

Rolf Warta

Dr. sc. hum.

## **Identifizierung tumorassoziierter Antigene in Kopf-Hals-Tumoren**

Hals-Nasen-Ohrenheilkunde

Betreuerin: Prof. Dr. rer. nat. Christel Herold-Mende

Jährlich werden weltweit mehr als 500.000 Fälle von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs (*Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*, HNSCC) diagnostiziert. Diese zeichnen sich durch eine große phänotypische und biologische Heterogenität aus. Trotz Fortschritten in Chirurgie, Strahlen- und Chemotherapie stagnieren die 5-Jahres-Überlebensraten bei ca. 50 %. Dies verdeutlicht die Notwendigkeit, neue und effektivere Therapieoptionen, wie z.B. Immuntherapien zu entwickeln. Für Letztere konnten kürzlich im Rahmen von klinischen Phase-III Studien erstmals Wirksamkeitsnachweise bei der Behandlung von Prostata-Karzinomen und Melanomen erbracht werden. Eine der wichtigsten Komponenten zellbasierter Immuntherapien bilden tumorassoziierte Antigene (TAAs), die einerseits immunogen und damit fähig zur Auslösung von T-Zell-Antworten sind und andererseits nicht nur häufig in Patiententumoren auftreten, sondern auch von einem möglichst großen Teil der Tumorzellen exprimiert werden. Da in HNSCC bisher nur wenige TAAs beschrieben wurden, sollten in der vorliegenden Arbeit Zielstrukturen spontaner Immunantworten identifiziert werden. Weiterhin sollte anhand von Expressions- und Überlebensanalysen deren Eignung als Zielmolekül künftiger Immuntherapien näher charakterisiert werden.

Die Identifizierung immunogener TAAs erfolgte mithilfe der in der Arbeitsgruppe entwickelten PF2D-ELISPOT-Methode. Diese stellt eine Kombination aus Proteomics-basierter Auftrennung von im Tumor enthaltenen Proteinen und T-Zell-Aktivierungsanalysen dar. Eine Hypothesenliste potentiell immunogener Antigene wurde massenspektrometrisch durch die Analyse immunogener Proteinfractionen generiert. Die entsprechend durchgeführte Untersuchung des Oropharynxkarzinoms HNO278 ergab eine Kandidatenliste von 562 Proteinen. Die Auswahl vielversprechender Kandidaten für weiterführende Analysen richtete sich danach, inwieweit diese mit der Unreife von Tumorzellen assoziiert sein könnten bzw. an deren fortgeschrittener Differenzierung beteiligt zu sein scheinen. So sollten Immunantworten gegen wesentliche Tumorkompartimente erfasst werden. Neben CRABP2, FABP5, PRDX1, XAGE1b, TNC und CD44 wurde zusätzlich CSPG4 in die Untersuchungen eingeschlossen, da es in anderen Tumorentitäten bereits die entsprechenden Voraussetzungen erfüllte.

Für die Validierung ihrer Immunogenität mittels IFN- $\gamma$ -ELISPOT wurden pro Kandidatengen mehrere synthetisch hergestellte Peptide verwendet, die entweder das gesamte Protein abdeckten oder im Falle zu großer Proteine die als besonders immunogen vorhergesagten Bereiche der Kandidatenproteine widerspiegelten. Für alle zuvor genannten Kandidaten wurde mindestens ein Peptid identifiziert, das von T-Zellen desselben Patienten erkannt wurde. Die Immunogenität derselben Peptide wurden am Blut von weiteren HNSCC-Patienten (n=10-24) getestet. Die stärksten und häufigsten Immunantworten wurden wie folgt in absteigender Reihenfolge beobachtet: FABP5 > XAGE1b > CRABP2 > PRDX1 > TNC > CSPG4, CD44. Insbesondere FABP5, XAGE1b, CRABP2 und PRDX1 zeigten eine deutlich höhere Immunogenität als die zum Vergleich herangezogenen klassischen TAAs (EGFR, MUC1, HER2/neu und p53). Da die TNC-, CSPG4- und CD44-spezifischen Peptide nur einen kleinen Teil des Proteins abdeckten, müssen weiterführende Untersuchungen zur abschließenden Beurteilung ihrer Immunogenität durchgeführt werden. XAGE1b wurde aufgrund von spontanen Immunantworten in gesunden Spendern von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen.

Die Expression der übrigen Kandidatengene wurde mithilfe mehrerer öffentlicher HNSCC Microarray Datensätze (n=22, n=57, n=167) sowie anhand eines eigenen Tumorkollektivs (n=40) mittels qRT-PCR im Vergleich zu Normalschleimhäuten und dysplastischen Schleimhäuten analysiert. Die stärkste Überexpression wurde im Tumor für CSPG4 und TNC gefolgt von FABP5 und CD44 beobachtet. Hingegen wurden CRABP2 und PRDX1 eher gleichbleibend und je nach Datensatz sogar abnehmend exprimiert. Die Überexpression von FABP5 und CSPG4 sowie die gleichbleibende Expression von CRABP2 ließen sich mittels Immunhistochemie auf Proteinebene anhand eines Gewebechips bestätigen. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte FABP5- und CSPG4-Expression in HNSCC mit einer signifikant schlechteren Prognose einhergeht, was die klinische Relevanz dieser Antigene weiter unterstreicht. Gerade für CSPG4 stellt dies die erste umfangreiche Analyse in HNSCC dar. Um die Ursachen der beobachteten Überexpression und Überlebensassoziation aufzuklären, wurden abschließend deskriptive Promotor-Methylierungsanalysen des CSPG4-Gens mittels MassARRAY durchgeführt. Diese ergaben einen signifikanten Zusammenhang zwischen erhöhter CSPG4-Protein-Expression und einer Promotor-Hypomethylierung. Ebenso konnte eine signifikante Korrelation zwischen schlechtem Überleben und Promotor-Hypomethylierung nachgewiesen werden. Trotz wenig überzeugender Immunogenitätsdaten legt die Regulation der Genexpression über mehrere Ebenen durch epigenetische

Modifikationen auf einen vielversprechenden Einsatz von CSPG4-Expression und Methylierung als zukünftiger Biomarker in HNSCC nahe.

Insgesamt gelang es mithilfe der PF2D-ELISPOT-Methode mehrere neue und vielversprechende TAAs in HNSCC zu identifizieren, die sich durch erhöhte Immunogenität und Überexpression in diesen Tumoren auszeichnen. In weiterführenden präklinischen Untersuchungen sollte ihre Eignung für zukünftige Immuntherapien von HNSCC substantiell erhärtet werden.