

**Universitätsmedizin Rostock**

Chirurgische Klinik und Poliklinik

Abteilung für Allgemeine, Thorax-, Gefäß- und Transplantationschirurgie

Direktor: Prof. Dr. med. Ernst Klar

***Identifizierung eines hochgradig mikrosatelliteninstabilen (MSI-H) spezifischen zytotoxischen T-Zell Epitopes, welches durch eine (-1)-Leserastermutation im Gen U79260 (Fat Mass and Obesity associated) generiert wird.***

**Inauguraldissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von

Anne Wienck, geboren am 06.09.1981 in Stralsund

aus Rostock

Rostock, 01.06.2012

**Amtierender Dekan:** Prof. Dr. Emil Christian Reisinger

**Gutachter:**

PD Dr. rer. nat. Michael Linnebacher, AG Molekulare Onkologie und Immuntherapie, Abteilung für Allg., Thorax-, Gefäß- und Transplantationschirurgie, Universitätsmedizin Rostock, Schillingallee 35, D-18057 Rostock

Prof. Dr. med. Brigitte Müller-Hilke, Universität Rostock, Medizinische Fakultät, Institut für Immunologie, Schillingallee 70, D-18057 Rostock

Priv.-Doz. Dr. med. Martin Gasser, Universitätsklinik Würzburg, Klinik & Poliklinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie, Gefäß- und Kinderchirurgie, Zentrum Operative Medizin, Oberdürrbacher Str. 6, D-97080 Würzburg

**Datum der öffentlichen Verteidigung:** 06.03.2013

# Inhaltsverzeichnis

	<b>Seite</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Vorwort	1
1.2. Epidemiologie von Tumorerkrankungen	2
1.3. Onkogenese	3
1.4. Einteilung und spezielle genetische Merkmale von CRCs	5
1.5. Mikrosatelliten	6
1.6. Das Mismatch-Repair-System und Mikrosatelliteninstabilität	6
1.7. Mikrosatelliteninstabilität und Karzinome	8
1.8. Tumorbekämpfung im intakten Immunsystem	9
1.9. Immune Escape Mechanismen	10
1.10. Immuntherapie in der Tumorbehandlung	12
1.11. U79260(FTO)	13
1.12. Zielstellung der vorliegenden Arbeit	14
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>15</b>
2.1. Materialien	15
2.1.1. Laborgeräte	15
2.1.2. Verbrauchsmaterialien	15
2.1.3. Laborchemikalien	16
2.1.4. Software	17
2.2. Methoden	18
2.2.1. Grundlegende Methoden der Zellkultur	18
2.2.2. Tumorzellen und T2	18
2.2.3. T2 Stabilisierungs-Assay	19
2.2.4. T- und B-Zell-Isolierung aus Vollblut	19
2.2.5. Kultur der B- und T-Zellen	20
2.2.6. Peptide	21
2.2.7. Herstellung eines T-Zell-Klons	21
2.2.8. ELISpot-Analyse	21
2.2.9. Oberflächenanalyse mittels Durchflusszytometrie	22
2.2.10. FACSotox	23
2.2.11. Statistik	24

---

<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>25</b>
3.1.	Computergestützte Analyse der theoretischen Bindefähigkeit von FPSs in die Peptidbindetasche des HLA-A0201-Moleküls	25
3.2.	T2 Stabilisierungs-Assay	25
3.3.	Erstellung FSP11-spezifischer T-Zellen und T-Zell-Klone	26
3.4.	Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenmarker	27
3.5.	ELISpot und Blockierungs-ELISpot	28
3.6.	FACSotox mit T2 und CD40Bs	30
3.7.	Cold Target Inhibition	32
3.8.	Lyse einer U79260(FTO) (-1) exprimierenden Tumorzelllinie	33
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>35</b>
4.1.	Das CRC und seine Therapie	34
4.2.	Herausforderungen in der Immuntherapie	36
4.3.	Aktuelle Ansätze zur Immuntherapie beim CRC	39
4.4.	Identifizierung und Charakterisierung eines neuen T-Zell-Epitops	41
4.5.	Ausblick	46
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>47</b>
<b>6.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>48</b>
<b>7.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>50</b>
<b>8.</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>51</b>
<b>9.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>52</b>
<b>10.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>58</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. Vorwort

Die folgende Arbeit beschäftigt sich mit der Identifizierung eines T-Zell-Epitopes als potentielle Komponente für zukünftige Ansätze spezifischer Immuntherapie zur Tumorbehandlung. Die Aktualität dieser Behandlungsstrategien spiegelt sich im Medizinreport des Deutschen Ärzteblattes vom November 2009 wider [Siegmond-Schultze, 2009]. Mehrere Ansätze zur klinischen Anwendung immuntherapeutischer Methoden in der Tumorbehandlung sind in der Erprobung. In einer Übersichtsarbeit des deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) erwiesen sich einige Impfstoffe als durchaus erfolgversprechend [Fournier et al., 2009]. Beispielsweise zeigte eine klinische Phase-III-Studie bei Patienten mit kolorektalem Tumor (CRC) und Lebermetastasen einen signifikanten Überlebensvorteil nach adjuvanter Impfung mit autologen, inaktivierten und künstlich virusinfizierten Tumorzellen [Schulze et al., 2009].

Auch auf verschiedenen Tagungen zum Thema Immuntherapie und Krebstherapie nimmt die patientenspezifische Tumorthherapie einen immer größeren Stellenwert ein [Siegmond-Schultze, 2009]. Dies ist wenig verwunderlich, ist doch der Nachweis erbracht, dass ein gesundes Immunsystem wie in Abbildung 1 dargestellt erfolgreich gegen Krebszellen vorgehen kann [Rammensee 2008]. Ziel der Immuntherapie ist die Ermöglichung der (Wieder-) Erkennung von Tumorzellen durch das Immunsystem, die sich bislang der Erkennung und Bekämpfung durch die körpereigene Abwehr entzogen haben.

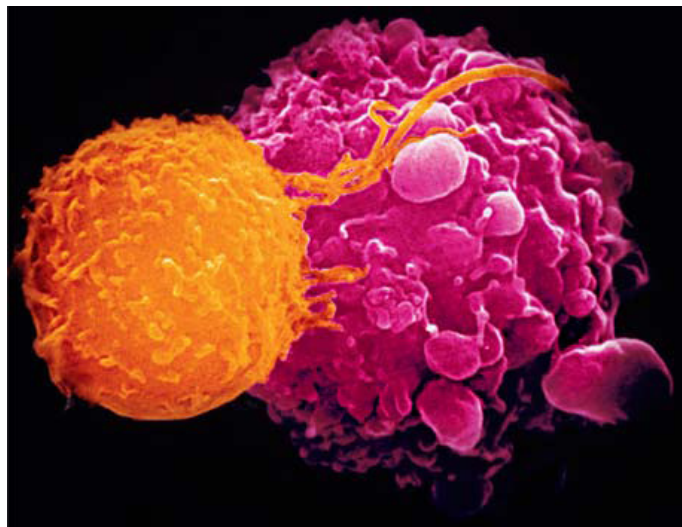


Abbildung 1: T-Lymphozyt mit der Fähigkeit zur Zytolyse (links) attackiert eine Tumorzelle (Quelle: Dtsch. Ärztebl. 11/2009, Titelseite).

## 1.2. Epidemiologie von Tumorerkrankungen

Einhergehend mit der steigenden Lebenserwartung erhöht sich auch die Inzidenz neoplastischer Erkrankungen insbesondere in den Industrienationen. So ist die Inzidenz des CRCs mit 30-35/100.000 Einwohnern hoch. Das Lebenszeitrisiko an einem CRC zu erkranken beträgt in Deutschland derzeit für Frauen 6,5% und für Männer 7,7%.

Auch in der Todesursachenstatistik spiegelt sich diese Entwicklung wider, Neoplasien belegen mittlerweile nach Herz-Kreislaufkrankungen den zweiten Platz. Wie in der Abbildung 2 dargestellt ist für beide Geschlechter das CRC mittlerweile die zweithäufigste Krebserkrankung und auch Krebstodesursache. Insgesamt hat die Inzidenz an Darmkrebs deutlich zugenommen, während die CRC-bedingte Mortalität jedoch rückläufig ist [Robert Koch Institut, 2010].

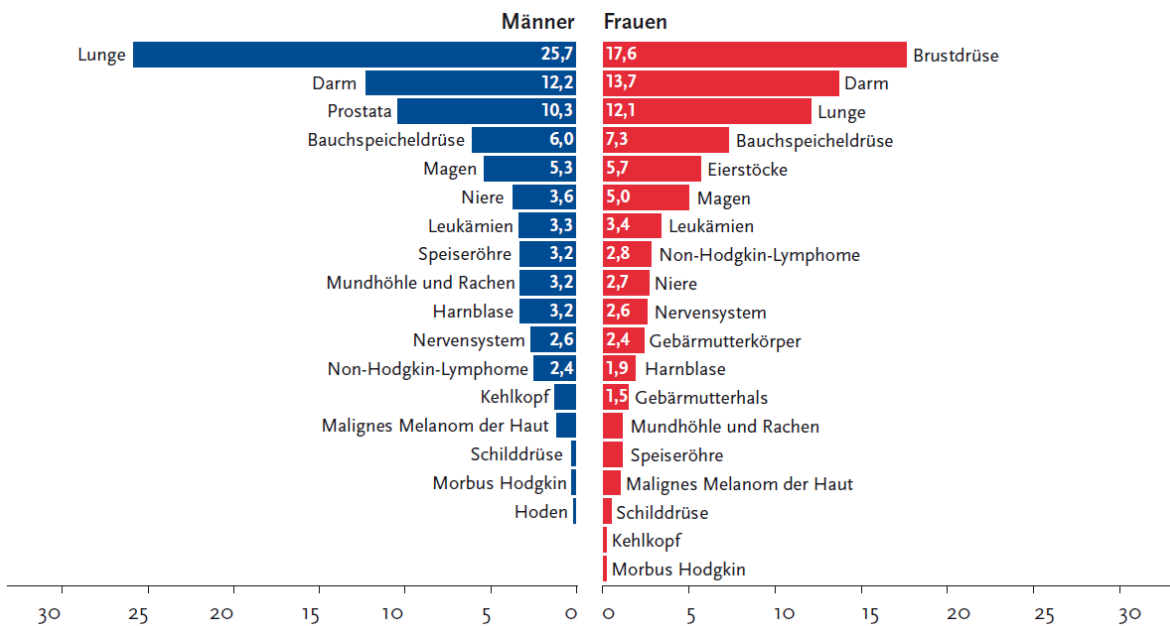


Abbildung 2: Prozentualer Anteil häufiger Tumorlokalisationen an den gesamten Krebssterbefällen in Deutschland 2006 (Quelle: Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends. 7. Ausgabe. Robert Koch-Institut, 2010).

### 1.3. Onkogenese

Die Kennzeichen eines Malignoms setzen sich laut Hanahan & Weinberg zusammen aus sechs biologischen Fähigkeiten, welche im Rahmen der mehrstufigen Tumorgenese erlangt werden (siehe Abbildung 3). Sie umfassen die Fähigkeit zur Generierung proliferativer Signale bei gleichzeitiger Resistenz gegenüber wachstumsinhibierenden Signalen und dem induzierten Zelltod. Zu diesen Fähigkeiten zählen weiterhin die Induktion von (Neo-) Angiogenese und einer unbegrenzten Zell-Replikation sowie die Fähigkeit zum invasiven Wachstum und zur Metastasierung. In den letzten Jahren spielen zunehmend zwei weitere biologische Fähigkeiten eine Rolle in der Tumorforschung: die Adaption des Energiehaushaltes an die Bedürfnisse des Tumors sowie die Befähigung von Tumoren (v.a. späterer Stadien) der antitumoralen Aktivität des Immunsystems zu entgehen. Allen Fähigkeiten liegt eine genomische Instabilität zu Grunde, welche zur Heterogenität der einzelnen Tumorentitäten führt [Hanahan & Weinberg, 2011].

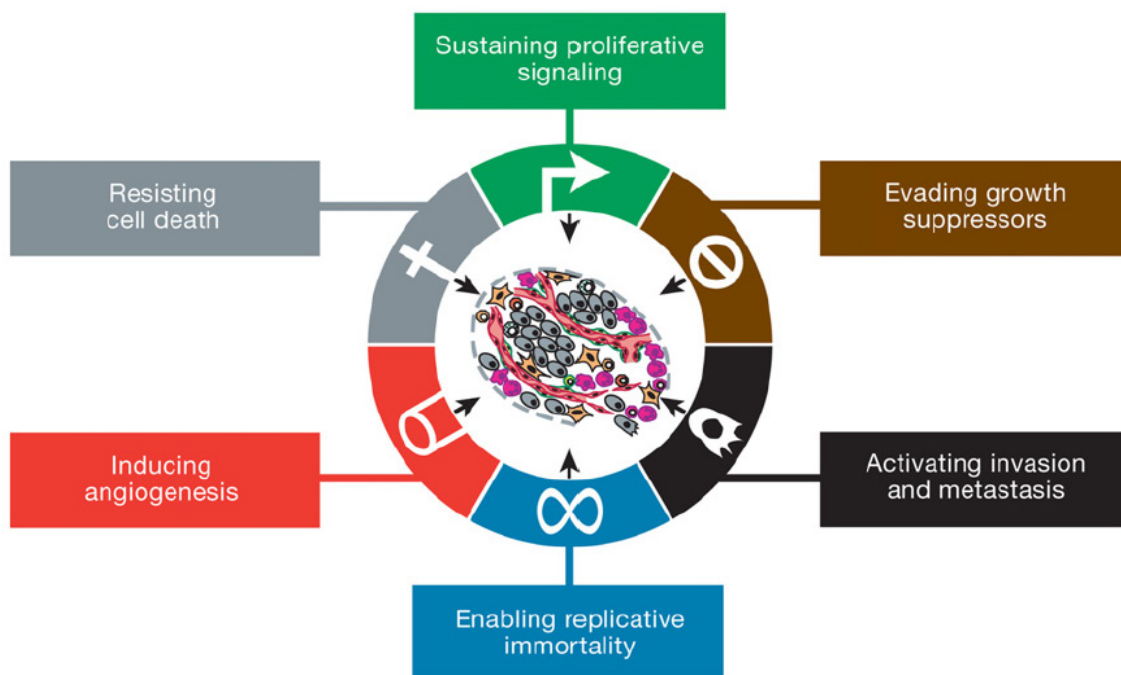


Abbildung 3: Die sechs charakteristischen biologischen Fähigkeiten eines Malignoms. Hierzu gehören die Generierung proliferativer Signale bei gleichzeitiger Umgehung wachstumsinhibierender Signale und die Umgehung des Zelltodes. Weiterhin spielt die Induktion der Angiogenese eine wichtige Rolle sowie die Fähigkeit zum invasiven Wachstum und zur Metastasierung. Ebenso ist die replikative Immortalisierung von entscheidender Bedeutung (Quelle: Hanahan & Weinberg, 2011).

Neben diesen bereits etablierten biologischen Fähigkeiten zeichnen sich zunehmend zwei Charakteristika ab, welche die Tumorentstehung sowie den Tumorprogress begünstigen können. Unterstützend wirkt zum Teil paradoxerweise auch die Inflammationsreaktion. Nicht in jedem Fall wird hierbei der Tumor angegriffen. Vielmehr häufen sich die Beweise, dass insbesondere durch das angeborene Immunsystem Tumorentstehung sowie Tumorprogress gefördert werden können. Dies geschieht zum Beispiel durch die Bereitstellung von Wachstumsfaktoren, die Förderung der Angiogenese oder die Reduktion des induzierten Zelltodes [Grivennikov et al., 2010; DeNardo et al., 2010]. Bei dem zweiten Charakteristikum handelt es sich um die genomische Instabilität und die damit einhergehende erhöhte Mutationsrate. Ursächlich hierfür sind unter anderem Mutationen in „Wächter-Genen“, deren Produkte beteiligt sind an der DNA-Reparatur, an der Erkennung fehlerhafter DNA oder an der Inaktivierung mutagener Substanzen und Moleküle [Negrini et al., 2010; Ciccia & Elledge, 2010]. Eine schematische Übersicht hierzu bietet Abbildung 4:

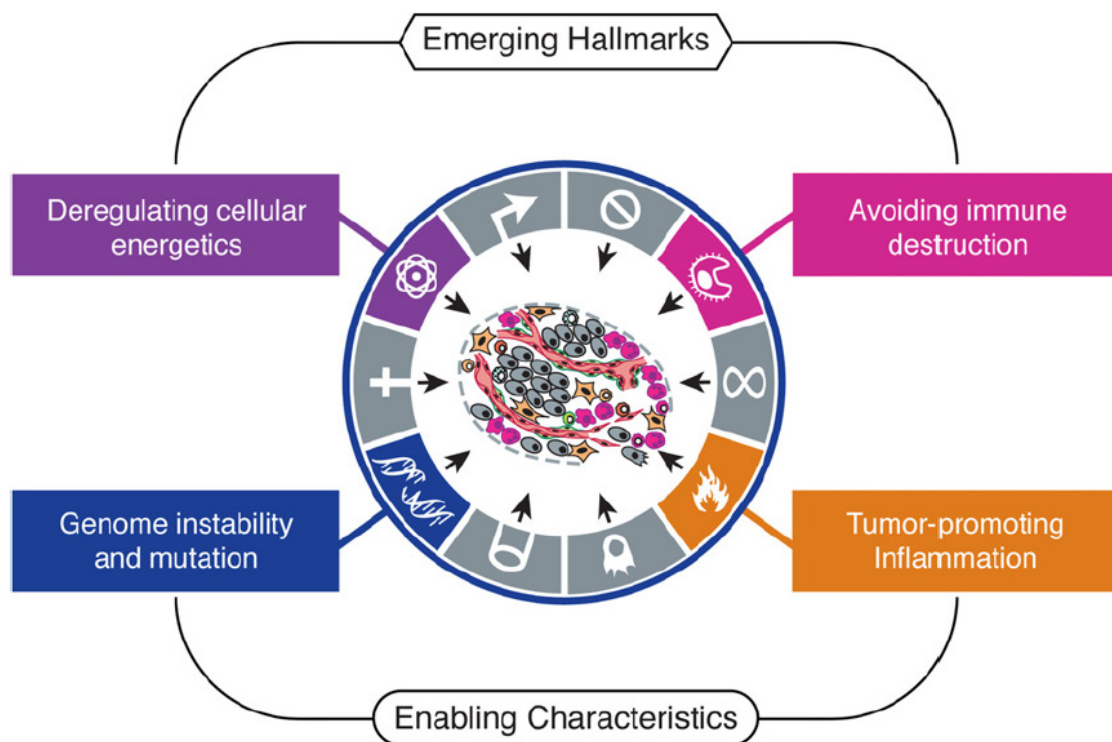


Abbildung 4: Sich abzeichnende weitere biologische Fähigkeiten maligner Entitäten, welche zumindest bei einem Teil der Tumoren unmittelbar an der Pathogenese beteiligt sind. Hierzu gehören die Beeinflussung des Energiehaushaltes zugunsten des Tumors sowie die Vermeidung der Zerstörung durch das Immunsystem. Weiterhin wird die Bedeutung der unterstützenden Faktoren genomische Instabilität (mit damit einhergehender erhöhter Mutationsrate) sowie die Tumorbegünstigende Inflammationsreaktion für Tumorentstehung und Tumorprogress hervorgehoben (Quelle: Hanahan & Weinberg, 2011).



#### 1.4. Einteilung und spezielle genetische Merkmale von CRCs

Für die Gruppe der CRC gibt es verschiedene Einteilungskriterien. Unterschieden wird unter anderem nach genetischer Disposition, hier werden die sporadisch auftretenden Tumoren abgegrenzt von den erblich bedingten Karzinomen. In letzterer Gruppe treten am häufigsten Tumoren im Zusammenhang mit der als hereditäres nicht-polypöses Kolorektalkarzinom (HNPCC) bezeichneten genetischen Prädisposition auf (3-5%), gefolgt von Tumoren aus der Gruppe der familiären adenomatösen Polyposis (FAP, ca. 1%). [Lynch et al., 1999; Poulogiannis et al., 2010]. Weiterhin können nach dem Auftreten genetischer Veränderungen chromosomal instabile Karzinome (CIN+; ca. 85% der CRCs) von hochgradig mikrosatelliteninstabilen Karzinomen (MSI-H; 15% der sporadischen und über 90% der HNPCC-Tumoren) unterschieden werden [Hisamuddin et al., 2006].

Bei den CIN+ Tumoren sind insbesondere Mutationen von Tumorsuppressorgenen ursächlich. Hierzu gehören vor allem das Gen vom Tumorprotein 53 oder das Gen für das adenomatöse Polyposis Coli Protein. Letzteres ist zum Beispiel bei FAP, aber auch bei ca. 85% der sporadisch auftretenden CRCs von Mutationen betroffen. Auch Onkogene (z. B. für die Cyclooxygenase 2 oder für das K(irsten) rat sarcoma Protein) können durch eine Mutation betroffen sein und zur Karzinogenese beitragen [Calistri et al., 2006; Hisamuddin et al., 2006]. Anders ist dies bei den MSI-H Tumoren, hier sind insbesondere folgende Genloci durch Mutationsereignisse betroffen und an der Tumorgenese beteiligt [Woerner et al., 2010; Reuschenbach et al., 2010]:

Genbezeichnung	Genlokalisierung	Funktion
Transforming growth factor beta receptor II; Insulin-like growth factor II receptor	3p22, 6q26	Signaltransduktion
MutS Homolog (MSH) 3; MSH6	5q11-q12, 2p16	DNA - Reparatur
Bcl-2 assoziiertes X-Protein	19q13.3-q13.4	Apoptose
Caspase-5	11q22.2-q22.3	Entzündung
Transcription Factor 4	18q21.1	Transkriptionsregulation
Beta-2-Mikroglobulin ( $\beta$ 2M)	15q21-q22.2	Immunüberwachung
Sec-63, O-linked N-acetyl-glucosamine Transferase	6q21, Xq13	Proteintranslokation und -modifikation
Absent in Melanoma 2	1q22	Tumorsuppressorgen
Meiotic recombination 11 Homolog	11q21	DNA-Reparatur
TATA box binding protein associated factor, RNA Polymerase I	2p25	Transkription
Zink Finger Protein 294	21q22.11	Ubiquitin-Ligase
Myristoylated alanine-rich Proteinkinase C Substrat	6q22.2	Membranprotein

*Tabelle 1: Übersicht der bislang bekannten Genloci, welche bei MSI-H Tumoren durch Mutationsereignisse an der Tumorgenese beteiligt sind. T: Thymin, A: Adenin, RNA: Ribonukleinsäure.*

### **1.5. Mikrosatelliten**

Mikrosatelliten sind kurze, repetitive, phylogenetisch konservierte Mono-, Di-, Tri- und Tetranukleotidsequenzen, welche etwa 1% unseres Gesamt-DNA-Gehalts ausmachen. Oft bestehen sie aus Wiederholungen der Basenpaare Cytosin-Adenin von bis zu 100 Nukleotideinheiten. Mikrosatelliten sind im gesamten Genom verteilt, sowohl in kodierenden als auch in nichtkodierenden Sequenzen. Ihr besonderes Merkmal ist die in allen Körperzellen eines Individuums identische Anzahl an Motivwiederholungen und damit eine charakteristische Länge. Interindividuell jedoch ist die Anzahl der Motivwiederholungen unterschiedlich und für jeden Menschen einzigartig. Mikrosatelliten gelten somit als genetischer Fingerabdruck und werden in diesem Zusammenhang unter anderem genutzt zur Vaterschaftstestung, Täterüberführung und Populationsforschung. Die genaue biologische Aufgabe der Mikrosatelliten ist bislang ungeklärt, vermutet werden eine Assoziation mit Rekombinationsvorgängen und eine direkte Beteiligung an der Genregulation [Saletti et al., 2001].

### **1.6. Das Mismatch-Repair-System und Mikrosatelliteninstabilität**

Das Mismatch-Repair-System (MMR) ist verantwortlich für die Reparatur von Basenfehlpaarungen, genauer von sogenannten Loops (kleineren, nicht gepaarten DNA-Schleifen). Weiterhin ist es beteiligt an der Rekombination nicht homologer DNA-Stränge. Das MMR-System besteht aus verschiedenen Komponenten. Ein Komplex besteht aus MSH2 und MSH6. Dieser ist verantwortlich für die Reparatur von Fehlpaarungen von 1 bis 2 Basenpaaren. Ein zweiter Komplex bestehend aus MSH2 und MSH3 repariert Fehlpaarungen von 2 bis 4 Basenpaaren. Beide Komplexe können ebenfalls die Insertion oder Deletion einer einzelnen Base erkennen. Ein letzter Komplex bestehend aus dem MutL Homolog (MLH) 1 und entweder Postmeiotic segregation increased (PMS) 2, PMS1 oder MLH3 lagert sich an einen der ersten beiden Komplexe an. Die fehlerhaften Basen der DNA-Stränge werden ausgeschnitten und der DNA-Strang anschließend durch die reguläre DNA-Polymerase aufgefüllt [Shah et al., 2010; Hsieh et al., 2008].

Tabelle 2 gibt einen Überblick über die bislang bekannten Gene, deren Transkriptionsprodukte am MMR-System beteiligt sind:

Gen	Genlokalisierung	Referenz
MLH1	3p21.3	Papadopoulos et al., 1994; Bronner et al., 1994
MSH2	2p22-p21	Fishel et al., 1994; Leach et al., 1993
MSH3	5q11-q12	Guerrette et al., 1998
MSH6	2p16	Miyaki et al., 1997; Akiyama et al., 1997
PMS1	2q31.1	Nicolaides et al., 1994
PMS2	7p22.2	Worthy et al., 2005; Hendriks et al., 2006

*Tabelle 2: Übersicht über die bislang identifizierten MMR-Gene und ihre Genlokalisierung.*

Die biologische Bedeutung des MMR-Systems spiegelt sich wider in einem um 80 bis 90% erhöhten Malignomrisiko beim Vorhandensein einer Mutation in einem Allel eines MMR-Gens. Ein intaktes MMR-System hingegen senkt die Mutationsrate in Mikrosatelliten um das Hundert- bis Tausendfache und reduziert damit auch das Tumorrisiko erheblich [Hsieh et al., 2008; Strand et al., 1993].

Bei HNPCC-Anlageträgern ist bereits in allen Zellen des Körpers ein Allel eines Gens des MMR-Systems (insbesondere MLH1 und/oder MSH2) durch eine autosomal-dominant vererbte Keimbahnmutation funktionsuntüchtig geworden. Wird nun das alleinige verbliebene funktionstüchtige Gen einer Zelle durch ein spontanes Mutationsereignis betroffen, steigt das Tumorrisiko, insbesondere für CRCs, erheblich. Anders als der Name „nicht-polypöses“ CRC vermuten lässt entwickelt sich auch bei CRCs der HNPCC-Gruppe der Tumor zumeist aus einem Adenom [Drescher et al., 2010; Lynch et al., 1998].

Doch auch bei etwa 15% der sporadisch auftretenden CRCs ist ein funktioneller Defekt des MMR-Systems ursächlich für die Tumorentstehung. Dies beruht in den überwiegenden Fällen auf einer Methylierung des Promotorbereichs des MLH1-Gens [Kim et al., 2010]. Die aberrante Promotormethylierung verursacht ein sogenanntes Gen-Silencing. Dies verhindert die Transkription von MLH1 und verursacht folglich eine Reduktion der für die regelrechte DNA-Reparatur benötigten Transkriptionsprodukte [Herman et al., 1998].

Eine weitere Ursache für das Ausschalten der DNA-Reparatur zeigte sich bei Patienten unter immunsuppressiver Therapie mit Azathioprin. Hier konnte ein gehäuftes Auftreten von akuter myeloischer Leukämie (AML) beobachtet werden. Deutlich häufiger als bei spontan auftretender AML lässt sich hier MSI-H nachweisen [Offman et al., 2004]. Dies beruht auf einer positiven Selektion von Zellen mit defektem MMR-System, da diese gegenüber dem antiproliferativen Wirkmechanismus der Thiopurine eine natürliche Resistenz aufweisen [Borie et al., 2009].

Unabhängig vom zugrundeliegenden Mechanismus kommt es bei einem funktionellen Ausfall des MMR-System zu einer unzureichenden Fehlerkorrektur bei der Neusynthese von DNA-Strängen. Dies verursacht eine über die Zeit zunehmende und variierende Deletion beziehungsweise Addition einzelner Basen und führt damit zum Phänomen der Mikrosatelliteninstabilität. Instabilität in einem kodierenden Mikrosatelliten (cMS) führt nahezu zwangsweise zu einer Verschiebung des Leserasters und wird demzufolge zu den Leserastermutationen (englisch: Frameshift-Mutation) gerechnet. Bei Translation der entsprechenden mutierten Sequenz werden von der Mutationsstelle aus in Richtung des Carboxyterminus Neopeptide, so genannte Frameshift-Peptide (FSP), synthetisiert. Diese Neopeptide können Epitope für die Erkennung durch zytotoxische T-Zellen (CTL) darstellen und bieten damit eine Angriffsfläche für das Immunsystem [Garbe et al, 2011; Linnebacher et al, 2001].

### **1.7. Mikrosatelliteninstabilität und Karzinome**

Zur Beurteilung von MSI haben sich insgesamt 5 Marker etabliert (Mononukleotide BAT25, BAT26; Dinukleotide D17S250, D5S346, D2S123), zusammengefasst im sogenannten Bethesda Panel. Je nach Anzahl der mutierten Marker wird unterschieden zwischen hochgradiger MSI (MSI-H, mindestens 2 Marker mutiert), niedriggradiger MSI (MSI-L, ein Marker mutiert) und mikrosatellitenstabilen Tumoren (MSS, keine Mutation). Da sich MSI-L Tumoren in ihrem klinischen und pathologischen Verhalten kaum von MSS-Tumoren unterscheiden wird im Weiteren insbesondere auf MSI-H Tumoren eingegangen [Pawlik et al., 2004; Boland et al., 1998].

MSI-H Tumoren zeigen einige ganz spezielle Merkmale, welche unter anderem auch mit einer besseren Prognose verbunden sind. Zu diesen Merkmalen zählt unter anderem eine schlechtere Differenzierung bei gleichzeitig besserer Prognose im Vergleich zu stadiengleichen CIN+ Tumoren. Weitere Merkmale sind eine geringere Rate an Fernmetastasierungen, eine erhöhte Apoptoserate im Tumorgewebe, eine hohe Anzahl tumorinfiltrierender T-Zellen sowie insgesamt eine höhere Anzahl zytotoxischer T-Zellen [Boland et al., 2010; Thibodeau et al., 1993].

Zusammengenommen führten diese Eigenschaften zu der Annahme, dass MSI-H Tumoren einer Erkennung und Bekämpfung durch das Immunsystem besser zugänglich sind als dies bei MSS/MSI-L Tumoren der Fall ist. Dies warf die Frage auf, ob MSI-H Tumoren spezielle Antigene aufweisen, die (mit)verantwortlich für diese bessere Immunüberwachung und die damit assoziierte bessere Prognose sind. Im Rahmen der Leserasterverschiebung produzieren MSI-H Tumoren die besagten spezifischen FSPs. Für einige FSPs konnte bei entsprechender Präsentation des Peptides bereits die Erkennung und Lyse durch CTLs gezeigt werden [Linnebacher et al., 2001; Ripberger et al., 2003; Schwitalle et al., 2004]. Damit ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass FSPs an der Erkennung von MSI-H Tumorentitäten durch das Immunsystem beteiligt sind.

### **1.8. Tumorbekämpfung im intakten Immunsystem**

Schon lange ist bekannt, dass dem Immunsystem beim Bekämpfen maligne entarteter Zellen eine tragende Rolle zukommt. In mehreren Studien konnte nachgewiesen werden, dass Tumorzellen einer sogenannten „tumor immune surveillance“, einer Überwachung durch das Immunsystem unterliegen [Finn 2008; Dunn et al., 2002; Burnet, 1957; Thomas, 1982; Burnet, 1970]. Von besonderer Bedeutung ist hierbei die Interaktion zwischen Komponenten des angeborenen Immunsystem (Antigen-präsentierende Zellen: APCs) mit denen des erworbenen Immunsystems (B- und T-Zellen) [Rossi & Young, 2005; Friedl et al., 2005]. In letzterer Gruppe sind es insbesondere die Cluster of Differentiation (CD) 4 und CD8-positiven T-Zellen, die an der Tumorerkennung und Bekämpfung beteiligt sind. Die CD8-CTLs können als Effektorzellen durch Freisetzung lytischer Granula die Apoptose auslösen. Hierzu müssen ihnen im Major histocompatibility complex (MHC) entsprechende tumorspezifische Peptide präsentiert werden [Henkart, 1994; Squier et al., 1994].

Ein spezieller Mechanismus kommt zum Tragen bei gleichzeitigem Vorhandensein tumorspezifischer Peptide sowie spezifischer aktivierter CD8-T-Zellen und Typ-1-T-Helferzellen. In diesem Fall kann über die Bindung von CD95-Ligand der T-Zelle an CD95 auf der Zielzellmembran eine Proteasenkaskade ausgelöst werden, welche über die Zerstörung von Zielzell-DNA zum Zelltod führt [Janssen et al., 2010; Suda et al., 1994].

Verschiedene Immunregulatoren unterstützen die Immunantwort. Insbesondere Zytokine wie Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) oder der Tumor Nekrose Faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und TNF- $\beta$  können z.B. Makrophagen anlocken oder die Expression von MHC-I-Molekülen hochregulieren. TNF- $\alpha$  und TNF- $\beta$  können zudem in Wechselwirkung mit dem TNF-Rezeptor I die Zerstörung der Zielzelle unterstützen [Mond et al., 1995].

Professionelle antigenpräsentierende Zellen (B-Zellen, dendritische Zellen (DC), Makrophagen) werden benötigt, um CD4-Zellen zu aktivieren. Hierzu erfolgt die Präsentation von Peptiden im MHC-II-Molekül, ein Zweitsignal in Form von IL 2 oder zellgebundene Aktivierungsmarker (z. B. CD54) unterstützt die Aktivierung der CD4-Zellen [Allison et al., 1995].

Über die oben genannten Mechanismen sollte es im gesunden Organismus zur Zerstörung der entarteten Zellen sowie zur Entwicklung eines immunologischen Gedächtnisses kommen [Smyth et al., 2002].

### **1.9. Immune Escape Mechanismen**

Verschiedene Mechanismen können dazu führen, dass maligne Zellen der Erkennung durch das Immunsystem entgehen. Einige Tumorentitäten entwickeln nur eine geringe Immunität, indem sie keine oder nur eine geringe Anzahl antigener Peptide präsentieren. Zudem kann an der Tumorzelloberfläche die Exprimierung von Adhäsionsmolekülen bzw. kostimulatorischen Molekülen fehlen, so dass keine adäquate T-Zell-Reaktion induziert oder aufrechterhalten werden kann. Einige Tumorzellen sezernieren Faktoren, welche T-Zellen direkt hemmen oder T-Suppressorzellen aktivieren und entgehen so der Immunabwehr. Insbesondere langsam wachsende Tumoren können über das Prinzip der Desensibilisierung der Immunantwort entgehen, indem sie stetig eine geringe Menge tumorassoziierter Antigene in die Blutbahn abgeben [Janeway et al., 2002].

Eine weitere Grundvoraussetzung für die Erkennung entarteter Zellen durch CTLs und deren Aktivierung ist die Tumorantigenpräsentation im Human leukocyte

antigen I Molekül (HLA, wobei diese den MHC-Molekülen spezifisch im Menschen entsprechen) [Stevanović et al., 1999]. Demzufolge kann über die Veränderung der HLA-I-Expression auf der Tumorzelloberfläche die Erkennung durch das Immunsystem gestört oder ganz aufgehoben werden [Algarra et al, 2004, Chang et al, 2007]. Ursächlich hierfür ist zum Beispiel die Mutation verschiedener Komponenten, deren Ausfall einen reibungslosen Ablauf der Immunerkennung unmöglich machen. Hierzu gehören unter anderem auch Mutationen von HLA-I-Genen [Koopman et al., 1999] oder eine Mutation des  $\beta 2M$  [Jordanova et al., 2003, Bicknell et al., 1996, Kloor et al., 2005]. Weiterhin können die Komponenten der Antigen-Prozessierung, wie z. B. die Peptidtransporter Transporter associated with antigen processing 1 (TAP1) und TAP2, von einer Mutation betroffen sein [Cabrera et al., 2003, Ferris et al., 2006, Seliger et al., 2003]. Eine Übersicht über die verschiedenen Mechanismen zur Umgehung der Immunüberwachung bietet Abbildung 5 [Evans et al., 2006].

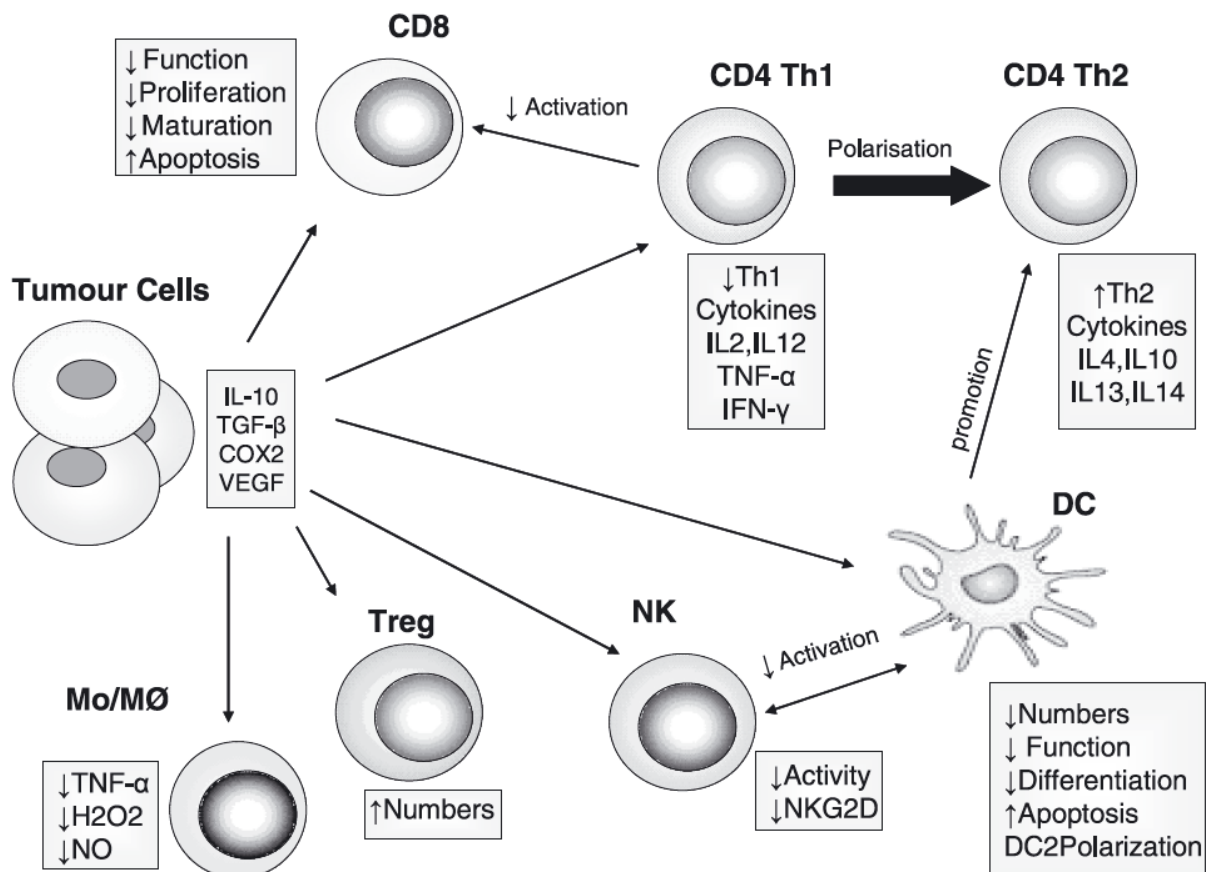


Abbildung 5: Mögliche Mechanismen, welche Tumorzellen zur Umgehung der Erkennung durch das Immunsystem nutzen. CD: Cluster of Differentiation, COX: Cyclooxygenase, DC dendritische Zelle, IL: Interleukin, IFN: Interferon, NK: natürliche Killerzelle, NO: Stickstoffmonoxid, Th: T-Helferzelle, TGF: Transforming Growth Factor, TNF: Tumor Nekrose Faktor, Treg: regulatorische T-Zellen, VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor [Evans et al., 2006].

### **1.10. Immuntherapie in der Tumorbehandlung**

Ziel der Immuntherapie ist die (Wieder-)Erkennung von maligne entarteten Zellen, die sich der Immunüberwachung entzogen haben. Unterschieden wird dabei die aktive Immunisierung (z. B. die Verimpfung von Tumorlysaten) von der passiven Immunisierung (z. B. die Verabreichung von monoklonalen Antikörpern, autologen T-Zellen oder Zytokinen). Bereits in den 90er Jahren des vorletzten Jahrhunderts experimentierte der Chirurg William B. Coley erfolgreich mit einer systemischen inflammatorischen Reaktion. Diese wurde verursacht durch die Injektion vom sogenannten Coley's Toxin (einer Mischung aus Streptokokken- und Serratia marescencens-Bakterienkulturen) zur Eindämmung des Tumorprogresses [Bickels et al., 2002]. Doch auch in der aktuelleren Forschung gibt es immer mehr Ansätze zur immuntherapeutischen Karzinombehandlung. Hierzu gehört die bereits etablierte passive Immuntherapie, z. B. durch die Gabe monoklonaler Antikörper wie Trastuzumab (Antikörper gerichtet gegen den human epidermal growth factor receptor 2) beim Mammakarzinom [Chang et al., 2010]. Ebenfalls gehört dazu die Therapie mit Bevacizumab, einem gegen den vascular endothelial growth factor (VEGF) gerichteten Antikörper, welcher beim metastasierten CRC eingesetzt wird [Hurwitz et al., 2009; Tol et al., 2010]. Doch auch die Therapie mit Interleukin 2 beim (metastasierten) malignen Melanom zählt zur passiven Immuntherapie [Bhatia et al., 2009].

Auch auf dem Gebiet der aktiven Immunisierung konnten z. B. in einer Phase-III-Studie erste Erfolge erzielt werden in der Behandlung des metastasierten CRC. Nach vollständiger Entfernung von Primärtumor und Metastasen wurden resezierte Tumorzellen zunächst bestrahlt, dann mit einem nicht humanpathogenen Virus infiziert und dem Patienten subkutan injiziert. Ein deutlich besseres Ergebnis mit geringerer Rezidivrate und Mortalität als in der Vergleichsgruppe konnte verzeichnet werden [Schulze et al., 2009]. Ähnliche Vorteile im rezidivfreien Überleben zeigten sich in einer Phase-III-Studie zur Immuntherapie beim Non-Hodgkin-Lymphom. Diese Tumoren gehen aus Antikörper-produzierenden B-Zellen hervor und bilden diese weiter – sie eignen sich auch als tumorspezifische Antigene. Durch Fusionierung der Tumorzelle mit einer Myelomzelle konnten Hybridomzelle gebildet werden, welche entsprechende Antikörper bildeten. Diese wurde an ein Trägerprotein gekoppelt und dem Patienten verabreicht, wodurch sich sowohl eine



zelluläre als auch eine humorale Immunantwort induzieren ließ [Schuster et al., 2009].

### **1.11. U79260(FTO)**

Das in der vorliegenden Arbeit untersuchte HLA-A0201-restringierte FSP11 stammt vom sogenannten „Fat Mass and Obesity“ assoziierten Gen U79260(FTO) und ist lokalisiert auf dem Chromosom 16q12.2 (gi:1710215). Die genaue Funktion des Gens ist bislang noch nicht endgültig geklärt. Wie der Name jedoch bereits zum Ausdruck bringt wird eine Assoziation mit der Regulation von Metabolismus und Energiehaushalt vermutet [Loos et al., 2008].

Die zugehörige mRNA zeigte eine Mutationsrate von 81,8% in CRCs sowie bis zu 100% in etablierten Zelllinien von CRCs. Im Vergleich dazu liegt die Mutationsrate in anderen Tumorentitäten deutlich niedriger (6,7% in Magenkarzinomen, 41,7% in Endometriumkarzinomen). Dies spricht für eine hohe Spezifität für das Auftreten in CRCs [Woerner et al., 2005; SelTarbase, Woerner et al., Release 200804].

### **1.12. Zielstellung der vorliegenden Arbeit**

Die Therapie von CRCs umfasst standardmäßig die operative Entfernung sowie eine stadienabhängige Radio- und Chemotherapie. Trotz guter Behandlungsmöglichkeit und guter Prognose in frühen Tumorstadien steigt die Letalität und Behandlungstoxizität mit zunehmendem Tumorprogress. Dies stellt insbesondere bei steigender Inzidenz von CRCs ein Behandlungsproblem dar. In bestimmten Subgruppen kommt es durch den Ausfall des MMR-Systems (über 90% bei Tumoren der HNPCC-Gruppe, 15% der sporadischen CRCs) zur Leserasterverschiebung und damit zur Translation von Neopeptiden, die dem Immunsystem als Erkennungsstruktur zur effektiven Tumorbekämpfung dienen könnten. In der folgenden Arbeit wurde ein derartiges Neopeptid (FSP11, TLSPGWSAV), entstehend durch eine (-1)-Leserasterverschiebung im Gen U79260(FTO), auf sein immunogenes Potential hin untersucht.

Zunächst erfolgte hierzu die Isolation von B- und T-Zellen aus dem Vollblut eines gesunden Spenders. Mittels CD40L Kultursystem wurden mit FSP11 beladene CD40-aktivierte B-Zellen (CD40Bs) genutzt zur Stimulation autologer T-Zellen. Diese wurden durchflusszytometrisch auf ihre Oberflächenmarker hin untersucht. Mittels IFN- $\gamma$ -Enzyme-linked Immunosorbent Spot (ELISpot) konnte die Erkennung von FSP11 durch die T-Zellen nachgewiesen werden. Zum Nachweis der spezifischen Erkennung erfolgten Blockierungs-ELISpot sowie eine Cold-Target-Inhibition. Zum Beweis des zytotoxischen Potentials wurde mittels Fluorescence activated cell sorting (FACS) ein Zytotoxizitätstest (FACSotox) durchgeführt. Hierzu wurden die Zielzellen (FSP11-beladene T2 und CD40Bs, Tumorzellen mit und ohne die zugrundeliegende Mutation) zusammen mit den spezifischen T-Zellen inkubiert und im Anschluss durchflusszytometrisch die Zytotoxizität bestimmt.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Materialien

#### 2.1.1. Laborgeräte

CO <sub>2</sub> Brutschrank	Binder
Bestrahlungsanlage	Gammabestrahlungsanlage IBL 673
Eismaschine	Scotsman AF80
FACS Calibur Durchflusszytometer	BD Biosciences
Freezing Container	Nalgene® Labware
HandyStep®	Brand
Kühlschrank	Liebherr
Lichtmikroskop Olympus CKX41	Olympus
Laborzentrifuge	Sigma
Mikropipetten	Eppendorf
Neubauer Zählkammer	Marienfeld GmbH & Co KG
Ratiolab® accupetta	Ratiolab
Sterile Werkbank s@flow 1.2	Nunc GmbH
Tiefkühlschrank -20°C	Bosch
Tiefkühlschrank -80°C	Kryotec
Vortexe-Genie2™	Scientific Industries
Präzisionswaage KERN EW	KERN
Wasserbad	MLW W11
Tischzentrifuge Centrifuge 54150	Eppendorf

#### 2.1.2. Verbrauchsmaterialien

Dispenser-Tips	Brand
Einwegpipetten Cellstar®	Greiner Bio-One
ELISpot-Platten	Mabtech, Nach, Schweden
Eppendorf-Reaktionsgefäße	Eppendorf
FACS-Röhrchen	Sarstedt
Kryo-Röhrchen cryo.s™	Greiner Bio-One
Küvetten	Sarstedt
Kulturplatten (6, 24, 96 Well)	Greiner Bio-One
PCR-Tubes	BioZym

Pipettenspitzen	Greiner Bio-One
Röhrchen	FALCON® Polypropylen Tubes 15ml und 50ml
Trennsäule & Separator	MACS Pan T cell isolation Kit II (Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach)
Zellkulturflaschen Cellstar®	Greiner Bio-One
Zentrifugenröhrchen Cellstar®	Greiner Bio-One

### 2.1.3. Laborchemikalien

β2M	SIGMA
5-Brom-4-Chlor-3-Indoxylphosphat/ Nitroblau-Tetrazoliumchlorid	Promega
Dimethylsulfoxid	AppliChem
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM/Ham's F12)	PAA
Ethanol	Zentralapotheke der Universitätsklinik Rostock
Ethidium Bromid Lösung 10 mg/ml	Promega
Fetal Calve Serum (FCS)	PAA
Ficoll (LSM 1077 Lymphocyte)	PAA
Formafix 4X	Grimm med. Logistik GmbH
Gentamicin	Ratiopharm
Interleukin 2/4/7	ImmunoTools
Insulin Transferrin Selenium	Gibco BRL
Iscove's modified DMEM (IMDM)	PAA
L-Glutamin (200mM)	PAA
Supplement	Invitrogen
Paraformaldehyd (1% bzw. 4%)	Apotheke des Klinikums
Penicillin	Jenapharm
Phosphate Buffered Saline (PBS)	PAA
Propidiumiodid	SIGMA
Streptavidin-gekoppelte alkalische Phosphatase	Mabtech
Streptomycin	Fatol

Trypanblau	AppliChem
Trypsin EDTA (1:250)	PAA
Tween 20	SIGMA

#### **2.1.4. Software**

Bildbearbeitung	Adobe Photoshop CS Adobe Illustrator
FACS-Analyse	CellQuest Pro ModFit LT™
Textprogramme	Microsoft Office

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Grundlegende Methoden der Zellkultur

Sofern nicht anders angegeben erfolgten sämtliche Experimente und Zellkulturen unter sterilen Bedingungen. Ebenfalls erfolgte, sofern nicht anders angegeben, die Inkubation sämtlicher Zellen und Versuchsansätze bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in wassergesättigter Atmosphäre.

Die Ernte von Suspensionzellen erfolgte durch Zentrifugation und Resuspension des Zellpellets in frischem Standardmedium. Die Ernte adhärenter Zellen erfolgte, sofern nicht anders angegeben, durch Absaugen des Nährmediums und Zugabe von 1ml Trypsin zum Ablösen der adhärenter Zellen vom Untergrund. Die Reaktion wurde nach ca. einer Minute mit 10ml Standardmedium gestoppt und 1-3x10<sup>6</sup> adhärenter Zellen wurden erneut in T75 bzw. T175 Flaschen ausgesät. Tabelle 3 gibt einen Überblick über die verwendeten Kulturmedien sowie deren Zusammensetzung:

<b>Standardmedium:</b> (B-Zellen, T2, Tumorzellen)	500ml DMEM/Hams F12 (1:1) FCS (10%) Glutamin (2mmol/l)
<b>B-Zell-Medium:</b>	Standardmedium Supplement (1:100) IL4 (2ng/ml) Penicillin (10IE/ml) Streptomycin (130µg/ml)
<b>T-Zell-Medium:</b>	500ml IMDM FCS (10%) Glutamin (2mmol/l) Supplement (1:100) Gentamicin (48µg/ml)
<b>Tabelle 3:</b> Zusammensetzung der verwendeten Zellkultur-Medien.	

### 2.2.2. Tumorzellen und T2

Folgende Tumorzellreihen wurden für die Experimente verwendet: HCT116: HLA-A0201<sup>(pos)</sup>/ U79260(FTO) (-4); SW480: HLA-A0201<sup>(pos)</sup>/ U79260(FTO) (wt); Colo60H: HLA-A0201<sup>(pos)</sup>; U79260(FTO) (-3) und KM12: HLA-A0201<sup>(neg)</sup>/ U79260(FTO) (-4). Die Zelllinien wurden entweder von der American Type Culture Collection oder der Tumorbank des DKFZ bezogen. Für einige Experimente wurde die HLA-A0201 exprimierende, in Suspension wachsende Zelllinie T2 (174 x CEM.T2 Hybridoma, TAP1/TAP2 defizient) verwendet.

### 2.2.3. T2 Stabilisierungs-Assay

Für das zu untersuchende Peptid wurden  $1,25 \times 10^6$  T2-Zellen in 1ml DMEM/F12 ohne Zusätze in ein 15ml Greiner-Röhrchen überführt und  $5 \mu\text{g/ml}$   $\beta 2\text{M}$  sowie  $10 \mu\text{g/ml}$  des entsprechenden Peptides zugegeben und über Nacht inkubiert. Es folgte ein Waschvorgang, die Resuspension des Zellpellets in 1,25 ml DMEM/F12 ohne Zusätze und die Ausplattierung in 6 Wells einer 96er U-Platte. Nach Zugabe von Anti-HLA-A0201 (Klon BB7.2) erfolgte die Inkubation auf Eis für 15min. Nach zweimaligem Waschen wurde der Zweitantikörper zugegeben und der Ansatz für 30min im Dunkeln auf Eis inkubiert. Nach nochmaligem Waschvorgang wurde das Zellpellet in PBS mit 1% Paraformaldehyd resuspendiert und an einem FACScalibur Durchflusszytomter (BD Biosciences, Heidelberg) gemessen. Die dabei erhaltene mittlere Fluoreszenz (Mean) wurde genutzt zur Berechnung des Fluoreszenzindex nach folgender Formel:

$$\text{Fluoreszenzindex} = \frac{\text{Mean Fluoreszenz mit Peptid} - \text{Mean Fluoreszenz ohne Peptid}}{\text{Mean Fluoreszenz ohne Peptid}}$$

### 2.2.4. T- und B-Zell-Isolierung aus Vollblut

B- und T-Zellen wurden aus dem Blut eines gesunden HLA-A0201<sup>(pos)</sup> Spenders nach vorheriger Aufklärung und dem Einholen einer schriftlichen Einverständniserklärung isoliert. Dazu wurden 20ml heparinisiertes Vollblut in ein 50ml Greiner-Röhrchen überführt und bis auf 35ml mit sterilem PBS-Puffer aufgefüllt. Im Anschluss erfolgte eine Unterschichtung mit Ficoll bis zu einem Gesamtvolumen von 50ml. Das Röhrchen wurde dann bei 2.000G für 15min ungebremst zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Interphasering in ein 50ml Greiner-Röhrchen transferiert, mit PBS auf ein Gesamtvolumen von 35ml aufgefüllt, abzentrifugiert und das entstehende Pellet in 10ml DMEM/Ham's F12 ohne Zusätze aufgenommen und gezählt.

Für die Trennung der B-Zellen von den T-Zellen wurde das Pan-T-Zell-Kit II von Magnetic Activated Cell Sorting (MACS) verwendet. Dazu wurde ein Zellpellet mit etwa  $1 \times 10^7$  Zellen in  $40 \mu\text{l}$  MACS-Puffer resuspendiert,  $10 \mu\text{l}$  Biotin Antibody Cocktail wurde hinzugegeben und der Ansatz 10min bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurde  $30 \mu\text{l}$  MACS Puffer sowie  $20 \mu\text{l}$  Anti-Biotin Mikro Beads zugegeben und erneut für 15min bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach einem Waschvorgang wurde das Zellpellet in  $500 \mu\text{l}$  MACS Puffer resuspendiert. Die Säule im Magneten wurde mit 3ml MACS Puffer

äquiliert und dann mit der Zellsuspension beschickt. Die Säule wurde viermal mit je 3 ml MACS Puffer nachgespült, die durchlaufende Flüssigkeit mit den T-Zellen wurde aufgefangen und im Anschluss erfolgte zur Gewinnung der B-Zellen die Entfernung der Säule aus dem Magneten und die Durchspülung mit 5ml MACS Puffer.

### **2.2.5. Kultur der B- und T-Zellen**

Die Kultur der B-Zellen erfolgte mit Hilfe des National Institute of Health (NIH) 3T3-CD154 Kultursystems - also NIH/3T3-Fibroblasten, die das humane CD154-Molekül an ihrer Oberfläche stabil exprimieren [Schultze et al., 1997; Linnebacher et al., 2001]. Zur Stimulation von B-Zellen wurden die NIH 3T3-CD154 Zellen geerntet, gewaschen und einer letalen Strahlendosis von 60Gy ausgesetzt. Anschließend erfolgte ein weiterer Waschvorgang, die Aufnahme in Standardmedium und die Ausplattierung in 6-Well-Platten ( $0,4 \times 10^5$  Zellen/Well). Nach Inkubation über Nacht sind die NIH an das Kulturgefäß adhären und das Medium wurde abgesaugt. Unmittelbar danach erfolgte die Aussaat von  $1 \times 10^6$  B-Zellen in 1ml B-Zell-Medium. Analog zu diesem Vorgehen wurden die B-Zellen alle drei bis vier Tage restimuliert. Im weiteren Verlauf werden diese so stimulierten und aktivierten B-Zellen als CD40-aktivierte B-Zellen (kurz: CD40Bs) bezeichnet.

Zur Stimulation der mittels magnetischer Zelltrennung erhaltenen CD3-positiven autologen T-Zellen wurden  $3 \times 10^6$  CD40Bs geerntet, zentrifugiert und mit B-Zell-Medium gewaschen. Anschließend erfolgte die Beladung der CD40Bs mit 10µg Peptid in 1ml IMDM ohne Zusätze. Nach 1h Inkubation wurden die CD40Bs zur Entfernung des überschüssigen Peptides gewaschen und mit 30Gy letal bestrahlt.

Die Stimulation der autologen T-Zellen erfolgte in einem Verhältnis von T-Zellen zu CD40Bs von 4:1. Zumeist wurden  $1,2 \times 10^7$  T-Zellen und  $3 \times 10^6$  Peptid-beladene CD40Bs gepoolt, abzentrifugiert und in 24ml T-Zell-Medium resuspendiert. Bis zum Tag 21 der Kultur erfolgte die zusätzliche Gabe von IL7 (10ng/ml), ab Tag 28 wurde das IL7 durch IL2 (100IU/ml) ersetzt. Anschließend erfolgte die Aussaat in eine 24-Well-Platte mit 2ml/Well. Bei schnellem Verbrauch des Nährmediums wurde das T-Zell-Medium unter Zugabe von Supplement und dem entsprechendem IL ausgetauscht. Nach 7 Tagen erfolgte die Ernte der T-Zellen und die Restimulation nach dem gleichen Protokoll.



### 2.2.6. Peptide

Verwendet wurden das Peptid FSP11 (TLSPGWSAV; (-1)-mutierte Form von U79260(FTO), gi:1710215). Weiterhin wurden als Kontrollpeptide das vom Influenza-Matrix-Protein abgeleitete MP (GILGLVFTL), das an der Wachstumsregulation beteiligte Peptid P68 (YLLPAIVHI) sowie als weitere Negativkontrolle das Peptid K01 (AHTKDGFNF) verwendet [Vonderheide et al., 1999]. Alle Peptide wurden bezogen von der Peptid-Synthese-Einheit des DKFZ oder von JPT Peptide Technologies (Berlin), in Dimethylsulfoxid aufgelöst (5mg/ml) und anschließend mit sterilem PBS auf 500µg/ml verdünnt.

### 2.2.7. Herstellung eines T-Zell-Klons

Zur Herstellung eines T-Zell-Klons wurden 0,7 T-Zellen/Well in 96-Well-U-Platten ausplattiert [Kahle et al., 1981]. Autologe CD40Bs ( $2 \times 10^4$  Zellen/Well) wurden mit einer letalen Dosis (30Gy) bestrahlt, mit FSP11 beladen und in einem finalen Volumen von 200µl T-Zell-Medium unter Zusatz von Supplement (1:100) und IL2 (100 IU/ml) zu den T-Zellen gegeben. Die klonierten T-Zellen wurden wöchentlich restimuliert und nach vier Wochen wurden auswachsende Klone in 24-Well-Platten überführt, wöchentlich restimuliert oder in weiterführenden Experimenten eingesetzt.

### 2.2.8. ELISpot-Analyse

Die Analyse mittels ELISpot erfolgte zur Identifikation von T-Zellen mit zytotoxischem Potential. Hierzu wurde eine 96-Well-Nitrozellulose-Platte mit IFN $\gamma$ -Antikörpern beschickt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am Folgetag erfolgte ein Waschvorgang mit Standardmedium sowie eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur mit Standardmedium (100µl/Well) zur Blockierung unspezifischer Proteinbindestellen.

Je Well wurden  $1 \times 10^3$  T-Zellen ausplattiert, dazu kamen  $1 \times 10^4$  T2-Zellen bzw. CD40Bs als Zielzellen in einem Gesamtvolumen von 200µl T-Zell-Medium je Well. Im Anschluss erfolgte die Zugabe der Peptide in einer finalen Konzentration von 10µg/ml. Nach einer Inkubationszeit von 16h wurde die Platte gewaschen und mit biotinyliertem anti-IFN $\gamma$ -Antikörper für 4h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Waschvorgang erfolgte die Inkubation mit Streptavidin-gekoppelter alkaliner Phosphatase für 2h bei Raumtemperatur gefolgt von einem finalen Waschschrift. Für die Spoterkennung wurde die Platte mit Nitroblau-Tetrazoliumchlorid/5-Brom-4-Chlor-3-Indoxylphosphat für 45 bis 60min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Abstoppen

der Reaktion erfolgte mit reichlich Wasser, nach dem Trocknen der Platte konnten die Spots ausgezählt werden. Die Anzahl Peptid-spezifischer T-Zellen wurde errechnet, indem die durchschnittliche Anzahl von Spots in den Kontroll-Wells ohne Peptid von der Anzahl der Spots in den Peptid-beladenen Wells abgezogen wurde. Einige der resultierenden Werte waren negativ, diese wurden als Null gewertet.

Zum Nachweis der HLA-A0201-Restriktion wurde ein Blockierungs-ELISpot durchgeführt. Dazu wurden FSP11-beladene T2-Zellen bzw. CD40Bs mit den in Tabelle 4 aufgeführten monoklonalen Antikörpern HLA-A0201 (Klon BB7.2) und Pan-Anti-MHC-I (Klon W6/32) inkubiert. Die Inkubation der spezifischen T-Zellen erfolgte mit den monoklonalen Antikörpern Anti-CD3 (Klon OKT3) und Anti-CD8 (Klon OKT8) [Konopitzky et al., 2002]. Anschließend erfolgte eine ELISpot-Analyse nach dem oben beschriebenen Protokoll.

Antikörper	Klon
Anti-CD3	OKT3
Anti-CD8	OKT8
Pan-Anti-MHC-I	W6/32
Anti-HLA-A0201	BB7.2

*Tabelle 4: Übersicht über die in der ELISpot-Analyse verwendeten Antikörper sowie der den Antikörper produzierende Zellklon.*

### 2.2.9. Oberflächenanalyse mittels Durchflusszytometrie

Zur Analyse der Oberflächenmarker der T-Zellen wurden  $3 \times 10^5$  T-Zellen mit PBS gewaschen und mit den in Tabelle 5 aufgeführten direkt Fluoresceinisothiocyanat-(FITC) oder Phycoerythrin- (PE) markierten Antikörpern für 15 Minuten auf Eis inkubiert.

Antikörper gegen humanes	Herkunft	FITC/PE	Bezugsquelle
CD3	Klon UCHT-1	PE	ImmunoTools
CD4	Klon MEM-241	FITC	ImmunoTools
CD8	Klon MEM-31	PE	ImmunoTools
CD45RA	Klon MEM-56	PE	ImmunoTools
CD45RO	Klon UCHL1	FITC	ImmunoTools
CD50	Klon MEM-171	FITC	Acris
CD54	Klon 15.2	FITC	Acris
CD62L	Klon LT-TD180	PE	ImmunoTools
CD102	Klon SM223F	FITC	Acris

*Tabelle 5: Übersicht über die in der Durchflusszytometrie verwendeten Antikörper sowie deren klonale Herkunft.*

Die Zellen wurden im Anschluss zweimal gewaschen und in PBS mit 1% Paraformaldehyd fixiert und resuspendiert.

Als Negativkontrolle erfolgte die Färbung mit Isotypkontrollen. Die Antikörper wurden bezogen von ImmunoTools (Friesoythe) oder Acris (Herford). Die Messung erfolgte mit einem FACScalibur Durchflusszytometer unter Verwendung der CellQuest Software (beides BD Biosciences, Heidelberg).

### 2.2.10. FACSotox

$1 \times 10^6$  Zielzellen (CD40Bs, T2, Tumorzellen) wurden mit  $5 \mu\text{M}$  Carboxyfluorescein-Succinimidylester in 1ml T-Zell-Medium für 30min inkubiert. Dann erfolgten ein zweimaliger Waschvorgang, die Resuspension der Zielzellen in 1ml T-Zell-Medium und die erneute Inkubation für 30min. Im Anschluss daran wurden die Zielzellen mit dem entsprechenden Peptid in einer Konzentration von  $5 \mu\text{g/ml}$  versetzt und in Medium ohne FCS für 1h inkubiert. Die CD40Bs, T2 und Tumorzellen wurden dann in 96-Well-Platten ( $1 \times 10^4$  Zellen/Well) ausgesät und es erfolgte die Zugabe von T-Zellen in unterschiedlichen Effektorzellen zu Zielzellen (englisch: Target, E:T) Verhältnissen. Für die Bestimmung des spontanen Zelltodes wurden Negativkontrollen ohne Zugabe von T-Zellen angelegt. Die Platten wurden für 6 bzw. 12h inkubiert. Zum Abgrenzen der toten von den lebenden Zellen erfolgte die Zugabe von  $15 \mu\text{g/ml}$  Propidiumjodid unmittelbar vor der Messung. Die Bestimmung der Zytotoxizität erfolgte durchflusszytometrisch. Zur Berechnung des Prozentsatzes spezifischer Lyse wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{Zytotoxizität (\%)} = \frac{100 \% \times \text{tote Zielzellen im experimentellen Ansatz}}{\text{Tote Zielzellen im experimentellen Ansatz} + \text{lebende Zellen im experimentellen Ansatz}} - \frac{100 \% \times \text{tote Zielzellen im Kontrollansatz}}{\text{Tote Zielzellen im Kontrollansatz} + \text{lebende Zellen im Kontrollansatz}}$$

Zum Nachweis der Peptidspezifität wurden unmarkierte CD40Bs mit FSP11 bzw. mit einem Kontrollpeptid beladen und in einem Inhibierungsversuch verwendet. Hierzu wurde ein FACSotox nach oben beschriebenem Protokoll durchgeführt. Zusätzlich wurden jedoch die unmarkierten CD40Bs im Verhältnis von markierten zu unmarkierten CD40Bs von 1:20 hinzugegeben.

**2.2.11. Statistik**

Alle Ergebnisse wurden als Mittelwerte angegeben. Zur Bestimmung des Unterschiedes zwischen zwei Messergebnissen wurde ein Student's-T-Test durchgeführt. Als signifikant galt ein Wert von  $p=0,05$  oder niedriger.

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1. Computergestützte Analyse der theoretischen Bindefähigkeit von FSPs in die Peptidbindetasche des HLA-A0201-Moleküls**

Computergestützte Analyseprogramme, die z. B. den linearen und positionsspezifischen SYFPEITHI Algorithmus verwenden, ermöglichen die Identifizierung derjenigen Peptide, welche Erkennungsstrukturen für immunkompetente Zellen bieten könnten. Die Bewertung der Peptidesequenz erfolgt hierbei nach dem Vorhandensein von Ankeraminoacidsäuren. Unter Zuhilfenahme von SYFPEITHI erfolgte die Berechnung der wahrscheinlichen Bindestärke der Peptidsequenz des FSP11 an das HLA-A0201-Molekül. Für eine gute Bindungsfähigkeit eines Peptides spricht ein Wert von mindestens 20 [Rammensee et al., 1999]. Der SYFPEITHI-Score von 25 für die Peptidsequenz des FSP11 (TLSPGWSAV) ist somit hinweisend auf eine hohe Bindefähigkeit an das HLA-A0201-Molekül und damit die potentielle Erkennung durch das Immunsystem.

#### **3.2. T2 Stabilisierungs-Assay**

Die theoretische Fähigkeit zur Stabilisierung des HLA-A0201-Komplexes sollte in einem praktischen Versuch untermauert werden. Hierzu erfolgte ein Stabilisierungs-Assay mit TAP1 und TAP2 defizienten T2-Zellen. T2-Zellen exprimieren an ihrer Oberfläche ausschließlich HLA-A0201. Auf Grund eines Defektes in den TAP-Transportern werden zudem nur Signalpeptide sowie TAP-unabhängige Peptide an der Zelloberfläche exprimiert.

Das HLA-A0201-Molekül wird lediglich im Peptid-beladenen Zustand stabil exprimiert. Demzufolge kann nach externer Zugabe von Peptiden die akkumulierte Menge der stabil exprimierten HLA-A0201 Moleküle auf der Zelloberfläche zur Beurteilung der Stärke der Bindefähigkeit des entsprechenden Peptides herangezogen werden.

Wie in der Abbildung 6 dargestellt zeigte sich ein deutlicher Anstieg der HLA-A0201-Expression nach externer Beladung mit dem FSP11. Im Vergleich dazu zeigte die Negativkontrolle mit unbeladenen bzw. mit dem nicht HLA-A0201-bindenden Kontrollpeptid K01 beladenen T2-Zellen keinen Anstieg der HLA-Exprimierung. Als Positivkontrolle dienten T2-Zellen, welche mit dem HLA-A0201-bindenden Influenza-Matrixprotein (MP) bzw. mit dem an der Wachstumsregulation beteiligten Peptid 68 (P68) beladen wurden. Angegeben ist der Fluoreszenzindex.

Demzufolge weist das FSP11, wie bereits durch den SYFPEITHI Algorithmus zu vermuten war, tatsächlich eine stabile Komplexbildung mit HLA-A0201-Molekülen auf und führt zu dessen gesteigerter Expression auf der Zelloberfläche.

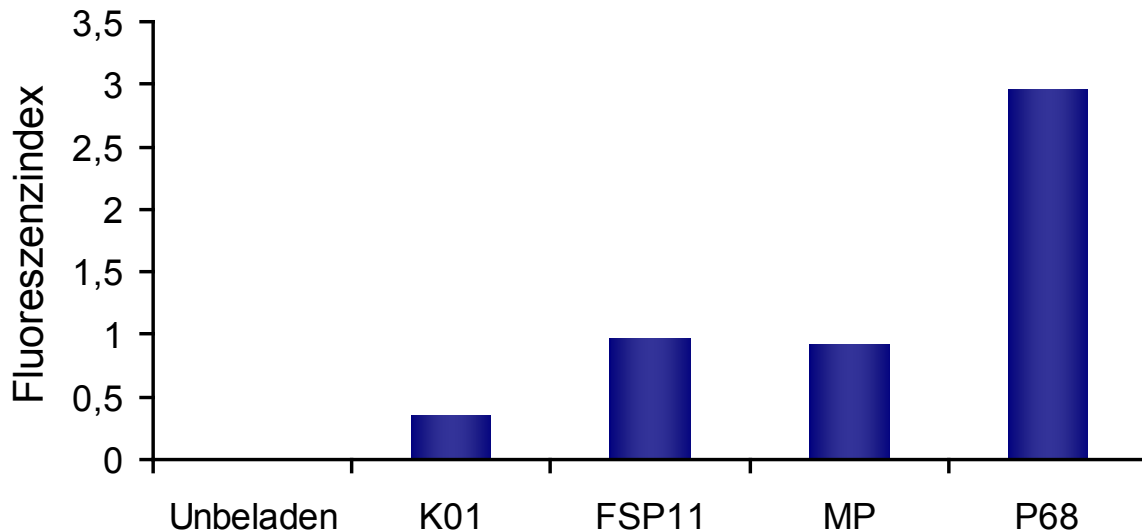


Abbildung 6: HLA-A0201-Stabilisierung durch FSP11. Die T2-Zellen wurden mit den entsprechenden Peptiden inkubiert und die HLA-A0201-Expression nach Inkubation mit dem HLA-A0201spezifischen Antikörper BB7.2 per FACS-Flow-Analyse ausgewertet. Dargestellt ist der Fluoreszenzindex. Als Negativkontrolle dienten unbeladene sowie mit dem nicht HLA-A0201-bindendem Peptid K01 beladene T2-Zellen. Zur Positivkontrolle erfolgte die Beladung mit dem nachweislich HLA-A0201-bindenden Proteinen MP und P68.

### 3.3. Erstellung FSP11-spezifischer T-Zellen und T-Zell-Klone

Analysiert wurde das immunogene Potentials des HLA-A0201-restringierten Peptids FSP11, welches sich ableitet aus der (-1)-Mutation eines T(15) cMS des U79260(FTO) Gens. Hierzu wurden T-Zell-Kulturen eines gesunden HLA-A0201<sup>+</sup> Spenders hergestellt.

Mittels des CD40L Kultursystems [Schultze et al., 1997] konnten unter Verwendung von CD40Bs als APCs FSP11-spezifische autologe T-Zellen gewonnen werden. Dazu wurden die CD40Bs mit FSP11 beladen und zur wiederholten Stimulation der autologen T-Zellen verwendet. Nach 28 Kulturtagen konnte ein 5,6facher Anstieg der T-Zell-Zahl beobachtet werden. Die Stimulation wurde für mehr als 100 Tage fortgesetzt und führte zu einer über 1.000fachen T-Zell-Expansion (Abbildung 7).

Im Weiteren konnte durch Vereinzelung der T-Zellen ein FSP11-spezifischer T-Zell-Klon gewonnen und weiteren Experimenten zugeführt werden.

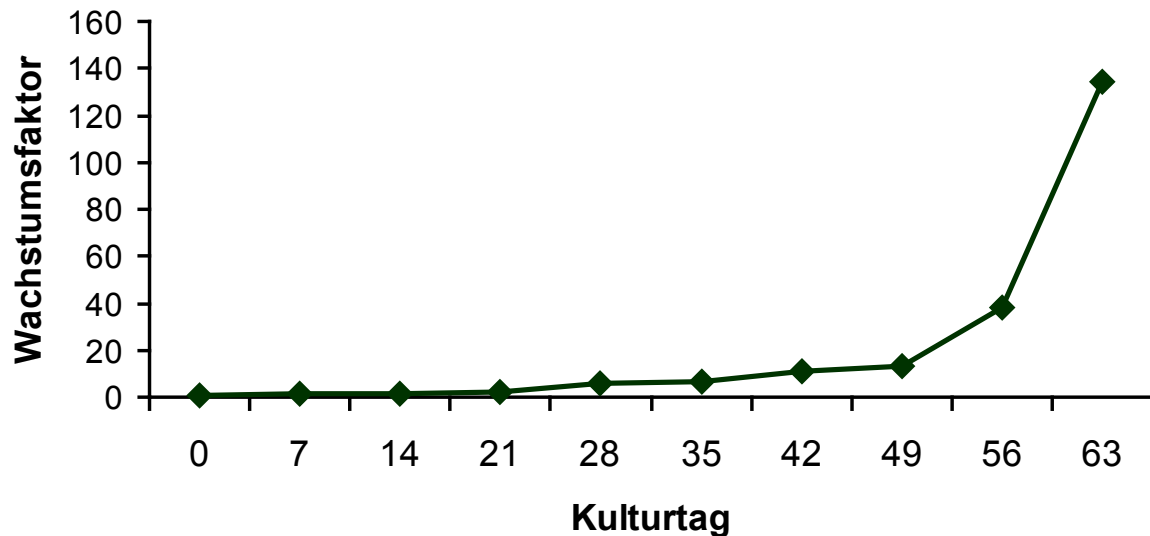


Abbildung 7: Wachstumskurve der autologen T-Zellen nach Stimulation mit FSP11-beladenen CD40Bs bis einschließlich Kulturtag 63.

### 3.4. Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenmarker

Die phänotypische Charakterisierung der stimulierten Zellen erfolgte mit Hilfe durchflusszytometrischer Analysen. Hierbei zeigte sich, dass die Zellkultur fast ausschließlich aus T-Zellen mit zytotoxischem Potential bestand (CD3: 99,9%, CD8: 99,0%, 91. Kulturtag) [Andersen et al., 2006].

Der Oberflächenmarker CD45 gehört zu den Tyrosin-Phosphatasen und spielt eine wichtige Rolle in der Lymphozytenentwicklung und der Signaltransduktion [Hermiston et al. 2003]. Im Rahmen des Aktivierungsprozesses der CTLs verändert sich die Expression der unterschiedlichen CD45-Isotypen. Die Expressierung von CD45RA durch ca. zwei Drittel der T-Zell-Kultur weist auf das Vorhandensein naiver T-Zellen hin. Der Nachweis von CD45RO auf knapp einem Drittel der T-Zell-Kultur ist ein Hinweis für das Vorhandensein von aktivierten T-Effektor-Zellen sowie von T-Gedächtniszellen [Andersen et al., 2006]. Die Expressierung von CD62L untermauert in seiner Funktion als Aktivierungsmarker weiterhin das zytotoxische Potential der T-Zell-Kultur.

Ein großer Teil der untersuchten T-Zellen exprimierte zudem die interzellulären Adhensionsmoleküle (ICAM) CD50 (97,6%), CD54 (61,5%) und CD102 (56,6%). Ihre Bedeutung liegt vor allem in der Lymphozytenaktivierung und der Induktion einer Immunreaktion auf spezifische Antigene [De Fougerolles et al. 1994].

Einen Überblick über die prozentualen Anteile der Expressierung einzelner Oberflächenmarker gibt Tabelle 6. In der Gesamtheit spricht das Expressionsmuster für eine überwiegend aus CTLs bestehende Zellkultur. Es dürften zudem sowohl naive als auch aktivierte T-Zellen und T-Gedächtniszellen vorliegen. Die Isotypkontrollen lagen zu jeder Zeit unter 2,5%.

Antigen	Positive Zellen (%)	Funktion
Isotypkontrolle FITC	1,6	Negativkontrolle
Isotypkontrolle PE	2,3	Negativkontrolle
CD3	99,9	T-Zellen
CD4	0,8	T-Helfer-Zellen
CD8	99,0	CTLs
CD45RA	60,4	Naive T-Zellen, T-Gedächtniszellen
CD45RO	27,0	aktivierte T-Effektor-Zellen, T-Gedächtniszellen
CD50	97,6	interzelluläres Adhäsionsmolekül (ICAM 3)
CD54	61,5	interzelluläres Adhäsionsmolekül (ICAM 1)
CD62L	29,4	L-Selectin (Aktivierungsmarker)
CD102	56,6	interzelluläres Adhäsionsmolekül (ICAM 2)

*Tabelle 6: FACS-Flow-Analyse der Oberflächenmarker der T-Zell-Kultur am 91. Kulturtag. Dargestellt sind Oberflächenmarker, der prozentuelle Anteil der die jeweiligen Marker tragenden Zellen an der Gesamtzellzahl sowie die Funktion des jeweiligen CD-Moleküls.*

### 3.5. ELISpot und Blockierungs-ELISpot

Zum Nachweis der spezifischen Erkennung des FSP11 durch T-Zellen erfolgte eine Analyse mittels IFN- $\gamma$ -ELISpot. HLA-A0201-positive Zielzellen wurden jeweils mit FSP11 oder Kontrollpeptid beladen und zur Stimulation der autologen T-Zellen genutzt. Anschließend erfolgte die Ermittlung der Anzahl IFN- $\gamma$  sezernierender T-Zellen durch Auszählung der Spots.

Bis zu 15,7% der T-Zellen in der Kultur sezernierten spezifisch IFN- $\gamma$  nach Stimulation mit FSP11-beladenen T2-Targetzellen und maximal 23,8% erkannten FSP11-beladene autologe B-Zellen. Exemplarisch dargestellt ist das Ergebnis einer ELISpot-Analyse der T-Zell-Kultur sowohl mit T2-Zellen (Abbildung 8A) als auch mit CD40Bs (Abbildung 8B) als Targetzellen. In beiden Experimenten führten unbeladene bzw. mit einem irrelevanten Peptid beladene Targetzellen kaum zu einer Zunahme der Spot-Zahl im Well. Eine signifikante Zunahme der Spots, entsprechend einer Aktivierung IFN- $\gamma$ -sezernierender CTLs, war jedoch auslösbar durch Inkubation der Targetzellen mit FSP11.



Zusammengenommen belegen diese Daten die Spezifität der Erkennung des FSP11 durch die T-Zell-Kultur. T2-Zellen exprimieren ausschließlich HLA-A0201 und keine weiteren HLA-Allele. Somit beruht die Erkennung der Zielzellen mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit an der Erkennung von FSP11 im direkten räumlichen Kontext mit dem HLA-A0201-Molekül.

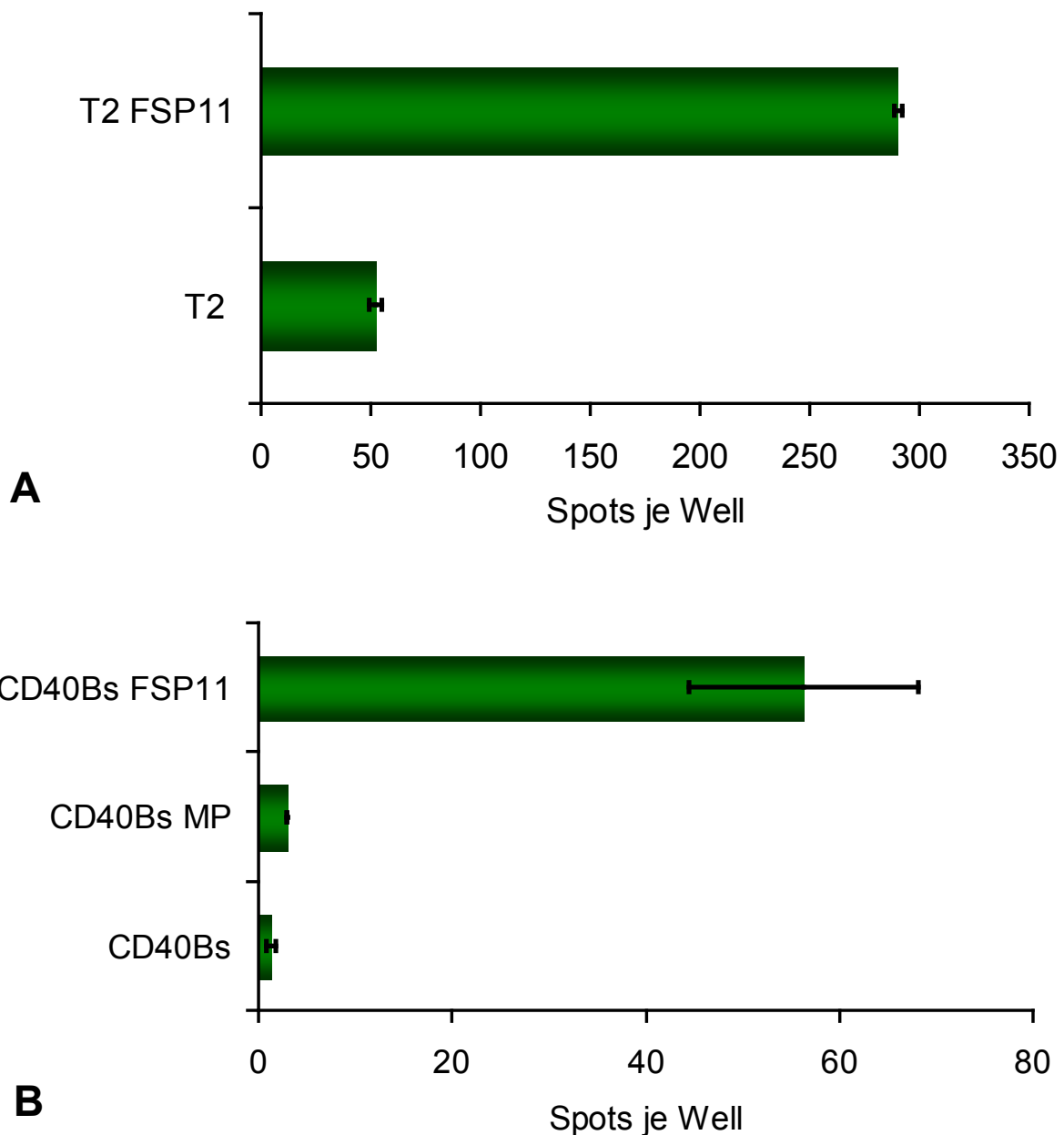


Abbildung 8: Exemplarische Darstellung der spezifischen Erkennung von T2-Zellen (Abb. 8A) und von CD40Bs (Abb. 8B) nach ihrer Beladung mit FSP11 durch die autologen T-Zellen. Im Gegensatz dazu werden die unbeladenen T2-Zellen und CD40Bs bzw. die mit dem Kontrollpeptid MP beladenen CD40Bs nicht erkannt (Angabe als Mittelwert aus je drei Wells, je Well 1.000 T-Zellen).

Zum weiteren und zusätzlichen Nachweis der HLA-A0201-Restriktion wurde ein Blockierungs-ELISpot durchgeführt. Hierbei zeigte sich eine deutliche Verringerung der Anzahl IFN- $\gamma$  sezernierender T-Zellen durch die Zugabe von Antikörpern gegen pan-MHC-I und HLA-A0201. Auch die Blockierung von CD3 bzw. CD8 mittels Antikörpern bewirkte einen deutlichen Rückgang der spezifischen Erkennung der FSP11-beladenen CD40Bs. Die Ergebnisse dieses Experimentes lassen ebenfalls darauf schließen, dass die Erkennung von FSP11 im direkten Zusammenhang mit dem HLA-A0201-Molekül erfolgt und dass hierzu CTLs benötigt werden (vergleiche hierzu Abbildung 9).

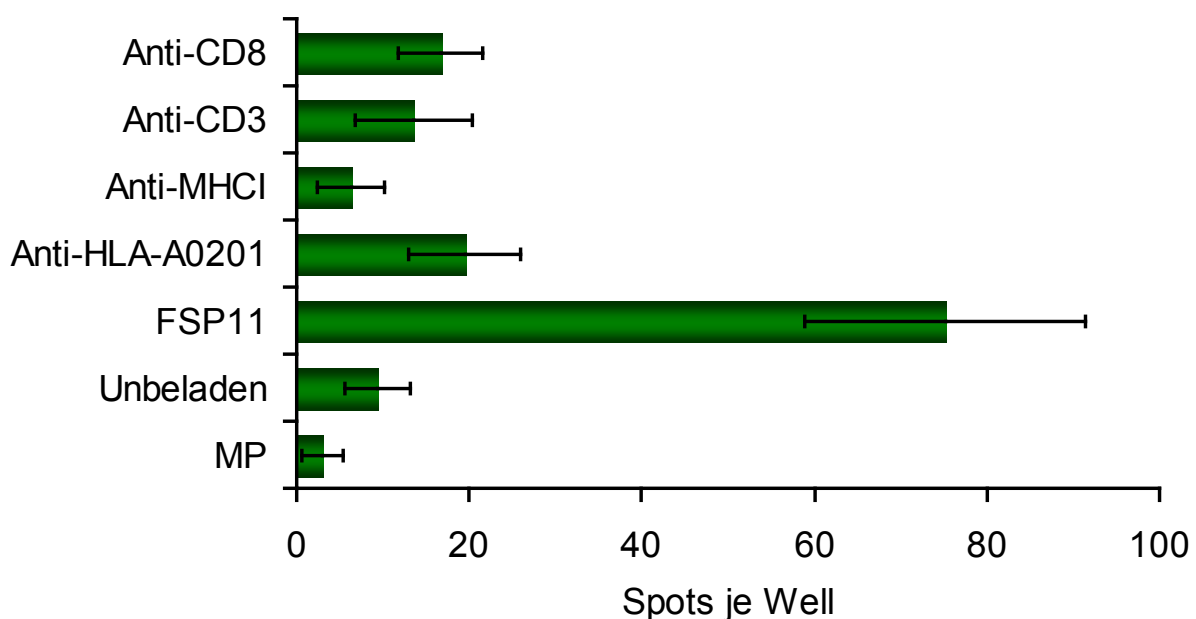


Abbildung 9: Der Blockierungs-ELISpot belegt die HLA-A0201-Restriktion durch den deutlichen Rückgang IFN- $\gamma$  sezernierender T-Zellen nach Zugabe von pan-MHC-I bzw. HLA-A0201-Antikörpern. Auf der Y-Achse aufgetragen die jeweiligen Peptide bzw. Antikörper, welche zu den autologen CD40Bs ergänzt wurden. Die Negativkontrollen erfolgten mit unbeladenen sowie mit dem Kontrollpeptid MP beladenen CD40Bs. Als Positivkontrolle dienten mit FSP11 beladene CD40Bs. Deutlich ersichtlich der Rückgang der spezifischen Erkennung der CD40Bs durch die autologen T-Zellen nach Inkubation mit den entsprechenden gegen MHC-I, HLA-A0201, CD3 bzw. CD8 gerichteten Antikörpern.

### 3.6. FACSotox mit T2 und CD40Bs

Nachdem das zytotoxische Potential der T-Zell-Kultur bereits im ELISpot-Assay nachgewiesen wurde, erfolgte in einem weiteren Schritt der formale Nachweis des spezifischen lytischen Potentials der T-Zellen mittels Zytotoxizitäts-Assay (FACSotox). Hierbei sollte die selektive Lyse FSP11-beladener Targetzellen durch die T-Zell-Kultur untersucht werden. Die Abgrenzung der lysierten Zellen erfolgte durch Zugabe von Propidiumiodid vor der durchflusszytometrischen Untersuchung.

In mehreren Experimenten konnte gezeigt werden, dass sowohl FSP11-beladene T2-Zellen als auch CD40Bs selektiv lysiert werden. In der Negativkontrolle zeigte sich weder eine relevante Lyse der unbeladenen noch der mit einem Kontrollpeptid beladenen Targetzellen. Exemplarisch dargestellt ist dies in Abbildung 10. In verschiedenen Effektor- zu Target-Zell-Verhältnissen ist auch eine Zunahme der Anzahl lysierter FSP11 beladener T2-Zellen (Abbildung 10A) sowie CD40Bs (Abbildung 10B) ersichtlich.

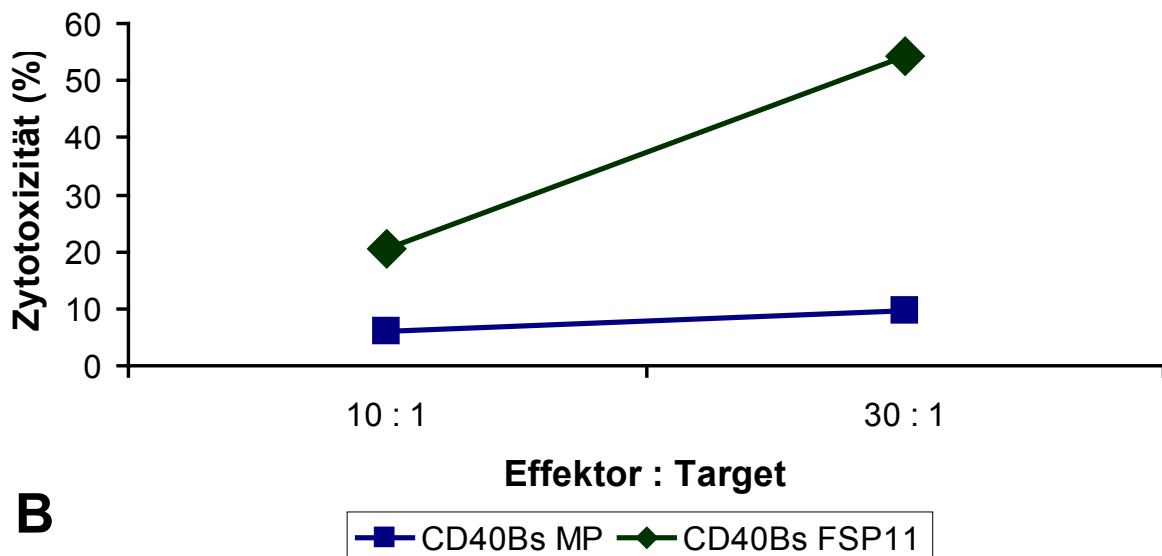
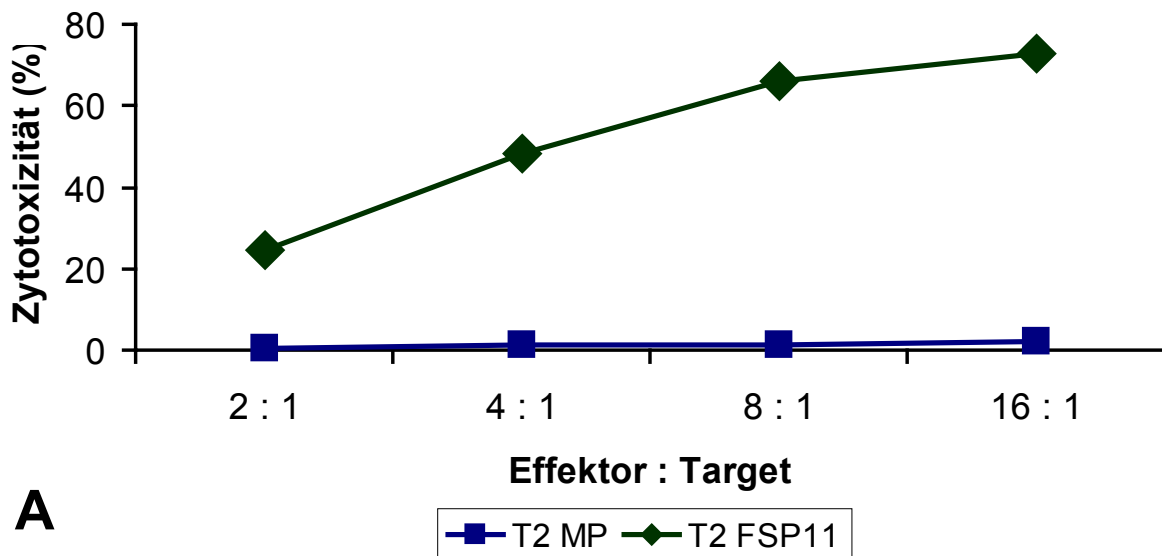


Abbildung 10: Nachweis der spezifischen Lyse FSP11-beladener T2-Zellen (Abb. 10A) bzw. CD40Bs (Abb. 10B) durch die autologen T-Zellen. In der Negativkontrolle zeigt sich weder eine relevante Lyse der unbeladenen noch der mit einem Kontrollpeptid beladenen Targetzellen. Hierdurch wird das zytotoxische Potential der T-Zell-Kultur belegt.

### 3.7. Cold Target Inhibition

Analog zur Durchführung einer klassischen „Cold Target Inhibition“ durch Zugabe eines Überschusses an nicht radioaktiv markierten Zielzellen zu einem Versuchsansatz mit T-Zellen und radioaktiv markierten Zielzellen erfolgte zur Bestätigung der FSP11-spezifischen Erkennung und HLA-A0201-Restriktion ein Inhibierungsversuch. Hierzu wurden ungefärbte CD40Bs im Überschuss zu einem FACSotox-Versuchsansatz hinzugegeben. Die Lyse der gefärbten FSP11 beladenen CD40Bs wurde deutlich vermindert durch die Zugabe der ungefärbten FSP11-beladenen CD40Bs (bei einem Verhältnis von gefärbten zu ungefärbten Targets von 1:20). Im Gegensatz dazu hatte die Zugabe von ungefärbten, mit einem Kontrollpeptid beladenen CD40Bs einen deutlich geringeren Einfluss auf die Lyse der Targetzellen (dargestellt in Abbildung 11). Es zeigte sich deutlich, dass die Zugabe von einem Überschuss an FSP11-beladenen CD40Bs zum Experimentansatz in verschiedenen Effektor zu Target-Verhältnissen eine deutliche Verringerung der FSP11-spezifischen Erkennung bewirkt hat. Dies ist hinweisend auf die FSP11-spezifische und HLA-A0201-restringierte Erkennung.

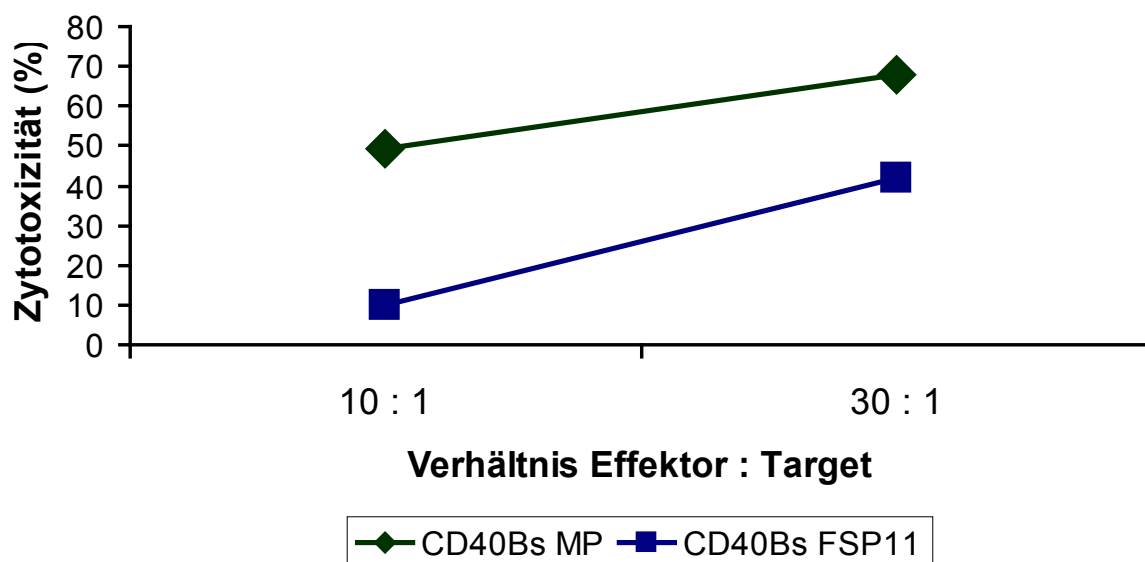


Abbildung 11: Ein Inhibierungs-Experiment wurde durchgeführt zum weiteren Nachweis der HLA-A0201-Restriktion und der spezifischen Erkennung von FSP11. Zu diesem Zwecke wurden zusätzlich zu den markierten und mit FSP11 beladenen Targetzellen in einem Verhältnis von 20:1 nicht markierte und unbeladene (grüne Kurve) sowie nicht markierte, aber ebenfalls mit FSP11 beladene (blaue Kurve) CD40Bs inkubiert. Das angegebene Effektor:Target Verhältnis bezieht sich hierbei ausschließlich auf die markierten Targets. Dargestellt ist der prozentuelle Anteil der durch die autologen T-Zellen lysierten FSP11-beladenen Targetzellen nach einer Inkubationszeit von 6 Stunden. Deutlich wird hierbei, dass nur durch Zugabe FSP11-beladener und unmarkierter Targets das zytotoxische Potential erheblich reduziert wurde.

### 3.8. Lyse einer U79260(FTO) (-1) exprimierenden Tumorzelllinie

Bereits gegenüber FSP11 beladenen B-Zellen und T2-Zellen konnte das zytotoxische Potential der T-Zell-Kultur nachgewiesen werden. Zum abschließenden Nachweis der spezifischen Erkennung und des zytotoxischen Potentials der T-Zell-Kultur erfolgt ein FACSotox-Experiment mit verschiedenen Tumorzelllinien. Hierzu wurde die FSP11-spezifische T-Zell-Kultur mit den einzelnen Tumorzelllinien inkubiert. Unmittelbar vor der durchflusszytometrischen Analyse erfolgte die Zugabe von Propidiumiodid zur Differenzierung zwischen lebenden und lysierten Targetzellen.

Eine spezifische Lyse konnte für die Tumorzelllinie HCT116 (HLA-A0201<sup>(pos)</sup>/U79260(FTO) (-4)) nachgewiesen werden. HCT116 exprimiert eine (-4)-Mutation von U79260(FTO), welche ebenso wie die (-1)-Leserasterverschiebung zur Bildung von FSP11 führen sollte. Belegt wurde dies durch die Zytotoxizitätsrate von fast 50% bei Inkubation von HCT116 mit der FSP11-spezifischen T-Zell-Kultur. Es erfolgte also eine spezifische Erkennung und Lyse der die zugrundeliegende Mutation tragenden Tumorzelllinie HCT116 (Abbildung 12).

Im Gegensatz dazu wurde weder die HLA-A0201<sup>(neg)</sup> Tumorzelllinie KM12 mit einer (-4)-Mutation im U79260(FTO)-Gen spezifisch lysiert noch die HLA-A0201<sup>(pos)</sup> Tumorzelllinie SW480, welche einen Wildtyp für U79260(FTO) aufweist.

Ein weiterer Beleg für die HLA-A0201-spezifische Erkennung zeigt sich in einem weiterführenden experimentellen Ansatz. Hierzu wurde die HLA-A0201<sup>(pos)</sup> Tumorzelllinie SW480 mit FSP11 inkubiert, bevor die Inkubation mit FSP11-spezifischen T-Zellen erfolgte. Dies führte zu einem deutlichen Anstieg der zytotoxischen Aktivität gegenüber SW480, vergleichbar mit dem zytotoxischen Potential der T-Zell-Kultur gegenüber HCT116 (Abbildung 12A).

Durch Vereinzlung konnte der FSP11-spezifische T-Zell-Klon C10/11 gewonnen werden. Zum Nachweis des zytotoxischen Potentials auch auf klonaler Ebene wurden ebenfalls FACSotox-Experimente durchgeführt. Auch durch den Klon C10/11 ließ sich in der durchflusszytometrischen Untersuchung eine deutliche Lyse der HLA-A0201<sup>(pos)</sup> Tumorzelllinie HCT116 nachweisen. Im Gegensatz dazu wurden die Kontrollen SW480 (HLA-A0201<sup>(pos)</sup>, U79260(FTO) (wt)) und Colo60H (HLA-A0201<sup>(pos)</sup>; U79260(FTO) (-3)) durch die Klonkultur nicht spezifisch erkannt oder lysiert (Abbildung 12B).

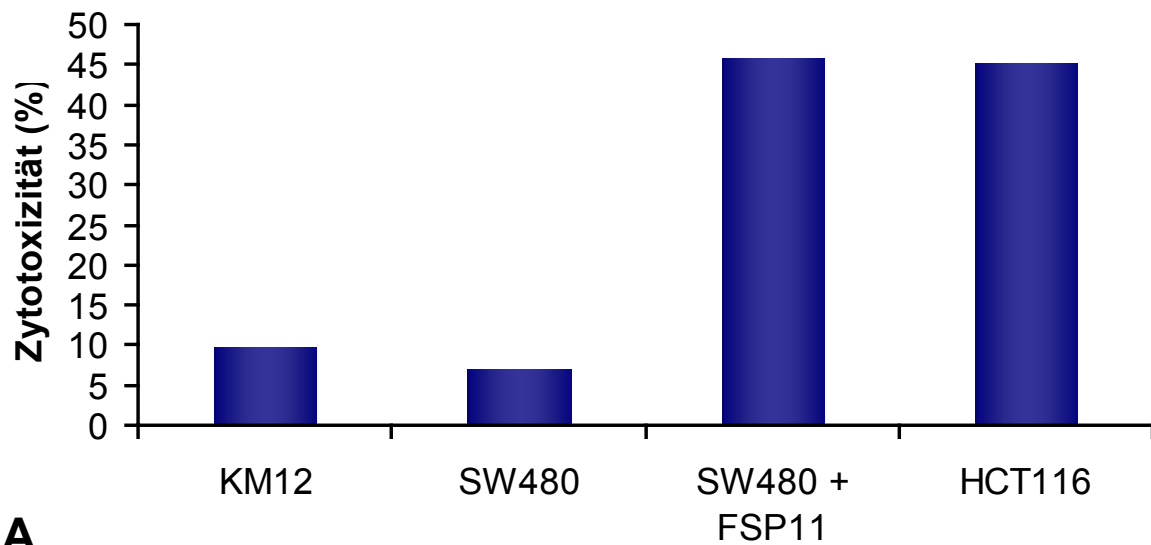
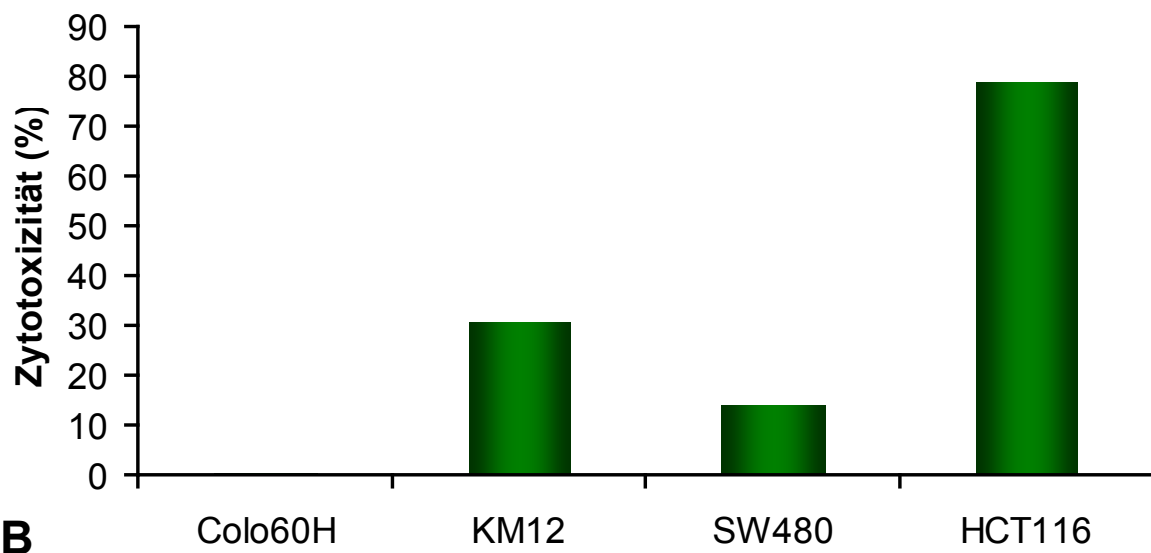
**A****B**

Abbildung 12: Das zytotoxische Potential der FSP11-spezifischen T-Zell-Kultur (Abb. 12A) bzw. eines FSP11-spezifischen Klonen (Abb. 12B) konnte im FACSotox bewiesen werden. Beide waren in der Lage, die HLA-A0201<sup>(pos)</sup> Tumorzelllinie HCT116, welche ebenfalls über die zugrundeliegende Mutation im U79260-Gen verfügt, spezifisch zu erkennen und zu lysieren. Nicht erkannt wurden hingegen die Tumorzelllinien KM12, Colo60H und SW480, die entweder kein HLA-A0201 exprimieren oder einen Wildtyp für U79260 aufweisen. Ebenfalls in Abbildung 7A gezeigt die spezifische Erkennung und Lyse der HLA-A0201<sup>(pos)</sup> Tumorzelllinie SW480 nach Inkubation mit FSP11.

## **4. Diskussion**

### **4.1. Das CRC und seine Therapie**

Trotz hervorragender Möglichkeiten zur Früherkennung des CRC (z. B. im Rahmen von altersabhängigen Screeninguntersuchungen) sowie insgesamt sinkender Letalität stellt die Behandlung des fortgeschrittenen und insbesondere des metastasierten CRC eine Herausforderung an das Gesundheitswesen dar. Dies gilt umso mehr, da in den letzten Jahren eine steigende Zahl von Patienten mit CRCs beobachtet werden kann. Zum einen beruht diese Tatsache sicherlich auf der zunehmenden Lebenserwartung, zum anderen auch auf den veränderten Lebens- und Ernährungsgewohnheiten in den westlichen Industrienationen. Die bislang identifizierten Risikofaktoren für die Entwicklung eines CRC sind vor allem Alkohol- und/oder Nikotinabusus, Bewegungsmangel, Adipositas und hoher Fleischkonsum – also zumeist die gesellschaftlichen Probleme, mit denen die westlichen Industrienationen zu kämpfen haben und die in absehbarer Zeit vermutlich auch nicht vollständig gelöst werden können [Huxley et al., 2009; Liang et al., 2009; Leufkens et al., 2010]. Demzufolge ist auch nicht zu erwarten, dass die Therapie des CRC in den nächsten Jahren an Bedeutung verliert, trotz der seit etwa 10 Jahren weitgehend stabilen Neuerkrankungsrate. Bedenkt man, dass das CRC bei beiden Geschlechtern weiterhin auf Platz zwei sowohl bei Inzidenz als auch bei krebisbedingter Mortalität liegt, erklärt sich die dringende Notwendigkeit optimierter Therapieformen [Robert-Koch-Institut, 2010].

Die aktuelle Therapie des CRC erfolgt stadienabhängig, wobei die Einteilung nach der Union International contre le Cancer (UICC) erfolgt. Im UICC-Stadium I (Infiltration maximal bis in die Tunica muscularis propria) reicht gewöhnlich die kurative R0-Resektion, eine ergänzende Therapie ist normalerweise nicht indiziert. Im UICC-Stadium II (lokale Infiltration maximal bis in die Nachbarorgane oder das Peritoneum viszerale) sollte neben der operativen Therapie in Abhängigkeit vom Risikoprofil eine adjuvante Chemotherapie erwogen werden. Als effektiv erwiesen haben sich hierbei eine Therapie mit 5-Fluoruracil/Folinsäure oder Capecitabin, ggf. in Kombination mit Oxaliplatin. Im UICC-Stadium III (regionärer Lymphknotenbefall ohne Fernmetastasen) sollte neben einer Operation ebenfalls eine adjuvante Chemotherapie erfolgen. Die Behandlung im UICC-Stadium IV (Fernmetastasierung) hängt in besonderem Maße von der Operabilität ab. Hier kann eine neoadjuvante (Radio-)Chemotherapie erwogen werden, um bei primär nicht resektablen

(Fern-)Metastasen eine Operabilität herzustellen [Schmiegel et al., 2008]. Bereits im Einsatz, aber nach aktueller Studienlage in seiner Effizienz hinterfragt, ist die adjuvante Behandlung mit Bevacizumab, einem anti-VEGF Antikörper [Hacker et al., 2010].

Da auch weiterhin trotz insgesamt verbesserter Therapiemöglichkeiten insbesondere im metastasierten Stadium die Lebenserwartung drastisch sinkt, könnte hier die Immuntherapie weitere und neue therapeutische Ansätze bieten.

#### **4.2. Herausforderungen in der Immuntherapie**

Einhergehend mit der schlechten Prognose vor allem im metastasierten Tumorstadium hat insbesondere die Immuntherapie nach langen Jahren der Vergessenheit einen neuen Auftrieb erfahren.

Dabei tauchen jedoch auch immer wieder neue Herausforderungen auf. Unter anderem ist ein Kennzeichen vieler immuntherapeutischen Ansätze der verzögerte Wirkeintritt. Zumeist kommt es auch zu einer initialen Verschlechterung bezogen auf die Gesamttumorlast, bevor ein deutlicher Tumorrückgang eintritt. Dies steht im Gegensatz zu den klassischen Therapieformen, bei denen bei Ansprechen zumeist sofort ein deutlicher Tumorrückgang beobachtet werden kann. Die Folge ist, dass die aktuell eingesetzten statistischen Methoden, Studienendpunkte und Beobachtungszeiträume vor allem in klinischen Phase III Studien nicht immer suffizient sind, um den positiven Effekt einer Immuntherapie zu erfassen. Diverse Gruppen beschäftigen sich mit der genauen Analyse unter anderem der statistischen Methoden und bieten Verbesserungsvorschläge [zusammengefasst in Hoos et al., 2010].

Weiterhin muss über ein immuntherapeutisches Verfahren insbesondere bei schnell wachsenden Tumorentitäten von Fall zu Fall unterschieden werden, denn nicht jeder Patient hat die (Lebens-)Zeit, um auf die zumeist verzögert eintretende immuntherapeutische Wirkung zu warten. Die erklärt vermutlich auch, warum sich die Immuntherapie insbesondere in Kombination mit den „klassischen“ Therapieansätzen bewährt hat. Die Tumorbekämpfung scheint am effektivsten zu sein, wenn immuntherapeutische Maßnahmen ergänzend zur Operation bzw. zur (Radio-)Chemotherapie durchgeführt werden. In einer Übersichtsarbeit befassen sich Baxevanis et al. ausführlich mit aktuellen Behandlungskonzepten zur kombinierten Tumortherapie bestehend aus Vakzinierung, Chemotherapie und monoklonalen Antikörpern. Die Arbeit macht ebenfalls deutlich, dass die ursprüngliche Befürchtung



der Kontraproduktivität einer kombinierten Therapie bestehend aus Immuntherapie und Chemotherapie sich anscheinend nicht bestätigt. Anders als vielleicht zu erwarten gewesen wäre kommt es durch die immunsuppressive Wirkung der Chemotherapeutika nicht notgedrungen zu einem Wirkverlust immuntherapeutischer Ansätze. Vielmehr häufen sich die Hinweise, dass durch bestimmte Chemotherapeutika sogar eine Wirkungsverstärkung (z. B. von Tumorzell-Vakzinierungen) erreicht werden kann. Ebenfalls entfalten bestimmte Chemotherapeutika eine immunmodulierende Wirkung und könnten damit synergistisch zur Immuntherapie wirken. Es konnte z. B. für Gemcitabine, Paclitaxel, Cisplatin, Cyclophosphamid und 5-Fluoruracil ein positiver Einfluss auf eine vor bzw. nach Chemotherapie verabreichte Immuntherapie nachgewiesen werden [zusammengefasst in Baxevanis et al., 2008]. Die zugrundeliegenden Mechanismen hierfür sind noch nicht abschließend geklärt. Einen möglichen Erklärungsansatz jedoch bietet zum Beispiel das Chemotherapeutikum Temozolomid. Es scheint in der Lage zu sein, regulatorische T-Zellen (Tregs) zu depletieren. Da Tregs die Aktivität nahezu aller weiteren Lymphoidzellen sowie auch von DCs supprimieren können, spielen sie eine wesentliche Rolle in der Regulation des Immunsystems. Mehrfach konnten Tregs für tumorassoziierte spezifische Antigene (TAA) bei Tumorpatienten in erhöhter Zahl nachgewiesen werden. Im Falle solider Tumoren ließ sich sogar ihre Akkumulation im Tumorgewebe aufzeigen. Dies scheint über den immunsuppressiven Effekt der Tregs in einigen Tumorentitäten zum Immune Escape, und damit zum Tumorprogress, beizutragen [Raghavan et al., 2011; Kim et al., 2010]. Ein weiterer Mechanismus kommt anscheinend bei platinhaltigen Chemotherapeutika zum Tragen. Diese regulieren die Expression vom programmed death receptor-ligand 2 sowohl auf Tumorzellen als auch auf DCs herunter. Dies verbessert das immunstimulatorische Potential von DCs und verringert das Potential des Tumors zum Immune Escape [Lesterhuis et al., 2011]. Für Gemcitabine konnte die Induktion von Tumornekrose bzw. Tumorapoptose mit konsekutiver Erhöhung der Antigenpräsentation nachgewiesen werden bei gleichzeitigem Erhalt der T-Zell-Funktion [Suzuki et al., 2007]. Ebenso gilt, dass beim Chemotherapie-induzierten Tumorzelltod TAAs freigesetzt werden, welche wiederum zur Aktivierung des Immunsystems beitragen können. Für Anthracycline sowie für Oxaliplatin konnte ein derartiger „immunogener Zelltod“ in besonderem Maße nachgewiesen werden. Die Tumorzellen werden nach ihrem Zelltod von DCs phagozytiert. Dies führt konsekutiv

zur Präsentation von TAAs an spezifische CD8-T-Zellen, welche anschließend bei der Kontrolle bzw. Elimination des Resttumors helfen [Zitvogel et al., 2010].

Idealerweise sollte durch eine Chemotherapie die Tumormasse deutlich reduziert werden, während die durch eine Tumorstadium induzierte Immunantwort den Resttumor beseitigt [Baxevanis et al., 2008]. In diesem Sinne konnten in einer Übersichtsarbeit zu aktuellen immuntherapeutischen Ansätzen bei CRCs ein deutlicher Benefit vor allem im frühen Tumorstadium II sowie bei vermutetem oder bewiesenem Resttumor aufgezeigt werden. Im Gegensatz dazu konnte bislang eine reine Immuntherapie in den fortgeschrittenen Tumorstadien III und IV noch keinen eindeutigen klinischen Nutzen erbringen. Heutzutage können jedoch auf Grund der verbesserten Vorsorgeuntersuchungen deutlich frühere Tumorstadien diagnostiziert werden. Wurden 1995 noch die Hälfte aller CRC-Erstdiagnosen im Stadium IV gestellt, sind dies heute nur noch geschätzte 10%. Währenddessen hat sich die Häufigkeit der Diagnose eines CRC im Stadium II von weniger als 20% auf ca. 40% verdoppelt. Dies führt dazu, dass heutzutage mehr CRCs primär einer operativen Therapie zugänglich sind. Dennoch erleiden die Hälfte der Patienten nach chirurgischer Tumoresektion trotz zumeist vorliegender makroskopischer Tumorfreiheit ein Rezidiv [Rao et al., 2011]. Betrachtet man den deutlichen Nutzen einer Immuntherapie in frühen Tumorstadien sowie die häufige Rezidivrate trotz makroskopischer Tumorfreiheit nach Resektion, dann bietet sich eine zusätzliche Immuntherapie auch schon in früheren Tumorstadien an als bislang angenommen [Rao et al., 2011, Baxevanis et al., 2008].

Für CRCs wird weiterhin ein direkt immunsuppressiver Effekte vermutet, denn nach Tumoresektion konnte mehrfach die Wiederherstellung einer antitumoralen Immunreaktion beobachtet werden [Galizia et al., 2002]. Verschiedene Mechanismen sind speziell beim CRC an diesem Phänomen, welches als Immune Escape bezeichnet wird, beteiligt [zusammengefasst in Evans et al., 2006]:

- Verlust oder Verminderung von HLA-Klasse I Antigen-Prozessierung und Präsentation (konsequente geringere Präsentation von TAAs an CTLs)
- Verlust kostimulatorischer Moleküle oder Signalmoleküle von T-Zellen
- Funktionsdefekte von DCs, natürlichen Killerzellen oder CTLs
- HLA-G Expression (damit einhergehend Inhibition von NKs und von CTLs)
- Verschiebung des Zytokin-Gleichgewichts hin zu TGF- $\beta$  und VEGF (Tumorzellwachstum und Angiogenese)

- Reduktion der Typ-I-T-Helferzellen zugunsten einer Typ-II-T-Helferzellen-Immunantwort (damit einhergehend Inhibition der proinflammatorischen Zytokinproduktion und der Immunantwort)
- Umgehung von Todesrezeptoren (z. B. durch Verlust von Fas-Rezeptoren auf der Tumorzell-Oberfläche)

Ziel einer Immuntherapie ist es somit unter anderem, die Immune Escape Mechanismen der Tumorzellen zu umgehen und die maligne entarteten Zellen erneut der Kontrolle durch das Immunsystem zuzuführen.

### **4.3. Aktuelle Ansätze zur Immuntherapie beim CRC**

Vielfach gibt es Belege für die Aktivierung des Immunsystems durch das CRC und zahlreiche tumor-assoziierte Peptide bzw. tumor-spezifische Antigene konnten bereits identifiziert werden [Chan et al., 2010; Line et al., 2002]. Das Immunsystem scheint durchaus befähigt zu einer gegen das CRC gerichteten Immunantwort. Jedoch reicht diese alleine oft nicht aus, um den Tumorprogress aufzuhalten [Camus et al., 2009]. Dennoch lässt das verlangsamte Tumorwachstum und sogar eine verlängerte Überlebenszeit bei hoher intratumoraler Lymphozyteninfiltration auf die Möglichkeiten des Immunsystems zur Tumorbekämpfung schließen [Baier et al., 2008; Galon et al., 2006].

In Hinblick auf die Therapie des CRC gibt es verschiedene Ansätze zur immuntherapeutischen Überwindung der unterschiedlichen Immune Escape Mechanismen. Dabei wird unterschieden zwischen aktiver und passiver Immuntherapie. In der passiven Immuntherapie gibt es zudem einige vielversprechende Ansätze zur Entwicklung spezifischer Antikörper [Mellman et al., 2011; Melero et al., 2007]. Ein weiterer Ansatz ist die Verabreichung von Zytokinen zur Stimulation des Immunsystems und zur Verbesserung der Tumorabwehr [Mazzolini et al., 2007].

Eine Möglichkeit der aktiven Immuntherapie ist unter anderem die Verimpfung autologer, letal bestrahlter Tumorzellen. Eine der ältesten bekannten Ansätze hierzu ist die subkutane Injektion einer Vakzine bestehend aus lysierten oder bestrahlten autologen Tumorzellen zusammen mit Bacille Calmette-Guerin. Diverse Arbeitsgruppen beschäftigen sich mit diesem Ansatz, welcher als OncoVAX bekannt wurde. Es kam jedoch zwischen den einzelnen Arbeitsgruppen zu teilweise widersprüchlichen Ergebnissen [Harris et al., 2000; Hoover et al., 1993]. Dies beruhte vor allem auf einer noch nicht standardisierten Herstellung der Vakzine. In weiteren

Versuchen mit dieser Vakzine, allerdings aus kontrollierter und standardisierter Herstellung, ließ sich im Stadium II eine deutliche Verbesserung sowohl bezüglich des Gesamtüberlebens als auch der Tumorprogression nachweisen. Dies belegt vor allem die Notwendigkeit einer standardisierten und qualitativ hochwertigen Herstellung von Vakzinen. Ebenso untermauert es die Vermutung, dass frühere Tumorstadien als bislang angenommen von einer Vakzinierung profitieren [Groot et al., 2005; Hanna et al., 2001; Vermorken et al., 1999].

In weiteren therapeutischen Ansätzen erfolgte die Impfung mit autologen, bestrahlten und virusinfizierten Tumorzellen. In einer klinischen Phase III Studie zeigten sich vielversprechende Ergebnisse durch Impfung autologer Tumorzellen, welche mit dem Newcastle disease Virus infiziert waren. Es ließ sich ein Vorteil sowohl im Gesamtüberleben als auch im metastasenfremden Überleben nachweisen [Schulze et al., 2009]. In einigen Studien zeigten sich im Vergleich zu OncoVAX sogar bessere Ergebnisse mit verlängerter Überlebenszeit, insbesondere bei lebermetastasierten CRCs [Ockert et al., 1996].

Interessanterweise führen diese Tumorimpfungen anscheinend nicht sofort zu einer spezifischen Immunantwort. Vielmehr enthalten die verimpften Virus- bzw. bakteriellen Zellen sogenannte pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). Hierbei handelt es sich um Strukturen, welche innerhalb der diversen mikrobiologischen Spezies konserviert sind. Diese werden durch sogenannte pattern recognition receptors (dazu gehören z. B. Toll-like Rezeptoren, TLR) des angeborenen Immunsystems erkannt und lösen zunächst eine unspezifische Immunreaktion und Inflamationsreaktion aus. Hierzu wird insbesondere durch TLRs über entsprechende Signalwege die Zytokinfreisetzung sowie die Aktivierung von NK-Zellen und CTLs vermittelt. Erst diese unspezifische Immunantwort führt zu einer Aktivierung des erworbenen Immunsystems und damit zur spezifischen antitumoralen und TAA-vermittelten Immunantwort. Bestimmte TLRs können zudem die immunsuppressive Wirkung der Tregs aufheben. Dies führt, zusammen mit ihrer Stimulation von DCs, zu einer deutlichen antitumoralen Immunantwort [Takeuchi & Akira, 2010; Hennessy et al., 2010].

Der Vorteil der autologen Tumorstoffimpfung liegt darin, dass mit großer Wahrscheinlichkeit TAAs mit der Fähigkeit zur Induktion einer Immunantwort vorhanden sind. Nachteilig ist, dass diese nur in geringer Anzahl vorliegen. Weiterhin wird die Gewinnung autologer Tumorzellen zur Entwicklung einer Vakzine deutlich

erschwert durch die Entwicklung des CRC in einem bakterienhaltigen Milieu. Da sich Metastasen zumeist in der Leber finden, ist auch hier keine leichte Gewinnung autologer Tumorzellen möglich. Weiterhin besteht die Befürchtung, dass nach Verabreichung der Vakzine trotz Bestrahlung der Tumorzellen immunsuppressive Zytokine freigesetzt werden könnten. Schlussendlich erfordern Ansätze zur autologen Vakzinierung ein Immunmonitoring. Dieses wird erschwert durch die Unkenntnis, welche TAAs genau für die Induktion der Immunantwort verantwortlich sind [Merika et al., 2010].

Um diese Probleme zu umgehen gibt es zahlreiche Ansätze zur Entwicklung einer Vakzine unter Verwendung definierter TAAs. Verwendet werden hierbei unter anderem Beta - Humanes Choriongonadotropin, Tumorprotein 53, Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor 2, Gastrin oder Carcinoembryonales Antigen als TAAs. Die Applikation erfolgt zumeist über einen viralen Vektor [zahlreiche Phase I und Phase II-Studien, zusammengefasst in Merika et al., 2010].

Weitere Arbeitsgruppen befassen sich mit der Verwendung von DCs, welche sowohl über MHC I als auch MHC II eine Immunantwort induzieren können. Die Herstellung der Vakzine erfolgt zum Beispiel über eine Stimulation der DCs mit Tumorlysat oder Tumor-RNA. Alternativ dazu erfolgt eine Transfektion mit Tumor-DNA oder es wird eine Fusionszelle aus Tumorzelle und DC hergestellt. Ebenfalls gibt es Ansätze zur Verwendung von DCs, welche mit multiplen TAAs beladen werden. Positive Ergebnisse konnten z. B. mit der Verwendung mRNA-beladener DCs als effektive Induktoren gewonnen werden [Chu et al., 2005].

Insbesondere im Bereich der aktiven Immunisierung gibt es somit einige erfolgversprechende therapeutische Ansätze. Sowohl zur spezifischen Adressierung bestimmter Tumorentitäten als auch zum Zwecke des Vakzin-Monitorings ist die Identifizierung und Charakterisierung von TAAs ein notwendiger erster Schritt.

#### **4.4. Identifizierung und Charakterisierung eines neuen T-Zell-Epitopes**

Die Herausforderung auf dem Gebiet der Immuntherapie, insbesondere im Bereich der aktiven Immunisierung, liegt in der Vermeidung der Entwicklung von Autoimmunphänomenen. Um dieses Risiko zu minimieren sollten potentielle Antigene möglichst über bestimmte Voraussetzungen verfügen:

1. bevorzugt ausschließliche und hohe Expression auf den (Tumor-) Targetzellen
2. Präsentation im HLA-Molekül (als Erkennungsstelle für CTLs)
3. Vorläufer-T-Zellen müssen auch nach negativer Selektion noch präsent sein

#### 4. Beteiligung des Antigens an der Tumorgenese und/oder dem Tumorprogress

Mehrfach wurde das immunogene Potential der MSI-H induzierten Frameshift-Mutationen unter Beweis gestellt. In diversen Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass FSPs, die durch Frameshift-Mutationen unter anderem in den Genen für den TGF-Beta-II-Rezeptor [Linnebacher et al., 2001; Saeterdal et al., 2001], die O-linked N-acetylglucosamine Transferase [Ripberger et al., 2003] und für Caspase-5 [Schwitalle et al., 2004] entstehen, CTLs mit der Fähigkeit zur Lyse von Tumorzellen mit der zugrunde liegenden Frameshift-Mutation induzieren können.

Desweiteren konnten Saeterdahl und Kollegen ein MHC-Klasse-II restringiertes Epitop von T-Helfer-Zellen identifizieren [Saeterdahl et al., 2001] und Ishikawa et al. erbrachten den Nachweis spezifischer Antikörper, welche gegen kodierende cMS Frameshift-mutierter Zielgene gerichtet sind [Ishikawa et al., 2004]. Erst kürzlich gelang die Identifizierung zweier weiterer HLA-A0201 restringierter FSPs, welche im Rahmen einer (-1)-Leserastermutation im MSH3-Gen entstehen und stark immunogen sind. Ebenfalls wurden Tumorzellen mit der zugrunde liegenden Mutation durch FSP-spezifische CTLs lysiert [Garbe et al., 2011].

Die Gruppe um Schwitalle analysierte zudem in einer umfangreichen Studie die Reaktivität peripherer T-Zellen gegenüber verschiedenen FSPs in Patienten mit MSI-H CRCs sowie in bislang gesunden HNPCC-Anlageträgern. Hierbei zeigte sich eine spezifische Erkennung eines Peptid-Mixes abgeleitet aus der (-1)-mutierten Form vom U79260(FTO) durch periphere T-Zellen bei 25% der Tumorpatienten (8/32) sowie bei 31% der gesunden HNPCC-Anlageträger (5/16). Es konnte zudem eine Reaktivität gegenüber zwei von drei *in vitro* expandierter Tumor-infiltrierenden T-Lymphozyten-Linien gezeigt werden, welche aus den MSI-H-Tumoren gewonnen wurden [Schwitalle et al., 2008]. Ein formeller Beweis für die Fähigkeit zur Tumorlyse durch spezifische, gegen die frameshiftmutierte Form von U79260(FTO) gerichtete T-Zellen fehlte jedoch bislang.

Die vorliegende Arbeit befasst sich daher mit dem Nachweis, dass FSP11, entstehend aus der (-1)-Mutation des Genes U79260(FTO), in der Lage ist, eine T-Zell-Antwort zu induzieren. Zu diesem Zweck erfolgte zunächst der Nachweis, dass FSP11 stabil im HLA-A0201-Komplex präsentiert werden kann. Hierfür sprechen sowohl der SYFPEITHI-Score von 25 als auch der T2-Stabilisierungs-Assay mit einem Fluoreszenz-Index von 0,98, welcher deutlich über dem Index der Negativkontrolle (0,36) liegt [Rammensee et al., 1999; Linnebacher et al., 2001].

Es erfolgte die erfolgreiche Induktion spezifischer T-Zellen durch Stimulation mit FSP11-beladenen B-Zellen. Über mehrere Wochen hinweg konnte eine weit über 1.000fache T-Zell-Expansion erreicht werden. Ebenfalls konnte für weiterführende Experimente ein FSP11-spezifischer Klon durch Vereinzlung der T-Zellen erhalten werden.

Die gewonnenen spezifischen T-Zellen wurden einer Analyse der Oberflächenmarker unterzogen. Hierbei zeigte sich, dass die Kultur fast ausschließlich aus CTLs bestand mit jeweils über 90% CD3 und CD8 positiven T-Zellen [Andersen et al., 2006]. Über 55% der Kultur exprimierte die interzellulären Adhäsionsmoleküle der ICAM-Gruppe (CD 54: 61,5%, CD 102: 56,6%, CD 50 97,6%) als Hinweis auf die Fähigkeit der T-Zell-Kultur zur Lymphozytenaktivierung und zur Induktion einer Immunreaktion [De Fougères et al., 1995]. Da zudem knapp ein Drittel der T-Zellen die Aktivierungsmarker CD45RO und CD62L aufweisen, spricht dies für einen hohen Anteil aktivierter T-Lymphozyten sowie von T-Gedächtniszellen in der T-Zell-Kultur [Andersen et al., 2006].

Der Nachweis der Spezifität der Erkennung vom FSP11 durch die T-Zell-Kultur erfolgte mit Hilfe einer IFN- $\gamma$ -ELISpot Analyse. Etwa 5,5% der T-Zell-Kultur sezernierte IFN- $\gamma$  nach Inkubation mit FSP11-beladenen autologen B-Zellen. Zum Nachweis der HLA-A0201-Restriktion erfolgte eine ELISpot-Analyse mit T2-Zellen als Zielzellen; diese exprimieren HLA-A0201 als einziges MHC-Molekül auf ihrer Oberfläche. Auch hier zeigte sich eine spezifische Erkennung FSP11-beladener T2-Zellen durch die T-Zell-Kultur.

Das zytotoxische Potential der T-Zell-Kultur und des FSP11-spezifischen Klons C10/11 konnte in einem FACSotox unter Beweis gestellt werden. Sowohl FSP11-beladene autologe B-Zellen als auch beladene T2-Zellen wurden durch die T-Zell-Kultur sowie den FSP11-spezifischen Klon lysiert.

Wichtigster Hinweis auf das zytotoxische Potential der durch das FSP11 induzierten CTLs ist die Lyse von Tumorzellen mit der zugrunde liegenden Mutation. Die HLA-A0201<sup>(pos)</sup> Tumorzelllinie HCT116, welche eine (-4)-Mutation im Gen U79260(FTO) aufweist und somit dem FSP11 zugrundeliegenden (-1)-Leseraster entspricht, wurde durch die FSP11-spezifische T-Zell-Kultur und den T-Zell-Klon C10/11 lysiert. Im Vergleich dazu wurden weder die HLA-A0201<sup>(neg)</sup> Tumorzelllinie KM12, die ebenfalls eine (-1)-Mutation trägt lysiert, noch die HLA-A0201<sup>(pos)</sup> Tumorzelllinie SW480, welche bezüglich U79260(FTO) einen Wildtyp aufweist.

Die Spezifität der Präsentation von FSP11 im Kontext mit dem HLA-A0201-Molekül konnte im Weiteren bewiesen werden durch die Lyse der Tumorzelllinie SW480, nachdem diese mit FSP11 inkubiert wurde.

Der weitere Nachweis der Spezifität für FSP11 und der HLA-A0201-Restriktion der T-Zell-Kultur konnte in einem Inhibierungsexperiment gezeigt werden. Hierzu erfolgte die Zugabe von ungefärbten, FSP11-beladenen CD40Bs im Überschuss zu einem FACSotox-Experiment. Dies reduzierte die Zielzellyse erheblich, während die Zugabe unbeladener CD40Bs keinen wesentlichen Einfluss auf die Lyse hatte. Weiterhin konnte in einem Blockierungs-ELISpot die Anzahl IFN- $\gamma$  sezernierender T-Zellen durch die Zugabe von HLA-A0201-Antikörpern sowie Antikörpern gegen das MHC-Klasse-I-Molekül signifikant gesenkt werden. Diese Daten belegen sowohl die HLA-A0201-Restriktion als auch die Spezifität der Erkennung von FSP11.

Somit konnte auch die endogene Expression von FSPs der (-1)-Mutation von U79260 belegt werden. Dies steht in einem gewissen Widerspruch zu der Tatsache, dass U79260 nicht gegenüber dem nonsense mediated RNA-decay (NMD) resistent ist. Man würde erwarten, dass Nonsense-Transkriptionsprodukte rasch dem Abbau zugeführt werden via NMD. Passend hierzu hat die Arbeitsgruppe um Williams zahlreiche Tumorzelllinien auf die Expression mutierter Proteine hin untersucht und konnte diese bei NMD-resistenten Transkriptionsprodukten nachweisen, nicht jedoch bei NMD-sensiblen Frameshift-Mutationen [Williams et al., 2010]. Ein möglicher Erklärungsansatz für den erbrachten Nachweis der endogenen Expression der (-1)-Mutation von U79260 könnte Translationsabhängigkeit des NMD sein. Bereits eine geringe Expression des mutierten Proteins aus der ursprünglichen Translation könnte ausreichen, um eine Immunantwort zu induzieren. Hierfür spricht, dass bereits geringste Peptidmengen (z. B. drei Peptide je MHC-Molekül) ausreichend sein können, um eine CTL-vermittelte Zellyse zu induzieren [Sykulev et al., 1996; Kageyama et al., 1995].

Im Vergleich zum gesunden Gewebe und vor allem in Vergleich zu anderen Tumorentitäten ist die Mutationsrate vom Gen U79260(FTO) in CRCs mit über 80%, in etablierten CRC-Tumorzelllinien sogar bis zu 100%, sehr hoch. Bei Endometriumkarzinomen liegt die Mutationsrate knapp über 40%, in Magenkarzinomen sogar nur knapp über 5%. Dies ist hinweisend sowohl auf eine hohe Wahrscheinlichkeit des Auftretens frameshiftmutierter Transkriptionsprodukte



von U79260(FTO) in MSI-H CRCs als auch auf eine gewisse Selektivität des Auftretens in CRCs.

Auch wenn der endgültige Beweis für die Funktion des Genes U79260(FTO) bislang noch nicht erbracht werden konnte, ist eine Assoziation mit der Regulation von Stoffwechsel und Energiehaushalt sehr wahrscheinlich [Wang et al., 2011; Loos et al., 2008; Woerner et al., 2005]. Wie bereits durch Hanahan & Weinberg postuliert spielt die Regulation und Manipulation am Energiehaushalt eine wichtige Rolle in der Tumorentwicklung [Hanahan & Weinberg, 2011]. Somit ist die Vermutung naheliegend, dass z. B. eine Mutation oder auch Überexpression des U79260(FTO)-Gens mit einer für den Tumorprogress positiven Modifikation des Energiehaushaltes einhergehen könnte. Unterstützt wird diese These durch den Nachweis einer deutlich erhöhten Expression von U79260(FTO) in Endometriumkarzinomen. In diesem Zusammenhang konnten Zhang et al. zeigen, dass die U79260(FTO)-Überexpression zur Aktivierung des Phosphoinositid-3-Kinasen/Proteinkinase B Signalweges sowie zur Aktivierung des Mitogen-aktivierte Proteinkinase Signalweges führt. Da diesen Signalwegen wesentliche Schlüsselfunktionen in der Regulation unter anderem von Zelldifferenzierung und Zellwachstum zukommt, trägt deren Aktivierung zu einer deutlich erhöhten Proliferationsrate und Invasivität des Tumors bei [Zhang et al., 2012].

Zusammengenommen machen diese Daten das Gen U79260(FTO) sowie das aus der (-1)-Mutation dieses Genes abgeleiteten FSP11 zu einem vielversprechenden Kandidaten für zukünftige immuntherapeutische Ansätze.

#### **4.5. Ausblick**

Mit zunehmenden Untersuchungen liegen mittlerweile einige gut charakterisierte, häufig auftretende und zum Teil von mit hoher Wahrscheinlichkeit an der Kanzerogenese beteiligten Genlokalisationen abstammende FSPs vor. Damit wurden vielversprechende Kandidaten zusammengetragen, welche in ihrer Gesamtheit für weiterführende Studien genutzt werden können [Garbe et al., 2011; Linnebacher et al., 2001; Saeterdal et al., 2001; Ripberger et al., 2003; Schwitalle et al., 2004]. Dennoch besteht sicherlich auch in Zukunft der Bedarf an der Identifizierung und Charakterisierung weiterer TAAs. Eine größere Gruppe gut charakterisierter TAAs, zum Beispiel aus der Gruppe der FSPs, könnte für zukünftige immuntherapeutische Versuche nützlich sein. Gerade bei MSI-H CRCs bietet sich auf Grund der genetischen Vielfalt ein Mix aus diversen FSPs an. Damit sollte sichergestellt sein, dass die Tumorzellen wenigstens einige FSPs aus dem Mix auch exprimieren und damit dem Immunsystem zugänglich werden. Dies würde immuntherapeutische Optionen für bereits an MSI-H CRCs erkrankte Patienten eröffnen. Darüber hinaus besteht aber auch die Hoffnung, dass in kommenden Jahren eine präventive Impfung noch gesunder HNPCC-Anlageträger mit hohem Tumorrisiko möglich wird. So könnte zum Beispiel ein Cocktail aus diversen häufig auftretenden FSPs genutzt werden, um T-Zellen zu stimulieren. Diese können dann zur Immunisierung gefährdeter Patienten verwendet werden, um die Malignomentstehung vollständig zu vermeiden.

Auch wenn weiterhin ein deutlicher Forschungsbedarf besteht, eröffnen sich durch die Peptid-Charakterisierung vielversprechende Möglichkeiten sowohl für therapeutische als auch für präventive Ansätze zur Immuntherapie insbesondere bei MSI-H CRCs.

## 5. Zusammenfassung

Trotz der Möglichkeiten zur Frühdiagnostik und insgesamt umfangreicher Therapieformen stellt die Behandlung des CRCs eine Herausforderung an das Gesundheitswesen dar. Bei seit Jahren zunehmender Patientenzahl und in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Erstdiagnose sowie vom Metastasierungsstatus steigender Letalität ist die Notwendigkeit einer erfolgreichen Behandlung vor allem in fortgeschrittenen Tumorstadien groß.

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung eines Neopeptides, gebildet von CRCs mit einer bestimmten Form der genetischen Instabilität, in Hinblick auf dessen Fähigkeit zur Induktion von CTLs. Das Peptid FSP11 (TLSPGWSAV), welches sich aus der (-1)-Mutation im Gen U9260(FTO) ableitet, konnte als neues MHC-I restringiertes Epitop für CTLs identifiziert werden. Es wird sowohl stabil im HLA-A0201 Molekül exprimiert als auch durch CTL spezifisch erkannt. FSP11 konnte in peripheren CD8 positiven T-Zellen eines gesunden Spenders eine IFN- $\gamma$  Freisetzung induzieren und es wurde bei Präsentation im HLA-A0201-Molekül spezifisch erkannt.

Zudem entwickelten die T-Zell-Kultur sowie der FSP11-spezifische T-Zell-Klon die Fähigkeit zur selektiven Erkennung und Lyse der Tumorzelllinie mit der zugrundeliegenden Mutation. Dies weist auf eine Translation von U9260(FTO) hin gefolgt von der weiteren Prozessierung der Peptide durch das zelluläre Proteasom und letztendlich deren Präsentation im MHC-I-Molekül an der Zelloberfläche.

Da FSPs in einer gesunden Zelle gewöhnlich nicht vorkommen, könnten sie eine Angriffsfläche für das Immunsystem darstellen und als tumorspezifische Antigene fungieren. Gestützt wird diese Vermutung durch die bessere Prognose von Patienten mit MSI-H CRCs. Die tumorspezifischen FSPs könnten hierbei die Immunantwort vermitteln. Da jedoch zahlreiche Mutationen der cMS auftreten, bietet es sich an, eine Gruppe häufig auftretender und stark immunogener FSPs zu charakterisieren, um für eine spätere klinische Anwendung die Wahrscheinlichkeit der Tumorerkennung zu steigern. In der klinischen Anwendung interessant sind hier vor allem die Möglichkeiten zur Entwicklung einer Immuntherapie basierend auf den FSPs. Insbesondere eröffnet sich hier auch die Möglichkeit zur Entwicklung einer prophylaktischen Impfung für noch gesunde HNPCC-Anlageträger, welche ein sehr hohes Risiko für die Entwicklung von MSI-H Tumoren haben.

## 6. Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
AML	Akute myeloische Leukämie
β2M	Beta-2-Mikroglobulin
CD	Cluster of Differentiation
CD40B	CD40-aktivierte B-Zellen
CIN+	Chromosomal instabil
cMS	Kodierender Mikrosatellit
COX	Cyclooxygenase
CRC	Kolorektales Karzinom
CTL	Zytotoxische T-Zelle
DC	Dendritische Zelle
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISpot	Enzyme-linked immunosorbent spot
E : T	Effektor : Target
et al.	et alii
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSP	Frameshift Peptid
FTO	Fat mass and obesity associated
Gy	Grey
HLA	Human Leukocyte Antigen
HNPCC	Hereditäres nichtpolypöses kolorektales Karzinom
ICAM	Interzelluläres Adhäsionsmolekül
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
MHC	Major Histocompatibility Complex
MLH	MutL (Escherichia coli) Homolog

---

MMR	Mismatch Repair System
MP	Influenza Matrixprotein
MSH	MutS (Escherichia coli) Homolog
MSI-H	Hochgradige Mikrosatelliteninstabilität
MSI-L	Niedriggradige Mikrosatelliteninstabilität
MSS	Mikrosatellitenstabil
NIH	National Institute of Health
NK	Natürliche Killerzellen
NMD	Nonsense mediated decay
NO	Stickstoffmonoxid
P68	Peptid 68
PBS	Phosphate Buffered Saline
PE	Phycoerythrin
PMS	Postmeiotic segregation increased (Saccharomyces cerevisiae)
TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
TAP	Transporter associated with antigen processing
TGF	Transforming growth factor
Th	T-Helferzelle
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Treg	Regulatorische T-Zellen
UICC	Union International contre le Cancer
VEGF	Vascular endothelial growth factor

## 7. Abbildungsverzeichnis

		<b>Seite</b>
Abbildung 1	T-Lymphozyt lysiert eine Tumorzelle	1
Abbildung 2	Übersicht der Krebssterbefällen in Deutschland 2006	2
Abbildung 3	Charakteristischen biologischen Fähigkeiten von Tumoren	3
Abbildung 4	Weitere biologische Fähigkeiten von Tumoren	4
Abbildung 5	Übersicht bekannter Immune Escape Mechanismen	11
Abbildung 6	T2-Stabilisierungs-Assay	25
Abbildung 7	Wachstumskurve autologer T-Zell-Kulturen	26
Abbildung 8	ELISpot mit T2-Zellen (Abb. 8A) und CD40Bs (Abb. 8B)	28
Abbildung 9	Blockierungs-ELISpot	29
Abbildung 10	FACSotox mit T2-Zellen (Abb. 10A) und CD40Bs (Abb. 10B)	30
Abbildung 11	Cold Target Inhibition	31
Abbildung 12	FACSotox mit Tumorzelllinien und der T-Zell-Kultur (Abb. 12A) sowie dem Klon C10/11 (Abb. 12B)	33

## 8. Tabellenverzeichnis

		<b>Seite</b>
Tabelle 1	An der Tumorgenese beteiligte Genloci bei MSI-H Tumoren	5
Tabelle 2	Bislang identifizierte MMR-Gene und ihre Genlokalisierung	7
Tabelle 3	Zusammensetzung der verwendeten Zellkultur-Medien	18
Tabelle 4	Übersicht verwendeter Antikörper (ELISpot-Analyse)	22
Tabelle 5	Übersicht verwendeter Antikörper (Durchflusszytometrie)	22
Tabelle 6	Oberflächenmarker der T-Zell-Kultur (Durchflusszytometrie)	27

## 9. Literaturverzeichnis

- Akiyama Y, Sato H, Yamada T, Nagasaki H, Tsuchiya A, Abe R, Yuasa Y. Germ-line mutation of the hMSH6/GTBP gene in an atypical hereditary nonpolyposis colorectal cancer kindred. *Cancer Res.* 1997 Sep 15;57(18):3920-3 (PMID: 9307272)
- Algarra I, García-Lora A, Cabrera T, Ruiz-Cabello F, Garrido F. The selection of tumor variants with altered expression of classical and nonclassical MHC class I molecules: implications for tumor immune escape. *Cancer Immunol Immunother.* 2004 Oct;53(10):904-10. Epub 2004 Apr 7 (PMID: 15069585)
- Allison JP, Hurwitz AA, Leach DR. Manipulation of costimulatory signals to enhance antitumor T-cell responses. *Curr Opin Immunol.* 1995 Oct;7(5):682-6. Review (PMID: 8573312)
- Andersen MH, Schrama D, Thor Straten P, Becker JC. Cytotoxic T cells. *J Invest Dermatol.* 2006; 126:32-41 Review (PMID: 16417215)
- Baier PK, Wimmenauer S, Hirsch T, von Specht BU, von Kleist S, Keller H, Farthmann EH. Analysis of the T cell receptor variability of tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal carcinomas. *Tumour Biol.* 1998;19(3):205-12 (PMID: 9591047)
- Bhatia S, Tykodi SS, Thompson JA. Treatment of metastatic melanoma: an overview. *Oncology (Williston Park).* 2009 May;23(6):488-96 (PMID: 19544689)
- Bickels J, Kollender Y, Merinsky O, Meller I. Coley's toxin: historical perspective. *Isr Med Assoc J.* 2002 Jun;4(6):471-2 (PMID: 12073431)
- Bicknell DC, Kaklamanis L, Hampson R, Bodmer WF, Karran P. Selection for beta 2-microglobulin mutation in mismatch repair-defective colorectal carcinomas. *Curr Biol.* 1996 Dec 1;6(12):1695-7 (PMID: 8994836)
- Boland CR, Goel A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology.* 2010 Jun;138(6):2073-2087.e3. (PMID: 20420947)
- Boland CR, Sato J, Saito K, Carethers JM, Marra G, Laghi L, Chauhan DP. Genetic instability and chromosomal aberrations in colorectal cancer: a review of the current models. *Cancer Detect Prev.* 1998;22(5):377-82. Review (PMID: 9727618)
- Borie C, Colas C, Dartigues P, Lazure T, Rince P, Buhard O, Folliot P, Chalastanis A, Muleris M, Hamelin R, Mercier D, Oliveira C, Seruca R, Chadburn A, Leblond V, Barete S, Gaïdano G, Martin A, Gaulard P, Fléjou JF, Raphael M, Duval A. The mechanisms underlying MMR deficiency in immunodeficiency-related non-Hodgkin lymphomas are different from those in other sporadic microsatellite instable neoplasms. *Int J Cancer* 2009; 125:2360-6 (PMID: 19551857)
- Bronner CE, Baker SM, Morrison PT, Warren G, Smith LG, Lescoe MK, Kane M, Earabino C, Lipford J, Lindblom A, et al. Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature.* 1994 Mar 17;368(6468):258-61 (PMID: 8145827)
- Burnet FM. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res.* 1970;13:1-27. Review (PMID: 4921480)
- Burnet M. Cancer; a biological approach. I. The processes of control. *Br Med J.* 1957 Apr 6;1(5022):779-86 (PMID: 13404306)
- Cabrera CM, Jiménez P, Cabrera T, Esparza C, Ruiz-Cabello F, Garrido F. Total loss of MHC class I in colorectal tumors can be explained by two molecular pathways: beta2-microglobulin inactivation in MSI-positive tumors and LMP7/TAP2 downregulation in MSI-negative tumors. *Tissue Antigens.* 2003 Mar;61(3):211-9 (PMID: 12694570)
- Calistri D, Rengucci C, Seymour I, Leonardi E, Truini M, Malacarne D, Castagnola P, Giaretti W. KRAS, p53 and BRAF gene mutations and aneuploidy in sporadic colorectal cancer progression. *Cell Oncol.* 2006; 28: 161-6 (PMID: 16988471)
- Camus M, Tosolini M, Mlecik B, Pagès F, Kirilovsky A, Berger A, Costes A, Bindea G, Charoentong P, Bruneval P, Trajanoski Z, Fridman WH, Galon J. Coordination of intratumoral immune reaction and human colorectal cancer recurrence. *Cancer Res.* 2009 Mar 15;69(6):2685-93 (PMID: 19258510)
- Chan CC, Fan CW, Kuo YB, Chen YH, Chang PY, Chen KT, Hung RP, Chan EC. Multiple serological biomarkers for colorectal cancer detection. *Int J Cancer.* 2010 Apr 1;126(7):1683-90 (PMID: 19795454)
- Chang CC, Ferrone S. Immune selective pressure and HLA class I antigen defects in malignant lesions. *Cancer Immunol Immunother.* 2007 Feb;56(2):227-36. Epub 2006 Jun 17. Review (PMID: 16783578)
- Chang HR. Trastuzumab-based neoadjuvant therapy in patients with HER2-positive breast cancer. *Cancer.* 2010 Jun 5;116(12):2856-67 (PMID: 20564392)
- Ciccia A, Elledge SJ. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell.* 2010 Oct 22;40(2):179-204. Review (PMID: 20965415)
- De Fougerolles AR, Qin X, Springer TA. Characterization of the function of intercellular adhesion molecule (ICAM)-3 and comparison with ICAM-1 and ICAM-2 in immune responses. *J Exp Med.* 1994; 179: 619-29 (PMID: 7905020)
- DeNardo DG, Andreu P, Coussens LM. Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. *Cancer Metastasis Rev.* 2010 Jun;29(2):309-16. Review (PMID: 20405169)



- Drescher KM, Sharma P, Lynch HT. Current hypotheses on how microsatellite instability leads to enhanced survival of Lynch Syndrome patients. *Clin Dev Immunol*. 2010;2010:170432. Epub 2010 Jun 10. Review (PMID: 20631828)
- Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*. 2002 Nov;3(11):991-8. Review (PMID: 12407406)
- Evans C, Dalglish AG, Kumar D. Review article: immune suppression and colorectal cancer. *Aliment Pharmacol Ther*. 2006 Oct 15;24(8):1163-77. Review (PMID: 17014575)
- Ferris RL, Whiteside TL, Ferrone S. Immune escape associated with functional defects in antigen-processing machinery in head and neck cancer. *Clin Cancer Res*. 2006 Jul 1;12(13):3890-5. Review (PMID: 16818683)
- Finn OJ. Cancer immunology. *N Engl J Med*. 2008 Jun 19;358(25):2704-15 (PMID: 18565863)
- Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, Copeland NG, Jenkins NA, Garber J, Kane M, Kolodner R. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell*. 1994 Apr 8;77(1):1 p following 166 (PMID: 8156592)
- Fournier P, Schirmacher V. Randomized clinical studies of anti-tumor vaccination: state of the art in 2008. *Expert Rev Vaccines* 2009; 8: 51-66 (PMID: 19093773)
- Friedl P, den Boer AT, Gunzer M. Tuning immune responses: diversity and adaptation of the immunological synapse. *Nat Rev Immunol*. 2005 Jul;5(7):532-45. Review (PMID: 15999094)
- Galizia G, Lieto E, De Vita F, Romano C, Orditura M, Castellano P, Imperatore V, Infusino S, Catalano G, Pignatelli C. Circulating levels of interleukin-10 and interleukin-6 in gastric and colon cancer patients before and after surgery: relationship with radicality and outcome. *J Interferon Cytokine Res*. 2002 Apr;22(4):473-82. Retraction in: *J Interferon Cytokine Res*. 2011 Sep;31(9):691 (PMID: 12034030)
- Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, Tosolini M, Camus M, Berger A, Wind P, Zinzindohoué F, Bruneval P, Cugnenc PH, Trajanoski Z, Fridman WH, Pagès F. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*. 2006 Sep 29;313(5795):1960-4 (PMID: 17008531)
- Garbe Y, Maletzki C, Linnebacher M. An MSI tumor specific frameshift mutation in a coding microsatellite of MSH3 encodes for HLA-A0201-restricted CD8+ cytotoxic T cell epitopes. *PLoS One*. 2011;6(11):e26517 (PMID: 22110587)
- Grivnenkov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 2010 Mar 19;140(6):883-99. Review (PMID: 20303878)
- Uyl-de Groot CA, Vermorken JB, Hanna MG Jr, Verboom P, Groot MT, Bonsel GJ, Meijer CJ, Pinedo HM. Immunotherapy with autologous tumor cell-BCG vaccine in patients with colon cancer: a prospective study of medical and economic benefits. *Vaccine*. 2005 Mar 18;23(17-18):2379-87 (PMID: 15755632)
- Guerrette S, Wilson T, Gradia S, Fishel R. Interactions of human hMSH2 with hMSH3 and hMSH2 with hMSH6: examination of mutations found in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Mol Cell Biol*. 1998 Nov;18(11):6616-23 (PMID: 9774676)
- Hacker U, Hallek M, Kubicka S. Multimodality therapy of colorectal cancer *Internist (Berl)*. 2010 Nov;51(11):1366-73. Review. German (PMID: 20967408)
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646-74. (PMID: 21376230)
- Hanna MG Jr, Hoover HC Jr, Vermorken JB, Harris JE, Pinedo HM. Adjuvant active specific immunotherapy of stage II and stage III colon cancer with an autologous tumor cell vaccine: first randomized phase III trials show promise. *Vaccine*. 2001 Mar 21;19(17-19):2576-82 (PMID: 11257395)
- Harris JE, Ryan L, Hoover HC Jr, Stuart RK, Oken MM, Benson AB 3rd, Mansour E, Haller DG, Manola J, Hanna MG Jr. Adjuvant active specific immunotherapy for stage II and III colon cancer with an autologous tumor cell vaccine: Eastern Cooperative Oncology Group Study E5283. *J Clin Oncol*. 2000 Jan;18(1):148-57 (PMID: 10623705)
- Hendriks YM, Jagmohan-Changur S, van der Klift HM, Morreau H, van Puijenbroek M, Tops C, van Os T, Wagner A, Ausems MG, Gomez E, Breuning MH, Bröcker-Vriends AH, Vasen HF, Wijnen JT. Heterozygous mutations in PMS2 cause hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma (Lynch syndrome). *Gastroenterology*. 2006 Feb;130(2):312-22 (PMID: 16472587)
- Henkart PA. Lymphocyte-mediated cytotoxicity: two pathways and multiple effector molecules. *Immunity*. 1994 Aug;1(5):343-6. Review (PMID: 7882166)
- Hennessy EJ, Parker AE, O'Neill LA. Targeting Toll-like receptors: emerging therapeutics? *Nat Rev Drug Discov*. 2010 Apr;9(4):293-307 (PMID: 20380038)
- Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JP, Markowitz S, Willson JK, Hamilton SR, Kinzler KW, Kane MF, Kolodner RD, Vogelstein B, Kunkel TA, Baylin SB. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Jun 9;95(12):6870-5 (PMID: 9618505)
- Hermiston ML, Xu Z, Weiss A. CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells. *Annu Rev Immunol*. 2003; 21:107-37 Review (PMID: 12414720)
- Hisamuddin IM, Yang VW. Molecular Genetics of Colorectal Cancer: An Overview. *Curr Colorectal Cancer Rep*. 2006 Apr;2(2):53-59 (PMID 19079560)

- Hoos A, Eggermont AM, Janetzki S, Hodi FS, Ibrahim R, Anderson A, Humphrey R, Blumenstein B, Old L, Wolchok J. Improved endpoints for cancer immunotherapy trials. *J Natl Cancer Inst.* 2010 Sep 22;102(18):1388-97. Epub 2010 Sep 8. Review (PMID: 20826737)
- Hoover HC Jr, Brandhorst JS, Peters LC, Surdyke MG, Takeshita Y, Madariaga J, Muenz LR, Hanna MG Jr. Adjuvant active specific immunotherapy for human colorectal cancer: 6.5-year median follow-up of a phase III prospectively randomized trial. *J Clin Oncol.* 1993 Mar;11(3):390-9 (PMID: 8445413)
- Hsieh P, Yamane K. DNA mismatch repair: molecular mechanism, cancer, and ageing. *Mech Ageing Dev.* 2008 Jul-Aug;129(7-8):391-407 (PMID: 18406444)
- Hurwitz HI, Yi J, Ince W, Novotny WF, Rosen O. The clinical benefit of bevacizumab in metastatic colorectal cancer is independent of K-ras mutation status: analysis of a phase III study of bevacizumab with chemotherapy in previously untreated metastatic colorectal cancer. *Oncologist.* 2009 Jan;14(1):22-8 (PMID: 19144677)
- Huxley RR, Ansary-Moghaddam A, Clifton P, Czernichow S, Parr CL, Woodward M. The impact of dietary and lifestyle risk factors on risk of colorectal cancer: a quantitative overview of the epidemiological evidence. *Int J Cancer.* 2009 Jul 1;125(1):171-80 (PMID: 19350627)
- Ishikawa T, Fujita T, Suzuki Y, Okabe S, Yuasa Y, Iwai T, Kawakami Y. Tumor-specific immunological recognition of frameshift-mutated peptides in colon cancer with microsatellite instability. *Cancer Res.* 2003; 63: 5564-72 (PMID: 14500396)
- Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:197-216. Epub 2001 Oct 4. Review (PMID: 11861602)
- Janssen EM, Lemmens EE, Gour N, Reboulet RA, Green DR, Schoenberger SP, Pinkoski MJ. Distinct roles of cytolytic effector molecules for antigen-restricted killing by CTL in vivo. *Immunol Cell Biol.* 2010 Oct;88(7):761-5. Epub 2010 Mar 23 (PMID: 20309009)
- Jordanova ES, Philippo K, Giphart MJ, Schuurin E, Kluin PM. Mutations in the HLA class II genes leading to loss of expression of HLA-DR and HLA-DQ in diffuse large B-cell lymphoma. *Immunogenetics.* 2003 Jul;55(4):203-9. Epub 2003 May 17 (PMID: 12756506)
- Kageyama S, Tsomides TJ, Sykulev Y, Eisen HN. Variations in the number of peptide-MHC class I complexes required to activate cytotoxic T cell responses. *J Immunol.* 1995 Jan 15;154(2):567-76 (PMID: 7814868)
- Kahle P, Wernet P, Rehbein A, Kumbier I, Pawelec G. Cloning of functional human T lymphocytes by limiting dilution: impact of filler cells and interleukin 2 sources on cloning efficiencies. *Scand J Immunol.* 1981; 14: 493-502 (PMID: 6278580)
- Kim JC, Choi JS, Roh SA, Cho DH, Kim TW, Kim YS. Promoter methylation of specific genes is associated with the phenotype and progression of colorectal adenocarcinomas. *Ann Surg Oncol.* 2010; 17: 1767-76 (PMID: 20077021)
- Kim TG, Kim CH, Park JS, Park SD, Kim CK, Chung DS, Hong YK. Immunological factors relating to the antitumor effect of temozolomide chemoimmunotherapy in a murine glioma model. *Clin Vaccine Immunol.* 2010 Jan;17(1):143-53 (PMID: 19889936)
- Kloor M, Becker C, Benner A, Woerner SM, Gebert J, Ferrone S, von Knebel Doeberitz M. Immunoselective pressure and human leukocyte antigen class I antigen machinery defects in microsatellite unstable colorectal cancers. *Cancer Res.* 2005 Jul 15;65(14):6418-24 (PMID: 16024646)
- Konopitzky R, König U, Meyer RG, Sommergruber W, Wölfel T, Schweighoffer T. Identification of HLA-A\*0201-restricted T cell epitopes derived from the novel overexpressed tumor antigen calcium-activated chloride channel 2. *J Immunol.* 2002 Jul 1;169(1):540-7 (PMID 12077286)
- Koopman LA, van Der Slik AR, Giphart MJ, Fleuren GJ. Human leukocyte antigen class I gene mutations in cervical cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1999 Oct 6;91(19):1669-77 (PMID: 10511595)
- Leach FS, Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, Jen J, Parsons R, Peltomäki P, Sistonen P, Aaltonen LA, Nyström-Lahti M, et al. Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell.* 1993 Dec 17;75(6):1215-25 (PMID: 8261515)
- Leufkens AM, Van Duijnhoven FJ, Siersema PD, Boshuizen HC, Vrieling A, Agudo A, Gram IT, Weiderpass E, Dahm C, Overvad K, Tjønneland A, Olsen A, Boutron-Ruault MC, Clavel-Chapelon F, Morois S, Palli D, Grioni S, Tumino R, Sacerdote C, Mattiello A, Herman S, Kaaks R, Steffen A, Boeing H, Trichopoulou A, Lagiou P, Trichopoulos D, Peeters PH, van Gils CH, van Kranen H, Lund E, Dumeaux V, Engeset D, Rodríguez L, Sánchez MJ, Chirlaque MD, Barricarte A, Manjer J, Almquist M, van Guelpen B, Hallmans G, Khaw KT, Wareham N, Tsilidis KK, Straif K, Leon-Roux M, Vineis P, Norat T, Riboli E, Bueno-de-Mesquita HB. Cigarette smoking and colorectal cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition study. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2011 Feb;9(2):137-44. Epub 2010 Oct 26 (PMID: 21029790)
- W. Joost Lesterhuis, Cornelis J.A. Punt, Stanleyson V. Hato, Dagmar Eleveld-Trancikova, Bastiaan J.H. Jansen, Stefan Nierkens, Gerty Schreibelt, Annemiek de Boer, Carla M.L. Van Herpen, Johannes H. Kaanders, Johan H.J.M. van Krieken, Gosse J. Adema, Carl G. Figdor, I. Jolanda M. de Vries. Platinum-based drugs disrupt STAT6-mediated suppression of immune responses against cancer in humans and mice. *J Clin Invest.* 2011 August 1; 121(8): 3100–3108 (PMCID: PMC3148725)
- Liang PS, Chen TY, Giovannucci E. Cigarette smoking and colorectal cancer incidence and mortality: systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer.* 2009 May 15;124(10):2406-15 (PMID: 19142968)

- Line A, Slucka Z, Stengrevics A, Silina K, Li G, Rees RC. Characterisation of tumour-associated antigens in colon cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2002 Nov;51(10):574-82 (PMID: 12384809)
- Linnebacher M, Gebert J, Rudy W, Woerner S, Yuan YP, Bork P, von Knebel Doeberitz M. Frameshift peptide-derived T-cell epitopes: a source of novel tumor-specific antigens. *Int J Cancer* 2001; 93: 6-11 (PMID: 11391614)
- Loos RJ, Bouchard C. FTO: the first gene contributing to common forms of human obesity. *Obes Rev*. 2008 May;9(3):246-50. Epub 2008 Mar 26 (PMID 18373508)
- Lynch HT, de la Chapelle A. Genetic susceptibility to non-polyposis colorectal cancer. *J Med Genet*. 1999 Nov;36(11):801-18 (PMID: 10544223)
- Lynch HT, Lynch JF. Genetics of colonic cancer. *Digestion*. 1998 Aug;59(5):481-92. Review (PMID: 9705533)
- Mazzolini G, Murillo O, Atorrasagasti C, Dubrot J, Tirapu I, Rizzo M, Arina A, Alfaro C, Azpilicueta A, Berasain C, Perez-Gracia JL, Gonzalez A, Melero I. Immunotherapy and immunoescape in colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2007 Nov 28;13(44):5822-31. Review (PMID: 17990348)
- Melero I, Hervas-Stubbs S, Glennie M, Pardoll DM, Chen L. Immunostimulatory monoclonal antibodies for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2007 Feb;7(2):95-106. Review (PMID: 17251916)
- Mellman I, Coukos G, Dranoff G. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature*. 2011 Dec 21;480(7378):480-9. doi: 10.1038/nature10673 (PMID: 22193102)
- Merika E, Saif MW, Katz A, Syrigos K, Morse M. Review. Colon cancer vaccines: an update. *In Vivo*. 2010 Sep-Oct;24(5):607-28. Review (PMID: 20952724)
- Miyaki M, Konishi M, Tanaka K, Kikuchi-Yanoshita R, Muraoka M, Yasuno M, Igari T, Koike M, Chiba M, Mori T. Germline mutation of MSH6 as the cause of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat Genet*. 1997 Nov;17(3):271-2 (PMID: 9354786)
- Mond JJ, Lees A, Snapper CM. T cell-independent antigens type 2. *Annu Rev Immunol*. 1995;13:655-92. Review (PMID: 7612238)
- Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD. Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010 Mar;11(3):220-8. Review (PMID: 20177397)
- Nicolaidis NC, Papadopoulos N, Liu B, Wei YF, Carter KC, Ruben SM, Rosen CA, Haseltine WA, Fleischmann RD, Fraser CM, et al. Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature*. 1994 Sep 1;371(6492):75-80 (PMID: 8072530)
- Ockert D, Schirmmacher V, Beck N, Stoelben E, Ahlert T, Flechtenmacher J, Hagemüller E, Buchcik R, Nagel M, Saeger HD. Newcastle disease virus-infected intact autologous tumor cell vaccine for adjuvant active specific immunotherapy of resected colorectal carcinoma. *Clin Cancer Res*. 1996 Jan;2(1):21-8 (PMID: 9816085)
- Offman J, Opelz G, Doehler B, Cummins D, Halil O, Banner NR, Burke MM, Sullivan D, Macpherson P, Karran P. Defective DNA mismatch repair in acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome after organ transplantation. *Blood*. 2004 Aug 1;104(3):822-8. Epub 2004 Apr 15 (PMID: 15090454)
- Papadopoulos N, Nicolaidis NC, Wei YF, Ruben SM, Carter KC, Rosen CA, Haseltine WA, Fleischmann RD, Fraser CM, Adams MD, et al. Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. *Science*. 1994 Mar 18;263(5153):1625-9 (PMID: 8128251)
- Pawlik TM, Raut CP, Rodriguez-Bigas MA. Colorectal carcinogenesis: MSI-H versus MSI-L. *Dis Markers*. 2004;20(4-5):199-206. Review (PMID: 15528785)
- Poulogiannis G, Frayling IM, Arends MJ. DNA mismatch repair deficiency in sporadic colorectal cancer and Lynch syndrome. *Histopathology*. 2010 Jan;56(2):167-79 (PMID: 20102395)
- Raghavan S, Quiding-Järbrink M. Regulatory T cells in gastrointestinal tumors. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2011 Aug;5(4):489-501 (PMID: 21780896)
- Rammensee H, Bachmann J, Emmerich NP, Bachor OA, Stevanović S. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* 1999; 50: 213-9 (PMID: 10602881)
- Rammensee HG: Erkennungsmechanismen des Immunsystems. In: Huber C, Rammensee HG, Wölfel T, Britten CM: Krebsimmuntherapien, Standards und Innovationen. Deutscher Ärzte Verlag, Köln, 2008
- Rao B, Han M, Wang L, Gao X, Huang J, Huang M, Liu H, Wang J. Clinical outcomes of active specific immunotherapy in advanced colorectal cancer and suspected minimal residual colorectal cancer: a meta-analysis and system review. *J Transl Med*. 2011 Jan 27;9:17. Review (PMID: 21272332)
- Reuschenbach M, Kloor M, Morak M, Wentzensen N, Germann A, Garbe Y, Tariverdian M, Findeisen P, Neumaier M, Holinski-Feder E, von Knebel Doeberitz M. Serum antibodies against frameshift peptides in microsatellite unstable colorectal cancer patients with Lynch syndrome. *Fam Cancer*. 2010 Jun;9(2):173-9 (PMID 19957108)

- Ripberger E, Linnebacher M, Schwitalle Y, Gebert J, von Knebel Doeberitz M. Identification of an HLA-A0201-restricted CTL epitope generated by a tumor-specific frameshift mutation in a coding microsatellite of the OGT gene. *J Clin Immunol.* 2003; 23: 415-23 (PMID: 14601650)
- Robert Koch-Institut (Hrsg.) (2010) Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland. Entwicklung der Prävalenzen zwischen 1990 und 2010. Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes. RKI, Berlin (37-44).
- Robert Koch-Institut (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg.). Berlin, 2010 Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends. 7. Ausgabe (11-15, 19-23, 36-39)
- Rossi M, Young JW. Human dendritic cells: potent antigen-presenting cells at the crossroads of innate and adaptive immunity. *J Immunol.* 2005 Aug 1;175(3):1373-81. Review (PMID: 16034072)
- Saeterdal I, Gjertsen MK, Straten P, Eriksen JA, Gaudernack G. A TGF betaRII frameshift-mutation-derived CTL epitope recognised by HLA-A2-restricted CD8+ T cells. *Cancer Immunol Immunother* 2001; 50: 469-76 (PMID: 11761441)
- Saeterdal I, Bjørheim J, Lislud K, Gjertsen MK, Bukholm IK, Olsen OC, Nesland JM, Eriksen JA, Møller M, Lindblom A, Gaudernack G. Frameshift-mutation-derived peptides as tumor-specific antigens in inherited and spontaneous colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 13255-60 (PMID: 11687624)
- Saletti P, Edwin ID, Pack K, Cavalli F, Atkin WS. Microsatellite instability: application in hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Ann Oncol.* 2001 Feb;12(2):151-60 (PMID: 11300317)
- Schmiegel W, Reinacher-Schick A, Arnold D, Graeven U, Heinemann V, Porschen R, Riemann J, Rödel C, Sauer R, Wieser M, Schmitt W, Schmol HJ, Seufferlein T, Kopp I, Pox C. Update S3-guideline "colorectal cancer" 2008. *Z Gastroenterol.* 2008 Aug;46(8):799-840 (PMID: 18759205)
- Schuler MM, Nastke MD, Stevanović S. (2007) SYFPEITHI: database for searching and T-cell epitope prediction. *Methods Mol Biol.* 2007; 409: 75-93 (PMID: 18449993)
- Schulze T, Kemmner W, Weitz J, Wernecke KD, Schirmacher V, Schlag PM. Efficiency of adjuvant active specific immunization with Newcastle disease virus modified tumor cells in colorectal cancer patients following resection of liver metastases: results of a prospective randomized trial. *Cancer Immunol Immunother.* 2009; 58: 61-9 (PMID: 18488223)
- Schultze JL, Michalak S, Seamon MJ, Dranoff G, Jung K, Daley J, Delgado JC, Gribben JG, Nadler LM. CD40-activated human B cells: an alternative source of highly efficient antigen presenting cells to generate autologous antigen-specific T cells for adoptive immunotherapy. *J Clin Invest.* 1997 Dec 1;100(11):2757-65 (PMID: 9389740)
- Schuster SJ, et al.: Idiotype Vaccine Therapy in Follicular Lymphoma in First Complete Remission: Phase III Clinical Trial Results; ASCO 2009, Abstract P2.
- Schwitalle Y, Kloor M, Eiermann S, Linnebacher M, Kienle P, Knaebel HP, Tariverdian M, Benner A, von Knebel Doeberitz M. Immune response against frameshift-induced neopeptides in HNPCC patients and healthy HNPCC mutation carriers. *Gastroenterology* 2008; 134: 988-97 (PMID: 18395080)
- Schwitalle Y, Linnebacher M, Ripberger E, Gebert J, von Knebel Doeberitz M. Immunogenic peptides generated by frameshift mutations in DNA mismatch repair-deficient cancer cells. *Cancer Immun.* 2004; 25; 4:14 (PMID: 15563124)
- Seliger B, Atkins D, Bock M, Ritz U, Ferrone S, Huber C, Störkel S. Characterization of human lymphocyte antigen class I antigen-processing machinery defects in renal cell carcinoma lesions with special emphasis on transporter-associated with antigen-processing down-regulation. *Clin Cancer Res.* 2003 May;9(5):1721-7 (PMID: 12738726)
- Shah SN, Hile SE, Eckert KA. Defective mismatch repair, microsatellite mutation bias, and variability in clinical cancer phenotypes. *Cancer Res.* 2010; 70: 431-5 Review (PMID: 20068152)
- Siegmund-Schultze N. Immuntherapien gegen Krebs: Die klinische Anwendung rückt näher. *Deutsches Ärzteblatt* vom 27.11.2009; Jahrgang 106, Heft Nr. 48, Seiten 2069-2073.
- Smyth MJ, Crowe NY, Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H, Godfrey DI. NKT cells - conductors of tumor immunity? *Curr Opin Immunol.* 2002 Apr;14(2):165-71. Review (PMID: 11869887)
- Squier MK, Cohen JJ. Cell-mediated cytotoxic mechanisms. *Curr Opin Immunol.* 1994 Jun;6(3):447-52. Review. (PMID: 7522467)
- Stevanović S, Schild H. Quantitative aspects of T cell activation--peptide generation and editing by MHC class I molecules. *Semin Immunol.* 1999 Dec;11(6):375-84. Review (PMID: 10625591)
- Strand M, Prolla TA, Liskay RM, Petes TD. Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. *Nature.* 1993 Sep 16;365(6443):274-6 (PMID: 8371783)
- Suda T, Nagata S. Purification and characterization of the Fas-ligand that induces apoptosis. *J Exp Med.* 1994 Mar 1;179(3):873-9 (PMID: 7509364)
- Suzuki E, Sun J, Kapoor V, Jassar AS, Albelda SM. Gemcitabine has significant immunomodulatory activity in murine tumor models independent of its cytotoxic effects. *Cancer Biol Ther.* 2007 Jun;6(6):880-5 (PMID: 17582217)

- Sykulev Y, Joo M, Vturina I, Tsomides TJ, Eisen HN. Evidence that a single peptide-MHC complex on a target cell can elicit a cytolytic T cell response. *Immunity*. 1996 Jun;4(6):565-71 (PMID: 8673703)
- Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science*. 1993 May 7;260(5109):816-9 (PMID: 8484122)
- Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. 2010 Mar 19;140(6):805-20 (PMID: 20303872)
- Thomas L. On immunosurveillance in human cancer. *Yale J Biol Med*. 1982 May-Aug;55(3-4):329-33 (PMID: 6758376)
- Tol J, Punt CJ. Monoclonal antibodies in the treatment of metastatic colorectal cancer: a review. *Clin Ther*. 2010 Mar;32(3):437-53 (PMID: 20399983)
- Tougeron D, Fauquembergue E, Rouquette A, Le Pessot F, Sesboüé R, Laurent M, Berthet P, Mauillon J, Di Fiore F, Sabourin JC, Michel P, Tosi M, Frébourg T, Latouche JB. Tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal cancers with microsatellite instability are correlated with the number and spectrum of frameshift mutations. *Mod Pathol*. 2009; 22: 1186-95 (PMID: 19503063)
- Vermorken JB, Claessen AM, van Tinteren H, Gall HE, Ezinga R, Meijer S, Scheper RJ, Meijer CJ, Bloemena E, Ransom JH, Hanna MG Jr, Pinedo HM. Active specific immunotherapy for stage II and stage III human colon cancer: a randomised trial. *Lancet*. 1999 Jan 30;353(9150):345-50 (PMID: 9950438)
- Vonderheide RH, Hahn WC, Schultze JL, Nadler LM. The telomerase catalytic subunit is a widely expressed tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity*. 1999 Jun;10(6):673-9 (PMID: 10403642)
- Wang H, Dong S, Xu H, Qian J, Yang J. Genetic variants in FTO associated with metabolic syndrome: a meta- and gene-based analysis. *Mol Biol Rep*. 2011 Dec 22. (PMID: 22189543)
- Williams DS, Bird MJ, Jorissen RN, Yu YL, Walker F, Zhang HH, Nice EC, Burgess AW. Nonsense mediated decay resistant mutations are a source of expressed mutant proteins in colon cancer cell lines with microsatellite instability. *PLoS One*. 2010 Dec 31;5(12):e16012 (PMID: 21209843)
- Woerner SM, A. Benner, Y.P. Yuan, P. Bork, M.v. Knebel Doeberitz, J.F. Gebert. SelTarbase, A Database for Prediction of Selective Targets in MSI-H Tumorigenesis, [www.seltarbase.org](http://www.seltarbase.org), release 200804
- Woerner SM, Kloor M, Mueller A, Rueschoff J, Friedrichs N, Buettner R, Buzello M, Kienle P, Knaebel HP, Kunstmann E, Pagenstecher C, Schackert HK, Möslin G, Vogelsang H, von Knebel Doeberitz M, Gebert JF; German HNPCC Consortium. Microsatellite instability of selective target genes in HNPCC-associated colon adenomas. *Oncogene*. 2005 Apr 7;24(15):2525-35 (PMID: 15735733)
- Woerner SM, Yuan YP, Benner A, Korff S, von Knebel Doeberitz M, Bork P. SelTarbase, a database of human mononucleotide-microsatellite mutations and their potential impact to tumorigenesis and immunology. *Nucleic Acids Res*. 2010 Jan;38(Database issue):D682-9. Epub 2009 Oct 9 (PMID 19820113)
- Worthley DL, Walsh MD, Barker M, Ruzkiewicz A, Bennett G, Phillips K, Suthers G. Familial mutations in PMS2 can cause autosomal dominant hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2005 May;128(5):1431-6 (PMID: 15887124)
- Zhang Z, Zhou D, Lai Y, Liu Y, Tao X, Wang Q, Zhao G, Gu H, Liao H, Zhu Y, Xi X, Feng Y. Estrogen induces endometrial cancer cell proliferation and invasion by regulating the fat mass and obesity-associated gene via PI3K/AKT and MAPK signaling pathways. *Cancer Lett*. 2012 Jan 2. (PMID: 22222214)
- Zitvogel L, Kepp O, Senovilla L, Menger L, Chaput N, Kroemer G. Immunogenic tumor cell death for optimal anticancer therapy: the calreticulin exposure pathway. *Clin Cancer Res*. 2010 Jun 15;16(12):3100-4 (PMID: 20421432)

## 10. Danksagung

An erster Stelle ist hier PD Dr. rer. nat. Linnebacher zu nennen für die Bereitstellung des Themas, vor allem aber für die hervorragende und umfangreiche Betreuung - angefangen bei den ersten Schritten im Labor bis hin zum Schreiben der letzten Seiten der Dissertation.

Die experimentellen Arbeiten im Labor hätte ich mir ohne Inga Boeck gar nicht vorstellen können. An sie geht ein großes Dankeschön für die zahlreichen Spät- und Nachtschichten, für die gegenseitige Motivation und die Freundschaft über das Labor hinaus.

Ebenso gilt mein Dank dem Laborteam, allen voran Mathias Krohn und Tina Kottek, für die tatkräftige Unterstützung beim wissenschaftlichen Arbeiten und die stets hilfsbereite und kollegiale Arbeitsatmosphäre.

Christina Mullins und Anne Roock danke ich sehr für die Durchsicht der Arbeit.

Ein besonderer Dank geht an meine Familie, sowohl für das Verständnis als auch für die Motivation, diese Arbeit neben Studium und Berufsleben fertig zu stellen.