

Aus der Klinik und Poliklinik für Chirurgie
der Universitätsmedizin Rostock
Arbeitsgruppe für Molekulare Onkologie und Immuntherapie
Direktor: Prof. Dr. med. Ernst Klar

Frameshift-Neopeptide als neue tumorspezifische Antigene in mikrosatelliten-instabilen hämatologischen Erkrankungen

Inauguraldissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von:

Fabian Schmidt

aus Münster

geboren am 9.2.1979 in Haan

Gutachter:

1. Gutachter: PD Dr. rer. nat. Michael Linnebacher
Klinik für Allgemeinchirurgie, Universitätsmedizin Rostock
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Carl Friedrich Classen
Univ.-Kinder- und Jugendklinik, Universitätsmedizin Rostock
3. Gutachter: Prof. Dr. med. Daniel Palmes
Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie, Universitätsklinikum
Münster

Datum der Einreichung: 16.09.2015

Datum der Verteidigung: 20.01.2016

Meinen Eltern, meiner Frau Rebecca und Jan gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-------------|
| Abkürzungsverzeichnis | ix |
| Abbildungsverzeichnis | xiii |
| Tabellenverzeichnis | xv |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Mismatch-Repair-Defizienz und Mikrosatelliteninstabilität in der Entstehung und Diagnostik von Krebserkrankungen | 1 |
| 1.1.1 Entdeckung des prokaryotischen und eukaryotischen Mismatch-Repair-Systems | 1 |
| 1.1.2 Das menschliche DNA-Mismatch-Repair-System | 1 |
| 1.1.3 DNA-Mikrosatelliten und Mikrosatelliteninstabilität | 3 |
| 1.1.4 MMR-Defizienz und MSI in Leukämie- und Lymphomerkrankungen | 5 |
| 1.2 Immunologische Tumorbekämpfung und Tumorstoffe | 8 |
| 1.2.1 Mechanismen der Tumorantigen-vermittelten Immunantwort | 10 |
| 1.2.2 Frameshift-Neopeptide als Tumorantigene in MSI-positiven Tumorerkrankungen | 12 |
| 1.2.3 Immuntherapie für Leukämie- und Lymphomerkrankungen | 13 |
| 1.3 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit | 14 |
| 2 Material und Methoden | 15 |
| 2.1 Geräte | 15 |
| 2.2 Verbrauchsmaterialien, Reagenzien und Chemikalien | 16 |
| 2.3 Kits | 17 |
| 2.4 Eukaryote Zelllinien | 17 |
| 2.5 Antikörper | 18 |
| 2.5.1 Monoklonale Primärantikörper | 18 |
| 2.5.2 Sekundärantikörper | 19 |
| 2.6 Synthetische Peptide | 19 |
| 2.6.1 Synthetische Frameshift-Neopeptide | 19 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 2.6.2 | Primer | 19 |
| 2.7 | Zellkultur von Leukämie- und Lymphomzelllinien | 19 |
| 2.7.1 | Auftauen und Einfrieren von Zellen | 19 |
| 2.7.2 | Kultivierung | 21 |
| 2.7.3 | Bestimmung von Zellzahl und Vitalitätsrate | 21 |
| 2.7.4 | Zellpassage | 21 |
| 2.8 | System zur Zellkultur von CD40-Ligand-aktivierten menschlichen B-Zellen | 21 |
| 2.9 | Induktion von peptidspezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten | 22 |
| 2.10 | Durchflusszytometrie | 22 |
| 2.11 | MMR-Genexpressionsanalyse mittels Western Blot | 23 |
| 2.12 | DNA-Fragmentlängenanalyse | 23 |
| 2.12.1 | gDNA-Isolation | 23 |
| 2.12.2 | DNA-Konzentrationsbestimmung und Verdünnung | 23 |
| 2.12.3 | Herstellung einer DNA-Masterplatte | 24 |
| 2.12.4 | Polymerase-Kettenreaktion | 24 |
| 2.12.5 | Fragmentlängenbestimmung mittels Genanalysegerät | 24 |
| 2.12.6 | Auswertung der Fragmentanalyse mittels Genescan Analysis Software | 24 |
| 2.13 | Enzyme-linked Immunospot (ELISpot) assay | 25 |
| 2.14 | ⁵¹ Chrome-Release-Assay | 25 |
| 3 | Ergebnisse | 27 |
| 3.1 | Expression von hMLH1 und hMSH2 in Leukämie- und Lymphomzelllinien | 27 |
| 3.2 | HLA-A2- und MHC-I-Status von Leukämie- und Lymphomzelllinien | 27 |
| 3.3 | Mutationsprofil kodierender Mikrosatelliten in L/L-Zelllinien | 29 |
| 3.4 | Erkennung von CMS-instabilen Zelllinien durch FSP-spezifische T-Zellen | 31 |
| 3.5 | Lyse CMS-instabiler L/L-Zelllinien durch FSP-spezifische T-Zellen | 34 |
| 4 | Diskussion | 39 |
| 4.1 | MMR-Defizienz und MSI untersuchter L/L-Zelllinien | 39 |
| 4.2 | Expression und immunogene Wirkung von FSP in MSI-positiven L/L-Zelllinien | 42 |
| 4.3 | Fazit | 44 |
| 5 | Literaturverzeichnis | 47 |
| A | Thesen | 63 |
| B | Ehrenwörtliche Erklärung | 65 |

C Lebenslauf

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------------|--|
| ⁵¹ Cr | Chrom-51 Radionuklid |
| Ab | antibody, Antikörper |
| ALL | Akute Lymphatische Leukämie |
| AML | Akute myeloische Leukämie |
| APC | antigen presenting cells, antigen-präsentierende Zellen |
| B-ALL | B-Vorläufer-ALL |
| B-CLL | Chronische lymphatische Leukämie aus Lymphozyten der B-Zellreihe |
| BCIP/NBT | 5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate p-toluidine salt / nitro-blue tetrazolium chloride |
| bzw. | beziehungsweise |
| CD | Cluster of Differentiation, Unterscheidungsgruppen |
| Ci | Curie |
| CLL | Chronische lymphatische Leukämie |
| CML | Chronische myeloische Leukämie |
| cMS | coding microsatellites, kodierende Mikrosatelliten |
| CO ₂ | Kohlendioxid |
| CSR | class switch recombination, Klassenwechsel |
| CTL | cytotoxic T-Lymphocytes, zytotoxische T-Lymphozyten |
| DC | dendritic cells, Dendritische Zellen |
| del | deletion, Basendeletion |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle Medium |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxyribonukleosidtriphosphate |

| | |
|-------------------------|---|
| ELISpot | Enzyme Linked Immuno Spot Assay |
| FITC | Fluorescein isothiocyanate |
| FSM | frameshift-Mutation, Mutation durch Leserasterverschiebung |
| FSP | frameshift-neopeptide, Frameshiftneopeptid |
| gDNA | genomic deoxyribonucleic acid, genomische Desoxyribonucleinsäure |
| GvHD | graft-versus-host-disease, Transplantat-Wirt-Reaktion |
| Gy | Gray |
| h | Stunde |
| H ₂ O | Wasser |
| HIV | Humanes Immundefizienz-Virus |
| HLA | Human Leukocyte Antigen, Humanes Leukozytenantigen |
| hMLH1 | humanes MutL-Homolog 1 |
| hMSH2 | humanes MutS-Homolog 2 |
| HNPCC | hereditary non-polyposis colorectal cancer, Hereditäres non-polypöses Kolonkarzinom |
| IDL | insertion-deletion loop, Insertions-Deletionsschleife |
| IFN | Interferon |
| Ig | Immunglobulin |
| IL | Interleukin |
| IMDM | Iscove's Modified Dulbecco's Medium |
| IU | International Units, Internationale Einheiten |
| L/L | Leukämie und Lymphom |
| mAb | monoclonal antibody, monoklonaler Antikörper |
| mCi | Millicurie |
| MCL | mantle cell lymphoma, Mantelzelllymphom |
| MDS | Myelodysplastisches Syndrom |
| MgCl ₂ | Magnesiumchlorid |

| | |
|----------|---|
| MHC | major histocompatibility complex, Haupthistokompatibilitätskomplex |
| min | Minute |
| ml | Milliliter |
| MLH | MutL-Homolog |
| MM | Multiplres Myelom |
| mM | Millimol |
| MMR | mismatch-repair |
| MSH | MutS-Homolog |
| MSI | Mikrosatelliteninstabilität |
| MSI-H | MSI-high, hochgradige Mikrosatelliteninstabilität |
| MSI-L | MSI-low, niedriggradige Mikrosatelliteninstabilität |
| MSI-pos. | MSI-positiv |
| Mut | mutator phenotype |
| n. a. | not available, nicht vorhanden |
| ng | Nanogramm |
| NHL | Non-Hodgkin-Lymphom |
| nm | Nanometer |
| NP-40 | nonyl phenoxyethoxyethanol - 40 |
| PBMC | peripheral blood mononuclear cells, mononukleäre Zellen des peripheren Blutes |
| PBS | phosphate buffered saline, phosphatgepufferte Salzlösung |
| PCR | polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion |
| PE | Phycoerythrin |
| PMS1 | postmeiotic segregation increased 1 |
| RER | replication error, Replikationsfehler |
| rpm | revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute |
| RPMI | Roswell Park Memorial Institute Medium |
| SDS | sodium dodecyl sulfate |
| sek | Sekunde |

| | |
|-------------|---|
| T-ALL | T-Vorläufer-ALL |
| TAA | tumor associated antigen, Tumorspezifisches Antigen |
| tAML | therapy-related acute myeloid leukemia, therapieassoziierte Akute Myeloische Leukämie |
| U | unit, Einheit |
| usw. | und so weiter |
| wt | wild type, Wildtyp |
| z. B. | zum Beispiel |
| °C | Grad Celsius |
| µl | Mikroliter |
| µM | Mikromol |

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|-----|---|----|
| 3.1 | Ermittlung der Expression der Gene hMLH1 und hMSH2 in den untersuchten L/L-Zelllinien durch Immunoblotting | 28 |
| 3.2 | Beispielhafte Auswertung einer DNA-Fragmentlängenanalyse zur Ermittlung von MSI in L/L-Zelllinien | 30 |
| 3.3 | Erkennung von L/L-Zellen durch FSP-spezifische T-Lymphozyten | 35 |
| 3.4 | Spezifische Lyse untersuchter MSI-positiver Zielzellen durch FSP26-spezifische T-Zellen im ⁵¹ Cr-Release Assay | 37 |
| 3.5 | Spezifische Lyse untersuchter MSI-positiver Zielzellen durch FSP31-spezifische T-Zellen im ⁵¹ Cr-Release Assay | 38 |

Tabellenverzeichnis

| | | |
|-----|---|----|
| 1.1 | Studien zu MSI in Leukämien und Lymphomen | 9 |
| 2.1 | Geräte | 15 |
| 2.2 | Verbrauchsmaterialien, Reagenzien und Chemikalien | 16 |
| 2.3 | Kits | 17 |
| 2.4 | Eukaryote Zelllinien | 17 |
| 2.5 | Monoklonale Primärantikörper | 18 |
| 2.6 | Sekundärantikörper | 19 |
| 2.7 | Synthetische Frameshift-Neopeptide | 19 |
| 2.8 | PCR-Primer | 20 |
| 3.1 | Expression von hMLH1 und hMSH2 in Leukämie- und Lymphomzelllinien . . | 28 |
| 3.2 | Expression von MHC I und HLA-A2 in Leukämie- und Lymphomzelllinien . . | 29 |
| 3.3 | Expression von MSI-Markern in ausgewählten Zelllinien | 31 |
| 3.4 | Mutationsstatus mikrosatelliten-instabiler Genloci in Leukämie- und Lymphomzelllinien | 32 |
| 3.5 | Mutationsstatus bekannter FSP-Ursprungsgene in untersuchten Zelllinien . . | 33 |
| 4.1 | Übersicht über die vorhandenen Studien zu MSI in L/L-Zelllinien | 40 |

1 Einleitung

1.1 Mismatch-Repair-Defizienz und Mikrosatelliteninstabilität in der Entstehung und Diagnostik von Krebserkrankungen

1.1.1 Entdeckung des prokaryotischen und eukaryotischen Mismatch-Repair-Systems

Die Existenz eines Systems zur Reparatur von Basenpaarungsfehlern im Rahmen der DNA-Replikation wurde zuerst im Bakterium *E. coli* nachgewiesen und drei Hauptkomponenten identifiziert. Sie wurden wegen ihrer Fähigkeit, eine Anhäufung von Replikationsfehlern – den sogenannten mutator phenotype (Mut) – zu verhindern, MutS, MutL und MutH genannt. In *Saccharomyces cerevisiae* wird die Funktion der bakteriellen MutS von sechs Genprodukten übernommen, welche als MutS-Homologe (MSH) 1–6 bezeichnet werden. Vier Genprodukte ersetzen MutL: Die MutL-Homologe MLH1, MLH2, MLH3 sowie PMS1 (post meiotic segregation 1), welches auch an der Meiose beteiligt ist¹. Im Menschen gelang zuerst der Nachweis eines menschlichen Homologs der bakteriellen MutS und der mykotischen MSH2, genannt human MSH2 (hMSH2)². Später wurden auch menschliche Homologe zu MutL / MLH1 (hMLH1)³, zu PMS1 in *S. cerevisiae* (hPMS1 / hPMS2)⁴ und zu MSH6 (hMSH6)⁵ identifiziert.

1.1.2 Das menschliche DNA-Mismatch-Repair-System

Das menschliche Mismatch-Repair (MMR) System ist ein essentieller Mechanismus zur Aufrechterhaltung der Stabilität des menschlichen Genoms. Seine Hauptfunktion ist die postreplikative Reparatur von Fehlern bei der Basenpaarung, etwa in Form von Insertion oder Deletion falscher Basenpaare oder sogenannten Insertions-Deletionsschleifen (insertion / deletion loop, IDL), kurzen, extrahelikalen Schleifen, welche durch ein "Abrutschen"

(slippage) der DNA-Polymerase entstehen⁶. Erst in neuerer Zeit wurden auch darüber hinausgehende Funktionen des MMR-Systems wie die Beteiligung an Signalisierungswegen bei DNA-Schäden, mutagenen Prozessen wie der somatische Hypermutation (somatic Hypermutation, SHM), dem Klassenwechsel von Immunglobulin-Isotypen in B-Zellen (class switch recombination, CSR) und der Instabilität von DNA-Trinukleotid-Repeats⁷⁻¹² nachgewiesen.

Die menschlichen Homologe zu MutS und MutL sind aus je zwei Molekülen zusammengesetzt, die eine funktionelle Einheit bilden. Das hMutS-Heterodimer besteht entweder aus den Molekülen hMSH2 und hMSH6 (genannt hMutS α) oder aus hMSH2 und hMSH3 (hMutS β). Das menschliche MutL-Korrelat hMutL α wird aus je einem Molekül hMLH1 und hPMS2 gebildet, hMutL β aus hMLH1 und hPMS1. Es wird allgemein angenommen, dass MutS α eine entscheidende Rolle bei der Erkennung von Basenpaarungsfehlern und kleinen IDL spielt, während MutS β auf größere IDL spezialisiert ist¹³.

Obwohl die Funktion des menschlichen MMR-Systems noch nicht in allen Einzelheiten abschließend geklärt ist, kann der Prozess der postreplikativen DNA-Reparatur nach jetzigem Kenntnisstand in vier Schritte unterteilt werden: 1. Erkennung eines Replikationsfehlers durch hMutS α oder hMutS β , welche dann eine bewegliche Klammer (sliding clamp) um den fehlerhaften Basenstrang bilden und diesen durch eine ATP-getriebene Seitwärtsbewegung von der DNA-Matrize lösen. 2. Rekrutierung von hMutL, welches durch ein Mismatch-Erkennungssignal an den distalen DNA-Strangbruch bindet, an dem die Basenexzision beginnen soll, und dort die DNA-Polymerase durch Exonuklease I und weitere an der DNA-Exzision beteiligte Proteine ersetzt; 3. Exzision des DNA-Stranges, welcher das falsche Nukleotid enthält und 4. Resynthese des entfernten DNA-Abschnittes durch die DNA-Polymerase unter Verwendung des verbliebenen DNA-Stranges als Vorlage^{14,15}.

Wenn Teile des menschlichen MMR-Systems ausfallen, etwa durch Mutation oder Promotor-methylierung, bleiben Replikationsfehler der DNA-Polymerase unkorrigiert. Art und Ausmaß der genetischen Instabilität, welche aus einem defekten MMR-System resultiert, hängt auch davon ab, welche hMutS- und hMutL-Proteine defekt sind. Eine teilweise Redundanz und funktionelle Überschneidung zwischen den α - und β -Untergruppen führt zu unterschiedlichen Tumorphänotypen¹⁶⁻¹⁸. Zellen mit einer defekten MMR entwickeln fast immer einen mutator phenotype, welcher durch einen 100- bis 1000-fachen Anstieg spontaner Mutationen gekennzeichnet ist¹⁹⁻²¹. Dieser Mutations-Phänotyp ist mit einer langen Reihe von Krebserkrankungen assoziiert, wie dem kolorektalen Karzinom, Karzinomen des Magens, des Endometriums und der Ovarien, des Pankreas, des Urogenitaltraktes, der Brust sowie mit hämatologischen Erkrankungen²²⁻²⁶.

Eine besondere Rolle spielt die MMR-Defizienz beim Lynch-Syndrom, früher als hereditäres nicht-polypöses Kolonkarzinom (hereditary non-polyposis colorectal carcinoma, HNPCC) bezeichnet. Bei dieser autosomal-dominant vererbten Erkrankung kommt es aufgrund einer Keimbahnmutation in einem der bekannten MMR-Gene (hMSH2, hMSH6, hMLH1, hMLH3 und hPMS2) zu einem ausgeprägten Mutationsphänotyp. Patienten mit Lynch-Syndrom haben ein stark erhöhtes Krebsrisiko, insbesondere ein 80%-iges Risiko für die Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms und bei weiblichen Patienten zusätzlich ein 60%-iges Risiko für die Entwicklung eines Endometriumkarzinoms und ein 25%-iges Risiko für ein Ovarialkarzinom²⁷. Während beim Lynch-Syndrom nur ein Allel des betroffenen MMR-Gens erblich bedingt mutiert ist und eine zusätzliche Veränderung des anderen Allels durch somatische Mutation oder Methylierung für die Krankheitsentstehung erforderlich ist, kommt es bei einer erblich bedingten Mutation beider Allele zur Entwicklung von bösartigen Neubildungen bereits in der frühen Kindheit²⁸⁻³¹.

1.1.3 DNA-Mikrosatelliten und Mikrosatelliteninstabilität

DNA-Mikrosatelliten sind DNA-Abschnitte, in denen kurze (1–6 Basenpaare) Nukleotidsequenzen bis zu 100 Mal wiederholt werden und die daher als *short tandem repeats* bezeichnet werden. Abhängig von der Anzahl verschiedener Basen innerhalb eines Repeats unterscheidet man Mono-, Di-, Tri-, Tetra-, Penta- und Hexanukleoidrepeats. Typischerweise besteht ein Mikrosatellit aus einer einzigen, stetig wiederholten Nukleotidsequenz. Werden diese Wiederholungen durch eine eingestreute unterschiedliche Base unterbrochen, spricht man von einem sogenannten imperfect repeat, bei eingestreuten längeren Basensequenzen von interrupted repeats. Wechseln sich innerhalb eines Mikrosatelliten zwei oder mehr unterschiedliche Nukleotidsequenzen miteinander ab, wird das Ergebnis als zusammengesetzter Mikrosatellit (compound microsatellite) bezeichnet³².

DNA-Mikrosatelliten sind nicht zufällig über das Genom verteilt. Sie konzentrieren sich im Euchromatin, in dem die DNA in aufgelockerter Form vorliegt und in dem sich der überwiegende Teil der Erbinformation befindet. Dieser Umstand macht Mikrosatelliten zu einem wichtigen Werkzeug in der Kartierung von Genen. Aber auch innerhalb der aktiven Genomabschnitte zeigen Mikrosatelliten eine Tendenz zur Ballung in bestimmten Regionen. Liegen Mikrosatelliten in kodierenden DNA-Abschnitten, spricht man von kodierenden Mikrosatelliten (coding microsatellites, cMS)³².

Bei der DNA-Replikation kommt es in Mikrosatelliten im Vergleich zu anderen DNA-Abschnitten überdurchschnittlich häufig zu einem Abrutschen der DNA-Polymerase (slippage). Hierdurch

werden repetitive DNA-Sequenzen unterschiedlicher Länge von der Polymerase übersprungen, bis die Replikation zu einem späteren Zeitpunkt wieder einsetzt. Aufgrund der sich ständig wiederholenden Nukleotidsequenz kommt es hierbei häufig nicht zu einer relevanten Leserasterverschiebung und damit zu einem Abbruch der Replikation. Stattdessen entsteht ein verkürztes Genprodukt. Eine Anhäufung von solchen Replikationsfehlern in DNA-Mikrosatelliten wird als Mikrosatelliten-Instabilität (MSI), MSI-Phänotyp oder replication error (RER) – Phänotyp bezeichnet und gilt als Charakteristikum einer defekten MMR³³.

Zum Nachweis eines defekten MMR-Systems im Rahmen der Diagnostik beim Lynch-Syndrom wurde ein spezifisches Set von Mikrosatelliten-Loci (BAT25, BAT26, D2S123, D5S346 und D17S250) ermittelt, welche auf eine vermehrte Längenänderung – und damit MSI – hin untersucht werden können. MSI tritt in bis zu 90% aller mit dem Lynch-Syndrom assoziierten Neoplasien auf, einschließlich Tumoren des Kolorektums, des Endometriums, des Magens und der Ovarien. Zudem wurde MSI in 15–20% der Fälle sporadisch auftretender kolorektaler und anderer Tumoren beobachtet³⁴. Nach international gültiger Übereinkunft wird eine Instabilität in zwei oder mehr der fünf genannten Loci oder 30%–40% aller anderen untersuchten MSI-Loci als hochgradige Mikrosatelliteninstabilität (MSI-high, MSI-H) definiert. Eine Instabilität in nur einem von fünf Markern wird als niedriggradige MSI (MSI-low, MSI-L) bezeichnet. MSI-H wird im allgemeinen durch eine Mutation in hMLH1 und / oder hMSH2 verursacht, während MSI-L überwiegend durch Mutationen in hMSH6 und / oder hPMS2 entsteht^{35–38}.

Neben dieser Funktion als diagnostischer Marker für die MMR-Defizienz wird dem MSI-Phänotyp auch eine aktive Rolle in der Tumorentstehung zugeschrieben. Denn Frameshift-Mutationen (FSM) in kodierenden Mikrosatelliten können höchstwahrscheinlich auch zu einer Beeinträchtigung der Genfunktion führen. Der Verdacht auf eine aktive Rolle in der Tumorigenese besteht bei cMS, deren Ursprungsgene eine Reihe von Voraussetzungen erfüllen: 1. eine hohe Mutationsfrequenz, 2. eine biallelische Inaktivierung, 3. eine funktionelle Rolle des betroffenen Gens in einem Tumorsuppressor-Pathway, 4. das Auftreten von Veränderungen im selben Pathway in MSI-negativen Tumoren und 5. das Vorliegen von funktionellen Suppressorstudien *in vitro* und / oder *in vivo*³³.

Es wurden bereits verschiedene Gene mit cMS identifiziert, welche den oben genannten Kriterien entsprechen. Diese sind an der Signaltransduktion (TGF β RII, IGF1R, PTEN), apoptotischen Vorgängen (BAX, Caspase-5), der posttranslationalen DNA-Reparatur (hMSH3, hMSH6, MBD4), transkriptionaler Regulation (TCF-4) und der Immunabwehr (b2M) beteiligt. Die Suche nach neuen Kandidaten für cMS mit den entsprechenden Kriterien wird durch die

Weiterentwicklung hochleistungsfähiger Datenbanken und verbesserter Suchalgorithmen vereinfacht³⁹⁻⁴¹.

Es gibt jedoch auch Hinweise darauf, dass eine eingeschränkte MMR beziehungsweise der MSI-Phänotyp neben der eben erwähnten tumorigenen Wirkung auch einen entgegengesetzten, tumorprotektiven Effekt haben könnte. So haben beispielsweise sowohl sporadische als auch erblich bedingte, MSI-positive kolorektale Karzinome eine bessere Prognose als mikrosatelliten-stabile Tumore⁴². Zudem konnte als Zeichen einer verstärkten Abwehrreaktion durch das körpereigene Immunsystem eine verstärkte Lymphozyteninfiltration in der Umgebung MSI-positiver Tumorzellen nachgewiesen werden⁴³⁻⁴⁵.

1.1.4 MMR-Defizienz und MSI in Leukämie- und Lymphomerkrankungen

Die Begriffe Leukämie und Lymphom fassen eine Reihe von proliferativen Erkrankungen des blutbildenden Systems zusammen, die in vielen Faktoren, wie den betroffenen Zelltypen, der Ätiologie und Pathogenese, der klinischen Symptomatik und dem Krankheitsverlauf teils erhebliche Unterschiede aufweisen. Aus diesem Grunde sind auch entsprechende Studienergebnisse nur zwischen gleichen oder eng verwandten Entitäten vergleichbar. Eine Übersicht über vorhandene Studien zum Auftreten von MMR-defizienz und MSI in verschiedenen Leukämien und Lymphomen gibt Tabelle 1.1 auf Seite 9.

Es mehren sich Hinweise darauf, dass eine Reihe von hämatologischen Erkrankungen besonders anfällig für MSI ist. So wurde ein hohes Maß an Instabilität in den nach Organ- und Stammzelltransplantation auftretenden sogenannten Posttransplantations-myeloproliferativen Erkrankungen, sowie der chemotherapie-assoziierten akuten myeloischen Leukämie (t-AML) und dem myelodysplastischem Syndrom (MDS) sowie HIV-assoziierten Lymphomen nachgewiesen⁴⁶⁻⁴⁸. Den genannten Erkrankungen ist eine vorübergehende oder dauerhafte schwere Immunsuppression gemeinsam, so dass ein direkter Zusammenhang zwischen der Immunkompetenz des Individuums und der Rate an MSI-positiven Neoplasien postuliert und experimentell teilweise auch schon bestätigt wurde⁴⁸. Aufgrund der sehr heterogenen Natur hämatologischer Erkrankungen überrascht es jedoch nicht, dass die nachgewiesenen Raten an MMR-Defizienz und MSI zwischen den einzelnen Entitäten stark variieren⁴⁹⁻⁶⁰.

Die chronische lymphatische Leukämie (CLL) wurde von verschiedenen Autoren auf das Vorliegen von MSI untersucht. Gartenhaus *et al.* fanden in Patientenproben von 29 CLL eine MSI in 2 von 29 (7 %) untersuchten Proben⁶¹. Volpe *et al.* untersuchten 9 Mikrosatelliten-Loci in Tumormaterial von 23 Patienten (17 B-CLL, vier Haarzelleukämien, einem Lymphom

und einer T-CLL). Weil keine der untersuchten Proben eine MSI aufwies, schlussfolgerten die Autoren, dass MSI nicht an der Entstehung dieser Erkrankung beteiligt sei⁵¹. In der B-CLL-Unterguppe einer Studie von Sanz-Vaqué *et al.* konnte MSI in drei von 24 Proben nachgewiesen werden. In keinem Fall lag eine Instabilität in mehr als 30 % der zehn untersuchten Marker vor; somit bestand ausschließlich MSI-L. Alle drei von MSI betroffenen Patienten zeigten interessanterweise einen auffallend schweren klinischen Verlauf mit starker Symptomatik und einem diffusen Knochenmarksbefall. Die Autoren wiesen jedoch darauf hin, dass ein Zusammenhang von Krankheits Schwere und vorhandener MSI daraus nicht abgeleitet werden könne⁵⁰. Niv *et al.* fanden in ihrer Untersuchung von 27 Patienten mit B-CLL eine ähnliche Rate an MSI (4/27, 14,8%)⁴⁹. Im Jahr 2007 untersuchten Sellick *et al.* 982 B-CLL-Patienten auf das Vorliegen einer MSI. Unter Verwendung eines eingeschränkten Markersets (BAT25 und BAT26) fanden sie eine Mikrosatelliteninstabilität in nur einem Prozent der Fälle. Eine Instabilität in beiden Markern (MSI-H) lag bei keinem der betroffenen Patienten vor⁵².

Molenaar *et al.* wiesen zwar MSI in Mononukleotidrepeats aus Bax und TGF β RII in fast der Hälfte der von ihnen untersuchten 14 L/L-Zelllinien nach, nicht jedoch in 98 primären Proben von Kindern mit ALL. Daraus schlossen sie, daß eine MMR-Defizienz in frisch isolierten Leukämiezellen sehr selten auftritt, betroffene Zellen jedoch bei der Etablierung von entsprechenden Zelllinien positiv selektiert werden könnten⁵⁷. In einer im selben Jahr erschienenen Studie fanden Reato *et al.* jedoch eine MSI in 9,7 % der 41 untersuchten Fälle von kindlicher ALL, so dass ein Auftreten von MSI zumindest in einem Subset der ALL wahrscheinlich scheint.

MSI tritt vor allem in rasch expandierenden hämatologischen Erkrankungen, wie der *de novo* AML des älteren Patienten, oder der t-AML / MDS im Zusammenhang mit einer Chemotherapie oder längerfristiger Immunsuppression auf^{47,48,62-64}. Das-Gupta *et al.* untersuchten elf MSI-Marker in 71 Fällen von AML. MSI wurde in 44 % der untersuchten therapieassoziierten AML sowie in 10% der Erkrankungen von Patienten über 60 Jahren nachgewiesen; nicht jedoch in *de novo* AML bei jüngeren Patienten⁶². Rimsza *et al.* konnten in einer Studie mit 132 Fällen von *de novo*- und sekundärer AML keinen Fall von MSI nachweisen und postulierten, dass MSI weder in neu aufgetretenen, noch in sekundären oder rezidivierenden AML-Erkrankungen eine Rolle spielt⁶⁵. In einer Studie von Sill *et al.* wurde in 20 Proben von Patienten mit AML, welche auf eine MSI in 12 Mikrosatelliten-Loci untersucht wurden, ebenfalls keine MSI nachgewiesen⁶⁶. Diesen Ergebnissen stehen mehrere Studien gegenüber, die auch bei der *de novo* AML teilweise hohe Raten an MSI feststellten. So lag der Anteil von MSI-positiven *de novo*-Erkrankungen bei Tasaka *et al.* bei 12 %, im Falle von Krank-

heitsrezidiven sogar bei 35 %⁶⁷. Sheikhha *et al.* fanden MSI in 20,5 % der untersuchten Fälle von *de novo* AML⁶⁸. Nomededéu *et al.* untersuchten Material von 102 Patienten mit *de novo* AML; MSI lag in 20 Fällen (19,6 %) vor. Hiervon waren 14 Fälle MSI-H und 6 Fälle MSI-L. Bezugnehmend auf die vorangegangenen Studien von Rimsza und Sill kamen die Autoren zu dem Schluss, dass MSI in *de novo* AML deutlich häufiger vorkommt als zuvor angenommen⁶⁹.

Die therapie-assoziierte akute myeloische Leukämie und das mit ihr verwandte Myelodysplastische Syndrom gehören zu den am besten auf das Vorliegen von MSI untersuchten hämatologischen Erkrankungen; gleichzeitig werden hier die höchsten Raten an MSI nachgewiesen. Offman *et al.* konnten zeigen, dass eine Immunsuppression die selektive Proliferation MMR-defizienter myeloider Zellen begünstigt und somit signifikant zur Entwicklung von t-AML / MDS bei Patienten unter Thiopurin-basierter Chemotherapie beiträgt. Ursächlich könnte die therapiebedingt fehlende Überwachung der Hämatopoese durch das Immunsystem sein⁴⁸. Interessanterweise wurde eine MSI auch in nicht neoplastisch verändertem Epithelgewebe von Patienten nach allogener, nicht jedoch nach autologer hämatopoetischer Stammzelltransplantation nachgewiesen^{70,71}. MSI war in diesen Studien signifikant mit dem Schweregrad einer graft-versus-host-disease (GvHD) korreliert; ihr Auftreten konnte auf den chronischen Stress durch die Interaktion der Spenderzellen mit dem Empfängerepithel zurückgeführt werden. Ob diese immunologische Reaktion durch FSPs und ihre Präsentation bedingt sein könnte, muss durch weitere Studien eruiert werden. Obwohl die Rate an MSI in 82 untersuchten Fällen von AML insgesamt hoch war (29,4% in AML, 21,4 % in MDS), fiel in einer Studie von Sheikhha *et al.* vor allem der hohe Anteil von MSI-positiven sekundären und therapieassoziierten AML auf. So waren drei von sieben Proben (42,9 %) von sekundärer AML und acht von 17 Fällen (47,1 %) von t-AML MSI-positiv. Bei der *de novo* AML lag der Anteil MSI-positiver Fälle hingegen bei nur 20,5 %. Beim im Rahmen dieser Studie ebenfalls untersuchten Myelodysplastischen Syndrom war dieser Unterschied noch deutlicher: Während beide Fälle von therapieassoziiertem MDS MSI-positiv waren, war dies nur in einem von zwölf Fällen von *de novo*-MDS der Fall⁶⁸. Die Studie gab einen weiteren Hinweis auf die hohe Rate von MSI bei sekundären und therapieassoziierten hämatologischen Erkrankungen. Auch eine Studie von Casorelli *et al.* diagnostizierte einen hohen Anteil von MSI-positiven t-AML/MDS (16/25, 60 %) und ein Fehlen MSI-positiver *de novo* Erkrankungen (0/28). In der Gruppe der therapieassoziierten Erkrankungen wiesen Patienten, die mit Chemotherapie behandelt wurden, deutlich häufiger einen MSI-Phänotyp auf als solche mit alleiniger Bestrahlung, was den bereits zuvor postulierten Zusammenhang von Chemotherapie mit einer Mikrosatelliteninstabilität untermauerte⁶⁴.

Bedi *et al.* untersuchten 21 B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome auf das Vorliegen einer MSI. Während sieben von 13 (53,8 %) der HIV-assoziierten Lymphome MSI-positiv waren, konnte MSI in acht HIV-negativen Lymphompatienten nicht nachgewiesen werden⁴⁶. Duval *et al.* fanden einen MSI-Phänotyp in zwei Prozent (12/603) der Fälle von Non-Hodgkin-Lymphomen. Alle betroffenen Fälle traten im Zusammenhang mit längerfristiger Immunsuppression durch vorangegangene Organtransplantationen oder HIV-Infektionen auf. 364 Fälle von spontanem NHL waren hingegen sämtlich MSI-negativ⁴⁷. In einer Studie von Rimsza *et al.* trat MSI in einer Subgruppe von Patienten mit Mantelzelllymphom ebenfalls nicht auf⁶⁵. Zusammenfassend legen diese Untersuchungen den Schluß nahe, dass MSI in immunsupprimierten Patienten mit Lymphomerkkrankungen, analog zu t-AML / MDS ein durchaus häufig anzutreffendes Phänomen ist und bei der Diagnostik und Therapie dieser Erkrankungen eine Rolle spielen könnte.

Für die in der vorliegenden Arbeit nicht untersuchte chronischen myeloischen Leukämie (CML) wiesen Wada *et al.* eine hohe Rate von MSI (73,7 %) nach.

1.2 Immunologische Tumorbekämpfung und Tumorstoffe

Ziel jeder Therapie maligner Erkrankungen ist die möglichst vollständige, selektive und dauerhafte Eradikation von Tumorzellen, ohne unerwünschte Nebenwirkungen auf gesundes Gewebe hervorzurufen. Herkömmliche Ansätze wie Chirurgie und Strahlentherapie erreichen diese Ziele nur teilweise, da sie auf eine lokale Tumorbekämpfung beschränkt sind beziehungsweise das Tumorgewebe nicht selektiv genug angreifen können. Die verfügbaren Chemotherapeutika haben zumeist signifikante Nebenwirkungen. Immunologische Therapieansätze hingegen versprechen durch Aktivierung des körpereigenen Immunsystems einen gezielten Angriff auf entartete Körperzellen. Hierzu gilt es, immunologische Merkmale zu finden, welche die Tumorzellen von gesundem Gewebe unterscheiden. Je spezifischer solche Merkmale für die entarteten Zellen sind, und je mehr spezifische Merkmale bekannt sind, desto höher ist die Chance, einen Angriff hochselektiv sogar gegen geringe Restmengen von Tumorzellen zu leiten, welche durch konventionelle Therapieformen nicht erreicht werden oder gegen diese resistent geworden sind^{73,74}.

Tabelle 1.1: Studien zu MSI in Leukämien und Lymphomen

| Studie | Jahr | Erkrankung | n | MSI (%) |
|--|------|----------------------------|-----|---------|
| CLL | | | | |
| Gartenhaus <i>et al.</i> ⁶¹ | 1996 | CLL | 29 | 7 |
| Volpe <i>et al.</i> ⁵¹ | 1996 | CLL | 23 | 0 |
| Sanz-Vaqué <i>et al.</i> ⁵⁰ | 2001 | B-CLL | 28 | 13 |
| Niv <i>et al.</i> ⁴⁹ | 2005 | B-CLL | 27 | 14.8 |
| Sellick <i>et al.</i> ⁵² | 2007 | <i>de novo</i> B-CLL | 982 | 1 |
| CML | | | | |
| Wada <i>et al.</i> ⁶⁰ | 1994 | CML | 19 | 73.7 |
| AML | | | | |
| Sill <i>et al.</i> ⁶⁶ | 1996 | AML | 20 | 0 |
| Tasaka <i>et al.</i> ⁶⁷ | 1997 | <i>de novo</i> AML | 17 | 12 |
| | | AML-Rezidiv | 6 | 35 |
| Rimsza <i>et al.</i> ⁶⁵ | 2000 | <i>de novo</i> AML / s-AML | 132 | 0 |
| Das-Gupta <i>et al.</i> ⁶² | 2001 | AML | 71 | 13 |
| Sheikhha <i>et al.</i> ⁶⁸ | 2002 | AML | 44 | 20.5 |
| Casorelli <i>et al.</i> ⁶⁴ | 2003 | <i>de novo</i> AML | 28 | 0 |
| Nomdedeu <i>et al.</i> ⁶⁹ | 2005 | <i>de novo</i> AML | 102 | 19.6 |
| t-AML / t-MDS | | | | |
| Ben-Yehuda <i>et al.</i> ⁷² | 1996 | t-AML/t-MDS | 16 | 94 |
| Sheikhha <i>et al.</i> ⁶⁸ | 2002 | s-AML | 7 | 42.9 |
| | | t-AML | 17 | 47.1 |
| | | t-MDS | 2 | 100 |
| Casorelli <i>et al.</i> ⁶⁴ | 2003 | t-AML/MDS | 25 | 60 |
| Offman <i>et al.</i> ⁴⁸ | 2004 | t-AML/MDS | 7 | 100 |
| Rund <i>et al.</i> ⁶³ | 2005 | t-AML/MDS | 22 | 77 |
| ALL | | | | |
| Molenaar <i>et al.</i> ⁵⁷ | 1998 | kindl. ALL | 98 | 0 |
| Reato <i>et al.</i> ⁵⁸ | 1998 | kindl. ALL | 41 | 9.7 |
| NHL | | | | |
| Bedi <i>et al.</i> ⁴⁶ | 1995 | B-NHL | 21 | 30 |
| Sanz-Vaqué <i>et al.</i> ⁵⁰ | 2001 | B-NHL (MCL) | 29 | 0 |
| Duval <i>et al.</i> ⁴⁷ | 2004 | NHL | 603 | 2 |

1.2.1 Mechanismen der Tumorantigen-vermittelten Immunantwort

Die Entdeckung von tumorspezifischen Antigenen (tumor associated antigens, TAA) eröffnete neue Wege in der Entwicklung von effektiven Immuntherapien gegen maligne Erkrankungen. TAA werden von Tumorzellen exprimiert und können eine humorale oder zellvermittelte Immunantwort des Körpers gegen die entsprechende Zelle auslösen⁷⁵. Obwohl einige der bekannten TAA von mutierten Genen abgeleitet sind, handelt es sich zumeist um nicht mutierte Genprodukte, wie etwa intrazelluläre Peptide, welche von Tumorzellen mithilfe von Molekülen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (major histocompatibility complex, MHC) an der Zelloberfläche exprimiert werden. Diese Antigen-Präsentation erfolgt durch die sogenannten humanen Leukozytenantigene (human leukocyte antigen, HLA). Ein präsentiertes Antigen kann dann von körpereigenen zytotoxischen T-Zellen (cytotoxic T-lymphocytes, CTL) erkannt und auf verschiedene Weise bekämpft werden. MHC- und HLA-Moleküle wurden zuerst im Zusammenhang mit den menschlichen Blutgruppen entdeckt und katalogisiert. Es existieren drei bekannte Untergruppen des MHC, welche sich in ihrer Struktur und dem Ausmaß ihrer Expression in verschiedenen Körperzellen unterscheiden. Im MHC I werden die HLA-Klassen HLA-A, HLA-B und HLA-C zusammengefasst, MHC II umfasst HLA-DR, -DP und -DQ. Der MHC III besteht nicht aus HLA-Molekülen, sondern beinhaltet Plasmaproteine, die an der unspezifischen Immunabwehr beteiligt sind. Die Expression der Humanen Leukozytenantigene ist hoch polymorph; daher werden die HLA-Klassen je nach Ausprägung weiter unterteilt nach Isotyp (z. B. HLA-A), dem exprimierten Allel (HLA-A02) und Suballel (HLA-A0201) sowie bis zu fünf zusätzlichen Ziffern, welche die Suballele weiter differenzieren. Die Moleküle des MHC unterscheiden sich im Ausmaß ihrer Expression in verschiedenen Zelltypen sowie in der Art der von ihnen präsentierten Antigene. MHC I-Moleküle werden von fast allen zellkernhaltigen Körperzellen exprimiert und präsentieren körpereigene Antigene und Peptide aus zuvor in die Zelle aufgenommenen und in Peptidfragmente aufgespaltenen Pathogenen (z. B. Viren) an CD8-positive (CD8⁺) CTL. Die Moleküle des MHC II werden fast ausschließlich von sogenannten professionellen antigen-präsentierenden Zellen (antigen presenting cells, APC) – wie B-Lymphozyten, dendritischen Zellen und Makrophagen – exprimiert. Deren Aufgabe ist es, ein Antigen aufzunehmen, es in kleine Molekülabschnitte, sogenannte Epitope, aufzuspalten und diese Epitope mit Hilfe der HLA an der Zelloberfläche zu präsentieren, wo sie von CD4⁺ T-Helferzellen erkannt werden, welche wiederum andere Zellen des Immunsystems aktivieren^{76,77}. Die Mehrzahl der bekannten TAA werden in Zusammenhang mit MHC I präsentiert und von spezifischen CD8⁺ CTL erkannt. Jedoch steigt auch die Zahl von bekannten TAA, welche durch HLA des MHC II präsentiert und von T-Helferzellen erkannt werden⁷⁸.

Warum Tumorzellen vom Immunsystem nicht regelhaft angegriffen werden, obwohl sie eine Vielzahl von tumorspezifischen Antigenen exprimieren, ist eine der wichtigsten Fragen in der Tumorimmunologie. Es wird angenommen, dass zur Erzeugung einer optimalen Immunantwort, insbesondere gegen schwach exprimierte Tumorantigene, mehrere verschiedene Stimuli erforderlich sind. Neben der Aktivierung des T-Zell-Rezeptors auf der Tumorzelloberfläche durch das an MHC-Moleküle gebundene Antigen ist ein zweites, sogenanntes co-stimulatorisches Signal notwendig, welches aus einer Interaktion verschiedener Corezeptoren auf der T-Zelle und der antigenpräsentierenden Zelle besteht⁷⁸. Zu den bekannten co-stimulatorischen Faktoren zählen die Interaktionspaare B7–CD28, CD40–CD40 Ligand, und CD70–CD27. Ohne solche costimulatorische Faktoren kommt es zu einer Anergie der T-Zellen und dadurch zu einer Immuntoleranz. Daher ist es nötig, beim priming antigenspezifischer T-Zellen für eine immunologische Therapie für das Vorhandensein der entsprechenden costimulatorischen Faktoren zu sorgen^{76,77}.

Einen weiteren essentiellen Baustein für die Erzeugung einer effektiven antitumoralen Immunantwort *in vivo* stellen die Zellen des angeborenen Immunsystems dar. Bei Gefahr durch Infektionserreger oder äußere Verletzungen werden verschiedene Mechanismen in Gang gesetzt, welche die zellvermittelte Abwehr durch CTL erleichtern. Die Dendritischen Zellen (dendritic cells, DC) haben die Aufgabe, Antigene aufzunehmen und durch Präsentation an ihrer Zelloberfläche CTL zu einer Reaktion gegen das Antigen zu stimulieren. Nachdem die dendritischen Zellen ein Antigen aufgenommen haben, kommt es zu einer vermehrten Expression von MHC Klasse I und II – Molekülen, Costimulatoren und Adhäsionsmolekülen. Zugleich wird durch vermehrte Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen eine T-Zellproliferation und –aktivierung erreicht. In den lymphatischen Organen des Körpers kommt es schließlich durch Ausschüttung von Interleukin 2 und Interleukin 12 zu einer weiteren Induktion der zellvermittelten Immunabwehr. Aus diesem Grund können Dendritische Zellen in Studien dazu genutzt werden, tumorassoziierte Antigene effektiv zu präsentieren und die zelluläre Immunabwehr zu induzieren⁷⁹.

Eine weitere Schlüsselrolle bei der Tumorbekämpfung durch das Immunsystem spielen höchstwahrscheinlich die T-Helferzellen, insbesondere der an der Aktivierung Antigenpräsentierender Zellen und der Modulation der zytotoxischen Immunantwort beteiligte Subtyp T_H1. Studien legen nahe, dass ein antigenspezifisches priming sowohl von CTL als auch von T-Helferzellen notwendig ist, um eine effektive Immunantwort auszulösen. Aus diesem Grund werden auch MHC II-restriktive Epitope aus tumorassoziierten Antigenen für Tumorstimmungen herangezogen⁸⁰.

Tumorstimmungen sollen eine spezifische Immunantwort gegen TAA hervorrufen und so zur

Zerstörung der antigentragenden malignen Zellen führen. In Analogie zu traditionellen Vakzinen, zum Beispiel gegen virale Erkrankungen, wird dieser Ansatz als aktive spezifische Immunotherapie bezeichnet, da das Immunsystem des Patienten entweder erstmals aktiviert oder restimuliert wird, um eine Immunantwort gegen maligne Zellen hervorzurufen. Experimentelle Studien legen nahe, dass durch die Tumorstimmung das Immunsystem des Patienten in die Lage versetzt werden kann, Tumorzellen selektiv zu identifizieren und anzugreifen⁸¹. Die bisher bekannten antigenspezifischen Vakzinen unterliegen zum großen Teil der Einschränkung, dass nur ein einzelnes tumorspezifisches Antigen als Zielstruktur dient. Nach einer vollständigen Elimination aller dieses spezifische Antigen exprimierenden Zellen besteht die Gefahr eines Erkrankungsrezidivs durch Tumorzellen, welche das spezifische Antigen nicht länger exprimieren. Darüber hinaus ist eine ausreichende Immunogenität des eingesetzten Antigens Voraussetzung für eine effektive Therapie. Im Gegensatz hierzu bestehen sogenannte polyvalente Vakzine aus mehreren verschiedenen tumorspezifischen Antigenen und können so die genannten Einschränkungen möglicherweise umgehen. Zudem wäre es durch Zusammenfassung mehrerer TAA unterschiedlicher Tumorentitäten zumindest theoretisch möglich, eine einzelne, gegen verschiedene maligne Erkrankungen zugleich gerichtete Vakzine herzustellen. Eine der größten Herausforderungen liegt daher in der Identifikation von Tumorantigenen, welche in einer größeren Anzahl von Patienten und Tumorentitäten nachweisbar sind und als Grundlage für eine mögliche polyvalente Tumorstimmung dienen können⁸².

1.2.2 Frameshift-Neopeptide als Tumoantigene in MSI-positiven Tumorerkrankungen

Durch Insertion oder Deletion einzelner Basenpaare kann es im Rahmen der DNA-Transkription zu einer Verschiebung im Leseraster (frameshift) kommen. Es werden dann durch die DNA-Polymerase zunächst sinnlose Peptidabschnitte, welche als Frameshift-Neopeptide (frameshift neopeptides, FSP) bezeichnet werden, synthetisiert. Die Genprodukte, bei deren Herstellung es zu einer solchen Fehlübersetzung kommt, verlieren in den meisten Fällen ihre – unter anderem tumorsupprimierende – Funktion⁸³. Da MMR-defiziente und MSI-positive Zellen besonders häufig Leserasterverschiebungen erleiden und die betroffenen Gene im Prozess der Karzinogenese positiv selektiert werden, könnte dieser Phänotyp nicht nur in der Tumorentstehung, sondern auch in der Tumorprogression und potentiell auch bei der späteren Metastasierung eine Rolle spielen⁴⁷.

Andererseits konnte in Studien gezeigt werden, dass FSP eine immunogene Wirkung entfalten

und damit einen tumorprotektiven Effekt haben könnten⁸⁴. FSP werden in gesunden Körperzellen mit einer funktionierenden MMR nur in seltenen Ausnahmefällen, in MMR-defizienten Zellen jedoch überdurchschnittlich häufig exprimiert. Potentielle FSP-Sequenzen können dabei mittels bioinformatischer Methoden aus dem menschlichen Genom vorhergesagt werden; eine Liste von codierenden Mikrosatelliten in Kandidatengenomen, welche in MSI-H kolorektalen Karzinomen besonders häufig mutiert waren, wurde in neuerer Zeit veröffentlicht und in einer frei zugänglichen Datenbank ständig aktualisiert (www.seltarbase.org)⁴⁰. Ausgehend von der Annahme, dass FSP vom Immunsystem als Antigene erkannt und durch den MHC an der Zelloberfläche präsentiert werden, gelang es, synthetisch hergestellte FSP zur Differenzierung von CD8⁺ CTL zu nutzen. Diese FPS-spezifischen CTL konnten kolorektale Karzinomzellen, welche die dem jeweiligen FSP zugrundeliegende Mutation trugen, erkennen und durch Zellyse effektiv zerstören⁸⁴. In weiteren Studien an MMR-defizienten Tumorzelllinien konnte bereits mehrfach die Expression von FSP nachgewiesen werden, welche von im oben geschilderten Verfahren hergestellten CTL erkannt und lysiert werden konnten⁸⁴⁻⁸⁹. Darüber hinaus konnte auch eine FSP-bedingte Induktion der humoralen Immunantwort in menschlichen Sera experimentell bewiesen werden⁹⁰.

1.2.3 Immuntherapie für Leukämie- und Lymphomerkrankungen

Im Vergleich zu soliden Tumoren haben hämatologische Neoplasien einige Eigenschaften, die sie zu idealen Kandidaten für eine vakzinbasierte Immuntherapie machen könnten. Tumormaterial ist leicht erhältlich, und durch herkömmliche Therapien kann die Tumorlast bis in einen Bereich reduziert werden, in dem ein günstiges Verhältnis von Effektor- zu Zielzellen besteht. Hinzu kommt, dass viele Leukämie- und Lymphomzellen von Zellen des Immunsystems abstammen und daher verstärkt antigenpräsentierende Eigenschaften haben⁷⁵. Der sogenannte graft-versus-leukemia Effekt, durch den die AML mittels Stammzelltransplantation geheilt werden kann, ist ein Indiz dafür, dass das Immunsystem in der Lage ist, Neoplasien des hämatopoietischen Systems zu bekämpfen⁹¹. Eine gezielte Immunotherapie hämatologischer Erkrankungen erfordert die Identifikation von TAA welche 1. leukämie-spezifisch sind, 2. in den meisten Leukämiezellen einschließlich der entsprechenden Stammzellen exprimiert werden, 3. eine Bedeutung in der Entstehung des Leukämie-Phänotyps haben und 4. möglichst hoch immunogen sind^{92,93}. Immunotherapien stellen eine vielversprechende Behandlungsoption für hämatologische Erkrankungen dar, und eine steigende Anzahl von Angriffspunkten konnte bereits identifiziert werden^{74,75,92,94,95}. So sind die allogene Stammzelltransplantation und die Transfusion von Spenderlymphozyten wirksame Therapien für die akute myeloische Leukämie; Antikörper-Therapien zeigen eine gute Wirksamkeit beim

Non-Hodgkin-Lymphom, und es konnte nachgewiesen werden, dass menschliche T-Zellen auch chemotherapieresistente Zelllinien aus CML und Multiplen Myelomen (MM) lysieren können⁷⁵.

1.3 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

In der vorliegenden Arbeit soll gezeigt werden, dass MSI-induzierte Frameshift-Neopeptide spezifische Tumorantigene in MSI-positiven hämatologischen Erkrankungen darstellen und von der zellulären Immunabwehr des menschlichen Körpers erkannt und angegriffen werden. Sie könnten daher das Spektrum immunologischer Angriffspunkte signifikant erweitern und als Grundlage für die Entwicklung T-Zell-basierter Tumorstoffe und anderer zellulärer Therapien dienen.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Tabelle 2.1: Geräte

| Gerät | Hersteller |
|-------------------------------|---|
| Analysewaage | Sartorius (Göttingen, Deutschland) |
| Elektrophoresekamera | Kodak (Stuttgart, Deutschland) |
| Tischzentrifuge | Eppendorf (Hamburg, Deutschland) |
| Durchflusszytometer | Becton Dickinson (Franklin Lakes, USA) |
| Kapillarsequenzierer | Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland) |
| 12-Kanalpipette, elektronisch | Thermo Scientific (Waltham, USA) |
| Thermocycler | Stratagene (Böblingen, Deutschland) |
| Vortexer | IKA (Staufen, Deutschland) |
| ELISpot-Lesegerät | Zeiss Kontron (Göttingen, Deutschland) |
| Mehrfachproben-Gammazähler | LKB-Wallac (Stockholm, Schweden) |

2.2 Verbrauchsmaterialien, Reagenzien und Chemikalien

Tabelle 2.2: Verbrauchsmaterialien, Reagenzien und Chemikalien

| | Hersteller |
|------------------------------------|--|
| Dulbecco's PBS (1x) ohne Ca & Mg | PAA (Cölbe, Deutschland) |
| DMEM / Ham's F-12 mit L-Glutamin | PAA |
| RPMI 1640 mit L-Glutamin | PAA |
| NuPAGE X-Cell Elektrophoresekammer | Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) |
| NuPAGE Bis-Tris Gel | Invitrogen |
| NuPAGE MES Laufpuffer | Invitrogen |
| IL-2 | PromoCell (Heidelberg, Deutschland) |
| IL-4 | Cellgenix (Freiburg, Deutschland) |
| IL-7 | Cellgenix |
| Interferon- γ | Cellgenix |
| Fötales Kälberserum | Invitrogen |
| NBT/BCIP | Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) |
| Chemoluminiszenz-Reagenz | Amersham (Freiburg, Deutschland) |
| Taq-Polymerase | Invitrogen |
| dNTP-Mix | Invitrogen |
| Tween | Sigma-Aldrich |
| DMSO | Merck (Darmstadt, Deutschland) |
| L-Glutamin | PAA |
| 37% Formaldehyd | Carl Roth GmbH (Karsruhe, Deutschland) |
| Bovines Serumalbumin (BSA) | Sigma-Aldrich |
| CaCl ₂ | Merck |
| Zitronensäure | Merck |
| Ethanol | Merck |
| Gel-Dry Drying Solution | Invitrogen |
| MgCl ₂ | Merck |
| Milchpulver | Carl Roth GmbH |
| Oligo(dT) Primer | Invitrogen |
| Penicillin / Streptomycin (100 x) | PAA |
| Zellkulturflaschen | Greiner Bio-One (Nürtigen, Deutschland) |

2.3 Kits

Tabelle 2.3: Kits

| Kit | Hersteller |
|--------------------------------------|---|
| DNeasy Blood & Tissue Kit | Qiagen (Hilden, Deutschland) |
| BigDyeTerminator v1.1 Sequencing Kit | Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland) |

2.4 Eukaryote Zelllinien

Tabelle 2.4: Eukaryote Zelllinien

| Zelllinie | Dignität | Acc-no. | Referenzen |
|-----------|-----------------|---------------|--|
| CTV-1 | AML | DSMZ ACC 40 | Chen et al., Gann (Jpn. J. Cancer Res.) 75: 660-664 (1984) |
| CTV-2 | AML | n. a. | Chen et al., Gann (Jpn. J. Cancer Res.) 75: 660-664 (1984) |
| NALM6 | prä-B-ALL | DSMZ ACC 128 | Hurwitz et al., Int. J. Cancer 23: 174-180 (1979) |
| HSB-2 | T-ALL | DSMZ ACC 435 | Adams et al., Cancer Res. 28: 1121-1125 (1968) |
| RAJI | Burkitt Lymphom | DSMZ ACC 319 | Pulvertaft, Lancet I: 238-240 (1964) |
| SW-480 | Kolonkarzinom | DSMZ ACC 313 | Leibovitz et al., Cancer Res. 36: 4562-4569 (1976) |
| RKO | Kolonkarzinom | ATCC CRL-2577 | Brattain et al., Cancer Metastasis Rev. 3: 177-191 (1984) |
| CCRF-CEM | T-ALL | DSMZ ACC 240 | Foley et al., Cancer 18: 522-529 (1965) |
| MOLT-3 | T-ALL | DSMZ ACC 84 | Minowada et al., J Natl Cancer Inst 49: 891-895 (1972) |
| MOLT-4 | T-ALL | DSMZ ACC 362 | Minowada et al., J Natl Cancer Inst 49: 891-895 (1972) |
| MOLT-14 | T-ALL | DSMZ ACC 437 | Drexler et al., Hematol Oncol 7: 115-125 (1989) |
| DG-75 | Burkitt Lymphom | DSMZ ACC 83 | Ben-Bassat et al., Int J Cancer 19: 27-33 (1977) |
| DAUDI | Burkitt Lymphom | DSMZ ACC 78 | Klein et al., Cancer Res 28: 1300-1310 (1968) |
| T2 | B-LCL | DSMZ ACC 598 | Salter et al., Immunogenetics 21: 235-246 (1985) |

2.5 Antikörper

2.5.1 Monoklonale Primärantikörper

Tabelle 2.5: Monoklonale Primärantikörper

| Antikörper | Klon | Hersteller |
|---|-----------|--|
| Maus-anti-human-MLH1 | G168-15 | BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland) |
| Maus-anti-human-MSH2 | G219-1129 | BD Biosciences |
| Maus-anti-human-HLA-A0201 | BB7.2 | BD Biosciences |
| Maus-anti-human-MHC I | W6/32 | BD Biosciences |
| Kaninchen-anti-human-IFN- γ (biotinyliert) | 7-B6-1 | Mabtech |

2.5.2 Sekundärantikörper

Tabelle 2.6: Sekundärantikörper

| Antikörper | Hersteller |
|--------------------------|--------------------------------|
| Ziege-anti-Maus-IgG-FITC | Dianova (Hamburg, Deutschland) |

2.6 Synthetische Peptide

2.6.1 Synthetische Frameshift-Neopeptide

Tabelle 2.7: Synthetische Frameshift-Neopeptide

| Name | Sequenz | Acc. no. | Protein | Referenz |
|-------|---------------------------|----------|----------------------|--------------------------|
| FSP02 | ¹³¹ -RLSSCVPVA | AAA61164 | TGF β -RII(-1) | Linnebacher et al., 2001 |
| FSP06 | ²⁸ -SLYKSPFPL | U77413 | OGT(-1) | Ripberger et al., 2003 |
| FSP11 | ⁵⁸ -TLSPGWSAV | U79260 | FTO(-1) | Linnebacher et al., 2010 |
| FSP26 | ⁶⁷ -FLIIWQNTM | U28015 | Caspase-5(-1) | Schwitalle et al., 2004 |
| FSP31 | ⁴⁰² -LIVSRTLLV | J04810 | MSH3(-1) | Garbe et al., 2011 |

2.6.2 Primer

Eine Übersicht über die für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) benutzten Primer gibt Tabelle 2.8 auf der nächsten Seite.

2.7 Zellkultur von Leukämie- und Lymphomzelllinien

2.7.1 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Die in einem Kryoröhrchen bei -80 °C bzw. -130 °C gelagerten Zellen wurden im Wasserbad bei 37 °C zügig aufgetaut, in 7,5 ml vorgewärmtem Medium aufgenommen und in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend wurden die Zellen für 10 min bei 1200 rpm

Tabelle 2.8: PCR-Primer

| Gene | Alt. Name | Acc.-no. | Repeat | Position | Sense | Antisense |
|----------|-----------|-----------------|--------|----------|------------------------------|--------------------------|
| CASP5 | | U28015 | A10 | 179 | CAGAgTTATgTCTTAaggTgAAgg | ACCATgAAgAACATCTTTgCCCg |
| MSH3 | | J04810 | A8 | 1202 | AgATgTgAATCCCCTAATCAAgC | ACTCCACAATgCCAATAAAAAAT |
| TGFBR2 | | M85079 | A10 | 709 | gCTgCTTCTCCAAAgTgCAT | CAGATCTCaggTCCCACACC |
| KIAA1052 | | AB028975 | A11 | 689 | gTCAACTTCTggggCCATTA | ACTCACCAgCgAACTTTTgg |
| KIAA1268 | PARP14 | AB033094 | A10 | 1985 | TCCTCTgTTTTgCaggAgTg | TgggATTTAgCCTTgACAgC |
| DKFZp762 | RCC2 | AB040903 | A10 | 64 | TgTATCTggTgAgTgggCTg | ggAgTgATgAgAAACCggAg |
| KIAA1503 | DNAH2 | ENSG00000183914 | T10 | 7587322 | TgCAgCTCTCCCAAgaAATTT | gAggTggggAgAgACAAAAA |
| KIAA1655 | | AB051442 | T12 | 2647 | gCAGCCTCTCACTCCACTTT | ggAgAATgCTTgAACCCAg |
| UST3 | SLC22A9 | AB062418 | A11 | 1096 | gCgCCTACAgTgCCTACTCT | gCATgTggAgCATTTACAC |
| AIM2 | | AF024714 | A10 | 1263 | TTCTCCATCCaggTTATTAaggC | TTAgACCAgTTggCTTgAATg |
| PRKWNK1 | KDP | AJ296290 | A10 | 1739 | AgTTggTACgggAggAgCA | ggAgCTgCTTgATTCCTgTC |
| MYO50 | KIF5A | AF063608 | T10 | 387 | TCAAgtTggAgCCTgACTTT | TCAAgCCTTAgAgCTTCCCA |
| MBD4 | MED1 | AF072250 | A10 | 1106 | TgACCAgTgAAgAAAACAgCC | gTTTATgATgCCAgAAgTTTTTTg |
| SEC63 | | AF100141 | A10 | 1596 | AgTAAAggACCCAAgAAAACtgc | TgCTTTTgTTTCTgTTgCTTTg |
| PRO0529 | | AF111848 | T10 | 1973 | gCTgACAgTgggAATgTgAC | CACAAggCTgTgCTCTCTCA |
| TMBIM4 | loc51643 | AF113127 | T10 | 554 | TgTAgCAGTAAATCATTAaggAAgTAAg | CggCTAAgACCAACTCCATT |
| ASTE1 | HT001 | AF113539 | A11 | 1048 | ATATgCCCCgCTgAAATA | TTggTgTgTgCAGTggTTCT |
| MRPL2 | | AF132956 | C12 | 978 | gCTTCTgCCCCAAgCTgATA | AgTCTgTACCATCCCCTCCC |
| RNASET2 | FLJ20378 | AK000385 | T17 | 816 | ggTACATCCCCAAaggTCATT | ggCAACAAGAgCAAAACTCTg |
| ZNF294 | FLJ11053 | AK001915 | A11 | 1695 | AAgCCgAAgAgCTCATgAA | CAGTTgTTAATTCCCAgCCTTC |
| MIS18BP1 | FLJ11186 | AK002048 | A11 | 716 | TggAACCAAgAAAATgTggA | CATCTgACTggAATgATTTgTTg |
| Q96NL9 | NDUFB5 | AK055159 | T14 | 690 | TTTCCTAATTTATggTTgAgCA | AgATCACCTCCAgACTgggT, |
| FLJ25378 | | AK058107 | T12 | 376 | TTggTggAATCTgTggTCAA | gAgATggTggAggTTgCAGT |
| PMS1 | | BC008410 | A11 | 642 | CTCAGAAAACCTTCACATCTTggT | CTTTATCaggACCAAgCCCA |
| GOSR1 | | BC012620 | T13 | 410 | TgCATACATACAgCggCAT | gTgCACATATCCAATgCagg |
| ZNF99 | C19orf9 | BC021822 | T16 | 494 | CAAATgTgAAgAATgTggCAA | ggAggTTgAggCCAgAgAAT |
| MARCKS | KCS | D10522 | A11 | 823 | gACTTCTTgCCCAAaggC | gCCgCTCAGCTTgAAAAG |
| TAF1B | TFSL1C | L39061 | A11 | 289 | ACCCAAATAAAAAGCCCTCAAC | CTACTTAAAATTCATTCATgTCC |
| ARHGAP1 | | U62794 | A11 | 54 | gCTgAgATCACACTCCAgCC | ATgACAACCTCaggAgCagg |
| OGT | HRNT1 | U77413 | T10 | 339 | TCACTTTTggCTgTgTCAGAg | gggAgggAAAaggAggTAAAg |
| FTO | U79260 | U79260 | T15 | 755 | TTTgTTATATCCCATTAaggTgCC | AgCCTggTgACAgAgTgAgAC |
| FBXO46 | HPDMPK | Y10936 | T14 | 710 | gCTTgATCCTgTTgATTTTCTACTC | CTgAATggAgAAgAAAATgAgATg |

abzentrifugiert, nach Absaugen des Überstands in 10 ml frischem Medium resuspendiert und in eine kleine Zellkulturflasche überführt. Zum Einfrieren wurden ca. 5×10^6 Zellen in 1,3 ml Einfriermedium aufgenommen, in ein Kryoröhrchen überführt und in einer Isopropanolbox über 8–12 h bei -80°C langsam abgekühlt. Die Langzeitlagerung erfolgte in einem Flüssigstickstofftank.

2.7.2 Kultivierung

Die verwendeten Leukämie- und Lymphom (L/L)-Zelllinien wurden in Zellkulturflaschen entweder in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) oder in Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI) 1640 mit 10 % fötalem Kälberserum und 2 mM L-Glutamin bei 37°C in mit Wasserdampf abgesättigter Atmosphäre mit 5 % v / v CO_2 kultiviert.

2.7.3 Bestimmung von Zellzahl und Vitalitätsrate

Zur Zellzahlbestimmung wurden 50 μl der Zellsuspension im Verhältnis 1:2 mit Trypanblau-Lösung gemischt und in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Nach Auszählen von 2 x 16 diagonal gegenüberliegenden Feldern ergibt die Multiplikation der gezählten Zellen mit 100 die Zellzahl pro Milliliter. Die Vitalitätsrate der Zellkultur ergibt sich aus der Formel: % lebende Zellen = $(\text{ungefärbte Zellen} / \text{gefärbte} + \text{ungefärbte Zellen}) \times 100$.

2.7.4 Zellpassage

Abhängig von der Proliferationsrate wurden die in Suspension wachsenden Leukämie- und Lymphomzellen ein- bis zweimal pro Woche passagiert. Nach Berechnung der Zellzahl wurde eine definierte Menge zellhaltigen Mediums abgenommen und verworfen und das verbliebene Volumen im Verhältnis von 1:3 bis 1:15 mit frischem, vorgewärmten Medium aufgefüllt.

2.8 System zur Zellkultur von CD40-Ligand-aktivierten menschlichen B-Zellen

Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) wurden mit stabil CD154 exprimierenden NIH / 3T3-Zellen (t-CD154) stimuliert. Mit einer

lethalen Strahlendosis (60 Gy) bestrahlte t-CD154 wurden über Nacht auf 6-well-Platten mit $0,4 \times 10^5$ Zellen / well kultiviert. Nach Waschen mit PBS wurden anschließend PBMC in einer Konzentration von 2×10^6 Zellen / ml in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) unter Zugabe von 2 ng / ml IL-4, $5,5 \times 10^{-7}$ M Cyclosporin A, 10 % humanem Antikörperserum, 5 mg / ml Insulin, 50 mg / ml Transferrin und 15 mg / ml Gentamicin hinzugefügt. Im Abstand von 3 bis 5 Tagen wurden die Zellen auf neue Platten mit frischen, bestrahlten t-CD154 überführt.

2.9 Induktion von peptidspezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten

CD40 exprimierende B-Zellen eines HLA-A0201-positiven Spenders wurden für 1 h mit 10 mg / ml synthetischem Frameshift-Peptid und 3 mg / ml humanem β 2-Mikroglobulin in serumfreiem IMDM bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zweimaligem Waschen zur Entfernung von überschüssigem Peptid wurden die Zellen mit 30 Gy bestrahlt und im Verhältnis von 4:1 zu CD3-positiven autologen T-Zellen in IMDM mit 10 % humanem AB-Serum, Supplementen (1:100) und humanem IL-7 (10 ng / ml) hinzugefügt. Anschließend wurde die Zellsuspension in einer Dichte von 2×10^6 Zellen / well in 1 ml Medium auf 24-well-Platten ausplattiert. Nach 3 Tagen in Kultur wurde 1 ml Medium hinzugefügt. Zur Restimulierung der T-Zellen wurde dieses Vorgehen wöchentlich wiederholt. IL-2 (10 IU / ml) wurde erstmals an Tag 21 hinzugefügt, an Tag 24 erneut gegeben und ab Tag 27 statt IL-7 eingesetzt.

2.10 Durchflusszytometrie

Die Expression von HLA-A2 und MHC-I auf den untersuchten Leukämie- und Lymphomzelllinien wurde durch extrazelluläre Färbung mit den primären monoklonalen Antikörpern BB7.2 und W6/32 (beide aus Hybridomüberstand), gefolgt von FITC-konjugiertem Anti-Maus-IgG und anschließender Durchflusszytometrie (FACS) gemessen. Als Negativkontrolle dienten Zellen ohne Erstantikörper bzw. isotyp-identische monoklonale Antikörper.

2.11 MMR-Genexpressionsanalyse mittels Western Blot

Für das Immunoblotting wurden Leukämie- und Lymphomzellen in SDS-Probenpuffer (0,25 M Tris-HCl pH 6,8, 20 % Glycerin, 4 % SDS und 10 % β -Mercaptoethanol) lysiert. Gleiche Mengen jedes Zelllysates wurden auf einem 10 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mittels Elektroblothing auf Nitrozellulose transferiert. Die Blots wurden anschließend mit den in Blockpuffer (Tris-Puffer, 0,1 % Tween-20, 5 % fettarme Trockenmilch) gelösten monoklonalen Antikörpern anti-hMLH1 und anti-hMSH2 inkubiert. Zur verbesserung der Chemolumineszenz wurde nach dem Waschen als Sekundärantikörper ein mit Meerrettichperoxidase konjugierter Kaninchen-anti-Maus-IgG-Antikörper eingesetzt.

2.12 DNA-Fragmentlängenanalyse

2.12.1 gDNA-Isolation

Die Gewinnung von gDNA aus den untersuchten Zelllinien erfolgte unter Einsatz eines entsprechenden Kits (DNeasy Blood & Tissue Kit). Circa 3×10^6 Zellen wurden zunächst für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert und das entstandene Zellpellet in PBS-Puffer auf ein Zielvolumen von 200 μ l resuspendiert. Nach Hinzufügen von 20 μ l Proteinase K und 200 μ l Puffer A2 wurden die Proben 10 min lang bei 70 °C im Thermomixer geschüttelt, anschließend 200 μ l 100 %-iges Ethanol hinzugefügt und erneut geschüttelt. Die entstandene Mischung wurde dann in die im Kit enthaltenen Zentrifugenröhrchen pipettiert und diese auf 2-ml-Sammelröhrchen aufgesteckt. Nach 1 min Zentrifugieren bei 8000 rpm wurden die Sammelröhrchen verworfen und durch neue ersetzt. Nach Hinzufügen von 500 μ l des mitgelieferten Puffers AW1 wurde erneut für 1 min bei 8000 rpm zentrifugiert, das Sammelröhrchen verworfen und nach Hinzufügen von 500 μ l Puffer AW2 mit einem neuen Sammelröhrchen für 3 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Die Zentrifugenröhrchen wurden auf 2-ml-Eppendorfröhrchen platziert, 200 μ l Puffer AE direkt in die Säulenmembran pipettiert und nach 1 min Inkubationszeit das Eluat bei 8000 rpm auszentrifugiert.

2.12.2 DNA-Konzentrationsbestimmung und Verdünnung

DNA-Konzentrationen wurden durch Verdünnung im Verhältnis 1:50 mit H₂O und anschließende Absorptionsmessung bei 260 nm Wellenlänge im Spektrophotometer bestimmt. Eine

Absorption von 1 entsprach hierbei einer ungefähren Konzentration von 50 $\mu\text{g} / \text{ml}$ DNA, die Konzentrationsbestimmung erfolgte anhand der Algorithmen des Photometers.

2.12.3 Herstellung einer DNA-Masterplatte

Zur Herstellung einer DNA-Masterplatte im 96-well-Format wurden die präparierte gDNA auf eine einheitliche Konzentration von 50 $\mu\text{g} / \text{ml}$ verdünnt und anschließend mit je 60 $\mu\text{l} / \text{well}$ auf eine PCR-Reaktionsplatte aufgetragen. Die Platte wurde mit einem Folienschweißgerät versiegelt und diente im Folgenden der Herstellung von Arbeitskopien.

2.12.4 Polymerase-Kettenreaktion

Zur PCR-Amplifikation der gDNA wurden 2 μl der DNA-Matrize (10 ng gDNA) aus dem vorherigen Schritt pro well von der DNA-Masterplatte in 96-well PCR-Platten pipettiert. Die PCR-Reaktion wurde mit einem Gesamtvolumen von 5 $\mu\text{l} / \text{well}$ mit 10 ng gDNA, 0,5 μl 10x Reaktionspuffer, 1,5 mM MgCl_2 , 0,2 mM dNTPs, 0,3 μM jedes Primers sowie 0,02 U Taq-DNA-Polymerase und aqua ad 5 μl unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Denaturierung bei 94 °C für 5 min, 35 Zyklen bei 94 °C für je 52 sek, Annealing bei 60 °C für 79 sek, Verlängerung der Primerstränge bei 72 °C für 42 sek und abschließende Verlängerung bei 72 °C für 7 min.

2.12.5 Fragmentlängenbestimmung mittels Genanalysegerät

Die Fragmentlängenbestimmung der amplifizierten gDNA wurde mittels eines ABI3100-Genanalyseystems durchgeführt. Hierzu wurden 2 μl des entsprechend verdünnten PCR-Produktes mit 0,125 μl eines Längenstandards (Rox500) und 12 μl Formamid eingesetzt.

2.12.6 Auswertung der Fragmentanalyse mittels Genescan Analysis

Software

Zur Analyse der Fragmentlängen wurden die Ergebnisse der Kapillarelektrophorese mittels der GeneScan Analysis Software ausgewertet. Hierbei wurde von einer MSI ausgegangen, wenn in L/L-Zelllinien gegenüber den bekanntermaßen Mikrosatelliten-stabilen Kontrollen

ein neu aufgetretenes Amplimer detektiert wurde oder Amplimere signifikant kleiner oder größer als beim Wildtyp waren. Signifikanz war definiert als: Verhältnis der Peak-Areale von untersuchten Zelllinien und Kontrollen von $\leq 0,5$ oder ≥ 2 .

2.13 Enzyme-linked Immunospot (ELISpot) assay

Zur quantitativen Bestimmung der zellulären Immunantwort spezifischer T-Lymphozyten auf Einzelzellebene wurden enzymgekoppelte Immunospot-Assays in Anlehnung an frühere Veröffentlichungen durchgeführt⁸⁹. 96-well Nitrozelluloseplatten wurden dazu mit 100 μl / well PBS angefeuchtet, mit einer Lösung aus anti-humanem-IFN- γ -Antikörper beschichtet, über Nacht bei 4 °C inkubiert und anschließend mit 200 μl / well serumhaltigem Medium geblockt. Leukämie- und Lymphomzellen wurden als Zielzellen (Targets) mit jeweils 3×10^4 Zellen / well in 100 μl Medium als Triplets ausplattiert und Effektorzellen (CTLs) mit 3×10^3 Zellen / well hinzugefügt. Als Positivkontrolle wurden FSP direkt zu Targets und Effektorzellen hinzugefügt, als Negativkontrolle Effektorzellen ohne Targets auspipettiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 37 °C und 5% CO₂. Nach Waschen mit PBS + 0,05% Tween wurde 4 h mit 100 μl / well mit biotinyliertem Kaninchen-anti-humanem IFN- γ monoklonalem Antikörper inkubiert, erneut gewaschen und mit einem Streptavidin-alkalische-Phosphatase-Konjugat für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS ohne Zusatz von Tween wurden die Platten mit 50 μl / well BCIP/NBT-Substrat-Lösung ca. 1 h bei Raumtemperatur entwickelt und die Reaktion anschließend mit reichlich Wasser abgestoppt. Nach dem Trocknen wurden die Spots mit einem speziellen Auswertungsmikroskop gezählt.

2.14 ⁵¹Chrome-Release-Assay

Zum Nachweis einer Antigen-spezifischen Lyse durch T-Effektorzellen wurden ⁵¹Cr-Release-Assays durchgeführt. Die als immunologische Targets fungierenden Leukämie- und Lymphomzellen wurden für 1 h mit 100 mCi ⁵¹Cr-Natriumchromat bei 37 °C inkubiert und anschließend mit 10^3 Zellen pro well in jeweils 3 wells auf einer 96-well-Platte ausplattiert. Unterschiedliche Mengen von CTL (1:100, 1:30, 1:10, 1:3) wurden bis zu einem Endvolumen von 200 μl hinzugefügt und bei 37 °C für 4 h, in einigen Experimenten für 12 h inkubiert. Um die Spontan- und Maximallyse zu bestimmen, wurden in einigen wells ⁵¹Cr-Natriumchromat-gelabelte Zielzellen ohne Zusatz von Effektorzellen bzw. unter Zusatz von 1

%-igem NP-40-Puffer ausplattiert. Nach Zentrifugieren der Platten wurde zellfreier Überstand (100 µl / well) abgenommen und dessen Radioaktivität im Mehrfachproben-Gammazähler gemessen. Das Ausmaß der Lyse wurde dabei prozentual wie folgt bestimmt:

$100 \% \times (\text{experimentelle Lyse} - \text{Spontanlyse}) / (\text{Maximallyse} - \text{Spontanlyse})$.

3 Ergebnisse

3.1 Expression von hMLH1 und hMSH2 in Leukämie- und Lymphomzelllinien

Mittels Immunoblotting (s. Abschnitt 2.11 auf Seite 23) wurde die Expression der Gene hMLH1 und hMSH2 in L/L-Zelllinien untersucht (s. Abb. 3.1 auf der nächsten Seite). Eine Übersicht über die Ergebnisse bietet Tabelle 3.1 auf der nächsten Seite. Der größte Teil der Zelllinien (CTV-1, CTV-2, DG-75, HSB-2, MOLT-14, MOLT-3 und NALM6) exprimierte nachweisbare hMLH1-Level. Ein Verlust der hMLH1-Expression wurde in den Zelllinien CCRF-CEM und REH beobachtet. Im Gegensatz dazu wurde hMSH2 nur in drei Zelllinien exprimiert (CCRF-CEM, MOLT-3 und REH). T2 wurde nicht als eigenständige Zelllinie gewertet, da es sich um eine Fusion von CCRF-CEM und einer EBV-transformierten B-Zelllinie handelt. B-LCL sind typischerweise nicht MSI-positiv und verfügen über ein funktionierendes MMR-System.

3.2 HLA-A2- und MHC-I-Status von Leukämie- und Lymphomzelllinien

Da die Antigenpräsentation und -erkennung im Kontext der verwendeten Spenderlymphozyten und FSP an die Expression von MHC I und HLA-A2 gebunden ist, wurden die in der Studie zum Einsatz kommenden L/L-Zelllinien auf das Vorhandensein der entsprechenden Genprodukte auf der Zelloberfläche hin untersucht. Hierzu diente die fluoreszenzaktivierte Durchflusszytometrie, welche in der in Abschnitt 2.10 auf Seite 22 geschilderten Weise durchgeführt wurde. Die Ergebnisse für die eingesetzten L/L-Zelllinien sind in Tabelle 3.2 auf Seite 29 dargestellt. Alle untersuchten Zelllinien exprimierten MHC I. CCRF-CEM, MOLT-3 und REH exprimierten kein HLA-A2 und konnten daher im Weiteren als Negativkontrollen

Tabelle 3.1: Expression von hMLH1 und hMSH2 in Leukämie- und Lymphomzelllinien

| Zelllinie | hMLH1 | | hMSH2 | |
|-----------|------------|--------------------|------------|-----------------|
| | Immunoblot | Literatur | Immunoblot | Literatur |
| CCRF-CEM | - | - ^{96,97} | + | + ⁵³ |
| CTV-1 | + | n. a. | - | n. a. |
| CTV-2 | + | n. a. | - | n. a. |
| DG-75 | + | n. a. | - | n. a. |
| HSB-2 | + | n. a. | - | - ⁵³ |
| MOLT-14 | + | n. a. | - | + ⁵³ |
| MOLT-3 | + | n. a. | + | n. a. |
| NALM6 | + | + ^{97,98} | - | + ⁵³ |
| REH | - | - ⁹⁷ | + | + ⁵³ |
| T2 | + | n. a. | + | n. a. |

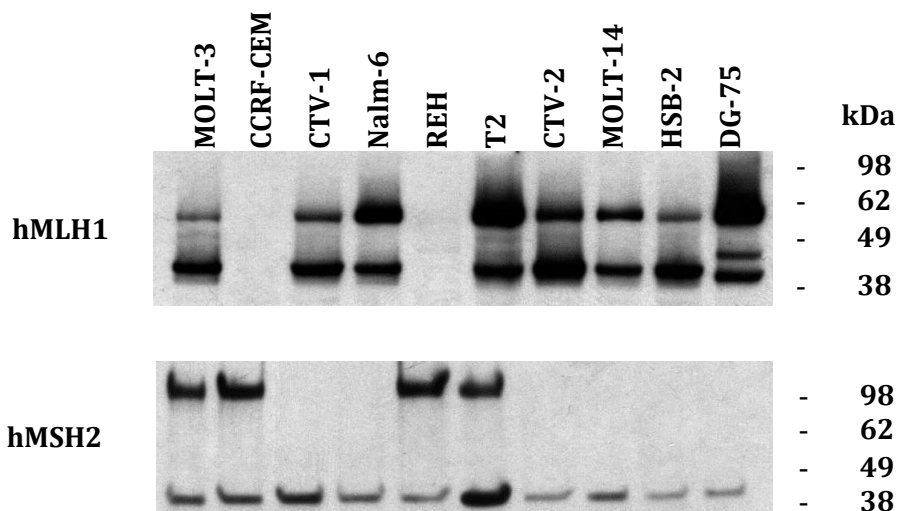
**Abbildung 3.1:** Ermittlung der Expression der Gene hMLH1 und hMSH2 in den untersuchten L/L-Zelllinien durch Immunoblotting

Tabelle 3.2: Expression von MHC I und HLA-A2 in Leukämie- und Lymphomzelllinien

| Zelllinie | MHC I | HLA-A2 |
|-----------|-------|--------|
| CCRF-CEM | + | - |
| CTV-1 | + | + |
| CTV-2 | + | + |
| HSB-2 | + | + |
| MOLT-14 | + | + |
| MOLT-3 | + | - |
| NALM6 | + | + |
| REH | + | - |
| DG-75 | + | + |
| T2 | + | + |

für die HLA-A2-Restriktion der FSP-Antigenpräsentation fungieren. Alle übrigen Zelllinien exprimierten HLA-A2 und standen daher für weitere Experimente zur Verfügung.

3.3 Mutationsprofil kodierender Mikrosatelliten in L/L-Zelllinien

Zum Nachweis von Frameshift-Mutationen wurden 33 cMS in MSI-positiven Zelllinien mittels DNA-Fragmentlängenanalyse (s. Abschnitt 2.12 auf Seite 23) untersucht. Eine beispielhafte Ausgabe der verwendeten Genescan Analysis Software zeigt Abb. 3.2 auf der nächsten Seite.

Zur Bestätigung der Mikrosatelliten-Instabilität der Untersuchten L/L-Zelllinien dienten neben den bekannten und auch für das Bethesda-Panel (s. Abschnitt 1.1.3 auf Seite 3) verwendeten Markern BAT25 und BAT26 der Marker CAT25. Dieses T₂₅-Mononucleotidrepeat aus dem CASP2-Gen ist hochspezifisch für das Vorliegen einer MSI und kann daher in Verbindung mit den eben genannten zwei Markern dazu dienen, mit gegenüber dem vollständigen Bethesda-Panel deutlich reduziertem Aufwand zuverlässig eine MSI zu diagnostizieren⁹⁹. Alle ausgewählten Zelllinien wiesen eine hochgradige MSI auf (s. Tabelle 3.3 auf Seite 31).

30 der 33 untersuchten Genloci zeigten eine Instabilität in mindestens einer L/L-Zelllinie (Tabelle 3.4 auf Seite 32). Durch Baseninsertionen verlängerte Allele wurden je nach Anzahl der überzähligen Basen mit +1, +2 und so weiter gekennzeichnet, Basendeletionen mit -1, -2 usw. Unveränderte Fragmentlängen entsprachen dem Wildtyp (wt). CTV-2 und

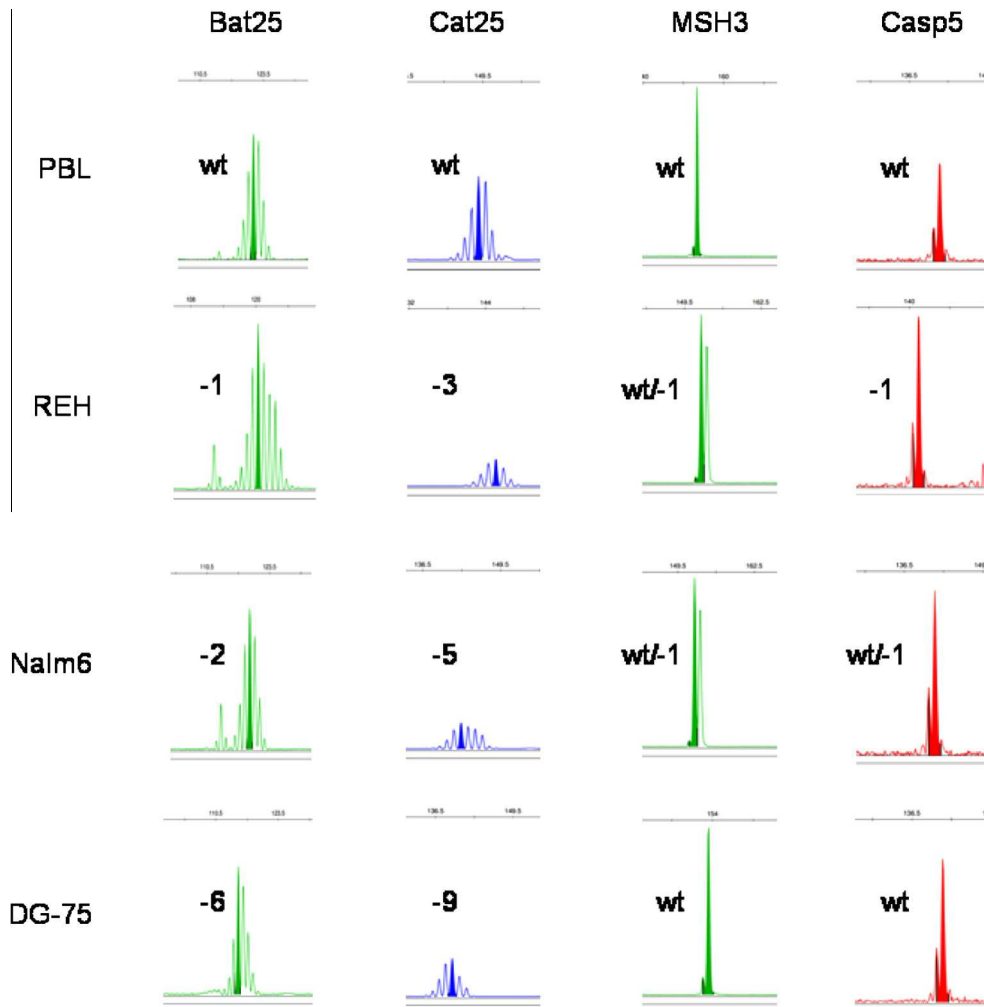


Abbildung 3.2: Beispielhafte Auswertung einer DNA-Fragmentlängenanalyse zur Ermittlung von MSI in L/L-Zelllinien. Die Marker BAT25 und Cat25 dienen der Diagnose von MSI, MSH3 und Casp5 tragen kodierende Mikrosatelliten. Die Zahl der hinzugekommenen oder fehlenden Basen ist gekennzeichnet. wt = Wildtyp.

Tabelle 3.3: Expression von MSI-Markern in ausgewählten Zelllinien

| Zelllinie | BAT25 | BAT26 | CAT25 |
|-----------|-------|-------|--------|
| CCRF-CEM | -2 | del | -6 |
| CTV-1 | -2 | del | -3 |
| CTV-2 | -1 | del | -3/-10 |
| HSB-2 | -2 | del | -2 |
| MOLT-14 | wt | -2 | -4 |
| MOLT-3 | -1 | -3 | -3 |
| NALM6 | -2 | -5 | -5 |
| REH | -1 | del | -3 |
| DG-75 | -6 | del | -9 |
| T2 | -1 | -4 | wt/-4 |

NALM6 schienen mit je 24 / 33 veränderten Loci die mikrosatelliten-instabilsten Zelllinien zu sein, während MOLT-14 die geringste Mutationsrate (9 / 33) aufwies. Insgesamt war eine MSI sehr häufig in den untersuchten Leukämie- und Lymphomzelllinien festzustellen. Deletionen kamen häufiger vor als Insertionen. Für jede der untersuchten Zelllinien konnte ein individuelles Muster der cMS-Instabilität dargestellt werden.

Unter den fünf Kandidaten, die für die folgenden immunologischen Untersuchungen verwendet wurden (s. Tabelle 3.5 auf Seite 33), war das am häufigsten mutierte Gen FTO (fat mass and obesity-associated gene), welches auf Chromosom 16q12.2 liegt. Mindestens ein Allel war in allen untersuchten Zelllinien instabil (9 / 9). Das entzündungsassoziierte Gen Casp5 war in 7 von 9 Zelllinien instabil. Etwa die Hälfte der untersuchten Zelllinien zeigte eine Instabilität von cMS der MMR-Gene MSH3 und TGF β RII. Im Gegensatz hierzu war OGT nur in REH verändert.

3.4 Erkennung von cMS-instabilen Zelllinien durch FSP-spezifische T-Zellen

Mittels eines enzymgekoppelten Immunoassays (s. Abschnitt 2.13 auf Seite 25) wurde die IFN- γ -Sekretion FSP-spezifischer T-Zellen (s. Abschnitt 2.9 auf Seite 22) in Gegenwart von MSI-positiven L/L-Zellen, welche die korrespondierende Frameshift-Mutation tragen und somit potentiell das entsprechende FSP exprimieren, untersucht. Hierzu dienten FSP-spezifische T-Zellen eines HLA-A0201-positiven Spenders, welche in der Literatur ausführlich

Tabelle 3.4: Mutationsstatus mikrosatelliten-instabiler Genloci in Leukämie- und Lymphomzelllinien

| Zelllinie | Locus | | | | | | | | | | | | | |
|--------------|----------|----------|----------|----------|----------|---------|-------|---------|-------|-------|-------|---------|----------|-------|
| | KIAA1052 | KIAA1268 | DKFZp762 | KIAA1503 | KIAA1655 | SLC22A9 | AIM2 | PRKWNK1 | MY050 | MBD4 | SEC63 | PRO0529 | loc51643 | HT001 |
| CCRF-CEM | wt | wt | -1 | wt | wt | -1 | wt/-1 | wt | wt | wt/-1 | wt | wt | wt/-1 | wt |
| CTV-1 | wt/-2 | wt | wt | wt | -2 | wt/-1 | wt/-1 | wt | wt | wt/-1 | wt | wt/-1 | -2/-1/wt | wt/-2 |
| CTV-2 | wt/-2 | wt | wt | wt | -2 | wt/-1 | -1 | wt | wt/-1 | -1/+1 | wt/-1 | wt/-1 | wt/-1 | wt/-2 |
| DG-75 | wt/-1 | wt | wt | wt | -1 | wt/-1 | wt/-1 | wt | wt | wt | wt/-1 | wt | wt | wt/-1 |
| HSB-2 | wt/-1 | wt | wt | wt | wt | wt/-1 | wt | wt | wt | wt/-1 | wt | wt | wt | -1 |
| MOLT-14 | wt | wt | wt | wt | -1/wt | wt | wt | wt | wt | wt | wt | wt | wt/+1 | wt |
| MOLT-3 | wt | wt | wt | wt | -1/wt | wt/-1 | +2 | wt | wt/-1 | wt | wt | wt/-1 | wt | wt/-1 |
| NALM-6 | wt/-1 | wt | wt/-1 | wt | -1 | -1 | -1/wt | wt | wt/-1 | wt | wt/-1 | wt/-1 | wt/-1 | -1 |
| REH | wt | wt | wt | wt | -1/wt/+1 | -1 | wt | wt | wt/-1 | wt | wt | wt/-1 | wt | del |
| T2 | wt | wt | wt | wt | wt | wt/-1 | wt | wt | wt | wt | wt | wt | wt/-1 | wt/-1 |
| Frequenz (n) | 5/9 | 0/9 | 2/9 | 0/9 | 7/9 | 8/9 | 6/9 | 0/9 | 4/9 | 4/9 | 3/9 | 5/9 | 5/9 | 7/9 |
| Frequenz (%) | 55,6 | 0,0 | 22,2 | 0,0 | 77,8 | 88,9 | 66,7 | 0,0 | 44,4 | 44,4 | 33,3 | 55,6 | 55,6 | 77,8 |

| Zelllinie | Locus | | | | | | | | | | | | | |
|--------------|----------|--------|----------|----------|-------|---------|-------|--------|---------|----------|---------|-------|----------|----------|
| | FLJ11186 | Q96NL9 | FLJ25378 | PMS1 | GOSR1 | C19ORF9 | KCS | TFSL1C | ARHGAP1 | HPDMPK | loc5129 | MRPL2 | FLJ20378 | FLJ11053 |
| CCRF-CEM | wt | wt/-1 | -2 | wt/-1 | -3 | -1/-2 | -1 | -1 | -2 | -3 | wt/-1 | -2/-3 | -1 | -1 |
| CTV-1 | wt | wt | -2 | wt/-1 | -1 | wt/-1 | -1 | wt | wt/-1 | -2 | wt/-2 | -2 | del | wt |
| CTV-2 | wt/-1 | wt/-1 | -2 | wt | wt/-2 | wt/-2 | -1 | wt | wt | -2 | wt/-1 | wt/-2 | -1 | wt/-1 |
| DG-75 | wt/-1 | wt/-1 | wt/-2 | wt/-1 | wt/-2 | wt/-1 | wt | wt/-1 | wt/-2 | wt/-1 | wt | -1 | -1 | wt/-1 |
| HSB-2 | wt/+1 | wt/-1 | wt/-2 | wt | wt/-1 | wt | -1 | -1 | wt/-1 | wt | wt | -2 | del | wt |
| MOLT-14 | wt | wt/+1 | wt | wt | wt | -1 | wt | wt | wt | wt | wt | wt/-2 | -1 | -1 |
| MOLT-3 | wt | wt/-1 | wt | wt | del | wt/-1 | del | wt/-1 | wt | -1 | wt | -2 | wt/-1 | wt/-1 |
| NALM6 | wt/-1 | wt/-1 | -1 | wt | -1/-3 | wt | wt/-1 | wt/-2 | wt | -5 | wt/-1 | -2 | -2 | wt |
| REH | wt | wt/-1 | wt | wt | wt | wt/-1 | wt | wt | wt | wt | wt | del | wt/-1 | wt |
| T2 | wt | wt | wt/-1 | wt/-1/+1 | wt | wt/-2 | wt | wt/-1 | wt | wt/-1/-3 | wt/-1 | wt/+1 | del | wt |
| Frequenz (n) | 4/9 | 8/9 | 6/9 | 3/9 | 7/9 | 7/9 | 6/9 | 5/9 | 4/9 | 6/9 | 4/9 | 9/9 | 9/9 | 5/9 |
| Frequenz (%) | 44,4 | 88,9 | 66,7 | 33,3 | 77,8 | 77,8 | 66,7 | 55,6 | 44,4 | 66,7 | 44,4 | 100 | 100 | 55,6 |

Tabelle 3.5: Mutationsstatus bekannter FSP-Ursprungsgene in untersuchten Zelllinien

| Zelllinie | TGF β RII | OGT | FTO | CASP5 | MSH3 | veränd. Loci |
|--------------|-----------------|-------|--------|--------|-------|--------------|
| CCRF-CEM | wt/-1 | wt | wt/-1 | wt/-1 | wt | 21/33 |
| CTV-1 | wt | wt | -2/-5 | wt/-1 | wt/-1 | 21/33 |
| CTV-2 | wt | wt | wt/-3 | wt/-1 | wt/-1 | 24/33 |
| HSB-2 | wt | wt | -1 | -1 | wt/-1 | 20/33 |
| MOLT-14 | wt/-1 | wt | wt/-1 | wt | wt | 9/33 |
| MOLT-3 | wt | wt | -1 | -1 | wt/-1 | 18/33 |
| NALM6 | wt/-1 | wt | -1 | wt /-1 | wt/-1 | 24/33 |
| REH | wt/+1 | wt/-1 | -1 | wt/-1 | wt/-1 | 13/33 |
| DG-75 | wt/-1 | wt | wt/-3 | wt | wt | 20/33 |
| T2 | wt | wt | wt /-1 | wt | wt | 12/33 |
| Frequenz (n) | 5/9 | 1/9 | 9/9 | 7/9 | 6/9 | |
| Frequenz (%) | 55,6 | 11,1 | 100 | 77,8 | 66,7 | |

charakterisiert wurden^{84,87,89,100}. Ihre FSP-spezifität wurde während der Zellpassagierung regelmäßig mittels IFN- γ -ELISpot unter Verwendung von exogen peptidbeladenen T2-Zielzellen sichergestellt. Unbeladene und mit irrelevantem Peptid beladene T2-Zellen dienten in den Experimenten als Negativkontrollen. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.3 auf Seite 35 zusammengestellt.

T-Zellen, welche gegen FSP02, ein Neopeptid aus TGF β RII(-1) gerichtet sind, zeigten sich hochreaktiv gegen die Zelllinien DG-75, NALM6 und MOLT-14. Diese Zellen sind sämtlich HLA-A2-positiv und exprimieren TGF β RII(-1). Die eingesetzten T-Zellen waren außerdem hoch reaktiv gegen exogen FSP-beladene T2-Zellen. Eine Reaktion gegen die TGF β RII(-1)-positive, jedoch HLA-A2-negative Zelllinie CCRF-CEM war nicht nachzuweisen. Dies demonstriert die HLA-A2-Restriktion der FSP02-spezifischen T-Zellen und bestätigt vorangegangene Ergebnisse mit dieser Zelllinie⁸⁴. Die HLA-A2-positiven, aber TGF β RII(wt) CTV-1-Zellen riefen keine Reaktion durch spezifische T-Zellen hervor (Schaubild A in Abb. 3.3 auf Seite 35).

Als nächstes wurde die Erkennung von FTO(-1) durch spezifische T-Zellen untersucht (Abbildung 3.3 B). Hier konnte zwar eine Reaktivität FSP11-spezifischer T-Zellen gegen peptidbeladene T2-Zellen nachgewiesen werden; eine messbare Reaktivität gegen HLA-A2-positive und FTO(-1) exprimierende Zellen bestand jedoch nicht.

Die HLA-A2-positiven, Casp5(-1) exprimierenden Zelllinien HSB-2, CTV-1 und NALM6 wurden von FSP26-spezifischen T-Zellen erkannt (Abbildung 3.3 C). Die Reaktivität war

spezifisch, da weder MOLT-3 noch CCRF-CEM erkannt wurden, welche zwar die (-1)-Variante von Casp5, nicht jedoch HLA-A2-exprimieren. CTV-2, eine HLA-A2-positive und Casp5(-1)-exprimierende Zelllinie, wurde wider Erwarten nicht erkannt.

Ein ähnliches Muster zeigte sich beim Einsatz FSP31-spezifischer T-Zellen (Abbildung 3.3 D). Dieses Frameshift-Neopeptid ist abgeleitet von der mutierten Form des MMR-Proteins MSH3. Die stärkste IFN- γ -Sekretion wurde erneut gegen exogen peptidbeladene, HLA-A2-positive T2-Zellen beobachtet. Eine spezifische Erkennung wurde jedoch auch gegen die MSH3(-1)-exprimierenden Zelllinien CTV-2, NALM6 und CTV-1 beobachtet. Eine Reaktivität gegen die MSH3(-1)-tragenden, aber HLA-A2-negativen MOLT-3 Zellen oder die HLA-A2-positiven, jedoch MSH3(wt) Zelllinie DG-75 bestand nicht, was als weiteres Indiz für die Spezifität der Reaktion gewertet werden konnte.

3.5 Lyse cMS-instabiler L/L-Zelllinien durch FSP-spezifische T-Zellen

Das zytotoxische Potential FSP-spezifischer T-Zellen wurde durch ^{51}Cr -Release-Assays bestimmt, welche in der in Abschnitt 2.14 auf Seite 25 geschilderten Weise durchgeführt wurden. Die Experimente wurden mit Casp5(-1)- und MSH3(-1)-spezifischen T-Zellen durchgeführt, da diese zuvor die stärkste Reaktivität gegen Zielzellen gezeigt hatten. Einen Überblick über die Ergebnisse gibt Abb. 3.4 bis 3.5 auf den Seiten 37–38.

Die stärkste Lyse durch FSP26-spezifische T-Zellen wurde bei der Zelllinie HSB-2 beobachtet (Abb 3.4 D). Gleichmaßen führte die Inkubation dieser T-Zellen mit radioaktiv markierten CTV-1- und NALM6-Zellen zu einer effektiven Zelltötung mit bis zu 35% Effektivität (E:T Verhältnis 100:1, Abb 3.4 A + C). Wie aufgrund der geringen IFN- γ -Sekretion in den vorangegangenen Experimenten zu vermuten war, lysierten FSP26-spezifische T-Zellen CTV-2 nur marginal (Abb. 3.4 B). Die Reaktion war jedoch hochspezifisch, da keine Aktivität gegen Raji (HLA-A2-negativ, Casp5(-1), Abb 3.4 E) und die CRC-Zelllinie SW480 (HLA-A2-positiv, Casp5(wt), Abb 3.4 F) zu beobachten war.

In einem weiteren Assay wurde die Funktion FSP31-spezifischer T-Zellen untersucht (Abb. 3.5 auf Seite 38). Substanzielle lytische Aktivität war gegen CTV-1 und NALM6 (jeweils 45% maximale Lyse, Abb. 3.5 A + C) zu beobachten. Interessanterweise wurden die zuvor durch FSP26-spezifische T-Zellen nur wenig lysierten CTV-2-Zellen in diesem Falle hocheffektiv zerstört (Abb. 3.5 B). HSB-2-Zellen mit MSH3(-1 / wt) wurden ebenfalls lysiert (Abb 3.5

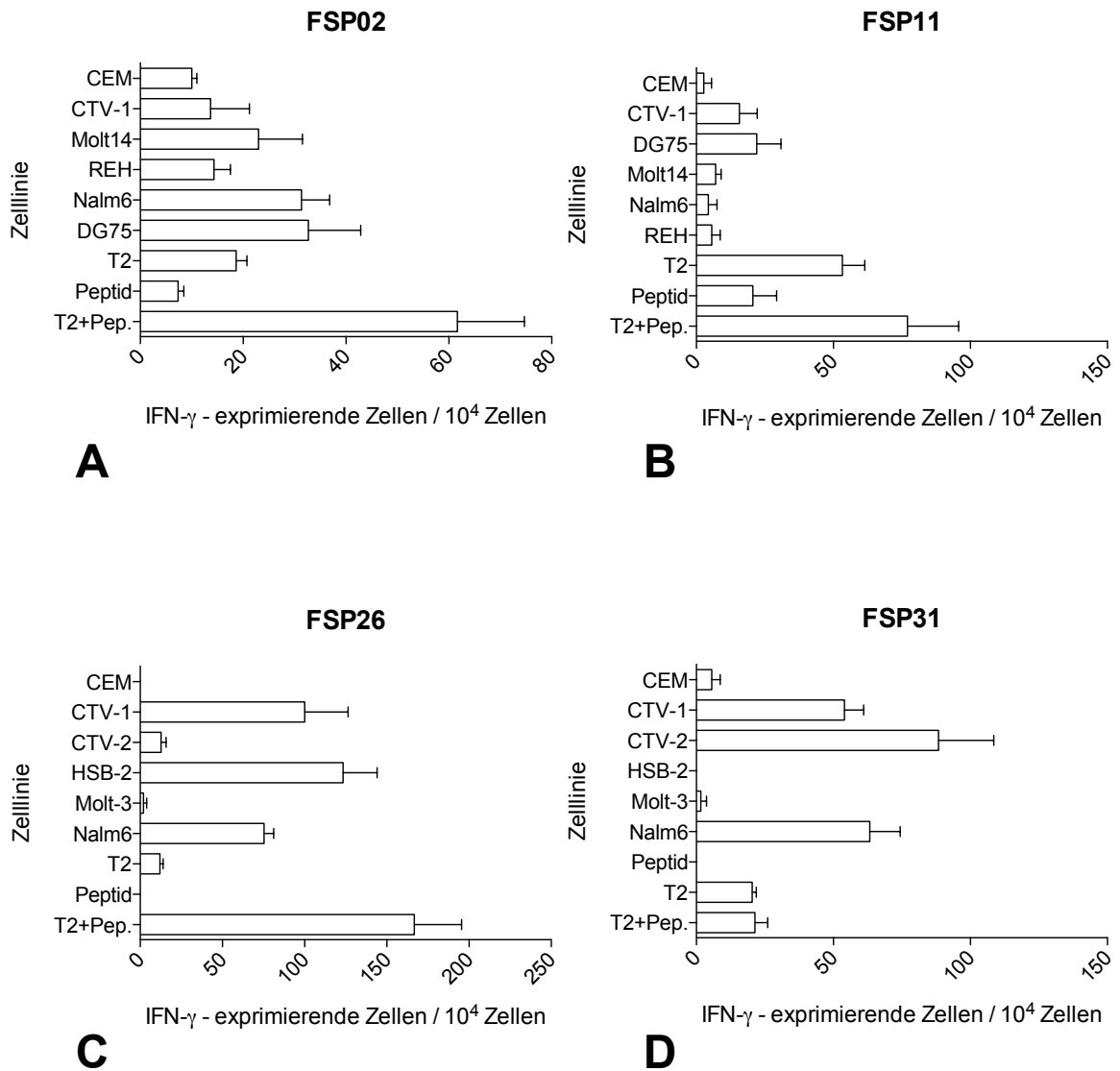


Abbildung 3.3: Interferon (IFN)- γ -enzymgekoppelter Immunospot Assay (ELISpot). Die Abbildung zeigt die Zahl der IFN- γ -sezernierenden T-Zellen gegen **A** FSP02 aus TGF β RII(-1), **B** FSP11 aus FTO(-1), **C** FSP26 aus Casp5(-1) und **D** FSP31 aus MSH3(-1). Gezeigt werden Mittelwert und Standardabweichung aus jeweils drei wells.

D), so dass MSH3(-1) als weiteres immunologisches Target für spezifische zytotoxische T-Lymphozyten angesehen werden muss. Eine unspezifische lytische Aktivität konnte ausgeschlossen werden, während die HLA-A2-Restriktion FSP31-spezifischer T-Zellen durch die fehlende Reaktivität gegen die CRC-Zelllinien SW480 (HLA-A2-positiv, MSH3(wt), Abb. 3.5 E) und RKO (HLA-A2-negativ, MSH3(-1), Abb. 3.5 F) bestätigt wurde.

FSP26 / Casp5(-1)

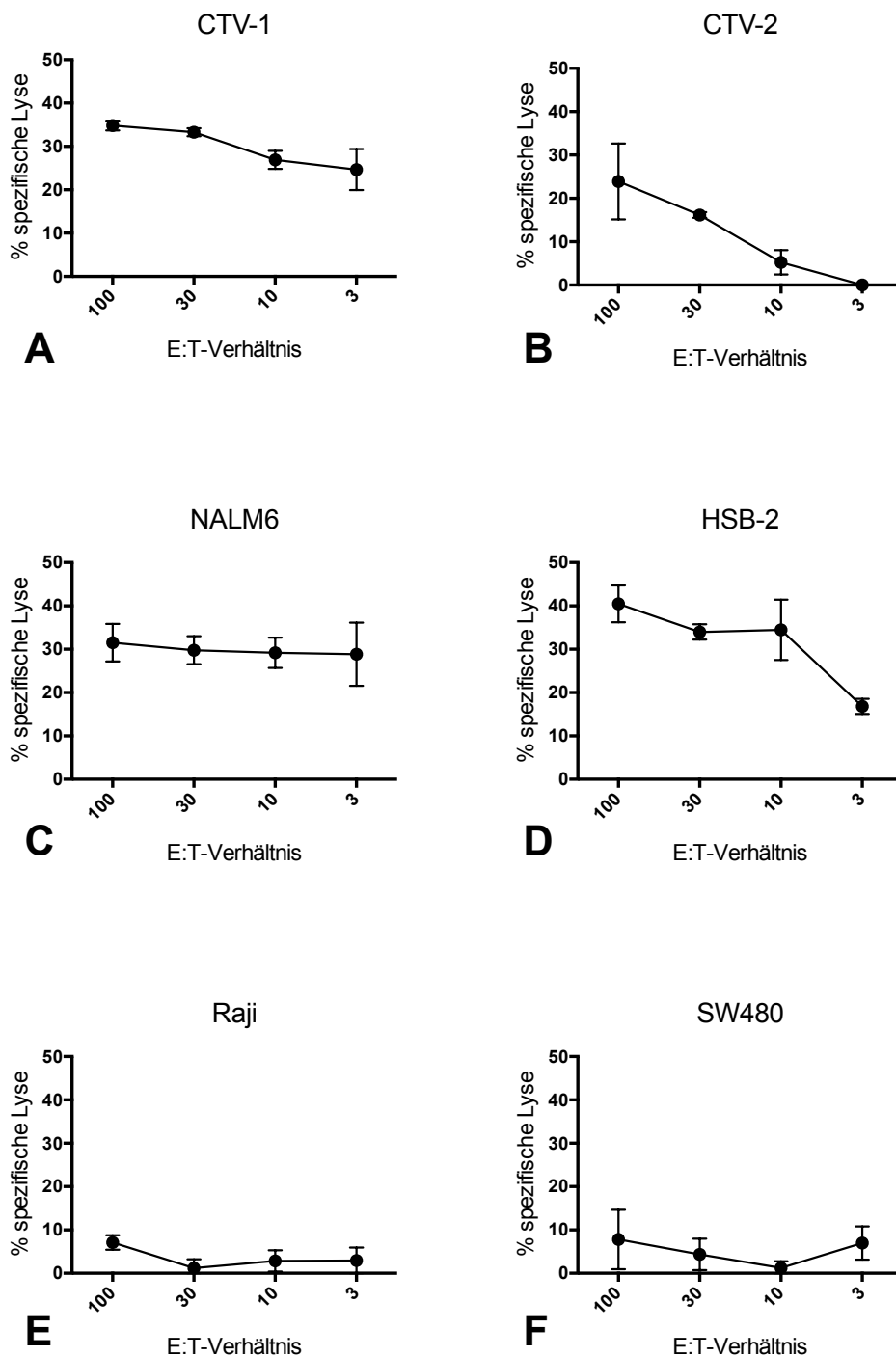


Abbildung 3.4: Spezifische Lyse untersuchter MSI-positiver Zielzellen durch FSP26-spezifische T-Zellen im ^{51}Cr -Release Assay. Gezeigt wird die Lyse der Zielzellen bei unterschiedlichen Effektor-Zielzellenverhältnissen (effektor:target ratio, E:T) als Mittelwert mit Standardabweichungen aus jeweils drei simultanen Messungen. **A–D** Spezifische Lyse von HLA-A2-positiven, Casp5(-1)-Zelllinien. Die HLA- und MSH3-Spezifität wird durch die fehlende Reaktion gegen die kolorektalen Karzinomzelllinien SW480 (HLA-A2 pos., MSH3(wt)) und Raji (HLA-A2 neg., Casp5(-1)) bestätigt (**E + F**).

FSP31 / MSH(-1)

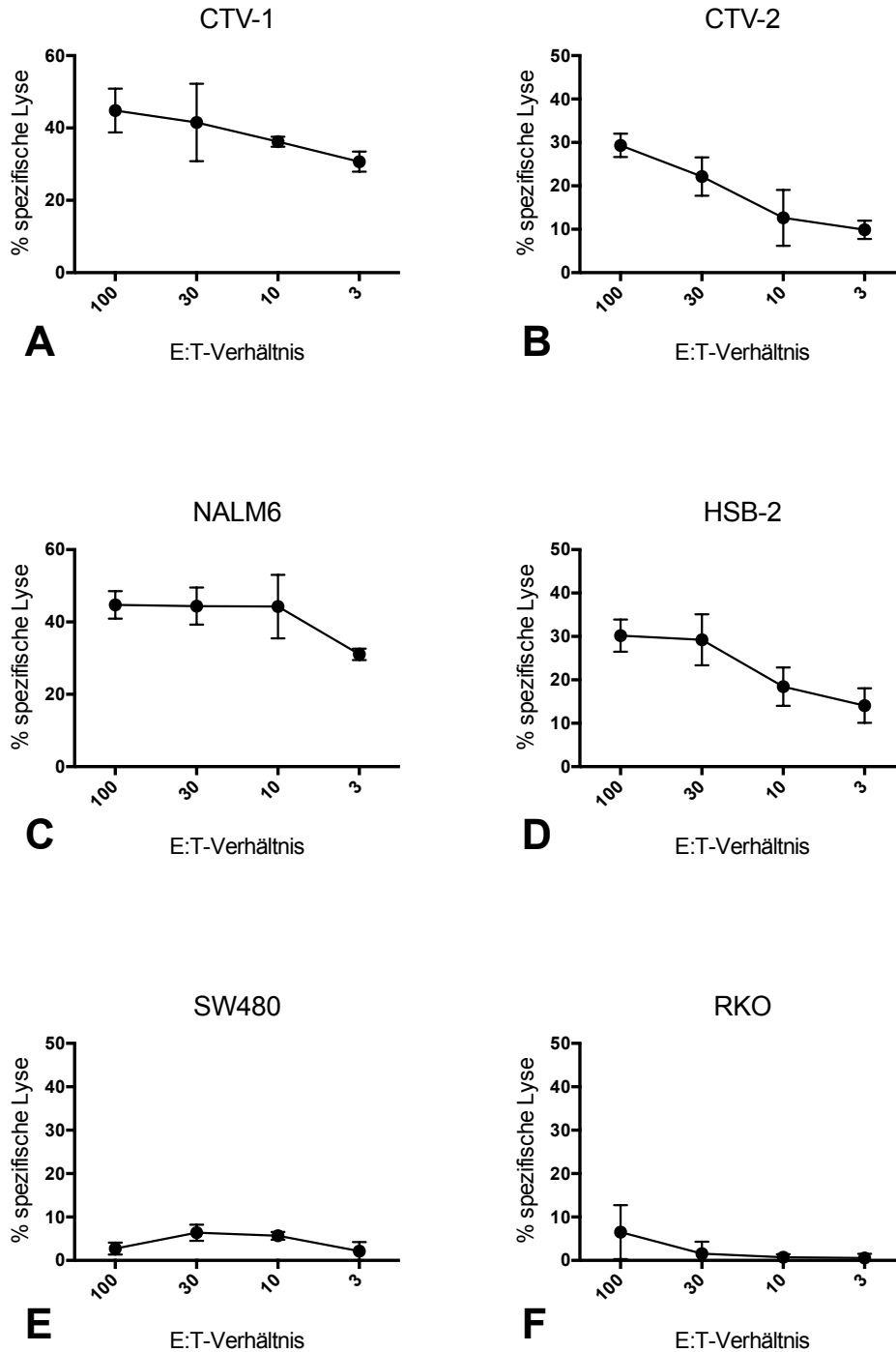


Abbildung 3.5: Spezifische Lyse untersuchter MSI-positiver Zielzellen durch FSP31-spezifische T-Zellen. Details s. Abb. 3.4 auf Seite 37. Die HLA-A2- und FSP31-Spezifität der gezeigten lytischen Aktivität gegen MSH3(-1)-Zelllinien (A-D) wird durch die fehlende Reaktion gegen SW480 (HLA-A2 pos., MSH3(wt)) und RKO (HLA-A2 neg., MSH3(-1)) bestätigt (E + F).

4 Diskussion

4.1 MMR-Defizienz und MSI untersuchter L/L-Zelllinien

Genetische Instabilität ist einer der grundlegenden Mechanismen der Krebsentstehung^{19,101}. Eine Inaktivierung des MMR-Systems erhöht die Rate an Spontanmutationen bei der DNA-Replikation um ein Vielfaches. Die Inaktivierung des MMR-Systems durch Keimbahnmutationen ist Auslöser des Lynch-Syndroms. Somatische Inaktivierungen des MMR-Systems durch Promotermethylierung des hMLH1-Gens verursachen zusätzlich bis zu 15 % sporadischer Tumore des Kolorektums, des Magens und des Endometriums^{22–26,102}.

Der Funktionsverlust eines oder mehrerer MMR-Gene (hMSH1, hMSH2, hMSH6, hMLH1 oder hPMS1) führt zu Mikrosatelliteninstabilität. Für verschiedene Erkrankungen wurden dabei charakteristische Ausfallsmuster beschrieben. So ist der Verlust von hMLH1 die Ursache für die Entstehung des MSI-Phänotyps in sporadischen MSI-positiven kolorektalen Karzinomen, während in HNPCC-assoziierten Tumoren die hMSH2-Defizienz ungefähr gleich häufig wie hMLH1-Defizienz auftritt. Für MSI-positive hämatologische Erkrankungen ist die Datenlage uneinheitlich. Die Deaktivierung von hMSH2 scheint häufiger ursächlich zu sein als die von hMLH1^{53,96}.

Die von uns verwendeten Leukämie- und Lymphomzelllinien wurden bisher nur zum Teil auf die Expression der MMR-Gene hin untersucht. Daher überprüften wir zunächst die Expression von hMLH1 und hMSH2 mittels Immunoblotting (s. Tabelle 3.1 auf Seite 28). Die gewonnenen Daten unterstützen die Annahme, eine fehlende hMSH2-Expression stelle einen häufigeren Pathomechanismus für die Entstehung von Mikrosatelliten-Instabilität in L/L-Zellen dar. So fehlte eine hMLH1-Expression in nur zwei von zehn Zelllinien, während hMSH2 in sieben von zehn Zelllinien ausgefallen war. Die Ergebnisse stimmten weitgehend mit den aus der Literatur bekannten Expressionsmustern^{64,103–106} überein. T2 wies als Hybrid einer normalerweise nicht MMR-defizienten, EBV-transformierten B-Zelllinie mit CCRF-CEM erwartungsgemäß eine Expression beider MMR-Gene auf. Die Expression von hMSH2 war in den Zelllinien MOLT-14 und NALM-6 war – im Gegensatz zu den bisher veröffentlichten

Tabelle 4.1: Übersicht über die vorhandenen Studien zu MSI in L/L-Zelllinien

| Studie | Erkrankungen | Zelllinien (n) | MSI (%) | Marker (n) |
|--------------------------------------|--------------|----------------|---------|------------|
| Molenaar <i>et al.</i> ⁵⁷ | ALL | 14 | 50 | 5 |
| Inoue <i>et al.</i> ⁵⁵ | T-ALL | 91 | 12 | 15 |
| Kodera <i>et al.</i> ¹¹⁴ | verschiedene | 57 | 21 | 29 |
| Ham <i>et al.</i> ¹¹⁵ | verschiedene | 50 | 26 | 7 |
| vorliegende Studie | verschiedene | 9 | 100 | 33 |

Ergebnissen – supprimiert. Möglicherweise ist dies durch die rasante Zunahme spontaner Mutationen nach Ausfall eines MMR-Gens erklärlich, welche im Laufe der Zellpassagen zu einem sekundären Ausfall anderer MMR-Gene führen könnte.

Da die Antigenpräsentation und -erkennung der eingesetzten FSP durch die L/L-Zellen im Kontext von MHC I und HLA-A0201 erfolgen muß⁸⁴, wurden die Zelllinien mittels FACS-Zytometrie auf die Expression der relevanten Oberflächenmarker hin untersucht (s. Abschnitt 3.2 auf Seite 27 und Tabelle 3.2 auf Seite 29). Alle untersuchten Zelllinien wiesen eine MHC I-Expression auf und waren damit grundsätzlich zur Präsentation von FSP in der Lage. CCRF-CEM, MOLT-3 und REH exprimierten kein HLA-A0201 und konnten daher für die weiteren Experimente als Negativkontrollen der HLA-A0201-spezifischen FSP-Antigenpräsentation dienen.

Eine Instabilität von Mikrosatelliten in kodierenden DNA-Abschnitten kann zur Expression fehlerhafter und in ihrer Funktion eingeschränkter Genprodukte führen. Tritt eine fehlerhafte Expression in direkt oder indirekt an der Tumorentstehung beteiligten Genen auf, kann dies die Entstehung maligner Erkrankungen zur Folge haben. Kodierende Mikrosatelliten mit einer nachgewiesenen hohen Mutationsfrequenz in malignen Erkrankungen, welche in mit der Tumorentstehung in Verbindung gebrachten Genen lokalisiert sind, werden als *real common target genes* bezeichnet⁴⁰ und können mittels bioinformatischer Methoden aus dem menschlichen Genom vorhergesagt werden^{40,41}. Durch Mutation verkürzte Genprodukte aus diesen Genen spielen mutmaßlich eine Rolle in der MSI-bedingten Karzinogenese¹⁰⁷⁻¹¹⁰. Im Kontext des kolorektalen Karzinoms zählen zu den betroffenen Genen beispielsweise TGFβRII, Bax, AIM2 und TCF4¹¹¹⁻¹¹³.

Art und Ausmaß der MSI in Leukämie- und Lymphomzelllinien wurden in mehreren Studien untersucht. Eine Übersicht der verfügbaren Arbeiten gibt Tabelle 4.1.

Die MSI-Raten schwankten zwischen 12 %⁵⁶ und ungefähr 50 %⁵⁷. Molenaar *et al.*, fanden MSI in der Hälfte der von ihnen untersuchten ALL-Zelllinien, wiesen jedoch darauf hin,

dass in der parallel durchgeführten Untersuchung an Patientenmaterial in 98 Proben keine MSI nachgewiesen werden konnte. Hieraus schlußfolgerten sie, dass erst die Etablierung von Zelllinien aus primärem Tumormaterial zur MSI führt. Kodera *et al.* untersuchten 57 Zelllinien verschiedener hämatologischer Erkrankungen und setzten hierbei ein Panel von 21 MSI-Markern ein. Sie fanden MSI in 26 % der untersuchten Zelllinien, wobei akute Leukämien und Non-Hodgkin-Lymphome überdurchschnittlich häufig betroffen waren.

In der vorliegenden Studie wurden mittels DNA-Fragmentlängenanalyse (s. Abschnitt 2.12 auf Seite 23) neun bekanntermaßen MSI-positive L/L-Zelllinien auf MSI in 33 kodierenden Mikrosatelliten untersucht. Alle untersuchten L/L-Zelllinien waren unter Verwendung eines hochspezifischen Markersets⁹⁹ MSI-H (s. Tabelle 3.3 auf Seite 31). In allen untersuchten L/L-Zelllinien waren mindestens 9/33 Mikrosatelliten-Marker instabil. Interessanterweise ließen sich keine klaren Unterschiede in den Mutationsfrequenzen bestimmter Zielgene in L/L-Zelllinien im Vergleich zu MSI-positiven kolorektalen Karzinomzellen nachweisen. So waren unter den am häufigsten mutierten cMS solche Marker zu finden, die bereits für das kolorektale Karzinom als *real common target genes* identifiziert wurden: TGF β RII⁸⁴, Caspase-5⁸⁷, FTO⁸⁹ und MSH3¹⁰⁰. Diese mutierten Gene sind an der Signaltransduktion (TGF β RII), Entzündungsreaktionen (Caspase-5) und der DNA-Reparatur (MSH3) beteiligt⁸³; FTO scheint eine Rolle im Energiemetabolismus zu spielen¹¹⁶ und ist in kolorektalen Karzinomzelllinien hochfrequent mutiert. Der an der Proteintranslokation und -modifikation (OGT3) beteiligte und beim kolorektalen Karzinom hoch mutierte cMS aus OGT⁸⁶ war hingegen nur in einer von neun L/L-Zelllinien verändert.

Die hohe Übereinstimmung hochfrequent mutierter cMS für das kolorektale Karzinom und die untersuchten L/L-Zelllinien überrascht insofern, als sowohl für hämatologische als auch für gastrointestinale Neoplasien in vorangegangenen Studien individuelle Mutationsprofile mit nur geringen Überschneidungen nachweisbar zu sein schienen^{55,104}. Sollten sich die in der vorliegenden Studie gemessenen Mutationsfrequenzen für die oben genannten, vom kolorektalen Karzinom bekannten cMS auch an primärem hämatoonkologischem Tumormaterial bestätigen, könnte dies eine hochinteressante Grundlage für eine polyvalente Vakzine gegen diese, gegebenenfalls sogar gegen weitere Tumorentitäten darstellen.

Die cMS aus MRP-L2 und FLJ20378 waren in allen untersuchten Zelllinien mutiert und könnten interessante diagnostische und therapeutische Optionen für hämatologische Erkrankungen bieten. MRP-L2 (mitochondrial ribosomal protein L2) ist an der Proteinsynthese in Mitochondrien beteiligt und noch wenig erforscht; eine Rolle in der Entstehung von Krankheiten konnte bisher nicht nachgewiesen werden^{117,118}. FLJ20378 ist ein hypothetisches Protein und bedarf ebenfalls weiterer Untersuchungen sowohl hinsichtlich seiner Funktion

als auch der Rate an MSI in anderen Erkrankungen. Die hohe Mutationsfrequenz dieser cMS in L/L-Zelllinien muß im Rahmen weiterer Untersuchungen auch bei primären Leukämie- und Lymphomzellen und gegebenenfalls anderen Malignomen nachgewiesen werden, damit diesen eine Rolle bei einer möglichen Vakzinierungsstrategie zukäme.

In einem Teil der untersuchten Zelllinien waren zu unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten auffällige Unterschiede in den Mutationsprofilen zu beobachten. Wenn gDNA derselben Zelllinie nach einigen weiteren Zellpassagen erneut untersucht wurde, zeigten sich in diesen Fällen zusätzliche Mutationen. Mikrosatelliten-instabile Tumorzellen entwickeln bekanntermaßen zusätzliche Mutationen im Laufe längerer Zellkultur¹⁰⁵. Ob dieses Phänomen lediglich auf die unnatürlichen Bedingungen einer Zellkultur zurückzuführen ist, oder auch eine Rolle *in vivo* spielt, ist weitgehend unbekannt. Eine Hypothese ist, dass L/L-Zellen im Laufe der Tumorprogression auch *in vivo* durch einen Selektionsdruck innerhalb des Tumors neue Mutationen erwerben, ähnlich wie für einzelne kolorektale Karzinome gezeigt. Dies sollte in zukünftigen klinischen Studien berücksichtigt werden. Für die weiteren immunologischen Experimente wurden zu einem definierten Zeitpunkt eingefrorene Zellpopulationen genutzt.

4.2 Expression und immunogene Wirkung von FSP in MSI-positiven L/L-Zelllinien

Mikrosatelliten-instabile Tumore weisen Eigenschaften auf, die die Vermutung nahelegen, dass durch MSI eine verstärkte antitumorale Immunantwort im menschlichen Körper ausgelöst wird. So wurde eine vermehrte peritumorale Lymphozyteninfiltration bei MSI-positiven Tumoren nachgewiesen. Diese weisen darüber hinaus eine höhere Apoptoserate und eine geringere Metastasierungstendenz auf und haben eine insgesamt bessere Prognose als MSS-Tumore¹¹⁹⁻¹²². Ob die erhöhte Apoptoserate und das verbesserte Überleben eine Folge der verstärkten Lymphozyteninfiltration ist, oder davon unabhängige Geschehen darstellen, ist noch nicht abschließend geklärt.

Die durch MMR-Defizienz hervorgerufene MSI führt aufgrund von Frameshift-Mutationen in kodierenden Mikrosatelliten zur Bildung von verkürzten Frameshift-Neopeptiden. Nach Proteindegradation dieser von der Zelle als fremd erkannten Peptide im Proteasom werden FSP-Epitope über Moleküle des MHC an der Zelloberfläche präsentiert und können dort

vom Immunsystem erkannt werden. Dieser Vorgang könnte einer der Gründe für die beschriebene Immunreaktion gegen MSI-positive Tumore sein⁸⁴. Tougeron *et al.* zeigten einen direkten Zusammenhang zwischen tumorinfiltrierenden Lymphozyten und hochgradiger MSI in kolorektalen Neoplasien. Schwitalle *et al.* gelang es, spezifische T-Zellen gegen Frameshift-Mutationen im peripheren Blut von HNPCC-Genträgern nachzuweisen. Ihr Vorkommen war dabei unabhängig vom Vorhandensein manifester Tumore⁸⁸. Des Weiteren gelang auch der Nachweis einer FSP-spezifischen Reaktion durch T-Helferzellen⁸⁵ sowie von humoralen Reaktionen gegen mutierte cMS als weiterem wichtigen Baustein der Immunogenität^{90,123}.

Unter Verwendung eines Systems zur Induktion FSP-spezifischer T-Zellen gelang es in der Vergangenheit wiederholt, eine spezifische Immunreaktion gegen FSP-exprimierende kolorektale Karzinomzellen und -zelllinien nachzuweisen. Hierzu wurden mögliche Frameshift-Sequenzen aus *real common target genes* mittels zweier Datenbanken^{124,125} auf ihre Bindungsfähigkeit an MCH- und HLA-A0201-Moleküle untersucht. Sequenzen, für die eine hohe Bindungsfähigkeit vorhergesagt wird, haben dabei eine größere Chance, durch die erwähnten Moleküle als Antigen präsentiert zu werden. Die entsprechenden Peptide wurden synthetisch hergestellt und dienten zur Induktion FSP-spezifischer T-Zellen. Anschließend konnte die immunogene Wirkung der synthetischen FSP durch Nachweis der Erkennung und effektiven Lyse sowohl exogen peptidbeladener als auch die zugrundeliegende Mutation spontan exprimierender kolorektaler Tumorzellen bestätigt werden^{84-89,100,116,126}. Eine Übersicht über die in dieser Studie untersuchten cMS, für die spezifische T-Zellen und synthetische Frameshift-Peptide für weitere Experimente zur Verfügung standen, gibt Tabelle 3.5 auf Seite 33.

Um zu ermitteln, ob die von uns untersuchten L/L-Zelllinien FSP nicht nur exprimieren, sondern auch an FSP-spezifische zytotoxische T-Zellen präsentieren, maßen wir die Interferon- γ -Sekretion der entsprechenden T-Zellen mittels Immunospot-Assays wie in Tabelle 3.1 auf Seite 28 beschrieben. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.3 auf Seite 35 dargestellt. Sie legen insgesamt eine HLA-restriktive Erkennung natürlich exprimierter, prozessierter und präsentierter Frameshift-Neopeptide in Leukämie- und Lymphomzellen durch FSP-spezifische T-Zellen nahe. Einzelne Ergebnisse überraschten jedoch. So wurden CTV-2-Zellen zwar von FSP31-, nicht jedoch von FSP26-spezifischen T-Zellen erkannt. Als Ursache kommen unterschiedliche Proteinexpression oder eine unterschiedlich starke Antigenpräsentation in Frage. Interessanterweise wurde die Zelllinie HSB-2 in einigen Experimenten von FSP31-spezifischen T-Zellen erkannt, in anderen jedoch nicht, obwohl sie HLA-A2-positiv sind. Wie oben beschrieben, beobachteten wir wiederholt Unterschiede im Mutationsstatus kodierender Mikrosatelliten nach längerer Zellkultur als Indiz für eine Akkumulation von Replikationsfehlern. Im Falle

von MSH3 konnte die unregelmäßige Erkennung bis zum Mutationsstatus von MSH3 zurückverfolgt werden. HSB-2-Zellen mit MSH3(-1/wt) wurden von FSP31-spezifischen T-Zellen erkannt, HSB-2 mit MSH3(wt) jedoch nicht. Ein anderes unerwartetes Ergebnis war die fehlende Erkennung von FTO(-1) in den L/L-Zelllinien, obwohl das immunogene Potential dieses T-Zell-Epitops bereits für verschiedene kolorektale Karzinomzelllinien beschrieben wurde⁸⁹. Eine weitere mögliche Erklärung könnte auch eine schwächere MHC- und HLA-A0201-Bindung der betroffenen FSP bieten. Die MHC-Bindungsfähigkeit hat großen Einfluß auf das immunogene Potential präsentierter Antigene¹²⁷.

Mittels ⁵¹Chrome-Release-Assays untersuchten wir die Fähigkeit der eingesetzten FSP-spezifischen T-Zellen, L/L-Zelllinien mit der zugrundeliegenden Mutation *in vitro* zu lysieren. Hierbei kamen solche T-Zellen zum Einsatz, die im vorangegangenen Experiment die höchste IFN- γ -Sekretion gezeigt hatten. Mehrere Zelllinien wurden effektiv lysiert, und sowohl die Spezifität als auch die HLA-A0201-Restriktion der Reaktion konnten mittels nicht mutierten respektive HLA-A0201-negativen Kontrollen bestätigt werden. Sowohl Caspase-5(-1)-spezifische als auch MSH3(-1)-spezifische T-Zellen lysierten die Zelllinien CTV-1, HSB-1 und NALM6, was diese Frameshift-Mutationen zu interessanten immunologischen Targets macht. Eine effektive MSH3(-1)-spezifische Lyse wurde außerdem gegen CTV-2 beobachtet, obwohl zuvor keine starke INF- γ -Sekretion beobachtet wurde.

4.3 Fazit

Die vorliegende Arbeit stellt einen Versuch dar, die vielversprechenden Ergebnisse der oben dargestellten Studien vom kolorektalen Karzinom auf hämatologische Erkrankungen zu übertragen. Wenngleich für Leukämien und Lymphome kein gesicherter Zusammenhang zwischen MMR-Defizienz und Krankheitsentstehung, wie etwa beim Lynch-Syndrom, existiert, ist die Rate an MMR und MSI für bestimmte Untergruppen, wie der therapie-assoziierten Leukämie und dem Myelodysplastischen Syndrom sowie für bestimmte Lymphome, etwa im Zusammenhang mit HIV-Infektionen oder nach Organtransplantation, hoch. Diesen Erkrankungen ist eine längerfristige Immunsuppression gemein. Die malignen Zellen zirkulieren im Blut oder sind in den lymphatischen Organen angesiedelt und sind daher stärker als bei soliden Tumoren dem Immunsystem des Körpers ausgesetzt. Dies läßt nicht nur die Annahme zu, dass eine immunologische Tumorstoffe gegen antigenpräsentierende Zellen solcher Erkrankungen eine große Zahl von Tumorzellen erreichen und bekämpfen könnte, sondern wirft auch die Frage auf, inwiefern immunogene Frameshift-Peptide direkt an der Entstehung

dieser Erkrankungen beteiligt sein könnten. Maletzki *et al.* schlagen ein Modell der L/L-Pathogenese vor, in dem MMR-defiziente und mikrosatelliten-instabile Vorläuferzellen bei funktionierendem Immunsystem anhand exprimierter FSP erkannt und in Schach gehalten werden. Bei Immunsuppression im Rahmen der oben genannten Erkrankungen könnte diese Überwachungsfunktion verloren gehen und es zu einer Expansion solcher Zellen kommen. Dies würde auch erklären, warum MMR-Defizienz und MSI nur selten in primären Leukämie- und Lymphomkrankungen nachweisbar ist¹²⁸.

Frameshift-Peptide weisen einige einzigartige Eigenschaften auf, die sie zu potentiell perfekten Tumorantigenen machen könnten. FSPs gelten für das menschliche Immunsystem als körperfremd (*non-self*) und werden nur von mikrosatelliten-instabilen Zellen exprimiert. Mehrere immunogene FSP entstehen aus direkt oder indirekt an der Tumorentstehung und -progression beteiligten Genen. Zudem kann eine einzelne Tumorentität potentiell eine große Zahl unterschiedlicher FSP-Tumorantigene exprimieren, was einer Resistenzbildung entgegengewirken könnte. Verglichen mit klassischen Tumorantigenen wird eine starke zytolytische Antwort bei Patienten mit MSI-positiven Tumoren deutlich einfacher hervorgerufen. FSP-spezifische Zellen des Immunsystems sowie FSP-spezifische Antikörper der humoralen Abwehr können im Blut von HNPCC-Patienten ohne Tumormanifestation sowie von gesunden Personen nachgewiesen werden. Bereits bestehende, FSP-spezifische Immunantworten müssen somit prinzipiell nur reaktiviert werden. Zusammengenommen bilden diese Eigenschaften eine exzellente Basis für die Entwicklung hochindividualisierter Multipeptid-Vakzine gegen MSI-positive Erkrankungen. FSPs könnten als spezifische Antigene in MSI-positiven hämatologischen Erkrankungen vielversprechende immunologische Zielstrukturen darstellen.

In unserer Studie wurden zunächst Leukämie- und Lymphomzelllinien unterschiedlicher Entität auf das Vorliegen von MMR-Defizienz und MSI untersucht. Anschließend dienten solche Zelllinien, die eine MSI in kodierenden Mikrosatelliten aus an der Tumorigenese beteiligten Genen (real common targets) aufwiesen, als immunologische Ziele für eine FSP-spezifische Erkennung und Lyse durch spezifische zytotoxische T-Zellen. Für diese Untersuchungen bedienten wir uns eines für das kolorektale Karzinom erfolgreich etablierten Modells⁸⁴.

Im Ergebnis konnten erstmals durch Mikrosatelliteninstabilität induzierte Frameshift-Neopeptide als leukämie- und lymphomspezifische Tumorantigene bestätigt werden. Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass 1. Frameshift-Neopeptide häufig in MSI-positiven Leukämie- und Lymphomzelllinien exprimiert werden, dass 2. die entsprechenden Peptide von der Zelle im Kontext mit HLA-Molekülen präsentiert werden, und somit 3. eine funktionelle Erkennung von Leukämie- und Lymphomzellen durch FSP-spezifische T-Zellen erlauben.

Diese Ergebnisse erweitern die bisher gemachten Erfahrungen mit FSPs als Tumorantigene bei kolorektalen Karzinomzellen^{85,87-89,95} und zeigen erstmals, dass ausgewählte Frameshift-Neopeptide ein verbindendes Charakteristikum verschiedener MSI-positiver Tumorentitäten darstellen können. Weitere Studien an primärem Leukämie- und Lymphommaterial sind nötig, um herauszufinden, ob Frameshift-Neopeptide echte immunologische Targets für die Therapie dieser Erkrankungen darstellen. Im Lichte des offensichtlichen Zusammenhangs von MSI-positiven Tumoren und einer Immunsuppression des Patienten, zum Beispiel nach Chemotherapie, Organtransplantation oder durch eine Virusinfektion, käme auch eine prophylaktische Impfung prädisponierter Patienten mit einer polyvalenten Vakzine in Betracht.

5 Literaturverzeichnis

- [1] Boiteux, Serge und Jinks-Robertson, Sue: *DNA repair mechanisms and the bypass of DNA damage in Saccharomyces cerevisiae*. Genetics, 193(4):1025–1064, April 2013.
- [2] Fishel, R, Lescoe, M K, Rao, M R, Copeland, N G, Jenkins, N A, Garber, J, Kane, M und Kolodner, R: *The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer*. Cell, 75(5):1027–1038, Dezember 1993.
- [3] Bronner, C E, Baker, S M, Morrison, P T, Warren, G, Smith, L G, Lescoe, M K, Kane, M, Earabino, C, Lipford, J und Lindblom, A: *Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer*. Nature, 368(6468):258–261, März 1994.
- [4] Nicolaides, N C, Papadopoulos, N, Liu, B, Wei, Y F, Carter, K C, Ruben, S M, Rosen, C A, Haseltine, W A, Fleischmann, R D und Fraser, C M: *Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer*. Nature, 371(6492):75–80, September 1994.
- [5] Imai, Y, Inoue, T und Ishikawa, T: *Mutations of the human MUT S homologue 6 gene in ampullary carcinoma and gastric cancer*. International journal of cancer. Journal international du cancer, 78(5):576–580, November 1998.
- [6] Kunkel, T A und Bebenek, K: *DNA replication fidelity*. Annual review of biochemistry, 69(1):497–529, 2000.
- [7] Jun, Sung Hoon, Kim, Tae Gyun und Ban, Changill: *DNA mismatch repair system. Classical and fresh roles*. FEBS Journal, 273(8):1609–1619, April 2006.
- [8] Hsieh, P: *Molecular mechanisms of DNA mismatch repair*. Mutation research, 486(2):71–87, Juli 2001.
- [9] Li, Guo Min: *Mechanisms and functions of DNA mismatch repair*. Cell Research, 18(1):85–98, Januar 2008.
- [10] Pena-Diaz, Javier und Jiricny, Josef: *Mammalian mismatch repair: error-free or error-prone?* Trends in biochemical sciences, 37(5):206–214, Mai 2012.

- [11] Edelbrock, Michael A, Kaliyaperumal, Saravanan und Williams, Kandace J: *Structural, molecular and cellular functions of MSH2 and MSH6 during DNA mismatch repair, damage signaling and other noncanonical activities*. Mutation research, 743-744:53–66, März 2013.
- [12] Jiricny, Josef: *Postreplicative mismatch repair*. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 5(4):a012633–a012633, April 2013.
- [13] Jascur, Thomas und Boland, C Richard: *Structure and function of the components of the human DNA mismatch repair system*. International journal of cancer. Journal international du cancer, 119(9):2030–2035, 2006.
- [14] Kolodner, R D und Marsischky, G T: *Eukaryotic DNA mismatch repair*. Current opinion in genetics & development, 9(1):89–96, Februar 1999.
- [15] Modrich, Paul: *Mechanisms in eukaryotic mismatch repair*. Journal of Biological Chemistry, 281(41):30305–30309, Oktober 2006.
- [16] Wind, N de, Dekker, M, Berns, A, Radman, M und Riele, H te: *Inactivation of the mouse Msh2 gene results in mismatch repair deficiency, methylation tolerance, hyperrecombination, and predisposition to cancer*. Cell, 82(2):321–330, Juli 1995.
- [17] Wind, N de, Dekker, M, Claij, N, Jansen, L, Klink, Y van, Radman, M, Riggins, G, Valk, M van der, Wout, K van't und Riele, H te: *HNPCC-like cancer predisposition in mice through simultaneous loss of Msh3 and Msh6 mismatch-repair protein functions*. Nature genetics, 23(3):359–362, November 1999.
- [18] Edelman, W, Umar, A, Yang, K, Heyer, J, Kucherlapati, M, Lia, M, Kneitz, B, Avdievich, E, Fan, K, Wong, E, Crouse, G, Kunkel, T, Lipkin, M, Kolodner, R D und Kucherlapati, R: *The DNA mismatch repair genes Msh3 and Msh6 cooperate in intestinal tumor suppression*. Cancer research, 60(4):803–807, Februar 2000.
- [19] Ionov, Yuriy, Peinado, Miguel A, Malkhosyan, Sergei, Shibata, Darryl und Perucho, Manuel: *Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis*. Nature, 363(6429):558–561, Juni 1993.
- [20] Loeb, L A, Loeb, K R und Anderson, J P: *Multiple mutations and cancer*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 100(3):776–781, Januar 2003.

- [21] Hsieh, Peggy und Yamane, Kazuhiko: *DNA mismatch repair: molecular mechanism, cancer, and ageing*. Mechanisms of Ageing and Development, 129(7-8):391–407, Juni 2008.
- [22] Grindedal, Eli Marie, Møller, Pål, Eeles, Ros, Stormorken, Astrid Tenden, Bowitz-Lothe, Inger Marie, Landrø, Stefan Magnus, Clark, Neal, Kvåle, Rune, Shanley, Susan und Maehle, Lovise: *Germ-line mutations in mismatch repair genes associated with prostate cancer*. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention, 18(9):2460–2467, August 2009.
- [23] Buerki, Nicole N, Gautier, Lucienne L, Kovac, Michal M, Marra, Giancarlo G, Buser, Mauro M, Mueller, Hansjakob H und Heinimann, Karl K: *Evidence for breast cancer as an integral part of Lynch syndrome*. Genes, Chromosomes and Cancer, 51(1):83–91, Dezember 2011.
- [24] Win, Aung Ko, Lindor, Noralane M, Young, Joanne P, Macrae, Finlay A, Young, Graeme P, Williamson, Elizabeth, Parry, Susan, Goldblatt, Jack, Lipton, Lara, Winship, Ingrid, Leggett, Barbara, Tucker, Katherine M, Giles, Graham G, Buchanan, Daniel D, Clendenning, Mark, Rosty, Christophe, Arnold, Julie, Levine, A Joan, Haile, Robert W, Gallinger, Steven, Le Marchand, Loïc, Newcomb, Polly A, Hopper, John L und Jenkins, Mark A: *Risks of primary extracolonic cancers following colorectal cancer in lynch syndrome*. JNCI Journal of the National Cancer Institute, 104(18):1363–1372, September 2012.
- [25] Win, Aung Ko, Young, Joanne P, Lindor, Noralane M, Tucker, Katherine M, Ahnen, Dennis J, Young, Graeme P, Buchanan, Daniel D, Clendenning, Mark, Giles, Graham G, Winship, Ingrid, Macrae, Finlay A, Goldblatt, Jack, Southey, Melissa C, Arnold, Julie, Thibodeau, Stephen N, Gunawardena, Shanaka R, Bapat, Bharati, Baron, John A, Casey, Graham, Gallinger, Steven, Le Marchand, Loïc, Newcomb, Polly A, Haile, Robert W, Hopper, John L und Jenkins, Mark A: *Colorectal and other cancer risks for carriers and noncarriers from families with a DNA mismatch repair gene mutation: a prospective cohort study*. Journal of Clinical Oncology, 30(9):958–964, März 2012.
- [26] Vasen, Hans F A, Blanco, Ignacio, Aktan-Collan, Katja, Gopie, Jessica P, Alonso, Angel, Aretz, Stefan, Bernstein, Inge, Bertario, Lucio, Burn, John, Capella, Gabriel, Colas, Chrystelle, Engel, Christoph, Frayling, Ian M, Genuardi, Maurizio, Heinimann, Karl, Hes, Frederik J, Hodgson, Shirley V, Karagiannis, John A, Lalloo, Fiona, Lindblom, Annika, Mecklin, Jukka Pekka, Møller, Pål, Myrhoj, Torben, Nagengast, Fokko M, Parc, Yann, Leon, Maurizio Ponz de, Renkonen-Sinisalo, Laura, Sampson, Julian R, Stormorken, Astrid, Sijmons, Rolf H, Tejpar, Sabine, Thomas, Huw J W, Rahner, Nils, Wijnen, Juul

- T, Järvinen, Heikki Juhani und Möslein, Gabriela: *Revised guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (HNPCC): recommendations by a group of European experts*. Gut, 62(6):812–823, Mai 2013.
- [27] Aarnio, M, Mecklin, J P, Aaltonen, L A, Nyström-Lahti, M und Järvinen, H J: *Life-time risk of different cancers in hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) syndrome*. International journal of cancer. Journal international du cancer, 64(6):430–433, Dezember 1995.
- [28] Wang, Q, Lasset, C, Desseigne, F, Frappaz, D, Bergeron, C, Navarro, C, Ruano, E und Puisieux, A: *Neurofibromatosis and early onset of cancers in hMLH1-deficient children*. Cancer research, 59(2):294–297, Januar 1999.
- [29] Guillotin, Delphine und Martin, Sarah A: *Exploiting DNA mismatch repair deficiency as a therapeutic strategy*. Experimental cell research, Juli 2014.
- [30] Wimmer, Katharina, Kratz, Christian P, Vasen, Hans F A, Caron, Olivier, Colas, Chrystelle, Entz-Werle, Natacha, Gerdes, Anne Marie, Goldberg, Yael, Ilencikova, Denisa, Muleris, Martine, Duval, Alex, Lavoine, Noémie, Ruiz-Ponte, Clara, Slavic, Irene, Burkhardt, Brigit, Brugieres, Laurence und EU-Consortium Care for CMMRD (C4CMMRD): *Diagnostic criteria for constitutional mismatch repair deficiency syndrome: suggestions of the European consortium 'care for CMMRD' (C4CMMRD)*. Journal of medical genetics, 51(6):355–365, Juni 2014.
- [31] Ripperger, Tim, Beger, Carmela, Rahner, Nils, Sykora, Karl W, Bockmeyer, Clemens L, Lehmann, Ulrich, Kreipe, Hans H und Schlegelberger, Brigitte: *Constitutional mismatch repair deficiency and childhood leukemia/lymphoma—report on a novel biallelic MSH6 mutation*. Haematologica, 95(5):841–844, Mai 2010.
- [32] Kofler, Robert, Schlotterer, Christian, Luschützky, Evita und Lelley, Tamas: *Survey of microsatellite clustering in eight fully sequenced species sheds light on the origin of compound microsatellites*. BMC genomics, 9(1):612, 2008.
- [33] Woerner, Stefan M, Kloor, Matthias, Knebel Doeberitz, Magnus von und Gebert, Johannes F: *Microsatellite instability in the development of DNA mismatch repair deficient tumors*. Cancer biomarkers : section A of Disease markers, 2(1-2):69–86, 2006.
- [34] Boland, C Richard und Goel, Ajay: *Microsatellite Instability in Colorectal Cancer*. Gastroenterology, 138(6):2073–2087.e3, Mai 2010.

- [35] Dietmaier, W, Wallinger, S, Bocker, T, Kullmann, F, Fishel, R und Ruschoff, J: *Diagnostic microsatellite instability: definition and correlation with mismatch repair protein expression*. *Cancer research*, 57(21):4749–4756, November 1997.
- [36] Boland, C R, Thibodeau, S N, Hamilton, S R, Sidransky, D, Eshleman, J R, Burt, R W, Meltzer, S J, Rodriguez-Bigas, M A, Fodde, R, Ranzani, G N und Srivastava, S: *A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer*. In: *Cancer research*, Seiten 5248–5257. University of California, San Diego, La Jolla 92093-0688, USA. crboland@ucsd.edu, November 1998.
- [37] Frayling, I M: *Microsatellite instability*. *Gut*, 45(1):1–4, Juli 1999.
- [38] Baudhuin, Linnea M, Burgart, Lawrence J, Leontovich, Olga und Thibodeau, Stephen N: *Use of microsatellite instability and immunohistochemistry testing for the identification of individuals at risk for Lynch syndrome*. *Familial cancer*, 4(3):255–265, 2005.
- [39] Thompson, Bryony A, Spurdle, Amanda B, Plazzer, John Paul, Greenblatt, Marc S, Akagi, Kiwamu, Al-Mulla, Fahd, Bapat, Bharati, Bernstein, Inge, Capella, Gabriel, Dunnen, Johan T den, Sart, Desiree du, Fabre, Aurelie, Farrell, Michael P, Farrington, Susan M, Frayling, Ian M, Frebourg, Thierry, Goldgar, David E, Heinen, Christopher D, Holinski-Feder, Elke, Kohonen-Corish, Maija, Robinson, Kristina Lagerstedt, Leung, Suet Yi, Martins, Alexandra, Møller, Pål, Morak, Monika, Nystrom, Minna, Peltomäki, Päivi, Pineda, Marta, Qi, Ming, Ramesar, Rajkumar, Rasmussen, Lene Juel, Royer-Pokora, Brigitte, Scott, Rodney J, Sijmons, Rolf, Tavtigian, Sean V, Tops, Carli M, Weber, Thomas, Wijnen, Juul, Woods, Michael O, Macrae, Finlay, Genuardi, Maurizio und InSiGHT: *Application of a 5-tiered scheme for standardized classification of 2,360 unique mismatch repair gene variants in the InSiGHT locus-specific database*. *Nature genetics*, 46(2):107–115, Februar 2014.
- [40] Woerner, Stefan M, Yuan, Yan P, Benner, Axel, Korff, Sebastian, Knebel Doeberitz, Magnus von und Bork, Peer: *SeTarse, a database of human mononucleotide-microsatellite mutations and their potential impact to tumorigenesis and immunology*. *Nucleic acids research*, 38(Database issue):D682–9, Januar 2010.
- [41] Woerner, S M, Gebert, J, Yuan, Y P, Sutter, C, Ridder, R, Bork, P und Knebel Doeberitz, M von: *Systematic identification of genes with coding microsatellites mutated in*

- DNA mismatch repair-deficient cancer cells*. International journal of cancer. Journal international du cancer, 93(1):12–19, Juli 2001.
- [42] Watson, P, Lin, K M, Rodriguez-Bigas, M A, Smyrk, T, Lemon, S, Shashidharan, M, Franklin, B, Karr, B, Thorson, A und Lynch, H T: *Colorectal carcinoma survival among hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma family members*. Cancer, 83(2):259–266, Juli 1998.
- [43] Kihana, T, Fujioka, T, Hamada, K, Kito, K, Takahashi, A, Tsukayama, C und Ito, M: *Association of replication error positive phenotype with lymphocyte infiltration in endometrial cancers*. Japanese journal of cancer research : Gann, 89(9):895–902, September 1998.
- [44] Kim, H, Jen, J, Vogelstein, B und Hamilton, S R: *Clinical and pathological characteristics of sporadic colorectal carcinomas with DNA replication errors in microsatellite sequences*. The American journal of pathology, 145(1):148–156, Juli 1994.
- [45] Dolcetti, R, Viel, A, Doglioni, C, Russo, A, Guidoboni, M, Capozzi, E, Vecchiato, N, Macrì, E, Fornasarig, M und Boiocchi, M: *High prevalence of activated intraepithelial cytotoxic T lymphocytes and increased neoplastic cell apoptosis in colorectal carcinomas with microsatellite instability*. The American journal of pathology, 154(6):1805–1813, Juni 1999.
- [46] Bedi, G C, Westra, W H, Farzadegan, H, Pitha, P M und Sidransky, D: *Microsatellite instability in primary neoplasms from HIV + patients*. Nature medicine, 1(1):65–68, Januar 1995.
- [47] Duval, A, Raphael, M, Brennetot, C, Poirel, H, Buhard, O, Aubry, A, Martin, A, Krimi, A, Leblond, V, Gabarre, J, Davi, F, Charlotte, F, Berger, F, Gaidano, G, Capello, D, Canioni, D, Bordessoule, D, Feuillard, J, Gaulard, P, Delfau, M H, Ferlicot, S, Eclache, V, Prevot, S, Guettier, C, Lefevre, P C, Adotti, F und Hamelin, R: *The mutator pathway is a feature of immunodeficiency-related lymphomas*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 101(14):5002–5007, April 2004.
- [48] Offman, J: *Defective DNA mismatch repair in acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome after organ transplantation*. Blood, 104(3):822–828, April 2004.
- [49] Niv, E, Bomstein, Y, Yuklea, M und Lishner, M: *Microsatellite instability in patients with chronic B-cell lymphocytic leukaemia*. British Journal of Cancer, 92(8):1517–1523, April 2005.

- [50] Sanz-Vaqué, L, Colomer, D, Bosch, F, López-Guillermo, A, Dreyling, M H, Montserrat, E und Campo, E: *Microsatellite instability analysis in typical and progressed mantle cell lymphoma and B-cell chronic lymphocytic leukemia*. *Haematologica*, 86(2):181–186, Februar 2001.
- [51] Volpe, G, Gamberi, B, Pastore, C, Roetto, A, Pautasso, M, Parvis, G, Camaschella, C, Mazza, U, Saglio, G und Gaidano, G: *Analysis of microsatellite instability in chronic lymphoproliferative disorders*. *Annals of Hematology*, 72(2):67–71, Februar 1996.
- [52] Sellick, G S, Lubbe, S J, Matutes, E, Catovsky, D und Houlston, R S: *Microsatellite instability indicative of defects in the major mismatch repair genes is rare in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia: Evaluation with disease stage and family history*. *Leukemia & lymphoma*, 48(7):1320–1322, Juli 2007.
- [53] Gu, Liya, Cline-Brown, Brandee, Zhang, Fujian, Qiu, Lu und Li, Guo Min: *Mismatch repair deficiency in hematological malignancies with microsatellite instability*. *Oncogene*, 21(37):5758–5764, August 2002.
- [54] Hangaishi, A, Ogawa, S, Mitani, K, Hosoya, N, Chiba, S, Yazaki, Y und Hirai, H: *Mutations and loss of expression of a mismatch repair gene, hMLH1, in leukemia and lymphoma cell lines*. *Blood*, 89(5):1740–1747, März 1997.
- [55] Inoue, K, Kohno, T, Takakura, S, Hayashi, Y, Mizoguchi, H und Yokota, J: *Frequent microsatellite instability and BAX mutations in T cell acute lymphoblastic leukemia cell lines*. *Leukemia research*, 24(3):255–262, März 2000.
- [56] Inoue, Kaoru, Kohno, Takashi, Takakura, Satoshi, Hayashi, Yasuhide, Mizoguchi, Hideaki und Yokota, Jun: *Corrigendum to: Frequent microsatellite instability and BAX mutations in T cell acute lymphoblastic leukemia cell lines Leukemia Research 24 (2000), 255–262*. *Leukemia research*, 25(3):275–278, März 2001.
- [57] Molenaar, Jan J, Molenaar, J J, Gérard, Bénédicte, Gérard, B, Chambon-Pautas, Cécile, Chambon-Pautas, C, Cavé, Hélène, Cavé, H, Duval, Michel, Duval, M, Vilmer, Etienne, Vilmer, E, Grandchamp, Bernard und Grandchamp, B: *Microsatellite instability and frameshift mutations in BAX and transforming growth factor-beta RII genes are very uncommon in acute lymphoblastic leukemia in vivo but not in cell lines*. *Blood*, 92(1):230–233, Juli 1998.
- [58] Reato, G, Basso, G, Putti, M C, Cignetti, A, Guarini, A und Foa, R: *Microsatellite analysis in childhood acute lymphoblastic leukemia*. *Haematologica*, 83(5):403–407, Mai 1998.

- [59] Baccichet, A, Benachenhou, N, Couture, F, Leclerc, J M und Sinnett, D: *Microsatellite instability in childhood T cell acute lymphoblastic leukemia*. *Leukemia*, 11(6):797–802, Juni 1997.
- [60] Wada, C, Shionoya, S, Fujino, Y, Tokuhira, H, Akahoshi, T, Uchida, T und Ohtani, H: *Genomic instability of microsatellite repeats and its association with the evolution of chronic myelogenous leukemia*. *Blood*, 83(12):3449–3456, Juni 1994.
- [61] Gartenhaus, R, Johns, M M, Wang, P, Rai, K und Sidransky, D: *Mutator phenotype in a subset of chronic lymphocytic leukemia*. *Blood*, 87(1):38–41, Januar 1996.
- [62] Das-Gupta, E P, Seedhouse, C H und Russell, N H: *Microsatellite instability occurs in defined subsets of patients with acute myeloblastic leukaemia*. *British journal of haematology*, 114(2):307–312, August 2001.
- [63] Rund, D, Krichevsky, S, Bar-Cohen, S, Goldschmidt, N, Kedmi, M, Malik, E, Gural, A, Shafran-Tikva, S, Ben-Neriah, S und Ben-Yehuda, D: *Therapy-related leukemia: clinical characteristics and analysis of new molecular risk factors in 96 adult patients*. *Leukemia*, 19(11):1919–1928, September 2005.
- [64] Casorelli, Ida, Offman, Judith, Mele, Luca, Pagano, Livio, Sica, Simona, D’Errico, Mariarosaria, Giannini, Giuseppe, Leone, Giuseppe, Bignami, Margherita und Karran, Peter: *Drug treatment in the development of mismatch repair defective acute leukemia and myelodysplastic syndrome*. *DNA repair*, 2(5):547–559, Mai 2003.
- [65] Rimsza, L M, Kopecky, K J, Ruschulte, J, Chen, I M, Slovak, M L, Karanes, C, Godwin, J, List, A und Willman, C L: *Microsatellite instability is not a defining genetic feature of acute myeloid leukemogenesis in adults: results of a retrospective study of 132 patients and review of the literature*. *Leukemia*, 14(6):1044–1051, Juni 2000.
- [66] Sill, H, Goldman, J M und Cross, N C: *Rarity of microsatellite alterations in acute myeloid leukaemia*. *British Journal of Cancer*, 74(2):255–257, Juli 1996.
- [67] Tasaka, T, Lee, S, Spira, S, Takeuchi, S, Nagai, M, Takahara, J und Koeffler, H P: *Microsatellite instability during the progression of acute myelocytic leukaemia*. *British journal of haematology*, 98(1):219–221, Juli 1997.
- [68] Sheikha, Mohammad H, Tobal, Khalid und Liu Yin, John A: *High level of microsatellite instability but not hypermethylation of mismatch repair genes in therapy-related and secondary acute myeloid leukaemia and myelodysplastic syndrome*. *British journal of haematology*, 117(2):359–365, Mai 2002.

- [69] Nomdedéu, Josep F, Perea, Granada, Estivill, Camino, Lasa, Adriana, Carnicer, Maria J, Brunet, Salut, Aventín, Anna und Sierra, Jorge: *Microsatellite instability is not an uncommon finding in adult de novo acute myeloid leukemia*. *Annals of Hematology*, 84(6):368–375, Juni 2005.
- [70] Themeli, M, Petrikkos, L, Waterhouse, M, Bertz, H, Lagadinou, E, Zoumbos, N, Finke, J und Spyridonidis, A: *Alloreactive microenvironment after human hematopoietic cell transplantation induces genomic alterations in epithelium through an ROS-mediated mechanism: in vivo and in vitro study and implications to secondary neoplasia*. *Leukemia*, 24(3):536–543, Januar 2010.
- [71] Faber, P: *Frequent genomic alterations in epithelium measured by microsatellite instability following allogeneic hematopoietic cell transplantation in humans*. *Blood*, 107(8):3389–3396, April 2006.
- [72] Ben-Yehuda, D, Krichevsky, S, Caspi, O, Rund, D, Polliack, A, Abeliovich, D, Zelig, O, Yahalom, V, Paltiel, O, Or, R, Peretz, T, Ben-Neria, S, Yehuda, O und Rachmilewitz, E A: *Microsatellite instability and p53 mutations in therapy-related leukemia suggest mutator phenotype*. *Blood*, 88(11):4296–4303, Dezember 1996.
- [73] Mocellin, Simone, Mandruzzato, Susanna, Bronte, Vincenzo, Lise, Mario und Nitti, Donato: *Part I: Vaccines for solid tumours*. *The Lancet Oncology*, 5(11):681–689, November 2004.
- [74] Mocellin, Simone, Semenzato, Gianpietro, Mandruzzato, Susanna und Rossi, Carlo Riccardo: *Part II: Vaccines for haematological malignant disorders*. *The Lancet Oncology*, 5(12):727–737, Dezember 2004.
- [75] Brayer, Jason B und Pinilla-Ibarz, Javier: *Developing strategies in the immunotherapy of leukemias*. *Cancer control : journal of the Moffitt Cancer Center*, 20(1):49–59, Januar 2013.
- [76] Mackay, Ian R, Rosen, Fred S, Delves, Peter J und Roitt, Ivan M: *The Immune System*. *The New England journal of medicine*, 343(2):108–117, Juli 2000.
- [77] Mackay, Ian R, Rosen, Fred S, Delves, Peter J und Roitt, Ivan M: *The Immune System*. *The New England journal of medicine*, 343(1):37–49, Juli 2000.
- [78] Mocellin, Simone und Nitti, Donato: *Therapeutics targeting tumor immune escape: Towards the development of new generation anticancer vaccines*. *Medicinal Research Reviews*, 28(3):413–444, 2008.

- [79] Radford, Kristen J, Tullett, Kirsteen M und Lahoud, Mireille H: *Dendritic cells and cancer immunotherapy*. *Current opinion in immunology*, 27:26–32, April 2014.
- [80] Accolla, Roberto S und Tosi, Giovanna: *Optimal MHC-II-restricted tumor antigen presentation to CD4+ T helper cells: the key issue for development of anti-tumor vaccines*. *Journal of Translational Medicine*, 10(1):154, 2012.
- [81] Lollini, Pier Luigi, Nicoletti, Giordano, Landuzzi, Lorena, Cavallo, Federica, Forni, Guido, De Giovanni, Carla und Nanni, Patrizia: *Vaccines and other immunological approaches for cancer immunoprevention*. *Current drug targets*, 12(13):1957–1973, Dezember 2011.
- [82] Gilboa, E: *The makings of a tumor rejection antigen*. *Immunity*, 11(3):263–270, September 1999.
- [83] Woerner, Stefan M, Benner, Axel, Sutter, Christian, Schiller, Marian, Yuan, Yan P, Keller, Gisela, Bork, Peer, Doeberitz, Magnus von Knebel und Gebert, Johannes F: *Pathogenesis of DNA repair-deficient cancers: a statistical meta-analysis of putative Real Common Target genes*. *Oncogene*, 22(15):2226–2235, April 2003.
- [84] Linnebacher, Michael, Gebert, Johannes, Rudy, Wolfgang, Woerner, Stefan, Yuan, Yan P, Bork, Peer und Knebel Doeberitz, Magnus von: *Frameshift peptide-derived T-cell epitopes: A source of novel tumor-specific antigens*. *International Journal of Cancer*, 93(1):6–11, Juli 2001.
- [85] Saeterdal, I, Bjørheim, J, Lislørud, K, Gjertsen, M K, Bukholm, I K, Olsen, O C, Nesland, J M, Eriksen, J A, Møller, M, Lindblom, A und Gaudernack, G: *Frameshift-mutation-derived peptides as tumor-specific antigens in inherited and spontaneous colorectal cancer*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(23):13255–13260, Oktober 2001.
- [86] Ripberger, Eva, Linnebacher, Michael, Schwitalle, Yvette, Gebert, Johannes und Knebel Doeberitz, Magnus von: *Identification of an HLA-A0201-restricted CTL epitope generated by a tumor-specific frameshift mutation in a coding microsatellite of the OGT gene*. *Journal of clinical immunology*, 23(5):415–423, September 2003.
- [87] Schwitalle, Yvette, Linnebacher, Michael, Ripberger, Eva, Gebert, Johannes und Knebel Doeberitz, Magnus von: *Immunogenic peptides generated by frameshift mutations in DNA mismatch repair-deficient cancer cells*. *Cancer immunity*, 4:14, November 2004.

- [88] Schwitalle, Yvette, Kloor, Matthias, Eiermann, Susanne, Linnebacher, Michael, Kienle, Peter, Knaebel, Hanns Peter, Tariverdian, Mirjam, Benner, Axel und Knebel Doeberitz, Magnus von: *Immune Response Against Frameshift-Induced Neopeptides in HNPCC Patients and Healthy HNPCC Mutation Carriers*. *Gastroenterology*, 134(4):988–997, April 2008.
- [89] Linnebacher, Michael, Wienck, Anne, Boeck, Inga und Klar, Ernst: *Identification of an MSI-H tumor-specific cytotoxic T cell epitope generated by the (-1) frame of U79260(FTO)*. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2010:841451, 2010.
- [90] Reuschenbach, Miriam, Kloor, Matthias, Morak, Monika, Wentzensen, Nicolas, Germann, Anja, Garbe, Yvette, Tariverdian, Mirjam, Findeisen, Peter, Neumaier, Michael, Holinski-Feder, Elke und Knebel Doeberitz, Magnus: *Serum antibodies against frameshift peptides in microsatellite unstable colorectal cancer patients with Lynch syndrome*. *Familial cancer*, 9(2):173–179, Dezember 2009.
- [91] Bleakley, Marie und Riddell, Stanley R: *Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect*. *Nature reviews. Cancer*, 4(5):371–380, Mai 2004.
- [92] Anguille, S, Van Tendeloo, V F und Berneman, Z N: *Leukemia-associated antigens and their relevance to the immunotherapy of acute myeloid leukemia*. *Leukemia*, 26(10):2186–2196, Juni 2012.
- [93] Cheever, Martin A, Allison, James P, Ferris, Andrea S, Finn, Olivera J, Hastings, Benjamin M, Hecht, Toby T, Mellman, Ira, Prindiville, Sheila A, Viner, Jaye L, Weiner, Louis M und Matrisian, Lynn M: *The prioritization of cancer antigens: a national cancer institute pilot project for the acceleration of translational research*. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 15(17):5323–5337, September 2009.
- [94] Rijke, B d: *A frameshift polymorphism in P2X5 elicits an allogeneic cytotoxic T lymphocyte response associated with remission of chronic myeloid leukemia*. *Journal of Clinical Investigation*, 115(12):3506–3516, Dezember 2005.
- [95] Greiner, J, Bullinger, L, Guinn, B a, Dohner, H und Schmitt, M: *Leukemia-Associated Antigens Are Critical for the Proliferation of Acute Myeloid Leukemia Cells*. *Clinical Cancer Research*, 14(22):7161–7166, November 2008.

- [96] Taverna, P, Liu, L, Hanson, A J, Monks, A und Gerson, S L: *Characterization of MLH1 and MSH2 DNA mismatch repair proteins in cell lines of the NCI anticancer drug screen*. Cancer chemotherapy and pharmacology, 46(6):507–516, 2000.
- [97] Matheson, Elizabeth C und Hall, Andrew G: *Assessment of mismatch repair function in leukaemic cell lines and blasts from children with acute lymphoblastic leukaemia*. Carcinogenesis, 24(1):31–38, Januar 2003.
- [98] Adachi, Noritaka, So, Sairei, Iizumi, Susumu, Nomura, Yuji, Murai, Kyoko, Yamakawa, Chie, Miyagawa, Kiyoshi und Koyama, Hideki: *The Human Pre-B Cell Line Nalm-6 Is Highly Proficient in Gene Targeting by Homologous Recombination*. DNA and Cell Biology, 25(1):19–24, Januar 2006.
- [99] Findeisen, P: *T25 Repeat in the 3' Untranslated Region of the CASP2 Gene: A Sensitive and Specific Marker for Microsatellite Instability in Colorectal Cancer*. Cancer research, 65(18):8072–8078, September 2005.
- [100] Garbe, Yvette, Maletzki, Claudia und Linnebacher, Michael: *An MSI Tumor Specific Frameshift Mutation in a Coding Microsatellite of MSH3 Encodes for HLA-A0201-Restricted CD8+ Cytotoxic T Cell Epitopes*. PloS one, 6(11):e26517, November 2011.
- [101] Lengauer, C, Kinzler, K W und Vogelstein, B: *Genetic instabilities in human cancers*. Nature, 396(6712):643–649, Dezember 1998.
- [102] Thibodeau, S N, French, A J, Cunningham, J M, Tester, D, Burgart, L J, Roche, P C, McDonnell, S K, Schaid, D J, Vockley, C W, Michels, V V, Farr, G H und O'Connell, M J: *Microsatellite instability in colorectal cancer: different mutator phenotypes and the principal involvement of hMLH1*. Cancer research, 58(8):1713–1718, April 1998.
- [103] Banerjea, Ayan, Ahmed, Shafi, Hands, Rebecca E, Huang, Fei, Han, Xia, Shaw, Peter M, Feakins, Roger, Bustin, Stephen A und Dorudi, Sina: *Colorectal cancers with microsatellite instability display mRNA expression signatures characteristic of increased immunogenicity*. Molecular cancer, 3(1):21, August 2004.
- [104] Banerjea, Ayan, Bustin, Stephen A und Dorudi, Sina: *The immunogenicity of colorectal cancers with high-degree microsatellite instability*. World J Surg Oncol, 3(1):26, Mai 2005.
- [105] Bocsi, J und Zaladni, A: *Establishment and long-term xenografting of human pancreatic carcinomas in immunosuppressed mice: changes and stability in morphology, DNA ploidy*

- and proliferation activity*. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 125(1):9–19, 1999.
- [106] Leite, Marina, Corso, Giovanni, Sousa, Sónia, Milanezi, Fernanda, Afonso, Luís P, Henrique, Rui, Soares, José Manuel, Castedo, Sérgio, Carneiro, Fátima, Roviello, Franco, Oliveira, Carla und Seruca, Raquel: *MSI phenotype and MMR alterations in familial and sporadic gastric cancer*. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 128(7):1606–1613, Juni 2010.
- [107] Wang, J, Sun, L, Myeroff, L, Wang, X, Gentry, L E, Yang, J, Liang, J, Zborowska, E, Markowitz, S und Willson, J K: *Demonstration that mutation of the type II transforming growth factor beta receptor inactivates its tumor suppressor activity in replication error-positive colon carcinoma cells*. *Journal of Biological Chemistry*, 270(37):22044–22049, September 1995.
- [108] Rampino, N, Yamamoto, H, Ionov, Y, Li, Y, Sawai, H, Reed, J C und Perucho, M: *Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype*. *Science (New York, N.Y.)*, 275(5302):967–969, Februar 1997.
- [109] Shimizu, Yosuke, Ikeda, Satoshi, Fujimori, Masahiko, Kodama, Shinya, Nakahara, Masahiro, Okajima, Masazumi und Asahara, Toshimasa: *Frequent alterations in the Wnt signaling pathway in colorectal cancer with microsatellite instability*. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 33(1):73–81, Januar 2002.
- [110] Dihlmann, Susanne, Kloor, Matthias, Fallsehr, Christine und Knebel Doeberitz, Magnus von: *Regulation of AKT1 expression by beta-catenin/Tcf/Lef signaling in colorectal cancer cells*. *Carcinogenesis*, 26(9):1503–1512, September 2005.
- [111] Woerner, Stefan M, Kloor, Matthias, Mueller, Annegret, Rueschoff, Josef, Friedrichs, Nicolaus, Buettner, Reinhard, Buzello, Moriz, Kienle, Peter, Knaebel, Hanns Peter, Kunstmann, Erdmute, Pagenstecher, Constanze, Schackert, Hans K, Möslein, Gabriela, Vogelsang, Holger, Knebel Doeberitz, Magnus von und Gebert, Johannes F: *Microsatellite instability of selective target genes in HNPCC-associated colon adenomas*. *Oncogene*, 24(15):2525–2535, Februar 2005.
- [112] Duval, Alex, Reperant, Maryline und Hamelin, Richard: *Comparative analysis of mutation frequency of coding and non coding short mononucleotide repeats in mismatch repair deficient colorectal cancers*. *Oncogene*, 21(52):8062–8066, November 2002.

- [113] Kim, Nam Gyun, Rhee, Hwanseok, Li, Long Shan, Kim, Hyunki, Lee, Jin Sung, Kim, Joo Hang, Kim, Nam Kyu und Kim, Hoguen: *Identification of MARCKS, FLJ11383 and TAF1B as putative novel target genes in colorectal carcinomas with microsatellite instability*. *Oncogene*, 21(33):5081–5087, August 2002.
- [114] Kodera, T, Kohno, T, Takakura, S, Morishita, K, Hamaguchi, H, Hayashi, Y, Sasaki, T und Yokota, J: *Microsatellite instability in lymphoid leukemia and lymphoma cell lines but not in myeloid leukemia cell lines*. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 26(3):267–269, November 1999.
- [115] Ham, Maria Francisca, Takakuwa, Tetsuya, Luo, Wen Juan, Liu, Angen, Horii, Akira und Aozasa, Katsuyuki: *Impairment of double-strand breaks repair and aberrant splicing of ATM and MRE11 in leukemia-lymphoma cell lines with microsatellite instability*. *Cancer Science*, 97(3):226–234, März 2006.
- [116] Loos, R J F und Bouchard, C: *FTO: the first gene contributing to common forms of human obesity*. *Obesity Reviews*, 9(3):246–250, Mai 2008.
- [117] Kenmochi, N, Suzuki, T, Uechi, T, Magoori, M, Kuniba, M, Higa, S, Watanabe, K und Tanaka, T: *The human mitochondrial ribosomal protein genes: mapping of 54 genes to the chromosomes and implications for human disorders*. *Genomics*, 77(1-2):65–70, September 2001.
- [118] O'Brien, T W, Fiesler, S E, Denslow, N D, Thiede, B, Wittmann-Liebold, B, Mougey, E B, Sylvester, J E und Graack, H R: *Mammalian mitochondrial ribosomal proteins (2). Amino acid sequencing, characterization, and identification of corresponding gene sequences*. *Journal of Biological Chemistry*, 274(51):36043–36051, Dezember 1999.
- [119] Meijer, Tineke W H, Hoogerbrugge, Nicoline, Nagengast, Fokko M, Ligtenberg, Marjolein J L und Krieken, J Han J M van: *In Lynch syndrome adenomas, loss of mismatch repair proteins is related to an enhanced lymphocytic response*. *Histopathology*, 55(4):414–422, Oktober 2009.
- [120] Drescher, Kristen M, Sharma, Poonam und Lynch, Henry T: *Current hypotheses on how microsatellite instability leads to enhanced survival of Lynch Syndrome patients*. *Clinical & developmental immunology*, 2010(6):170432–13, 2010.
- [121] Deschoolmeester, Vanessa, Baay, Marc, Van Marck, Eric, Weyler, Joost, Vermeulen, Peter, Lardon, Filip und Vermorken, Jan B: *Tumor infiltrating lymphocytes: an intriguing player in the survival of colorectal cancer patients*. *BMC immunology*, 11(1):19, 2010.

- [122] Tougeron, David, Fauquembergue, Emilie, Rouquette, Alexandre, Le Pessot, Florence, Sesboüé, Richard, Laurent, Michèle, Berthet, Pascaline, Mauillon, Jacques, Di Fiore, Frédéric, Sabourin, Jean Christophe, Michel, Pierre, Tosi, Mario, Frebourg, Thierry und Latouche, Jean Baptiste: *Tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal cancers with microsatellite instability are correlated with the number and spectrum of frameshift mutations*. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 22(9):1186–1195, September 2009.
- [123] Ishikawa, Toshiaki, Fujita, Tomonobu, Suzuki, Yuriko, Okabe, Satoshi, Yuasa, Yasuhito, Iwai, Takehisa und Kawakami, Yutaka: *Tumor-specific immunological recognition of frameshift-mutated peptides in colon cancer with microsatellite instability*. *Cancer research*, 63(17):5564–5572, September 2003.
- [124] Parker, K C, Bednarek, M A und Coligan, J E: *Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains*. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 152(1):163–175, Januar 1994.
- [125] Rammensee, H, Bachmann, J, Emmerich, N P, Bachor, O A und Stevanović, S: *SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs*. *Immunogenetics*, 50(3-4):213–219, November 1999.
- [126] Koesters, Robert, Linnebacher, Michael, Coy, Johannes F, Germann, Anja, Schwitalle, Yvette, Findeisen, Peter und Knebel Doeberitz, Magnus von: *WT1 is a tumor-associated antigen in colon cancer that can be recognized by in vitro stimulated cytotoxic T cells*. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 109(3):385–392, 2004.
- [127] Sette, A, Vitiello, A, Reheman, B, Fowler, P, Nayersina, R, Kast, W M, Melief, C J, Oseroff, C, Yuan, L, Ruppert, J, Sidney, J, Guercio, M F del, Southwood, S, Kubo, R T, Chesnut, R W, Grey, H M und Chisari, F V: *The relationship between class I binding affinity and immunogenicity of potential cytotoxic T cell epitopes*. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 153(12):5586–5592, Dezember 1994.
- [128] Maletzki, Claudia, Stier, Saskia und Linnebacher, Michael: *Microsatellite instability in hematological malignancies: Hypermutation vs. immune control-who is challenging who?* *OncoImmunology*, 2(8):e25419, August 2013.

A Thesen

1. Mismatch-repair-defiziente Leukämie- und Lymphomzelllinien (L/L-Zelllinien) weisen eine hohe Zahl an Basenpaarungsfehlern in DNA-Mikrosatelliten (Mikrosatelliten-Instabilität, MSI) auf.
2. MSI wird in L/L-Zelllinien ungleich häufiger durch einen Ausfall des MMR-Gens hMSH2 als durch Ausfall von hMLH1 verursacht.
3. Mehrere in L/L-Zellen hochfrequent mutierte kodierende Mikrosatelliten (coding microsatellites, cMS) liegen in direkt oder indirekt an der Tumorentstehung beteiligten Genen, was eine Beteiligung der MSI an der Tumorentstehung denkbar scheinen lässt.
4. In Zellkultur kommt es im Laufe der der Zeit zu einer Verstärkung der MSI, was auf eine fehlende Kontrolle durch das Immunsystem zurückzuführen sein könnte.
5. Durch Leserasterverschiebungen in cMS kommt es zur Bildung von verkürzten Frameshift-Neopeptiden (FSP), welche von den betroffenen Zellen als körperfremd erkannt und in einer HLA-A201-restriktiven Weise an der Zelloberfläche präsentiert werden.
6. Entsprechend FSP-spezifisch differenzierte zytotoxische T-Zellen können solche Zellen *in vitro* erkennen und zerstören.
7. FSP stellen daher tumorspezifische Antigene für MSI-positive hämatologische Erkrankungen dar und könnten als Grundlage für eine immunologische Tumorstoffe dienen.
8. Eine L/L-Zelle kann mehrere FSP präsentieren, was die immunogene Wirkung erhöhen und einer Resistenzbildung entgegenwirken könnte.
9. Das Mutationsprofil MSI-positiver L/L-Zelllinien weist Übereinstimmungen mit dem MSI-positiver kolorektalen Karzinome und Karzinomzelllinien auf, so daß eine polyvalente Vakzinierung gegen mehrere Tumorentitäten zugleich möglich scheint.
10. Weitere Studien sowohl *in vitro* als auch *in vivo* sind notwendig, um weitere immunogene Frameshift-Mutationen in Zelllinien und primärem Tumormaterial verschiedener Malignome zu identifizieren.

B Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Bei der Auswahl und Auswertung folgenden Materials haben mir andere Personen weder entgeltlich noch unentgeltlich geholfen.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder anderer Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich versichere ehrenwörtlich, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe.

Münster, den 22. Januar 2016

Fabian Schmidt

C Lebenslauf

Persönliche Daten

| | |
|---------------------|----------------------------|
| Name | Fabian Schmidt |
| Geburtsdatum | 9.2.1979 |
| Geburtsort | Haan |
| Staatsangehörigkeit | deutsch |
| Familienstand | verheiratet |
| Anschrift | Nordstr. 32, 48149 Münster |

Schulbildung

| | |
|-----------|--|
| 1985–1988 | Grundschule Wilbeck, Erkrath |
| 1988–1993 | Gymnasium Hochdahl, Erkrath |
| 1994–1998 | Internationale Gesamtschule Heidelberg |

Zivildienst

| | |
|-----------|---|
| 1998–1999 | Frauenklinik der Universität Heidelberg |
|-----------|---|

Hochschulbildung

| | |
|-----------|--|
| 1999–2000 | Studium der Rechtswissenschaft an der Ruprecht-Karls-Universität zu Heidelberg |
| 2000–2007 | Studium der Humanmedizin an der Ruprecht-Karls-Universität zu Heidelberg |

Ärztliche Tätigkeit

| | |
|--------------|--|
| seit 11/2007 | Assistenzarzt für Chirurgie Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie Universitätsklinikum Münster |
|--------------|--|