemia **29**(4): 760-769.
- Moshaver, B., M. A. van der Pol, A. H. Westra, G. J. Ossenkoppele, S. Zweegman and G. J. Schuurhuis (2008). "Chemotherapeutic treatment of bone marrow stromal cells strongly affects their protective effect on acute myeloid leukemia cell survival." Leuk Lymphoma **49**(1): 134-148.
- Moss, A. C., P. P. Doran and P. Macmathuna (2007). "In Silico Promoter Analysis can Predict Genes of Functional Relevance in Cell Proliferation: Validation in a Colon Cancer Model." Transl Oncogenomics **2**: 1-16.
- Mrozek, K., N. A. Heerema and C. D. Bloomfield (2004). "Cytogenetics in acute leukemia." Blood Rev **18**(2): 115-136.

- Mrozek, K., G. Marcucci, D. Nicolet, K. S. Maharry, H. Becker, S. P. Whitman, K. H. Metzeler, S. Schwind, Y. Z. Wu, J. Kohlschmidt, M. J. Pettenati, N. A. Heerema, A. W. Block, S. R. Patil, M. R. Baer, J. E. Kolitz, J. O. Moore, A. J. Carroll, R. M. Stone, R. A. Larson and C. D. Bloomfield (2012). "Prognostic significance of the European LeukemiaNet standardized system for reporting cytogenetic and molecular alterations in adults with acute myeloid leukemia." *J Clin Oncol* **30**(36): 4515-4523.
- Mumberg, D., P. A. Monach, S. Wanderling, M. Philip, A. Y. Toledano, R. D. Schreiber and H. Schreiber (1999). "CD4(+) T cells eliminate MHC class II-negative cancer cells in vivo by indirect effects of IFN-gamma." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(15): 8633-8638.
- Murati, A., M. Brecqueville, R. Devillier, M. J. Mozziconacci, V. Gelsi-Boyer and D. Birnbaum (2012). "Myeloid malignancies: mutations, models and management." *BMC Cancer* **12**: 304.
- Nishida, S., N. Hosen, T. Shirakata, K. Kanato, M. Yanagihara, S. Nakatsuka, Y. Hoshida, T. Nakazawa, Y. Harada, N. Tatsumi, A. Tsuboi, M. Kawakami, Y. Oka, Y. Oji, K. Aozasa, I. Kawase and H. Sugiyama (2006). "AML1-ETO rapidly induces acute myeloblastic leukemia in cooperation with the Wilms tumor gene, WT1." *Blood* **107**(8): 3303-3312.
- Oka, Y., A. Tsuboi, T. Taguchi, T. Osaki, T. Kyo, H. Nakajima, O. A. Elisseeva, Y. Oji, M. Kawakami, K. Ikegame, N. Hosen, S. Yoshihara, F. Wu, F. Fujiki, M. Murakami, T. Masuda, S. Nishida, T. Shirakata, S. Nakatsuka, A. Sasaki, K. Udaka, H. Dohy, K. Aozasa, S. Noguchi, I. Kawase and H. Sugiyama (2004). "Induction of WT1 (Wilms' tumor gene)-specific cytotoxic T lymphocytes by WT1 peptide vaccine and the resultant cancer regression." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(38): 13885-13890.
- Oktyabri, D., A. Ishimura, S. Tange, M. Terashima and T. Suzuki (2016). "DOT1L histone methyltransferase regulates the expression of BCAT1 and is involved in sphere formation and cell migration of breast cancer cell lines." *Biochimie* **123**: 20-31.
- Oldfield, V., G. M. Keating and C. M. Perry (2005). "Imiquimod: in superficial basal cell carcinoma." *Am J Clin Dermatol* **6**(3): 195-200; discussion 201-192.
- Olenchock, B. A., R. Guo, J. H. Carpenter, M. Jordan, M. K. Topham, G. A. Koretzky and X. P. Zhong (2006). "Disruption of diacylglycerol metabolism impairs the induction of T cell anergy." *Nat Immunol* **7**(11): 1174-1181.
- Pabst, T., B. U. Mueller, P. Zhang, H. S. Radomska, S. Narravula, S. Schnittger, G. Behre, W. Hiddemann and D. G. Tenen (2001). "Dominant-negative mutations of CEBPA, encoding CCAAT/enhancer binding protein-alpha (C/EBPalpha), in acute myeloid leukemia." *Nat Genet* **27**(3): 263-270.
- Pandey, P., S. Rachagani, S. Das, P. Seshacharyulu, Y. Sheinin, N. Naslavsky, Z. Pan, B. L. Smith, H. L. Peters, P. Radhakrishnan, N. R. McKenna, S. S. Giridharan, D. Haridas, S. Kaur, M. A. Hollingsworth, R. G. MacDonald, J. L. Meza, S. Caplan, S. K. Batra and J. C. Solheim (2015). "Amyloid precursor-like protein 2 (APLP2) affects the actin cytoskeleton and increases pancreatic cancer growth and metastasis." *Oncotarget* **6**(4): 2064-2075.
- Pandey, P., B. Sliker, H. L. Peters, A. Tuli, J. Herskovitz, K. Smits, A. Purohit, R. K. Singh, J. Dong, S. K. Batra, D. W. Coulter and J. C. Solheim (2016). "Amyloid precursor protein and amyloid precursor-like protein 2 in cancer." *Oncotarget* **7**(15): 19430-19444.

- Parcej, D. and R. Tampe (2010). "ABC proteins in antigen translocation and viral inhibition." *Nat Chem Biol* **6**(8): 572-580.
- Park, M. Y., J. H. Moon, K. S. Lee, H. I. Choi, J. Chung, H. J. Hong and E. Kim (2007). "FAF1 suppresses I κ B kinase (IKK) activation by disrupting the IKK complex assembly." *J Biol Chem* **282**(38): 27572-27577.
- Parker, K. C., M. A. Bednarek and J. E. Coligan (1994). "Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains." *J Immunol* **152**(1): 163-175.
- Pastore, F., A. Dufour, T. Benthous, K. H. Metzeler, K. S. Maharry, S. Schneider, B. Ksienzyk, G. Mellert, E. Zellmeier, P. M. Kakadia, M. Unterhalt, M. Feuring-Buske, C. Buske, J. Braess, M. C. Sauerland, A. Heinecke, U. Krug, W. E. Berdel, T. Buechner, B. Woermann, W. Hiddemann, S. K. Bohlander, G. Marcucci, K. Spiekermann, C. D. Bloomfield and E. Hoster (2014). "Combined molecular and clinical prognostic index for relapse and survival in cytogenetically normal acute myeloid leukemia." *J Clin Oncol* **32**(15): 1586-1594.
- Patel, J. P., M. Gonen, M. E. Figueroa, H. Fernandez, Z. Sun, J. Racevskis, P. Van Vlierberghe, I. Dolgalev, S. Thomas, O. Aminova, K. Huberman, J. Cheng, A. Viale, N. D. Socci, A. Heguy, A. Cherry, G. Vance, R. R. Higgins, R. P. Ketterling, R. E. Gallagher, M. Litzow, M. R. van den Brink, H. M. Lazarus, J. M. Rowe, S. Luger, A. Ferrando, E. Paietta, M. S. Tallman, A. Melnick, O. Abdel-Wahab and R. L. Levine (2012). "Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia." *N Engl J Med* **366**(12): 1079-1089.
- Pearson, R., J. Fleetwood, S. Eaton, M. Crossley and S. Bao (2008). "Kruppel-like transcription factors: a functional family." *Int J Biochem Cell Biol* **40**(10): 1996-2001.
- Pedersen-Bjergaard, J., M. T. Andersen and M. K. Andersen (2007). "Genetic pathways in the pathogenesis of therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia." *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 392-397.
- Perez-Diez, A., N. T. Joncker, K. Choi, W. F. Chan, C. C. Anderson, O. Lantz and P. Matzinger (2007). "CD4 cells can be more efficient at tumor rejection than CD8 cells." *Blood* **109**(12): 5346-5354.
- Peters, H. L., A. Tuli, X. Wang, C. Liu, Z. Pan, M. M. Ouellette, M. A. Hollingsworth, R. G. Macdonald and J. C. Solheim (2012). "Relevance of amyloid precursor-like protein 2 C-terminal fragments in pancreatic cancer cells." *Int J Oncol* **41**(4): 1464-1474.
- Petersdorf, S. H., K. J. Kopecky, M. Slovak, C. Willman, T. Nevill, J. Brandwein, R. A. Larson, H. P. Erba, P. J. Stiff, R. K. Stuart, R. B. Walter, M. S. Tallman, L. Stenke and F. R. Appelbaum (2013). "A phase 3 study of gemtuzumab ozogamicin during induction and postconsolidation therapy in younger patients with acute myeloid leukemia." *Blood* **121**(24): 4854-4860.
- Proikas-Cezanne, T., S. Waddell, A. Gaugel, T. Frickey, A. Lupas and A. Nordheim (2004). "WIPI-1 α (WIPI49), a member of the novel 7-bladed WIPI protein family, is aberrantly expressed in human cancer and is linked to starvation-induced autophagy." *Oncogene* **23**(58): 9314-9325.
- Purbhoo, M. A., D. J. Irvine, J. B. Huppa and M. M. Davis (2004). "T cell killing does not require the formation of a stable mature immunological synapse." *Nat Immunol* **5**(5): 524-530.

- Ramakrishnan, R., D. Assudani, S. Nagaraj, T. Hunter, H. I. Cho, S. Antonia, S. Altioik, E. Celis and D. I. Gabrilovich (2010). "Chemotherapy enhances tumor cell susceptibility to CTL-mediated killing during cancer immunotherapy in mice." J Clin Invest **120**(4): 1111-1124.
- Ramirez, M. C. and L. J. Sigal (2004). "The multiple routes of MHC-I cross-presentation." Trends Microbiol **12**(5): 204-207.
- Rammensee, H., J. Bachmann, N. P. Emmerich, O. A. Bachor and S. Stevanovic (1999). "SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs." Immunogenetics **50**(3-4): 213-219.
- Randle, S. J. and H. Laman (2016). "F-box protein interactions with the hallmark pathways in cancer." Semin Cancer Biol **36**: 3-17.
- Rauscher, F. J., 3rd, J. F. Morris, O. E. Tournay, D. M. Cook and T. Curran (1990). "Binding of the Wilms' tumor locus zinc finger protein to the EGR-1 consensus sequence." Science **250**(4985): 1259-1262.
- Ravandi, F., A. K. Burnett, E. D. Agura and H. M. Kantarjian (2007). "Progress in the treatment of acute myeloid leukemia." Cancer **110**(9): 1900-1910.
- Ravandi, F., E. K. Ritchie, H. Sayar, J. E. Lancet, M. D. Craig, N. Vey, S. A. Strickland, G. J. Schiller, E. Jabbour, H. P. Erba, A. Pigneux, H. A. Horst, C. Recher, V. M. Klimek, J. Cortes, G. J. Roboz, O. Odenike, X. Thomas, V. Havelange, J. Maertens, H. G. Derigs, M. Heuser, L. Damon, B. L. Powell, G. Gaidano, A. M. Carella, A. Wei, D. Hogge, A. R. Craig, J. A. Fox, R. Ward, J. A. Smith, G. Acton, C. Mehta, R. K. Stuart and H. M. Kantarjian (2015). "Vosaroxin plus cytarabine versus placebo plus cytarabine in patients with first relapsed or refractory acute myeloid leukaemia (VALOR): a randomised, controlled, double-blind, multinational, phase 3 study." Lancet Oncol **16**(9): 1025-1036.
- Reilly, J. T. (2005). "Pathogenesis of acute myeloid leukaemia and inv(16)(p13;q22): a paradigm for understanding leukaemogenesis?" Br J Haematol **128**(1): 18-34.
- Rezvani, K., A. S. Yong, S. Mielke, B. Jafarpour, B. N. Savani, R. Q. Le, R. Eniafe, L. Musse, C. Boss, R. Kurlander and A. J. Barrett (2011). "Repeated PR1 and WT1 peptide vaccination in Montanide-adjuvant fails to induce sustained high-avidity, epitope-specific CD8+ T cells in myeloid malignancies." Haematologica **96**(3): 432-440.
- Rezvani, K., A. S. Yong, S. Mielke, B. N. Savani, L. Musse, J. Superata, B. Jafarpour, C. Boss and A. J. Barrett (2008). "Leukemia-associated antigen-specific T-cell responses following combined PR1 and WT1 peptide vaccination in patients with myeloid malignancies." Blood **111**(1): 236-242.
- Riese, M. J., J. Grewal, J. Das, T. Zou, V. Patil, A. K. Chakraborty and G. A. Koretzky (2011). "Decreased diacylglycerol metabolism enhances ERK activation and augments CD8+ T cell functional responses." J Biol Chem **286**(7): 5254-5265.
- Riese, M. J., L. C. Wang, E. K. Moon, R. P. Joshi, A. Ranganathan, C. H. June, G. A. Koretzky and S. M. Albelda (2013). "Enhanced effector responses in activated CD8+ T cells deficient in diacylglycerol kinases." Cancer Res **73**(12): 3566-3577.
- Rini, B. I. *et al.* IMA901, a multipptide cancer vaccine, plus sunitinib versus sunitinib alone, as first-line therapy for advanced or metastatic renal cell carcinoma (IMPRINT): a multicentre, open-label, randomised, controlled, phase 3 trial. Lancet Oncol **17**(11):1599-1611.
- Ritchie, E. K., E. J. Feldman, P. J. Christos, S. D. Rohan, C. B. Lagassa, C. Ippoliti, J. M. Scandura, K. Carlson and G. J. Roboz (2013). "Decitabine in patients with newly

- diagnosed and relapsed acute myeloid leukemia." Leuk Lymphoma **54**(9): 2003-2007.
- Rivett, A. J. and A. R. Hearn (2004). "Proteasome function in antigen presentation: immunoproteasome complexes, Peptide production, and interactions with viral proteins." Curr Protein Pept Sci **5**(3): 153-161.
- Robbins, P. F., Y. C. Lu, M. El-Gamil, Y. F. Li, C. Gross, J. Gartner, J. C. Lin, J. K. Teer, P. Cliften, E. Tycksen, Y. Samuels and S. A. Rosenberg (2013). "Mining exomic sequencing data to identify mutated antigens recognized by adoptively transferred tumor-reactive T cells." Nat Med **19**(6): 747-752.
- Robinson, J., J. A. Halliwell, H. McWilliam, R. Lopez, P. Parham and S. G. Marsh (2013). "The IMGT/HLA database." Nucleic Acids Res **41**(Database issue): D1222-1227.
- Romero, D. (2016). "Immunotherapy: PD-1 says goodbye, TIM-3 says hello." Nat Rev Clin Oncol **13**(4): 202-203.
- Rosenberg, S. A. (1999). "A new era for cancer immunotherapy based on the genes that encode cancer antigens." Immunity **10**(3): 281-287.
- Rowley, J. D. (2008). "Chromosomal translocations: revisited yet again." Blood **112**(6): 2183-2189.
- Ryu, S. W., S. K. Chae, K. J. Lee and E. Kim (1999). "Identification and characterization of human Fas associated factor 1, hFAF1." Biochem Biophys Res Commun **262**(2): 388-394.
- Sansom, D. M. (2000). "CD28, CTLA-4 and their ligands: who does what and to whom?" Immunology **101**(2): 169-177.
- Sartore-Bianchi, A., F. Gasparri, A. Galvani, L. Nici, J. W. Darnowski, D. Barbone, D. A. Fennell, G. Gaudino, C. Porta and L. Mutti (2007). "Bortezomib inhibits nuclear factor-kappaB dependent survival and has potent in vivo activity in mesothelioma." Clin Cancer Res **13**(19): 5942-5951.
- Sato, E., S. H. Olson, J. Ahn, B. Bundy, H. Nishikawa, F. Qian, A. A. Jungbluth, D. Frosina, S. Gnjjatic, C. Ambrosone, J. Kepner, T. Odunsi, G. Ritter, S. Lele, Y. T. Chen, H. Ohtani, L. J. Old and K. Odunsi (2005). "Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(51): 18538-18543.
- Schipper, R. F., J. D'Amato, J. T. Bakker, J. Bakker, J. J. van Rood and M. Oudshoorn (1997). "HLA gene haplotype frequencies in bone marrow donors worldwide registries." Hum Immunol **52**(1): 54-71.
- Schirle, M., W. Keilholz, B. Weber, C. Gouttefangeas, T. Dumrese, H. D. Becker, S. Stevanovic and H. G. Rammensee (2000). "Identification of tumor-associated MHC class I ligands by a novel T cell-independent approach." Eur J Immunol **30**(8): 2216-2225.
- Schmetterer, K. G., A. Neunkirchner and W. F. Pickl (2012). "Naturally occurring regulatory T cells: markers, mechanisms, and manipulation." Faseb j **26**(6): 2253-2276.
- Schmid, C., M. Labopin, A. Nagler, M. Bornhauser, J. Finke, A. Fassas, L. Volin, G. Gurman, J. Maertens, P. Bordigoni, E. Holler, G. Ehniger, E. Polge, N. C. Gorin, H. J. Kolb and V. Rocha (2007). "Donor lymphocyte infusion in the treatment of first hematological relapse after allogeneic stem-cell transplantation in adults with acute myeloid leukemia: a retrospective risk factors analysis and comparison with other

- strategies by the EBMT Acute Leukemia Working Party." *J Clin Oncol* **25**(31): 4938-4945.
- Schmitt, M., A. Schmitt, M. T. Rojewski, J. Chen, K. Giannopoulos, F. Fei, Y. Yu, M. Gotz, M. Heyduk, G. Ritter, D. E. Speiser, S. Gnjatic, P. Guillaume, M. Ringhoffer, R. F. Schlenk, P. Liebisch, D. Bunjes, H. Shiku, H. Dohner and J. Greiner (2008). "RHAMM-R3 peptide vaccination in patients with acute myeloid leukemia, myelodysplastic syndrome, and multiple myeloma elicits immunologic and clinical responses." *Blood* **111**(3): 1357-1365.
- Schoenberger, S. P., R. E. Toes, E. I. van der Voort, R. Offringa and C. J. Melief (1998). "T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions." *Nature* **393**(6684): 480-483.
- Schreiber, R. D., L. J. Old and M. J. Smyth (2011). "Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion." *Science* **331**(6024): 1565-1570.
- Seder, R. A., P. A. Darrah and M. Roederer (2008). "T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design." *Nat Rev Immunol* **8**(4): 247-258.
- Sehgal, A., T. L. Whiteside and M. Boyiadzis (2015). "Programmed death-1 checkpoint blockade in acute myeloid leukemia." *Expert Opin Biol Ther* **15**(8): 1191-1203.
- Sekeres, M. A., P. Elson, M. E. Kalaycio, A. S. Advani, E. A. Copelan, S. Faderl, H. M. Kantarjian and E. Estey (2009). "Time from diagnosis to treatment initiation predicts survival in younger, but not older, acute myeloid leukemia patients." *Blood* **113**(1): 28-36.
- Seremet, T., F. Brasseur and P. G. Coulie (2011). "Tumor-specific antigens and immunologic adjuvants in cancer immunotherapy." *Cancer J* **17**(5): 325-330.
- Serve, H., U. Krug, R. Wagner, M. C. Sauerland, A. Heinecke, U. Brunnberg, M. Schaich, O. Ottmann, J. Duyster, H. Wandt, T. Fischer, A. Giagounidis, A. Neubauer, A. Reichle, W. Aulitzky, R. Noppeney, I. Blau, V. Kunzmann, R. Stuhlmann, A. Kramer, K. A. Kreuzer, C. Brandts, B. Steffen, C. Thiede, C. Muller-Tidow, G. Ehninger and W. E. Berdel (2013). "Sorafenib in combination with intensive chemotherapy in elderly patients with acute myeloid leukemia: results from a randomized, placebo-controlled trial." *J Clin Oncol* **31**(25): 3110-3118.
- Shen, Y., Y. M. Zhu, X. Fan, J. Y. Shi, Q. R. Wang, X. J. Yan, Z. H. Gu, Y. Y. Wang, B. Chen, C. L. Jiang, H. Yan, F. F. Chen, H. M. Chen, Z. Chen, J. Jin and S. J. Chen (2011). "Gene mutation patterns and their prognostic impact in a cohort of 1185 patients with acute myeloid leukemia." *Blood* **118**(20): 5593-5603.
- Shih, A. H., O. Abdel-Wahab, J. P. Patel and R. L. Levine (2012). "The role of mutations in epigenetic regulators in myeloid malignancies." *Nat Rev Cancer* **12**(9): 599-612.
- Shih, K., H. T. Arkenau and J. R. Infante (2014). "Clinical impact of checkpoint inhibitors as novel cancer therapies." *Drugs* **74**(17): 1993-2013.
- Shortman, K., M. Egerton, G. J. Spangrude and R. Scollay (1990). "The generation and fate of thymocytes." *Semin Immunol* **2**(1): 3-12.
- Sill, H., W. Olipitz, A. Zebisch, E. Schulz and A. Wolfler (2011). "Therapy-related myeloid neoplasms: pathobiology and clinical characteristics." *Br J Pharmacol* **162**(4): 792-805.
- Smith, C. and V. Cerundolo (2001). "Immunotherapy of melanoma." *Immunology* **104**(1): 1-7.

- Smits E, Berneman ZN, Van Tendeloo VFI. Immunotherapy of acute myeloid leukemia: current approaches. *Oncologist* 2009; 14: 240–252.
- Snell, G. D. (1944). "ANTIGENIC DIFFERENCES BETWEEN THE SPERM OF DIFFERENT INBRED STRAINS OF MICE." *Science* **100**(2595): 272-273.
- Song, E. J., S. H. Yim, E. Kim, N. S. Kim and K. J. Lee (2005). "Human Fas-associated factor 1, interacting with ubiquitinated proteins and valosin-containing protein, is involved in the ubiquitin-proteasome pathway." *Mol Cell Biol* **25**(6): 2511-2524.
- Song, J., D. Mercer, X. Hu, H. Liu and M. M. Li (2011). "Common leukemia- and lymphoma-associated genetic aberrations in healthy individuals." *J Mol Diagn* **13**(2): 213-219.
- Southam, C. M., L. F. Craver, H. W. Dargeon and J. H. Burchenal (1951). "A study of the natural history of acute leukemia with special reference to the duration of the disease and the occurrence of remissions." *Cancer* **4**(1): 39-59.
- Stern, L. J., J. H. Brown, T. S. Jardetzky, J. C. Gorga, R. G. Urban, J. L. Strominger and D. C. Wiley (1994). "Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide." *Nature* **368**(6468): 215-221.
- Stevanovic, S. (2002). "Identification of tumour-associated T-cell epitopes for vaccine development." *Nat Rev Cancer* **2**(7): 514-520.
- Stoltze, L., A. K. Nussbaum, A. Sijts, N. P. Emmerich, P. M. Kloetzel and H. Schild (2000). "The function of the proteasome system in MHC class I antigen processing." *Immunol Today* **21**(7): 317-319.
- Stone, R. M., T. Fischer, R. Paquette, G. Schiller, C. A. Schiffer, G. Ehninger, J. Cortes, H. M. Kantarjian, D. J. DeAngelo, A. Huntsman-Labed, C. Dutreix, A. del Corral and F. Giles (2012). "Phase IB study of the FLT3 kinase inhibitor midostaurin with chemotherapy in younger newly diagnosed adult patients with acute myeloid leukemia." *Leukemia* **26**(9): 2061-2068.
- Sturm, T., T. Leinders-Zufall, B. Macek, M. Walzer, S. Jung, B. Pommerl, S. Stevanovic, F. Zufall, P. Overath and H. G. Rammensee (2013). "Mouse urinary peptides provide a molecular basis for genotype discrimination by nasal sensory neurons." *Nat Commun* **4**: 1616.
- Sugiyama, H. (2010). "WT1 (Wilms' tumor gene 1): biology and cancer immunotherapy." *Jpn J Clin Oncol* **40**(5): 377-387.
- Sun, J. C., M. A. Williams and M. J. Bevan (2004). "CD4+ T cells are required for the maintenance, not programming, of memory CD8+ T cells after acute infection." *Nat Immunol* **5**(9): 927-933.
- Sykulev, Y., M. Joo, I. Vturina, T. J. Tsomides and H. N. Eisen (1996). "Evidence that a single peptide-MHC complex on a target cell can elicit a cytolytic T cell response." *Immunity* **4**(6): 565-571.
- Tallman, M. S., D. G. Gilliland and J. M. Rowe (2005). "Drug therapy for acute myeloid leukemia." *Blood* **106**(4): 1154-1163.
- Thol, F., R. F. Schlenk, M. Heuser and A. Ganser (2015). "How I treat refractory and early relapsed acute myeloid leukemia." *Blood* **126**(3): 319-327.
- Tian, M., Y. Z. Cui, G. H. Song, M. J. Zong, X. Y. Zhou, Y. Chen and J. X. Han (2008). "Proteomic analysis identifies MMP-9, DJ-1 and A1BG as overexpressed proteins in pancreatic juice from pancreatic ductal adenocarcinoma patients." *BMC Cancer* **8**: 241.
- Tolg, C., S. R. Hamilton, K. A. Nakrieko, F. Kooshesh, P. Walton, J. B. McCarthy, M. J. Bissell and E. A. Turley (2006). "Rhamm-/- fibroblasts are defective in CD44-

- mediated ERK1,2 mitogenic signaling, leading to defective skin wound repair." *J Cell Biol* **175**(6): 1017-1028.
- Topalian, S. L., G. J. Weiner and D. M. Pardoll (2011). "Cancer immunotherapy comes of age." *J Clin Oncol* **29**(36): 4828-4836.
- Tran, E., S. Turcotte, A. Gros, P. F. Robbins, Y. C. Lu, M. E. Dudley, J. R. Wunderlich, R. P. Somerville, K. Hogan, C. S. Hinrichs, M. R. Parkhurst, J. C. Yang and S. A. Rosenberg (2014). "Cancer immunotherapy based on mutation-specific CD4+ T cells in a patient with epithelial cancer." *Science* **344**(6184): 641-645.
- Tsimberidou, A. M., H. M. Kantarjian, S. Wen, M. J. Keating, S. O'Brien, M. Brandt, S. Pierce, E. J. Freireich, L. J. Medeiros and E. Estey (2008). "Myeloid sarcoma is associated with superior event-free survival and overall survival compared with acute myeloid leukemia." *Cancer* **113**(6): 1370-1378.
- Tsuboi, A., Y. Oka, T. Kyo, Y. Katayama, O. A. Elisseeva, M. Kawakami, S. Nishida, S. Morimoto, A. Murao, H. Nakajima, N. Hosen, Y. Oji and H. Sugiyama (2012). "Long-term WT1 peptide vaccination for patients with acute myeloid leukemia with minimal residual disease." *Leukemia* **26**(6): 1410-1413.
- Turpeinen, H., P. J. Ojala, K. Ojala, M. Miettinen, L. Volin and J. Partanen (2013). "Minor histocompatibility antigens as determinants for graft-versus-host disease after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation." *Int J Immunogenet* **40**(6): 495-501.
- Turtle, C. J., L. A. Hanafi, C. Berger, M. Hudecek, B. Pender, E. Robinson, R. Hawkins, C. Chaney, S. Cherian, X. Chen, L. Soma, B. Wood, D. Li, S. Heimfeld, S. R. Riddell and D. G. Maloney (2016). "Immunotherapy of non-Hodgkin's lymphoma with a defined ratio of CD8+ and CD4+ CD19-specific chimeric antigen receptor-modified T cells." *Sci Transl Med* **8**(355): 355ra116.
- Ustun, C. and G. Marcucci (2015). "Emerging diagnostic and therapeutic approaches in core binding factor acute myeloid leukaemia." *Curr Opin Hematol* **22**(2): 85-91.
- Van den Eynde, B. J. and S. Morel (2001). "Differential processing of class-I-restricted epitopes by the standard proteasome and the immunoproteasome." *Curr Opin Immunol* **13**(2): 147-153.
- van der Bruggen, P., C. Traversari, P. Chomez, C. Lurquin, E. De Plaen, B. Van den Eynde, A. Knuth and T. Boon (1991). "A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma." *Science* **254**(5038): 1643-1647.
- Van Driessche, A., Z. N. Berneman and V. F. Van Tendeloo (2012). "Active specific immunotherapy targeting the Wilms' tumor protein 1 (WT1) for patients with hematological malignancies and solid tumors: lessons from early clinical trials." *Oncologist* **17**(2): 250-259.
- van Rooij, N., M. M. van Buuren, D. Philips, A. Velds, M. Toebes, B. Heemskerk, L. J. van Dijk, S. Behjati, H. Hilkmann, D. El Atmioui, M. Nieuwland, M. R. Stratton, R. M. Kerkhoven, C. Kesmir, J. B. Haanen, P. Kvistborg and T. N. Schumacher (2013). "Tumor exome analysis reveals neoantigen-specific T-cell reactivity in an ipilimumab-responsive melanoma." *J Clin Oncol* **31**(32): e439-442.
- Van Tendeloo, V. F., A. Van de Velde, A. Van Driessche, N. Cools, S. Anguille, K. Ladell, E. Gostick, K. Vermeulen, K. Pieters, G. Nijs, B. Stein, E. L. Smits, W. A. Schroyens, A. P. Gadisseur, I. Vrelust, P. G. Jorens, H. Goossens, I. J. de Vries, D. A. Price, Y. Oji, Y. Oka, H. Sugiyama and Z. N. Berneman (2010). "Induction of complete and molecular remissions in acute myeloid leukemia by Wilms' tumor 1

- antigen-targeted dendritic cell vaccination." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(31): 13824-13829.
- Viatte, S., P. M. Alves and P. Romero (2006). "Reverse immunology approach for the identification of CD8 T-cell-defined antigens: advantages and hurdles." Immunol Cell Biol **84**(3): 318-330.
- Vigneron, N., V. Stroobant, B. J. Van den Eynde and P. van der Bruggen (2013). "Database of T cell-defined human tumor antigens: the 2013 update." Cancer Immun **13**: 15.
- Vogt, L., S. P. Schrimpf, V. Meskenaite, R. Frischknecht, J. Kinter, D. P. Leone, U. Ziegler and P. Sonderegger (2001). "Calsyntenin-1, a proteolytically processed postsynaptic membrane protein with a cytoplasmic calcium-binding domain." Mol Cell Neurosci **17**(1): 151-166.
- Vollmer, M., L. Li, A. Schmitt, J. Greiner, P. Reinhardt, M. Ringhoffer, M. Wiesneth, H. Dohner and M. Schmitt (2003). "Expression of human leucocyte antigens and co-stimulatory molecules on blasts of patients with acute myeloid leukaemia." Br J Haematol **120**(6): 1000-1008.
- Walker, A. and R. Johnson (2016). "Commercialization of cellular immunotherapies for cancer." Biochem Soc Trans **44**(2): 329-332.
- Walter, A., M. Schafer, V. Cecconi, C. Matter, M. Urosevic-Maiwald, B. Belloni, N. Schonewolf, R. Dummer, W. Bloch, S. Werner, H. D. Beer, A. Knuth and M. van den Broek (2013). "Aldara activates TLR7-independent immune defence." Nat Commun **4**: 1560.
- Walter, S., T. Weinschenk, A. Stenzl, R. Zdrojowy, A. Pluzanska, C. Szczylik, M. Staehler, W. Brugger, P. Y. Dietrich, R. Mendrzyk, N. Hilf, O. Schoor, J. Fritsche, A. Mahr, D. Maurer, V. Vass, C. Trautwein, P. Lewandrowski, C. Flohr, H. Pohla, J. J. Stanczak, V. Bronte, S. Mandruzzato, T. Biedermann, G. Pawelec, E. Derhovanessian, H. Yamagishi, T. Miki, F. Hongo, N. Takaha, K. Hirakawa, H. Tanaka, S. Stevanovic, J. Frisch, A. Mayer-Mokler, A. Kirner, H. G. Rammensee, C. Reinhardt and H. Singh-Jasuja (2012). "Multi-peptide immune response to cancer vaccine IMA901 after single-dose cyclophosphamide associates with longer patient survival." Nat Med **18**(8): 1254-1261.
- Walz, S., J. S. Stickel, D. J. Kowalewski, H. Schuster, K. Weisel, L. Backert, S. Kahn, A. Nelde, T. Stroh, M. Handel, O. Kohlbacher, L. Kanz, H. R. Salih, H. G. Rammensee and S. Stevanovic (2015). "The antigenic landscape of multiple myeloma: mass spectrometry (re)defines targets for T-cell-based immunotherapy." Blood **126**(10): 1203-1213.
- Wang, D. B., X. K. Lu, X. Zhang, Z. G. Li and C. X. Li (2016). "Carbonic anhydrase 1 is a promising biomarker for early detection of non-small cell lung cancer." Tumour Biol **37**(1): 553-559.
- Wang, F., J. Travins, B. DeLaBarre, V. Penard-Lacronique, S. Schalm, E. Hansen, K. Straley, A. Kernysky, W. Liu, C. Gliser, H. Yang, S. Gross, E. Artin, V. Saada, E. Mylonas, C. Quivoron, J. Popovici-Muller, J. O. Saunders, F. G. Salituro, S. Yan, S. Murray, W. Wei, Y. Gao, L. Dang, M. Dorsch, S. Agresta, D. P. Schenkein, S. A. Biller, S. M. Su, S. de Botton and K. E. Yen (2013). "Targeted inhibition of mutant IDH2 in leukemia cells induces cellular differentiation." Science **340**(6132): 622-626.

- Wang, H., X. Zheng, F. G. Behm and M. Ratnam (2000). "Differentiation-independent retinoid induction of folate receptor type beta, a potential tumor target in myeloid leukemia." *Blood* **96**(10): 3529-3536.
- Wang, P., J. Sidney, C. Dow, B. Mothe, A. Sette and B. Peters (2008). "A systematic assessment of MHC class II peptide binding predictions and evaluation of a consensus approach." *PLoS Comput Biol* **4**(4): e1000048.
- Wang, X. and I. Riviere (2015). "Manufacture of tumor- and virus-specific T lymphocytes for adoptive cell therapies." *Cancer Gene Ther* **22**(2): 85-94.
- Wherry, E. J. 2011. 'T cell exhaustion', *Nat Immunol*, 12: 492-9.
- Weiden, P. L., N. Flournoy, E. D. Thomas, R. Prentice, A. Fefer, C. D. Buckner and R. Storb (1979). "Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts." *N Engl J Med* **300**(19): 1068-1073.
- Weinberg, O. K., M. Seetharam, L. Ren, K. Seo, L. Ma, J. D. Merker, J. Gotlib, J. L. Zehnder and D. A. Arber (2009). "Clinical characterization of acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes as defined by the 2008 WHO classification system." *Blood* **113**(9): 1906-1908.
- Welch, J. S., T. J. Ley, D. C. Link, C. A. Miller, D. E. Larson, D. C. Koboldt, L. D. Wartman, T. L. Lamprecht, F. Liu, J. Xia, C. Kandoth, R. S. Fulton, M. D. McLellan, D. J. Dooling, J. W. Wallis, K. Chen, C. C. Harris, H. K. Schmidt, J. M. Kalicki-Veizer, C. Lu, Q. Zhang, L. Lin, M. D. O'Laughlin, J. F. McMichael, K. D. Delehaunty, L. A. Fulton, V. J. Magrini, S. D. McGrath, R. T. Demeter, T. L. Vickery, J. Hundal, L. L. Cook, G. W. Swift, J. P. Reed, P. A. Alldredge, T. N. Wylie, J. R. Walker, M. A. Watson, S. E. Heath, W. D. Shannon, N. Varghese, R. Nagarajan, J. E. Payton, J. D. Baty, S. Kulkarni, J. M. Kicco, M. H. Tomasson, P. Westervelt, M. J. Walter, T. A. Graubert, J. F. DiPersio, L. Ding, E. R. Mardis and R. K. Wilson (2012). "The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia." *Cell* **150**(2): 264-278.
- Wetzler, M., M. R. Baer, S. J. Stewart, K. Donohue, L. Ford, C. C. Stewart, E. A. Repasky and S. Ferrone (2001). "HLA class I antigen cell surface expression is preserved on acute myeloid leukemia blasts at diagnosis and at relapse." *Leukemia* **15**(1): 128-133.
- Widenmeyer, M., H. Griesemann, S. Stevanovic, S. Feyerabend, R. Klein, S. Attig, J. Hennenlotter, D. Wernet, D. V. Kuprash, A. Y. Sazykin, S. Pascolo, A. Stenzl, C. Gouttefangeas and H. G. Rammensee (2012). "Promiscuous survivin peptide induces robust CD4+ T-cell responses in the majority of vaccinated cancer patients." *Int J Cancer* **131**(1): 140-149.
- Williams, K. M., F. T. Hakim and R. E. Gress (2007). "T cell immune reconstitution following lymphodepletion." *Semin Immunol* **19**(5): 318-330.
- Wiseman, D. H., B. F. Greystoke and T. C. Somerville (2014). "The variety of leukemic stem cells in myeloid malignancy." *Oncogene* **33**(24): 3091-3098.
- Yang, F. and X. F. Yang (2005). "New concepts in tumor antigens: their significance in future immunotherapies for tumors." *Cell Mol Immunol* **2**(5): 331-341.
- Yasukawa, M., H. Fujiwara, T. Ochi, K. Suemori, H. Narumi, T. Azuma and K. Kuzushima (2009). "Clinical efficacy of WT1 peptide vaccination in patients with acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome." *American Journal of Hematology* **84**(5): 314-315.

- Ye, H., B. Adane, N. Khan, T. Sullivan, M. Minhajuddin, M. Gasparetto, B. Stevens, S. Pei, M. Balys, J. M. Ashton, D. J. Klemm, C. M. Woolthuis, A. W. Stranahan, C. Y. Park and C. T. Jordan (2016). "Leukemic Stem Cells Evade Chemotherapy by Metabolic Adaptation to an Adipose Tissue Niche." Cell Stem Cell **19**(1): 23-37.
- Yeh, P. Y., S. E. Chuang, K. H. Yeh, Y. C. Song and A. L. Cheng (2003). "Involvement of nuclear transcription factor-kappa B in low-dose doxorubicin-induced drug resistance of cervical carcinoma cells." Biochem Pharmacol **66**(1): 25-33.
- Yin, L., J. P. Wang, T. P. Xu, W. M. Chen, M. D. Huang, R. Xia, X. X. Liu, R. Kong, M. Sun, E. B. Zhang and Y. Q. Shu (2015). "Downregulation of Kruppel-like factor 2 is associated with poor prognosis for nonsmall-cell lung cancer." Tumour Biol **36**(4): 3075-3084.
- Yuan, X. and T. R. Malek (2012). "Cellular and molecular determinants for the development of natural and induced regulatory T cells." Hum Immunol **73**(8): 773-782.
- Zagozdzon, R. and J. Golab (2015). "Cancer stem cells in haematological malignancies." Contemp Oncol (Pozn) **19**(1a): A1-6.
- Zhang, B., J. Huang, H. L. Li, T. Liu, Y. Y. Wang, P. Waterman, A. P. Mao, L. G. Xu, Z. Zhai, D. Liu, P. Marrack and H. B. Shu (2008). "GIDE is a mitochondrial E3 ubiquitin ligase that induces apoptosis and slows growth." Cell Res **18**(9): 900-910.
- Zhang, W., L. Levi, P. Banerjee, M. Jain and N. Noy (2015). "Kruppel-like factor 2 suppresses mammary carcinoma growth by regulating retinoic acid signaling." Oncotarget **6**(34): 35830-35842.
- Zheng, Y., B. Xu, Y. Zhao, H. Gu, C. Li, Y. Wang and X. Chang (2015). "CA1 contributes to microcalcification and tumourigenesis in breast cancer." BMC Cancer **15**: 679.
- Zhou, H. S., B. Z. Carter and M. Andreeff (2016). "Bone marrow niche-mediated survival of leukemia stem cells in acute myeloid leukemia: Yin and Yang." Cancer Biol Med **13**(2): 248-259.
- Zhou, Q., M. E. Munger, R. G. Veenstra, B. J. Weigel, M. Hirashima, D. H. Munn, W. J. Murphy, M. Azuma, A. C. Anderson, V. K. Kuchroo and B. R. Blazar (2011). "Coexpression of Tim-3 and PD-1 identifies a CD8+ T-cell exhaustion phenotype in mice with disseminated acute myelogenous leukemia." Blood **117**(17): 4501-4510.
- Zhou, W., X. Feng, C. Ren, X. Jiang, W. Liu, W. Huang, Z. Liu, Z. Li, L. Zeng, L. Wang, B. Zhu, J. Shi, J. Liu, C. Zhang, Y. Liu and K. Yao (2013). "Over-expression of BCAT1, a c-Myc target gene, induces cell proliferation, migration and invasion in nasopharyngeal carcinoma." Mol Cancer **12**: 53.
- Zhu, J. and W. E. Paul (2010). "Peripheral CD4+ T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors." Immunol Rev **238**(1): 247-262.
- Zitvogel, L., O. Kepp and G. Kroemer (2011). "Immune parameters affecting the efficacy of chemotherapeutic regimens." Nat Rev Clin Oncol **8**(3): 151-160.
- zur Hausen, H., H. Schulte-Holthausen, H. Wolf, K. Dorries and H. Egger (1974). "Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors. II. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human herpes group viruses." Int J Cancer **13**(5): 657-664.

Zusätzliche Quellen (Lehrbuch, Diplomarbeit):

Marsh, S.G.E. Et al 2000 HLA-FACTS Book, ed S.G.E.M.P.D. Barber; London: Academic Press

Murphy K, Travers P, Walport M (2008) Janeway's Immunobiology, a) "The Humoral Immune"Response Immunity". S.387-429, In Garland Science

Murphy K, Travers P, Walport M (2008) Janeway's Immunobiology b) "Antigen recognition by T-cells" S.138-143 & "T-cell mediated Immunity" S.335-387; In Garland Science

Schuster, H. (2010) „Flow cytometric dissection of renal cell carcinoma“ (Diplomarbeit), Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Tübingen

8 Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde am Interfakultären Institut für Zellbiologie in der Abteilung für Immunologie unter Betreuung von Prof. Stefan Stevanovic und Prof. Hans-Georg Rammensee durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit meiner Betreuerin Dr. Juliane Walz (Fachärztin, Medizinische Klinik II, Abteilung für Onkologie) und Prof. Stefan Stevanovic (Leiter Molekulare Tumorimmunologie).

Die Versuche wurden nach Einarbeitung durch Labormitglieder Daniel Kowalewski (Diplom-Biologe), Dr. rer. Nat. Heiko Schuster, Nico Trautwein (Diplom-Biochemiker), Dr. rer. nat. Karoline Laske und Dr. rer. Nat. Nora Mirza von mir eigenständig durchgeführt.

Die eigentliche massenspektrometrische Messung wurde nach allen erforderlichen Vorbereitungen durch Daniel Kowalewski durchgeführt.

Die quantitativen durchflusszytometrischen Analysen wurden mit Unterstützung durch Dr. Heiko Schuster durchgeführt.

Die Analysen zur funktionellen Charakterisierung wurden nach Einarbeitung durch Dr. Nora Mirza und Dr. Karoline Laske selbstständig (Elispots) sowie mit Unterstützung (Intrazelluläre Zytokinfärbung) durchgeführt.

Die statistische und bioinformatische Auswertung erfolgte durch Daniel Kowalewski sowie das Institut für Bioinformatik der Universität Tübingen (insb. Matthias Walzer). Unpaired student-Tests wurden durch Dr. Juliane Walz und mich durchgeführt.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig nach Anleitung durch Prof. Stefan Stevanovic verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den

[Claudia Berlin]

9 Veröffentlichungen

Publikationsliste:

Berlin, C., D. J. Kowalewski, H. Schuster, N. Mirza, S. Walz, M. Handel, B. Schmid-Horch, H. R. Salih, L. Kanz, H. G. Rammensee, S. Stevanovic, and J. S. Stickel. 2015. 'Mapping the HLA ligandome landscape of acute myeloid leukemia: a targeted approach toward peptide-based immunotherapy', *Leukemia*, 29: 647-59.

Kowalewski, D. J., H. Schuster, L. Backert, C. Berlin, S. Kahn, L. Kanz, H. R. Salih, H. G. Rammensee, S. Stevanovic, and J. S. Stickel. 2015. 'HLA ligandome analysis identifies the underlying specificities of spontaneous antileukemia immune responses in chronic lymphocytic leukemia (CLL)', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112: E166-75.

Diensterfindungsschrift: *Multipeptidvaccine zur Immuntherapie der akuten myeloischen Leukämie (5402P525)*, 2014 / Co-Erfinder des Patents mit dem Titel: *Novel immunotherapy against several tumors of the blood, such as acute myeloid leukemia (aml)*; u. a. US 20150320848 A1;

Backert, L., D. J. Kowalewski, S. Walz, H. Schuster, C. Berlin, M. C. Neidert, M. Schemionek, T. H. Brummendorf, V. Vucinic, D. Niederwieser, L. Kanz, H. R. Salih, O. Kohlbacher, K. Weisel, H. G. Rammensee, A. S. Stevanovi, and J. S. Walz. 2017. 'A meta-analysis of HLA peptidome composition in different hematological entities: Entity-specific dividing lines and "pan-leukemia" antigens', *Oncotarget*.

Peptide promiscuity within the HLA-A*03 supertype: Tight allotype restriction of frequently recognised epitopes and individual MHC ligand repertoires. *C. G. Grabenbauer, M Di Marco, C Berlin, D. J. Kowalewski, A. Pulfermuller, J S. Walz, H.-G. Rammensee and S. Stevanovic; Tissue Antigen, currently in review*

10 Danksagung

Mein aufrichtiger herzlicher Dank gilt all denen, die mich im Laufe dieser Arbeit auf vielfältige Weise unterstützt haben und ohne die diese Arbeit nicht entstanden wäre!!

Prof. Dr. H-G. Rammensee gilt mein besonderer Dank für das ständige Interesse am Fortgang meiner Arbeit, sein Interesse sowie für die Verbreitung der besonders guten Arbeitsatmosphäre in der Abteilung für Immunologie!

Prof. S. Stevanovic danke ich ganz herzlich für das Interesse am Fortgang meiner Arbeit, sein offenes Ohr bei allen großen und kleinen Fragen, für zahlreiche Ratschläge und Anregungen, seine Unterstützung und das Vertrauen in meine Arbeit!

Ein großer Dank geht an Dr. Juliane Walz, für die Überlassung des sehr interessanten Projekts, Ihr Vertrauen in meine Arbeit, Ihr ständiges Interesse am Fortgang meiner Arbeit und die intensive Betreuung!

Für die Einarbeitung ins Labor, die intensive und gute Betreuung, für die Unterstützung in allen Labor-& Computer-/Technik-relevanten Bereichen, die Beantwortung zahlreicher Fragen möchte ich Daniel Kowalewski danken! Die zahlreichen Diskussionen haben mir wertvolle Denkanstöße und Anregungen gegeben und waren für den Fortgang meiner Arbeit sehr hilfreich!

Ein besonderer Dank geht auch an Dr. Heiko Schuster für seine großartige Unterstützung & Hilfsbereitschaft, die sehr gute Betreuung sowie sein stets offenes Ohr bei allen Fragen und Problemen - selbst in stressigsten Momenten!! Die zahlreichen Gespräche und Diskussionen haben mir wertvolle Anregungen gegeben, meinen „immunologischen/technischen Horizont“ deutlich erweitert und waren für den Fortgang meiner Arbeit sehr bereichernd!!

Dr. Nora Mirza möchte ich für ihre tolle Unterstützung während meiner Arbeit, im Besonderen bei allen zellbiologischen Fragen, ihr immer offenes Ohr bei allen Fragen und Problemen, ihr stätiges Interesse an meiner Arbeit danken!!

Dr. Karoline Laske möchte ich ganz herzlich für ihre immerwährende, großartige Unterstützung und ihr ständig offenes Ohr bei allen Fragen und Problemen, die vielen sehr wertvollen Anregungen und Ratschläge sowie Ihren Zuspruch in schwierigen Phasen danken!!

PD Dr. Cecile Gouttefangeas möchte ich für ihr offenes Ohr selbst in stressigen Momenten und Unterstützung, sowie für zahlreiche Anregungen, Ratschläge und Empfehlungen danken, die für den Fortgang meiner Arbeit sehr bereichernd waren!

Der allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Stevanovic für die gute Atmosphäre und tolle Unterstützung sowie für die interessanten & lehrreichen 2,5 Jahre aktiver Laborarbeit!

C. Falkenburger, P. Hristic, K. Graf, F. Löwenstein, B. Pömmerl N. Zutschke für ihre Hilfe, Unterstützung und zahlreichen guten Ratschläge! Besonders möchte ich an der Stelle P.Hristic, K. Graf und N. Zutschke für die freundliche Herstellung meiner vielen Peptide!

Für die Organisation, den reibungslosen Ablauf, ein offenes Ohr und die Unterstützung bei diversen Fragen möchte ich L. Yakes und G. Hörr danken!

Allen anderen Elchen für die gute Atmosphäre und die Hilfe und Unterstützung!

In der Medizinischen Klinik möchte ich Herrn Prof. Kanz und Herrn Prof. H. R. Salih für die gute Kooperation und die Bereitstellung der AML-Proben danken!

Der Abteilung für Transfusionsmedizin möchte ich für die freundliche Bereitstellung der Leukozytenkonzentrate gesunder Spender danken, ohne die die vergleichenden HLA-Analysen nicht möglich gewesen wären.

Für die mir immer gewährte, unermüdliche Unterstützung möchte ich an dieser Stelle meiner Familie und Freunden danken, die immer an die Fertigstellung dieser geglaubt habe

