

DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde
der Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

vorgelegt von
Diplom-Biologin **Saskia Rösch**
aus Heidelberg, Deutschland

Tag der mündlichen Prüfung: _____

Identifizierung Tumorstroma-assoziiierter T-Zellantigene in Plattenepithelkarzinomen des oberen Aerodigestivtrakts

**GUTACHTER: Prof. Dr. Philipp Beckhove
Prof. Dr. Christel Herold-Mende**

*Allen Krebspatienten,
und all denjenigen, die einen geliebten Menschen
an diese Krankheit verloren haben.*

I. INHALTSVERZEICHNIS

I. INHALTSVERZEICHNIS I

II. ZUSAMMENFASSUNG IV

III. ABSTRACT VI

IV. AKRONYME VII

1 EINLEITUNG 1

1.1 KREBSERKRANKUNGEN 1

1.2 MALIGNNE NEOPLASMIEN DES HALS-, NASEN- UND OHRENBEREICHS 2

 1.2.1 *Epidemiologie von HNSCC* 2

 1.2.2 *Klinische Symptomatik, Diagnostik und Therapieoptionen von HNSCC* 3

 1.2.3 *Risikofaktoren und Ätiologie* 5

 1.2.4 *Pathogenese und Molekularbiologie unter Berücksichtigung des HPV-Status* 6

1.3 IMMUNOLOGIE 7

 1.3.1 *Das Immunsystem* 7

 1.3.2 *T-Zellvermittelte Immunität* 7

 1.3.3 *Tumorimmunologie* 10

 1.3.4 *Immunologie des Tumorstromas* 13

1.4 IMMUNOTHERAPIE 18

 1.4.1 *Impfantigene und Vakzinierungsstrategien* 19

 1.4.2 *CAFs als (immun-)therapeutische Zielstrukturen* 21

1.5 ZIELSETZUNG 23

2 MATERIAL 24

2.1 GERÄTE 24

2.2 VERBRAUCHSMATERIALIEN 25

2.3 CHEMIKALIEN 26

2.4 ZELLKULTURBASISMEDIE, PUFFER UND ZUSÄTZE 27

2.5 PUFFER, LÖSUNGEN UND MEDIEN 27

2.6 KITS 30

2.7 ANTIKÖRPER 30

 2.7.1 *Primärantikörper für die Immunhistochemie* 30

 2.7.2 *Isotypkontrollen für die Immunhistochemie und Immunfluoreszenz* 31

 2.7.3 *Fluorochrom-konjugierte Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenz* 31

 2.7.4 *FACS-Antikörper* 31

 2.7.5 *Antikörper für den BeadSort* 32

 2.7.6 *Antikörper für den IFN- γ -ELISPOT-Assay* 32

2.8 SYNTHETISCH HERGESTELLTE LANGE PEPTIDE 32

2.9 BIOLOGISCHES MATERIAL 34

 2.9.1 *Ethikvotum* 34

 2.9.2 *Studienkollektive* 34

 2.9.3 *Primäre humane Zelllinien* 36

 2.9.4 *Software* 37

 2.9.5 *Datenbanken* 38

3	METHODEN	39
3.1	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	39
3.1.1	<i>Kultivierungsbedingungen</i>	39
3.1.2	<i>Kultivierung adhärenter Zellkulturen</i>	39
3.1.3	<i>Herstellung von Zellpellets</i>	40
3.1.4	<i>Kryokonservierung und Inkulturnahme</i>	40
3.1.5	<i>Bestimmung der Lebendzellzahl</i>	40
3.2	IMMUNHISTOLOGIE	41
3.2.1	<i>Kryokonservierung von humanen Gewebeproben</i>	41
3.2.2	<i>Anfertigung von Kryo-Gewebedünnschnitten</i>	41
3.2.3	<i>Hämatoxylin-Eosin-Färbung</i>	42
3.2.4	<i>Immunhistochemische Färbungen</i>	42
3.2.5	<i>Herstellung von Multiwell-Objektträgern für die Immunzytochemie</i>	43
3.2.6	<i>Mehrfach-Immunfluoreszenzfärbung von Multiwell-Objektträgern</i>	43
3.3	LASER CAPTURE MICRODISSECTION (LCM)	44
3.3.1	<i>Anfertigung von Kryo-Gewebedünnschnitten für die LCM</i>	45
3.3.2	<i>Kresylviolett-Färbung</i>	46
3.3.3	<i>Laser Capture Microdissektion mittels PALM MicroBeam System</i>	46
3.4	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	47
3.4.1	<i>Zweidimensionale Proteinfractionierung mittels ProteomeLab™ PF2D System</i>	47
3.4.2	<i>HLA-basierte Peptidprädiktion und Peptidsynthese</i>	52
3.5	IMMUNBIOLOGISCHE METHODEN	53
3.5.1	<i>Depletion von Tumorzellen mittels magnetischer Zellsortierung</i>	53
3.5.2	<i>Isolierung von humanen mononukleären Zellen aus peripherem Blut</i>	54
3.5.3	<i>Untersuchung antigenspezifischer T-Zellantworten</i>	54
3.5.4	<i>Durchflusszytometrische Zellanalysen</i>	58
3.6	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	59
3.6.1	<i>RNA-Extraktion und DNase-Verdau</i>	59
3.6.2	<i>Microarray-Analysen</i>	60
3.7	STATISTISCHE DATENAUSWERTUNG UND VISUALISIERUNG	60
4	ERGEBNISSE	62
4.1	VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN VON TUMOR UND TUMORSTROMA BEI DER INDUKTION SPONTANER T-ZELLIMMUNANTWORTEN	62
4.1.1	<i>Spontane T-Zellimmunantworten gegen HNSCC-Tumorlysate</i>	63
4.1.2	<i>Charakterisierung der primären HNSCC-Zellkulturen</i>	65
4.1.3	<i>CAFs als potenzielle Zielstrukturen spontaner T-Zellantworten</i>	73
4.2	IDENTIFIZIERUNG CAF-ASSOZIIERTER ANTIGENE	74
4.2.1	<i>PF2D-Proteomfractionierung</i>	75
4.2.2	<i>Massenspektrometrische Proteinidentifizierung der immunogenen 2D-Fractionen</i>	77
4.3	AUSWAHL POTENZIELLER CAF-ASSOZIIERTER T-ZELLANTIGENE	78
4.3.1	<i>Erstellung eines Microarray-Datensatzes zur Anreicherung CAF-assoziiertes Gene</i>	78
4.3.2	<i>Intersektionsbasierter Filterprozess zur Auswahl CAF-assoziiertes T-Zellantigene</i>	83
4.4	PEPTIDSYNTHESE UND IMMUNOGENITÄTSANALYSE AUSGEWÄHLTER CAF-ANTIGENE IN DEN URSPRUNGSPATIENTEN	86
4.4.1	<i>Prädiktion HLA-restringierter Peptide</i>	86
4.4.2	<i>Immunogenitätsanalyse ausgewählter Peptide in den Ursprungspatienten</i>	87

4.5	T-ZELLIMMUNANTWORTEN IMMUNOGENER CAF-ASSOZIIERTER ANTIGENE IN GESUNDEN INDIVIDUEN UND WEITEREN HNSCC-TUMORPATIENTEN	89
4.5.1	<i>Untersuchung von T-Zellantworten gegen CAF-Antigene in gesunden Individuen.....</i>	89
4.5.2	<i>Untersuchung von T-Zellimmunantworten gegen CAF-assoziierte Peptide in weiteren HNSCC-Tumorpatienten</i>	92
4.6	CHARAKTERISIERUNG DER CAF-ASSOZIIERTEN T-ZELLANTIGENE	94
4.6.1	<i>mRNA-Expressionsanalyse in HNSCC-Tumorgeweben & Normalschleimhautproben ...</i>	95
4.6.2	<i>Proteinexpressionsanalysen von DNAJB11, NANS, HIST2H2AC, THBS2 und HIST2H2AC in dysplasiefreier Normalschleimhaut und HNSCC-Tumorgeweben.....</i>	98
5	DISKUSSION	103
5.1	KREBS-ASSOZIIERTE FIBROBLASTEN ALS ZIELSTRUKTUR FÜR EINE T-ZELL-BASIERTE IMMUNTHERAPIE.....	105
5.1.1	<i>Verifizierung des in vitro-Aktivierungsstatus der verwendeten CAF-Kulturen</i>	105
5.1.2	<i>Induktion von spontanen T-Zellantworten durch CAF-assoziierte Antigene.....</i>	107
5.1.3	<i>Die Rolle von FAP bei der Induktion spontaner T-Zellantworten</i>	108
5.2	ANREICHERUNG UND IDENTIFIZIERUNG NEUER CAF-ASSOZIIERTER ANTIGENE.....	109
5.2.1	<i>Anreicherung über die PF2D-ELISPOT-Methode</i>	109
5.2.2	<i>Filterprozess zur Anreicherung CAF-assoziiert exprimierter Strukturen</i>	111
5.3	EIGNUNG DER IDENTIFIZIERTEN KANDIDATEN ALS NEUE CAF-TAS.....	114
5.3.1	<i>Immunogenität, Expression und physiologische Funktion der Antigene</i>	115
6	AUSBLICK	124
7	DANKSAGUNG	125
8	LITERATURVERZEICHNIS.....	127
9	ANHANG	140
9.1	ABBILDUNGEN.....	140
9.2	TABELLEN	143

II. ZUSAMMENFASSUNG

Epitheliale Tumore zeichnen sich histopathologisch durch ein substanzielles, desmoplastisches Tumorstroma aus, welches die Tumorzellinseln umgibt. Die Hauptzellpopulation dieses Tumorstromas bilden Krebs-assoziierte Fibroblasten (CAFs). Diese zeichnen sich durch eine permanente Aktivierung aus, welche mit der Expression eines CAF-assoziierten Phänotyps einhergeht. Inwieweit dieser Phänotyp in der Lage ist, spontane T-Zellantworten zu induzieren und ob CAFs damit als neue zusätzliche Quelle von T-Zellantigenen dienen können, sollte im Rahmen dieser Dissertation untersucht werden.

Dafür wurde ein neuartiger Ansatz gewählt, der auf der Kombination der PF2D-ELISPOT-Methode mit einem auf Microarraydaten basierenden Filterprozess beruhte. Zunächst wurden Tumorzellen und korrespondierende CAFs aus HNSCC-Tumorgeweben isoliert, charakterisiert und der Aktivierungsstatus der CAFs verifiziert. Mittels IFN- γ -ELISPOT-Assay konnten reaktive T-Zellen sowohl gegen Tumor- als auch gegen CAF-Lysate detektiert und damit bestätigt werden, dass auch CAFs immunogene Strukturen aufweisen. Mittels der PF2D-ELISPOT-Methode wurde das komplexe CAF-Proteom dann stufenweise reduziert und parallel eine Anreicherung der immunogenen Bestandteile bewirkt. Massenspektrometrisch wurden 852 Proteine als potenzielle Zielstrukturen für die T-Zellantworten identifiziert. Über Intersektionsstudien, die auf den Microarray-Expressionsdaten eines *in situ*- sowie eines *in vitro*-Datensatzes beruhten, wurden gezielt 36 CAF-spezifische Kandidaten herausgefiltert, deren immunogenes Potenzial dann über synthetische Peptide in einem IFN- γ -ELISPOT-Assay verifiziert wurde. Insgesamt konnten so 15 neue CAF-assoziierte T-Zellantigene identifiziert werden. Fünf dieser Peptide wurden ausgeschlossen, da sie auch in tumorfreien Individuen T-Zellantworten auslösten. Die Immunogenität der verbleibenden zehn Peptide wurde in einer Kohorte von 19 HNSCC-Tumorpatienten untersucht. Dabei zeigte das TXNDC17-Peptid mit einer Ansprechrate von fast 40 % die häufigste und zugleich die stärkste Immunantwort, gefolgt von DNAJB11 und NANS mit 21 % sowie von THBS2 und HIST2H2AC mit 16 %. Expressionsuntersuchungen ergaben für DNAJB11, NANS, TXNDC17 und THBS2 verglichen mit den Normalschleimhautproben erhöhte mRNA- sowie Proteinexpressionslevel im Tumor. Zudem konnte über immunhistochemische Färbungen eine Stroma-assoziierte Expression der Kandidaten nachgewiesen werden. Hingegen wurde HIST2H2AC in allen untersuchten Normalschleimhautproben nachgewiesen.

Insgesamt ist es uns gelungen, mehrere vielversprechende CAF-assoziierte Antigene zu identifizieren, die eine Tumorstroma-assoziierte Expression aufweisen (i), T-Zellen aus der Peripherie von Tumorpatienten aktivieren (ii), jedoch keine Reaktivität in gesunden Spendern hervorrufen (iii) und damit neben FAP immunogene Strukturen des Stromas darstellen (iv). Inwieweit sich diese neu identifizierten Antigene für immuntherapeutische Anwendungen in HNSCC eignen, müssen weiterführende präklinische Untersuchungen zeigen.

III. ABSTRACT

Epithelial-derived tumors are histopathologically characterized by a desmoplastic stromal compartment which surrounds the malignant cancer cells. This tumor stroma mainly consists of cancer-associated fibroblasts (CAFs) which are characterized by an irreversibly activated phenotype that is presumed to be associated with the expression of CAF-associated antigens.

Here, we focused on the identification of immunogenic CAF-associated T cell target antigens (CAF-TAs) using a novel approach which combines the PF2D-ELISPOT-method with a microarray data-based filter process. CAFs and corresponding tumor cells (TUCs) were isolated from freshly resected HNSCC tumor tissues using tissue explantation method following several in depth characterization steps including verification of the CAF activation status. We detected significant T cell (TC) responses against CAF and TUC lysates. Interestingly, the amount of CAF-reactive TCs was comparable to TUC-reactive TCs, indicating that CAF-TAs might also play a role in tumor immune responses. By applying the PF2D-ELISPOT-method CAF proteome was fractionated and in parallel enriched for immunogenic proteins. Subsequent mass spectrometric analysis of immunogenic fractions resulted in 852 potential immunogenic candidates. The intersection-based filter process resulted in 36 potential CAF-associated antigens. Immunogenicity of candidates was verified by the use of long synthetic peptides in a peptide ELISPOT. As a result, we have identified 15 novel CAF-associated target antigens of spontaneous TC responses. In a cohort of nine healthy individuals and 19 HNSCC patients we have shown that five (DNAJB11, NANS, HIST2H2AC, TXNDC17, THBS2) of this newly identified CAF-TAs triggered TC responses in 16 to 40 % of cancer patients, whereas no reactive TCs were detected in healthy individuals.

Furthermore, expression analysis of two *in situ* data sets confirmed overexpression of these antigens in HNSCC tissues as compared to dysplasia-free oral mucosa samples. Immunohistochemical staining further corroborated a stroma-associated expression which was in case of THBS2 and DNAJB11 even limited to the stromal compartment. In contrast, epithelial cells and stromal cells of normal mucosa showed a strong HIST2H2AC expression.

In conclusion, we have successfully shown that CAFs might serve as additional source of antigens, since we identified a set of novel CAF-TAs that are highly immunogenic and expressed in the stromal compartment of HNSCC tumors.

IV. AKRONYME

Tabelle 1: Akronyme

Abkürzung	Bezeichnung
%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm (10^{-6} Gramm)
µl	Mikroliter (10^{-6} Liter)
µm	Mikrometer (10^{-6} Meter)
ABC	<i>Avidin Biotin Complex</i> (Avidin-Biotin-Komplex)
AdV	Adenovirus
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
APC	<i>Antigen Presenting Cell</i> (antigenpräsentierende Zelle)
BCs	<i>B cells</i> (B-Zellen)
BCA	<i>Bicinchoninic Acid</i> (Bicinchoninsäure)
BRCA 1/2	<i>Breast Cancer 1/2</i>
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CAFs	<i>Cancer-associated Fibroblasts</i> (Krebs-assoziierte Fibroblasten)
CAF-TAs	<i>CAF-associated Target Antigens</i> (Zielantigene Krebs-assoziiierter Fibroblasten)
CAR	<i>Chimeric Antigen Receptor</i> (chimärer Antigenrezeptor)
CCND1	<i>Cyclin D1</i>
CDKN2A	<i>Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 2A</i>
CLDN12	<i>Claudin 12</i>
CLF1	<i>Cofilin 1</i>
CMV	Cytomegalovirus
cm ³	Kubikzentimeter
COL	<i>Collagen</i> (Kollagen)
CT	Computertomografie
CTA	<i>Cancer Testis Antigen</i>
CTL	<i>Cytotoxic T Lymphocytes</i> (zytotoxische T-Zellen)
CTLA-4	<i>Cytotoxic T Lymphocyte-associated Antigen 4</i>
CXCL	<i>C-X-C motif chemokine</i>
DC	<i>Dendritic Cell</i> (Dendritische Zelle)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DNAJB11	<i>DnaJ Heat Shock Protein Family (Hsp40) Member B11</i>
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i> (Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung)
DSG1	Desmoglein 1
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen

Abkürzung	Bezeichnung
EBV	Epstein-Barr Virus
ECM	<i>Extracellular Matrix</i> (Extrazellulärmatrix)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i> (epidermaler Wachstumsfaktor)
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> (epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor)
EMT	<i>Epithelial-to-Mesenchymal Transition</i> (Epithel-mesenchymale Transition)
EndTM	<i>Endothelial-to-Mesenchymal Transition</i> (Endothel-mesenchymale Transition)
EPCAM	<i>Epithelial Cell Adhesion Molecule</i> (epitheliales Zelladhäsionsmolekül)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FABP5	<i>Fatty Acid Binding Protein 5</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated Cell Sorting</i> (Durchflusszytometrie)
FAFs	Fibrose-assoziierte Fibroblasten
FAP	<i>Fibroblast Activation Protein</i>
FasL	<i>Fas Cell Surface Death Receptor Ligand</i>
FasR	<i>Fas Cell Surface Death Receptor</i>
FBN1	<i>Fibronectin 1</i>
FKS	Fötales Kälberserum
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
FGFR 1/2/3	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor 1/2/3</i>
FOXP3	<i>Forkhead-Box-Protein P3</i>
FSC	<i>Forward Scatter</i> (Vorwärtsstreulicht)
FSP1	<i>Fibroblast-specific Protein 1 (S100A4)</i>
g	Erdbeschleunigung ($g = 9,81\text{m/s}^2$)
GEO	<i>Gene Expression Omnibus</i>
GO	<i>Gene Ontology</i>
GSTO1	<i>Glutathione S-Transferase Omega 1</i>
GZMA	Granzym A
h	<i>Hour</i> (Stunde)
H2AFZ	<i>H2A Histone Family Member Z</i>
HE	Hämatoxilin-Eosin
HGF	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>
HISS	<i>High Ionic Salt Solution</i>
HIST2H2AC	<i>Histone Cluster 2, H2ac</i>
HLA	<i>Human Leucocyte Antigen</i> (Histokompatibilitätsantigen)
HMW	<i>High Molecular Weight</i>
HNSCC	<i>Head and Neck Squamous Cell Carcinoma</i> (Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinom)
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HPRT1	<i>Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase</i>
HPV	Humanes Papillomavirus

Abkürzung	Bezeichnung
HSP90AA1	<i>Heat Shock Protein 90 kDa Alpha, Class A Member 1</i>
HSP90B1	<i>Heat Shock Protein 90 kDa Beta, Member 1</i>
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IF	Immunfluoreszenzfärbungen
IFN- γ	Interferon gamma
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
KRT	Zytokeratin
LAMA4	Laminin A4
LCM	<i>Laser Capture Microdissection</i> (kontaktfreie Laser-Mikrodissektion)
mAK	monoklonaler Antikörper
MDSC	<i>Myeloid-derived Suppressor Cell</i> (Myeloide Suppressorzelle)
MFI	<i>Mean Fluorescence Intensity</i> (mittlere Fluoreszenzintensität)
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> (Haupthistokompatibilitätskomplex)
min.	Minute
ml	Milliliter (10^{-3} Liter)
mm	Millimeter (10^{-3} Meter)
MMP	Matrixmetalloproteinase
MRT	Magnetresonanztomografie
NANS	<i>N-Acetylneuraminase Synthase</i> (N-Acetylneuraminsäuresynthase)
NCBI	<i>National Center for Biotechnology and Informatics</i>
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
NFs	<i>Normal Gingiva-derived Fibroblast</i> (Normale Gingivafibroblasten)
NG2	<i>Neuron-glia Antigen 2</i>
NK	<i>Natural Killer Cell</i> (Natürliche Killerzelle)
nm	Nanometer (10^{-9} Meter)
NPTN	<i>Neuroplastin</i>
NSCLC	<i>Non-small Cell Lung Cancer</i> (Nichtkleinzelliges Lungenkarzinom)
NSH	Normalschleimhaut
OSCC	<i>Oral Squamous Cell Carcinoma</i>
OT	Objektträger
PAFAH1B3	<i>Platelet Activating Factor Acetylhydrolase 1b Catalytic Subunit 3</i>
PALLD	<i>Palladin</i>
PBMCs	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i> (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (phosphatgepufferte Salzlösung)
PC	<i>Principal Component</i> (Hauptkomponente)
PCA	<i>Principal Component Analysis</i> (Hauptkomponentenanalyse)
PD-1	<i>Programmed Cell Death 1</i>
PDGF	<i>Platelet-derived Growth Factor</i>

Abkürzung	Bezeichnung
PD-L1	<i>Programmed Cell Death Ligand 1</i>
PEN	Polyethylen-Naphtalat
PET	Positronenemissionstomografie
pl	Isoelektrischer Punkt
PIK3CA	<i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, Catalytic Subunit Alpha</i>
PMF	<i>Peptide Mass Fingerprint</i> (Peptidmassenfingerprint)
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
ROIs	<i>Regions of Interest</i>
RPC	<i>Reversed Phase Chromatography</i> (Umkehrphasenchromatografie)
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i> (Mustererkennungsrezeptor)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDF-1	<i>Stromal-derived Factor 1</i>
SEB	Staphylokokken Enterotoxin B
SLP	<i>Synthetic Long Peptides</i> (synthetisch hergestellte lange Peptide)
SSC	<i>Sideward Scatter</i> (Seitwärtsstreulicht)
TA	<i>Tumor Antigen</i> (Tumorantigen)
TAA	<i>Tumor-associated Antigen</i> (Tumor-assoziiertes Antigen)
TACSTD2	<i>Tumor-associated Calcium Signal Transducer 2</i>
TAM	<i>Tumor-associated Macrophage</i> (Tumor-assoziierte Makrophage)
TAP	<i>Transporter-associated with Antigen Processing</i>
TC	<i>T Cell</i> (T-Zelle)
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
TCR	<i>T Cell Receptor</i> (T-Zellrezeptor)
T _{eff}	T-Effektorzelle
TFA	<i>Trifluor Acid</i> (Trifluoressigsäure)
TGF- α	<i>Transforming Growth Factor Alpha</i>
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor Beta</i>
T _H 1	T-Helferzelle Typ 1
T _H 2	T-Helferzelle Typ 2
THBS2	<i>Thrombospondin 2</i>
TLR-L	<i>Toll-like Receptor Ligand</i> (T-Zellrezeptorligand)
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i>
TP53	Tumorprotein 53
T _{reg}	Regulatorische T-Zelle
TSA	<i>Tumor-specific Antigen</i> (Tumor-spezifisches Antigen)
t-SNE	<i>t-distributed Stochastic Neighbour Embedding</i>
TXNDC17	<i>Thioredoxin Domain Containing 17</i>

Abkürzung	Bezeichnung
TUCs	<i>Tumor Cells</i> (Tumorzellen)
UICC	<i>Union for International Cancer Control</i>
UV	Ultraviolett
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
WHO	<i>World Health Organization</i> (Weltgesundheitsorganisation)
α -SMA	<i>α-Smooth Muscle Actin</i>
β -ME	β -Mercaptoethanol

1 EINLEITUNG

1.1 Krebserkrankungen

Krebserkrankungen sind nach Herz-Kreislaufkrankungen die häufigste Todesursache in Deutschland. Im Jahr 2013 starben rund 224.000 Deutsche an den Folgen ihrer Krebserkrankung – das sind 25 % aller Sterbefälle (Statistisches Bundesamt, 2015). Weltweit registrierte die *World Health Organization* (WHO) im Jahr 2012 über 14,1 Millionen Neuerkrankungen und 8,2 Millionen krebsbedingte Todesfälle. Während die auf Herz-Kreislaufkrankungen zurückführbaren Sterbefälle in den Industrieländern stetig abnehmen, steigt die krebsbedingte Mortalitätsrate immer weiter (Torre *et al.*, 2015). Extrapoliert man diese Trends, so könnte Krebs in 10 bis 15 Jahren die weltweit häufigste Todesursache darstellen (Torre *et al.*, 2015). Zusammengenommen unterstreichen diese Fakten die gesamtgesellschaftliche Relevanz der Krebsforschung.

Krebserkrankungen sind sowohl auf klinischer als auch auf molekularer Ebene – in Bezug auf Ursachen, Entwicklung und Verlauf – äußerst heterogen. Neben mannigfaltigen Umweltfaktoren, genetischer Prädisposition und diversen Virusinfektionen sind es vor allem die individuelle Lebensweise und die stetig steigende Lebenserwartung, die das Risiko an Krebs zu erkranken steigen lassen (Hanahan & Weinberg, 2000). Die wesentlichen Ereignisse sind jedoch genetische und epigenetische Mutationen, die molekular- und zellbiologische Veränderungen mit sich bringen. Diese können sich manifestieren und schließlich die Tumorneogenese bedingen (Hanahan & Weinberg, 2011). Hanahan und Weinberg fassten die wesentlichen Veränderungen in ihrem im Jahr 2000 publizierten Review „*The Hallmarks of Cancer*“ zusammen. Demnach sind Tumorzellen befähigt, die Apoptose zu umgehen (1), wachstumshemmende Signalwege zu blockieren (2), sich unendlich zu teilen (3), Angiogenese zu betreiben (4), eine unabhängige Energieversorgung aufzubauen (5) und in umliegendes Gewebe einzuwandern, um dort Metastasen zu bilden (6) (Hanahan & Weinberg, 2000). Elf Jahre später wurden diese Merkmale um vier weitere ergänzt: Die Fähigkeit von Tumoren, die immunologische Kontrolle zu umgehen (7), die tumorbegünstigende Inflammation (8), Mutationen, die genetische Instabilität bedingen (9) und epigenetische Veränderungen (10) wurden aufgenommen (Hanahan & Weinberg, 2011). Zusammengenommen kann die Krebsentstehung und -progression demnach als multifaktorieller und mehrstufiger Prozess verstanden werden, der keinen festen Regeln folgt.

Das zunehmende Verständnis dieser molekularen Prozesse und hochkomplexen Interaktionsmechanismen sowie die immensen Fortschritte auf den Gebieten der Immunologie und Krebsimmuntherapie haben dazu geführt, dass das Behandlungsspektrum ständig erweitert wird und immuntherapeutische Ansätze weiter an klinischer Bedeutung gewinnen (Mellman *et al.*, 2011). Während monomodale Tumortherapien aufgrund der Heterogenität und genomischen Instabilität der Tumorzellen mit Resistenzentwicklungen verbunden sind (Gottesman, 2002; Gillet & Gottesman, 2010), versprechen individuelle Kombinationen multimodaler Behandlungsstrategien verbunden mit einer präziseren Diagnostik durchaus Erfolg (Komarova & Boland, 2013). Dies belegen auch aktuelle Statistiken aus den USA, die einen sukzessiven Anstieg der Überlebenden aufzeigen (Siegel *et al.*, 2013; Miller *et al.*, 2016).

1.2 Maligne Neoplasien des Hals-, Nasen- und Ohrenbereichs

Unter dem Sammelbegriff HNO-Tumore werden alle malignen Neoplasien des oberen Aerodigestivtraktes zusammengefasst. Ebenso vielfältig wie die Gewebetypen in diesem Bereich sind auch die Tumorsubtypen. Die Unterscheidung erfolgt anhand der Lokalisation: Mundhöhle (Lippen, Zunge, Mundboden, Gaumen, Speicheldrüsen), Pharynx, Larynx, Nase und Nasennebenhöhlen sowie äußerer Hals und Schilddrüse (Preiß *et al.*, 2014). Die verschiedenen Subtypen sind ihrerseits durch eine hohe klinische, pathologische, phänotypische und biologische Heterogenität gekennzeichnet (Forastiere *et al.*, 2001; Braakhuis *et al.*, 2003; Wittekind, 2014; Keck *et al.*, 2015). Über 90 % der HNO-Tumore können der Subkategorie Plattenepithelkarzinome (*Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*, HNSCC) zugeordnet werden. Dies inkludiert Tumore, die aus den Plattenepithelien des Nasen- und Mundraumes, des Oro- und Hypopharynx sowie des Larynx hervorgehen (Leemans *et al.*, 2010). Weitaus seltener werden Tumore aus drüsenartigem Gewebe der Nase und den Nasennebenhöhlen, Adenokarzinome und Sarkome diagnostiziert (Wittekind, 2014).

1.2.1 Epidemiologie von HNSCC

Mit jährlich etwa 600.000 neudiagnostizierten Patienten befinden sich HNSCC auf dem sechsten Platz der weltweit häufigsten Krebsarten (Kamangar, 2006; Leemans *et al.*, 2010). Die Fünf-Jahres-Überlebensrate liegt seit 1975 konstant bei 60 % und obwohl die Früherkennung einer der wichtigsten prognostischen Faktoren darstellt und die Überlebensrate auf bis zu 80 % ansteigen lässt, werden nur etwa ein Drittel der Tumore in einem frühen Stadium

diagnostiziert (Curry *et al.*, 2014). Das führt dazu, dass viele Tumore bei Erstdiagnose bereits sehr weit fortgeschritten sind, und es, trotz primär kurativer Therapieansätze, in etwa 30-40 % der Fälle zur Entstehung lokaler Rezidive und/oder Metastasierung kommt, was eine entsprechend ungünstigere Prognose bedingt (Kamangar, 2006; Marur & Forastiere, 2008; Curry *et al.*, 2014). Obwohl HNSCC zumeist sporadisch vorkommen, gibt es auch ein hereditäres Tumorsyndrom, das sich im Kopf-Hals-Bereich manifestiert: die Fanconi-Anämie (Kutler, 2002).

1.2.2 Klinische Symptomatik, Diagnostik und Therapieoptionen von HNSCC

Die Klinik von HNSCC variiert je nach Lokalisation des Tumors. Die häufigsten Symptome sind anhaltende Heiserkeit, Schluckbeschwerden, Schwellungen am Hals, blutiger Auswurf und Taubheitsgefühle (Schmoll *et al.*, 2005; Preiß *et al.*, 2014). Aufgrund dieser unspezifischen Symptomatik bleiben diese Tumore bei der hausärztlichen Erstuntersuchung häufig unerkannt. Die HNO-fachärztlichen Untersuchungen in der Klinik umfassen dann genauere bildgebende Verfahren wie Ultraschalluntersuchungen, Computertomografie (CT), Magnetresonanztomografie (MRT) oder in Ausnahmefällen die Positronen-Emissionstomografie (PET). Bei begründetem Tumorverdacht erfolgt eine diagnostische Panendoskopie der oberen Atem- und Speisewege. Zur diagnostischen Sicherung wird eine Gewebebiopsie entnommen, die histopathologisch charakterisiert wird (Wittekind, 2014).

1.2.2.1 TNM-Klassifizierung von HNSCC

Die traditionelle Stadieneinteilung erfolgt nach der Systematik des TNM-Klassifikationssystems der *Union for International Cancer Control* (UICC) (Leemans *et al.*, 2010; Wittekind, 2014). Hierbei werden Kriterien wie die Größe und Ausdehnung des Primärtumors (T), das Vorhandensein von Krebszellen in den drainierenden und regionalen Lymphknoten (N) und/oder Fernmetastasen (M) herangezogen. Diese initiale Einstufung und die therapeutische Kontrolle stellen die wichtigsten prognostischen Faktoren dar (Wittekind, 2014). Wie in Tabelle 2 gezeigt, sinken die Heilungs- und damit die Überlebenschancen mit steigendem TNM-Stadium.

Mittels der klassischen TNM-Einteilung lassen sich jedoch nur bedingt Aussagen über das Therapieansprechen treffen. Daher gibt es verschiedene Bestrebungen, HNSCC anhand ihrer unterschiedlichen molekularen Profile zu charakterisieren.

Tabelle 2: Fünf-Jahresüberleben von Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren (Wittekind, 2014).

TNM-Stadium	5-Jahres-Überlebensrate
I	75-90 %
II	40-70 %
III	20-50 %
IV	10-30 %

Wegweisend waren hier erste Ganzgenomsequenzierungen des Konsortiums *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) sowie diverse integrative Genomanalysen verschiedener Arbeitsgruppen, die wesentlich zu einem besseren Verständnis der molekularen Grundlagen beitrugen (Cancer Genome Atlas Network, 2015; Keck *et al.*, 2015). Einige dieser Arbeiten werden unter Punkt 1.2.4 näher beleuchtet.

1.2.2.2 Therapeutisches Vorgehen

Das therapeutische Vorgehen bei HNSCC ist im Wesentlichen abhängig von der Lokalisation und dem TNM-Stadium des Tumors und zielt darauf ab, die wichtigsten Organfunktionen im Kopf-Hals-Bereich zu erhalten, um die Lebensqualität der Betroffenen so wenig wie möglich zu beeinträchtigen (Preiß *et al.*, 2014). Standardtherapie ist die operative Resektion, die möglichst radikal durchgeführt werden sollte, ohne dabei umliegende Organe zu schädigen (Wittekind, 2014). Sind Tumore aufgrund ihrer Lage und/oder Größe nicht vollständig zu resektieren, werden diese primär operativ behandelt, gefolgt adjuvanten Chemo- oder Radiotherapien (Leemans *et al.*, 2010). Häufig verabreichte Chemotherapeutika sind Cisplatin, Fluorouracil, Paclitaxel (Taxol®) und Methotrexat (Colevas, 2006). Bei großen, stark infiltrierenden und somit inoperablen Tumoren wird primär eine induktive Radio-Chemotherapie angeordnet (Haddad & Shin, 2008). Außerdem wurde mit Cetuximab (Handelsname Erbitux®, EGFR-Antagonist) in Deutschland erstmals ein monoklonaler Antikörper für die Erstlinientherapie von rezidivierenden und/oder metastasierenden Kopf-Hals-Tumoren zugelassen (Vermorken *et al.*, 2008). Überdies sollten bei Patienten mit weit fortgeschrittenen Tumoren, Lokalrezidiven, loko-regionären Rezidiven und/oder Fernmetastasen weitere therapeutische Maßnahmen – gegebenenfalls im Rahmen klinischer Studien – in Betracht gezogen werden. Hier bieten diverse immuntherapeutische Ansätze vielversprechende Möglichkeiten, die derzeit in einer Vielzahl klinischer Studien validiert werden. Einen Überblick bieten die Internetpräsenzen des *National Institute of Health (ClinicalTrials.gov)* oder des *Cancer Research Institute (CancerResearch.org)*.

1.2.3 Risikofaktoren und Ätiologie

Sowohl die Exposition exogener kanzerogener Noxen wie Nikotin, Lösungsmittel oder Asbest als auch Virusinfektionen begünstigen die maligne Transformation von gesunden Epithelzellen der Schleimhäute (Forastiere *et al.*, 2001; Haddad & Shin, 2008; Adelstein *et al.*, 2009). Zugrundeliegend ist ein mehrstufiger Prozess im Zuge dessen molekulargenetische Veränderungen akkumulieren, die sich schließlich histopathologisch manifestieren. Eine anfängliche Hyperplasie kann sich so über mehrere epitheldysplasie-stadien zu einem *Carcinoma in situ* entwickeln, das dann weiter zu einem invasiven Karzinom prosperieren kann (Forastiere *et al.*, 2001; Haddad & Shin, 2008).

Als Risikofaktoren gelten zum einen das Rauchen und exzessiver Konsum hochprozentigen Alkohols und zum anderen Infektionen mit den humanen Papillomviren (HPV) Typ 16 oder Typ 18 und dem Epstein-Barr-Virus (EBV) (Marur & Forastiere, 2008). Während EBV-Infektionen mit Nasopharynx-Karzinomen assoziiert sind, begünstigen HPV-Infektionen die Entstehung von Oropharynx-Karzinomen (Granata *et al.*, 2012). Seit den 1990er Jahren wird ein Anstieg der HPV16-assoziierten Oropharynx-Tumoren vor allem bei jüngeren männlichen Individuen beobachtet (Hammarstedt *et al.*, 2006; Mehanna *et al.*, 2013). Als Ursache für diese Entwicklung wird das veränderte Sexualverhalten der jüngeren Generationen hin zu mehr und früherem Oralverkehr diskutiert (Gillison *et al.*, 2008; Marur *et al.*, 2010). Dass die Inzidenz vor allem beim männlichen Geschlecht ansteigt, wird auf die erhöhte HPV-Prävalenz in zervikalem Gewebe zurückgeführt (Marur *et al.*, 2010).

Interessanterweise gehen HPV-Infektionen jedoch auch mit einer signifikant besseren Prognose, längerem Gesamtüberleben und einem besseren Ansprechen auf Radio- und Chemotherapie einher (Fakhry *et al.*, 2008; Gillison *et al.*, 2008; Ang *et al.*, 2010), wohingegen HPV16-negative (HPV16(-)) Tumore mit erhöhten loko-regionären Rezidivierungsraten und schlechterem Therapieansprechen assoziiert sind (Ganly *et al.*, 2000; Poeta *et al.*, 2007; Perrone *et al.*, 2010; Skinner *et al.*, 2012). Damit stellt der HPV-Status den derzeit stärksten prognostischen Marker für HNSCC dar (Ang *et al.*, 2010; Keck *et al.*, 2015). Obwohl Einigkeit darüber herrscht, dass HPV16(+) und HPV16(-) Tumore distinkte Entitäten hinsichtlich Klinik, Histopathologie und Molekularbiologie repräsentieren (Leemans *et al.*, 2010; Agrawal *et al.*, 2011; Keck *et al.*, 2015; Wichmann *et al.*, 2015), gibt es kein therapeutisch relevantes Klassifikationssystem, das klinische Anwendung findet. Stattdessen werden alle Patienten, unabhängig von der zugrundeliegenden Biologie, basierend auf der TNM-Klassifikation behandelt

(Forastiere *et al.*, 2008; Marur & Forastiere, 2008; Seiwert *et al.*, 2015). Die aktuellen Bestrebungen, durch integrative Genomanalysen Subtypen zu unterscheiden, Biomarker für ebendiese zu identifizieren und die dahinterstehende Biologie aufzuklären, führen jedoch bereits heute zu einem besseren Verständnis und zu einer differentielleren Diagnostik.

1.2.4 Pathogenese und Molekularbiologie unter Berücksichtigung des HPV-Status

Die zunehmende Anzahl an HPV(+) Tumoren und das Wissen um die klinischen und molekularen Unterschiede zwischen HPV(+) und HPV(-) Tumoren erfordern eine differenzierte Analyse dieser beiden Gruppen. Dabei ist unbedingt darauf zu achten, dass nur Tumore mit „aktiver“ HPV16-Infektion (DNA(+) und RNA(+)) eine distinkte Gruppe hinsichtlich Molekularbiologie und Klinik bilden (Wichmann *et al.*, 2015). Tumore, die zwar die Virus-DNA enthalten (DNA(+)), in denen diese jedoch nicht transkribiert wird (RNA(-)), weisen ein ähnliches RNA-Expressionsmuster auf wie *per se* HPV16-negative (DNA(-)) Tumore (Cancer Genome Atlas Network, 2015; Wichmann *et al.*, 2015).

Die integrativen Analysen der TCGA-Daten zeigen, dass HPV(-) Tumore insgesamt deutlich mehr Mutationen aufweisen als HPV(+) (Agrawal *et al.*, 2011). Dieser Unterschied ist unabhängig davon, ob die Patienten Raucher oder Nichtraucher waren. Jedoch wurden in Tumoren von Rauchern generell deutlich mehr Mutationen identifiziert, unabhängig vom HPV-Status (Agrawal *et al.*, 2011). Werden ausschließlich Krebs-assoziierte Gene betrachtet, zeigt sich kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der Mutationen HPV(+) und HPV(-) Tumore, wohl aber in der Art der mutierten Gene (Seiwert *et al.*, 2015). Bei HPV(-) Tumoren sind es Mutationen der Gene *TP53* (*Tumor Protein 53*), *CDKN2A* (*Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 2A*), *PIK3CA* (*Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha*) und *NOTCH1* sowie Kopienzahlamplifikationen des *Epidermal Growth Factor Receptor* (*EGFR*), von *Cyclin D1* (*CCND1*) und des *Fibroblast Growth Factor Receptor 1* (*FGFR1*). HPV(+) Tumore hingegen zeigen einzigartige Punktmutationen sowie somatische Aberrationen in DNA-Reparaturgenen wie beispielsweise den *BRCA* (*Breast Cancer*) 1- und *BRCA2*-Genen (Seiwert *et al.*, 2015).

Zusammengenommen legen diese Fakten nahe, dass nicht etwa eine erhöhte Mutationsfrequenz, sondern vor allem das distinkte Mutationsspektrum (verursacht durch das Rauchen oder die Virus-DNA) und dessen Auswirkungen für die unterschiedliche Pathogenese und Molekularbiologie von HPV(+) und HPV(-) Tumoren verantwortlich ist.

1.3 Immunologie

1.3.1 Das Immunsystem

Das humane Immunsystem gliedert sich in zwei Arme: das phylogenetisch sehr alte, unspezifische angeborene und das mit den Vertebraten entstandene hochspezifische adaptive Immunsystem. Zum angeborenen Immunsystem zählen die Haut und Schleimhäute, die anatomische und physiologische Barrieren bilden, das Komplementsystem und die Zellvermittelte Abwehr durch Makrophagen, Dendritische Zellen (*Dendritic Cells*, DCs), Natürliche Killerzellen (*Natural Killer Cells*, NKs) und Mastzellen (Pezzutto *et al.*, 2007). Diese Zellen reifen im Knochenmark und zirkulieren vorwiegend im Blut. Eingedrungene Infektionserreger werden von umherwandernden DCs oder residenten Makrophagen anhand sogenannter Mustererkennungsrezeptoren (*Pattern Recognition Receptors*, PRRs) erkannt und anschließend phagozytiert (Murphy, 2011). Aktivierte DCs wandern in die sekundären lymphatischen Organe ein und aktivieren dort die B- und T-Zellen; den Arm des adaptiven Immunsystems. Mit ihren hochspezifischen Rezeptoren können diese Zellen auf über 1×10^8 verschiedene Antigene reagieren (Arstila, 1999). Während T-Zellen (*T Cells*, TCs) infizierte Zellen direkt erkennen und gezielt abtöten (zelluläre Abwehr), sekretieren B-Zellen (*B Cells*, BCs) Antikörper (humorale Abwehr), welche die Pathogene opsonisieren und damit das Komplementsystem aktivieren. Zudem können BCs – analog zu DCs – den TCs Antigene präsentieren und so die Immunantwort unterstützen (Pezzutto *et al.*, 2007; Resch *et al.*, 2010). Nachdem die Immunreaktion abgelaufen ist, bilden sich T- und B-Gedächtniszellen, die im Falle einer wiederholten Infektion mit demselben Pathogen eine vielfach schnellere und effizientere Immunreaktion auslösen (Murphy, 2011).

1.3.2 T-Zellvermittelte Immunität

1.3.2.1 Entwicklung und Reifung der T-Lymphozyten

TCs entwickeln sich im Knochenmark aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen. Diese Progenitorzellen wandern dann zur Reifung in den Thymus (Pezzutto *et al.*, 2007; Murphy, 2011). Dort entstehen durch somatische Rekombination verschiedener Rezeptorsegmente 25-100 Millionen T-Zellklone, von denen jeder mit einem anderen T-Zellrezeptor (*T Cell Receptor*, TCR) ausgestattet ist (Arstila, 1999). Um die Funktionalität der Rezeptoren zu gewährleisten und eine Reaktion gegen gesunde körpereigene Zellen auszuschließen, findet noch im Thymus eine Selektion statt. Dabei binden die TCs an MHC-Rezeptoren (*Major Histocompatibility Complex*, Haupthistokompatibilitätskomplex), die mit körpereigenen Pep-

tiden beladen sind (MHC-Peptidkomplexe). Bei TCs, die diese Peptidkomplexe zu schwach binden oder gar nicht erkennen, wird umgehend die Apoptose eingeleitet. Selbiges geschieht mit autoreaktiven TCs, deren TCR den MHC-Peptidkomplex mit einer zu hohen Affinität binden, da dies später Autoimmunerkrankungen auslösen kann (Herndon *et al.*, 2005). Es werden also nur solche T-Zellklone ausgewählt, die eine mittlere Bindungsaffinität an den MHC-Peptidkomplex aufweisen. Nur 5 % aller T-Zellklone überleben diese Selektionsschritte und zirkulieren anschließend als immunkompetente Zellen im Blut und besiedeln die sekundären Lymphorgane (Murphy, 2011). Diese Selektionsmechanismen sind deshalb so essenziell, weil das Immunsystem dadurch „selbst“ von „fremd“ unterscheiden kann.

Da Tumorzellen körpereigene Zellen darstellen, sind sie für das Immunsystem nur schwer zu erkennen. Jedoch zeichnen sich Tumorzellen durch veränderte Gen- und Proteinexpressionsprofile aus, welche über die MHC-Komplexe an der Zelloberfläche präsentiert werden. T-Zellen erkennen diese MHC-Peptidkomplexe als „fremd“ und die Tumorzelle kann infolgedessen angegriffen und eliminiert werden. Die Identifizierung solcher Veränderungen bildet die Grundlage für T-Zell-basierte Immuntherapien.

1.3.2.2 Aktivierung, Differenzierung und Funktion von T-Lymphozyten

Die Aktivierung naiver TCs erfolgt, indem TCRs Antigenpeptide erkennen, die über MHC-Rezeptoren präsentiert werden (Davis & Bjorkman, 1988). Es werden zwei Klassen von MHC-Molekülen unterschieden: MHC-I und MHC-II. MHC-I-Moleküle werden von allen kernhaltigen Körperzellen exprimiert und präsentieren intrazelluläre Antigenpeptide auf der Zelloberfläche (Murphy, 2011). Diese intrazellulären Proteine werden zuerst proteosomal verdaut und im Anschluss über den Antigenpeptid-Transporter (*Transporter-associated with Antigen Processing*, TAP) in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums geleitet. Das TAP-gebundene Peptid wird nun präferenziell an MHC-I gebunden und an die Zelloberfläche transportiert (Procko *et al.*, 2006), wo die MHC-I-Antigenpeptid-Komplexe dann CD8-positiven ($CD8^+$) TCs präsentiert werden. Diese antigenspezifischen TCs erkennen abnorme Peptide und töten die betroffenen Zellen sofort. Die TCs können so gesunde von kranken Körperzellen und respektive körpereigen von körperfremd unterscheiden. CD4-positive ($CD4^+$) TCs hingegen erkennen ihr Antigenpeptid über MHC-II-Moleküle. Diese werden hauptsächlich von professionellen antigenpräsentierenden Zellen (*Antigen Presenting Cells*, APCs) wie zum Beispiel DCs exprimiert. Die von APCs phagozytierten Proteine sind extrazellulären Ursprungs und werden in den Phagosomaten verdaut. Diese verschmelzen dann

mit MHC-II-tragenden Vesikeln, die dann wiederum mit der Zellmembran verschmelzen und die MHC-II-Peptidkomplexe den T-Helferzellen (T_H) präsentieren (Villadangos *et al.*, 2007).

Neben der Bindung des TCR an den MHC-Peptidkomplex bedarf es eines zusätzlichen Signals zur T-Zellaktivierung. Das von APCs exprimierte kostimulatorische Molekül CD80/CD86 bindet an den TC-Korezeptor CD28, wodurch die TCs vermehrt Interleukin(IL)-2 sekretieren. Durch autokrine Stimulation kommt es so zur klonalen Expansion der antigenspezifischen TCs und schließlich zu deren Differenzierung zu T-Effektorzellen (T_{eff}). Fehlt dieses Signal, kommt es zur T-Zellanergie und Apoptose (Alegre *et al.*, 2001; Nikolich-Žugich, 2008).

Abhängig von ihrem Korezeptor werden $CD4^+$ und $CD8^+$ TCs unterschieden. Die $CD4^+$ TCs haben vorwiegend unterstützende Funktionen bei der Immunantwort und werden deshalb auch als T-Helferzellen (T_H) bezeichnet. Hierbei werden drei Subtypen (T_H1 , T_H2 und T_H17) unterschieden, die durch die Sekretion spezieller Zytokinmuster charakterisiert sind (Murphy, 2011). T_H1 schütten Interleukin (IL)-2, Tumornekrosefaktor (TNF)- α und Interferon (IFN)- γ aus, was die Aktivierung und Differenzierung von Makrophagen bedingt. T_H2 vermitteln die humorale Immunantwort, indem sie diverse Interleukine und TNF- β sekretieren und damit BCs aktivieren. Namensgebend für den T_H17 -Subtyp ist die Ausschüttung von IL-17. Dieser erst im Jahr 2005 entdeckten Subpopulation wird eine Rolle bei der Entstehung von chronischen Entzündungsprozessen und Autoimmunerkrankungen zugeschrieben (Harrington *et al.*, 2005).

Die $CD8^+$ TCs hingegen wirken direkt zytotoxisch und werden deshalb als zytotoxische TCs (*Cytotoxic T Lymphocytes*, CTLs) bezeichnet. Sie spielen eine essenzielle Rolle bei der Bekämpfung von Viren, intrazellulär persistierenden Bakterien und Tumorzellen. Ein Mechanismus ist die Lyse der gebundenen Zielzelle über die Sekretion lytischer Granula. Diese enthalten Perforine und Granzyme. Im ersten Schritt perforiert ausgeschüttetes Perforin die Zellmembran. Durch die entstandenen Poren gelangen dann Granzyme in die Zelle. Diese aktivieren diverse Caspasen und induzieren darüber die Apoptose der Zielzelle (Masson *et al.*, 2002). Ein weiterer Mechanismus ist die Induktion der Apoptose über direkten Zell-Zell-Kontakt. Aktivierte TCs exprimieren den Liganden FasL. Dieser bindet an den sogenannten Todesrezeptor (Fas-Rezeptor (FasR)) auf der zu tötenden Zielzelle. Durch die Bindung von FasL an den FasR wird ein spezielles Apoptoseprogramm (*Activation-induced Cell Death*, AICD) induziert (Green *et al.*, 2003).

Ein weiteres von CTLs sekretiertes Schlüsselmolekül ist IFN- γ , das eine verstärkte Expression

von MHC-II-Molekülen bei APCs und MHC-I bei *normalen* bzw. mutierten Körperzellen induziert (Rosa & Fellous, 1988; Zhou, 2009). Ebenso werden der proteosomale Abbau und das *TAP Processing* durch IFN- γ erhöht (Ma *et al.*, 1997). Zusammengenommen bedingt dies eine erhöhte Antigenpräsentation und damit eine Verstärkung der Immunantwort. IFN- γ wirkt überdies auch systemisch, indem es die Entwicklung von undifferenzierten CD4⁺ T-Helferzellen (T_{H0}) in Typ1 T-Helferzellen (T_{H1}) bedingt und parallel die T_{H2}-Polarisierung unterdrückt (Gajewski & Fitch, 1988).

1.3.2.3 Abschalten der Immunreaktion

Nach erfolgreicher Eliminierung der Zielzelle ist das Abschalten der Effektormechanismen von essenzieller Bedeutung, um eine unkontrollierte und überschießende Immunreaktion zu unterbinden. Zunächst fehlt, sobald das Antigen eliminiert ist, der antigene Reiz. Das bedingt Anergie und Apoptose vieler T_{eff}. Zudem treffen die im Verlauf der Immunreaktion drastisch expandierten CTLs immer häufiger aufeinander und treiben sich durch FasR/FasL-Interaktionen gegenseitig in die Apoptose (Lynch *et al.*, 1995). Daneben gibt es zahlreiche weitere Suppressormechanismen, welche die Abschaltung der Immunantwort bedingen. Eine besondere Bedeutung kommt hierbei dem Rezeptormolekül *Cytotoxic T Lymphocyte-associated Antigen 4* (CTLA-4) zu. Im Zuge der TCR-vermittelten Aktivierung exprimieren TCs verstärkt CTLA-4. Nun konkurrieren der inhibierende Rezeptor (CTLA-4) und der kostimulierende Rezeptor (CD28) um die Bindung an CD80/CD86. Da CTLA-4 eine höhere Affinität gegenüber CD80/CD86 besitzt, wird CD28 sukzessive verdrängt (Alegre *et al.*, 2001). Folglich wird weniger IL-2 sekretiert, die Proliferation verlangsamt und die Immunantwort wird schließlich beendet. Ein weiteres Schlüsselmolekül ist das von TCs exprimierte *Programmed Cell Death 1* (PD-1), durch dessen Bindung an seinen Liganden *Programmed Cell Death 1 Ligand 1* (PD-L1) ebenfalls die Produktion von IL-2 und damit die T-Zellproliferation gehemmt wird (Alegre *et al.*, 2001). Auch Tumorzellen können CTLA-4 und PD-L1 exprimieren und beeinflussen darüber die Proliferation und Expansion der T-Zellen (Contardi *et al.*, 2005; Ghebeh *et al.*, 2006). Auf den immunsuppressiven Einfluss der Tumorzellen wird im nächsten Kapitel näher eingegangen.

1.3.3 Tumormunologie

Das Immunsystem erfüllt eine Wächterfunktion (engl. *Immune Surveillance*; Immunüberwachung) und ist dadurch imstande, Tumorzellen zu erkennen und diese gezielt zu eliminieren

(Schreiber *et al.*, 2011). Jedoch sind die eigentlichen Merkmale von Tumorzellen, wie beschleunigtes Zellwachstum, erhöhte Proliferationsraten oder verändertes Apoptoseverhalten für das Immunsystem *per se* nicht erkennbar. Die Erkennung erfolgt über das veränderte Proteinexpressionsprofil der Tumorzellen, das auf der Zelloberfläche präsentiert werden muss. Während mutierte Oberflächenmoleküle wie Rezeptoren oder Adhäsionsmoleküle direkt erkannt werden, müssen mutierte intrazelluläre Proteine zuerst proteosomal verdaut und anschließend über MHC-I-Rezeptoren präsentiert werden (Murphy *et al.*, 2009).

1.3.3.1 Das Konzept des Cancer Immunoediting

Das Konzept des *Cancer Immunoediting* beschreibt die Rolle des Immunsystems bei der Tumorentstehung und -progression und gliedert sich in drei Phasen: *Elimination*, *Equilibrium*, *Escape* (Dunn *et al.*, 2004; Schreiber *et al.*, 2011). Dabei werden die Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems gleichermaßen aktiviert, was eine Tumor-spezifische Immunantwort auslöst und darüber die Eliminierung der Tumorzellen bedingt (*Elimination*) (Schreiber *et al.*, 2011). Überleben jedoch einige der Tumorzellen den Angriff des Immunsystems, tritt die nächste Phase ein: *Equilibrium*. Das Immunsystem kontrolliert das Wachstum und die Ausbreitung der Tumorzellen. Jedoch entwickeln Tumorzellen koevolutiv Mechanismen, um sich dieser Überwachung zu entziehen und so zu überleben. Einerseits führt der herrschende Selektionsdruck zur verminderten Expression von MHC-I-Molekülen, was zur Akkumulation von schwach immunogenen Krebszellen führt (Ogino *et al.*, 2006). Andererseits sezernieren Tumorzellen Chemokine und Zytokine, wie den *Transforming Growth Factor β* (TGF- β), Galectin-1 oder Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO), wodurch ein anti-inflammatorisches, protumorigenes Mikromilieu geschaffen wird (Hanahan & Weinberg, 2011). Gelingt es den verbleibenden Tumorzellen, der Kontrolle des Immunsystems zu entkommen (*Immune Escape*), hat dies die Tumorprogression zur Folge (Dunn *et al.*, 2004; Schreiber *et al.*, 2011).

1.3.3.2 Protektive und immunsuppressive Eigenschaften des Immunsystems

Das Immunsystem hat auch nach erfolgreichem *Immune Escape* und der Etablierung eines soliden Tumors noch protektive Eigenschaften. So konnte bereits für zahlreiche Tumorentitäten gezeigt werden, dass eine erhöhte Immunzellinfiltration mit einer besseren Prognose und einem signifikant besserem Überleben korreliert (Halliday *et al.*, 1995; Kerr *et al.*, 1998; Inoue *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2003; Pagès *et al.*, 2005; Carreras *et al.*, 2006; Galon *et al.*,

2006; Lohr *et al.*, 2011; Mahmoud *et al.*, 2011; Azimi *et al.*, 2012; Mahmoud *et al.*, 2012; Rusakiewicz *et al.*, 2013). Mit dem Fokus auf TCs sind dafür vor allem aktivierte CTLs beziehungsweise ein hohes Verhältnis von CTLs ($CD8^+$) zu T_{reg} ($CD4^+/FoxP3^+$) verantwortlich (Curiel *et al.*, 2004). Auch Tumor-assoziierte Makrophagen (*Tumor-associated Macrophages*, TAMs) des M1-Phänotyps tragen durch die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine, wie IL-2, IL-23 und IFN- γ zu einer Immunantwort gegen den Tumor bei (Mantovani *et al.*, 1992; Mills *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2002; Sica *et al.*, 2006).

Neben seiner protektiven Wirkung kann dem Immunsystem aber auch eine tumorunterstützende Wirkung zugeschrieben werden. Hierfür sind hauptsächlich solche Mechanismen verantwortlich, die normalerweise eine überschießende Immunreaktion verhindern sollen. Eine Schlüsselfunktion kommt hierbei neben Makrophagen des M2-Phänotyps, den myeloiden Suppressorzellen (*Myeloid-derived Suppressor Cells*, MDSCs) und vor allem den T_{reg} zu. Verschiedene Arbeiten haben gezeigt, dass eine erhöhte Infiltration dieser Immunzellen mit einer deutlich schlechteren Prognose assoziiert ist (Sasada *et al.*, 2003; Curiel *et al.*, 2004; Sato *et al.*, 2005; Bates *et al.*, 2006). Durch die immunsupprimierenden Eigenschaften der T_{reg} wird die anti-Tumorimmunantwort so weit beeinträchtigt, dass es letztlich zur Immuntoleranz kommt (Facciabene *et al.*, 2012). Dies geschieht über die Sekretion von Granzym B oder Galectin-1, wodurch gezielt T_{eff} zytolysiert werden (i), über die Sekretion von immunsupprimierenden Molekülen (ii), die Störung des Metabolismus (iii) und die Suppression von DCs (iv) (Vignali *et al.*, 2008; Facciabene *et al.*, 2012). So konnte gezeigt werden, dass regulatorische $CD4^+/CD25^+/FoxP3^+$ TCs große Mengen TGF- β , IL-10 und IL-35 sezernieren, wodurch die Effektorfunktion der CTLs inhibiert wird (Vignali *et al.*, 2008; Facciabene *et al.*, 2012). Überdies sind $CD8^+$ TCs *in vitro* imstande, Tumorzellen effektiv zu töten (Curiel *et al.*, 2004). Dieser Effekt konnte jedoch durch Zugabe von T_{reg} aufgehoben werden (Antony *et al.*, 2005). Ein weiterer Regulierungsmechanismus ist die Induktion der Apoptose bei CTLs und antigenpräsentierenden DCs (Facciabene *et al.*, 2012). Die Interaktion von T_{reg} mit DCs über CTLA-4 bedingt die Expression des Enzyms IDO, wodurch der Tryptophankatabolismus aktiviert wird (Read *et al.*, 2000). Die Metaboliten sorgen dann für eine immunsuppressive Mikroumgebung, was die T-Effektorzellfunktion hemmt und wodurch weitere T_{reg} in den Tumor einwandern (Fallarino *et al.*, 2003; Prendergast *et al.*, 2009). Auch Tumorzellen selbst exprimieren IDO und tragen dadurch wesentlich zu einer immunsuppressiven Mikroumgebung bei (Prendergast *et al.*, 2014). Werden tumorinfiltrierende T_{reg} depletiert, bedingt dies eine massive

Veränderung des Zytokinmilieus, was die Initiation einer Antitumorantwort zur Folge hat und letztlich zur Reduktion der Tumormasse führt (Onizuka *et al.*, 1999; Shimizu *et al.*, 1999; Yu, 2005).

Zusammengenommen lassen sich von diesen Forschungsergebnissen mögliche (immun)therapeutische Angriffspunkte ableiten, um eine Reaktivierung der anti-Tumorimmantwort zu erreichen. Neben der gezielten Eliminierung der Tumorzellen sollten für eine erfolgreiche Tumorthherapie solche immunsuppressiven Mechanismen des Immunsystems inhibiert, und das Gleichgewicht hin zu protektiven pro-inflammatorischen Zellen verschoben werden.

1.3.3.3 Der Immunoscore® – Immunzellinfiltration als prognostischer Biomarker

Aufgrund der prognostischen Relevanz der Immunzellinfiltration wird derzeit die Anwendung des sogenannten *Immunoscore*® als prognostischer Biomarker validiert (Pagès *et al.*, 2005; Mlecnik *et al.*, 2011; Galon *et al.*, 2012). Hierfür wurde ein internationales Konsortium initiiert, das derzeit die Implementierung des *Immunoscore*® als additive Komponente zum herkömmlichen TNM-System für die Klassifizierung von Kolonkarzinomen validiert (*Immunoscore.org*). Die Übertragung dieser TNM-Immunklassifizierung auf weitere Tumorentitäten, wie beispielsweise Lungenkrebs oder HNSCC, wird derzeit diskutiert.

1.3.4 Immunologie des Tumorstromas

Solide Tumore bestehen nicht nur aus den malignen Tumorzellen, sondern aus einer Vielzahl verschiedener Zelltypen. Diese formen das tumorsupportive Stroma, das wesentlich zur Tumourprogression und Metastasierung beiträgt. Neben verschiedenen Immunzellen, der Extrazellulärmatrix (*Extracellular Matrix*, ECM), den Endothelzellen der Lymph- und Blutgefäße kommt hier vor allem den Krebs-assoziierten Fibroblasten (*Cancer-associated Fibroblasts*, CAFs) eine Schlüsselrolle zu. Diese stellen mit bis zu 70 % die Hauptzellpopulation des Tumorstromas solider Tumore dar (Kalluri, 2016).

1.3.4.1 Ursprung und Aktivierung von Krebs-assoziierten Fibroblasten

Naive, nicht-aktivierte Fibroblasten sind in die ECM des Bindegewebes eingebettet und durch die Expression von für Zellen mesenchymalen Ursprungs typischen Markern wie Vimentin und Fibronectin gekennzeichnet (Kalluri & Zeisberg, 2006). Zusätzlich zeichnen sie sich durch die Expression des *Fibroblast Specific Protein 1* (FSP1) (Kalluri, 2016) sowie durch

eine äußerst geringe Proliferationsrate (Ki67) aus. Diese ist namensgebend für diese, auch als „ruhend“ bezeichneten, Fibroblasten (Strutz *et al.*, 1995).

Im Zuge der Wundheilung sezernieren verletzte Epithelzellen und infiltrierende Immunzellen Wachstumsfaktoren wie TGF- β 1, den *Epidermal Growth Factor* (EGF), den *Platelet-derived Growth Factor* (PDGF) und den *Fibroblast Growth Factor* (FGF), was ruhende Fibroblasten gezielt zum Wundherd lockt und deren Aktivierung bedingt (Zeisberg *et al.*, 2000). Diese Aktivierung geht mit einer erhöhten Expression von Aktivierungsmarkern, wie der Aktin-Isoform α -Smooth Muscle Actin (α -SMA), CD90 oder dem *Neuron-gial Antigen 1* (NG2) einher, weswegen aktivierte Fibroblasten auch als Myofibroblasten bezeichnet werden (Kalluri, 2016). Am Wundherd angekommen, hyperproliferieren die aktivierten Fibroblasten und synthetisieren vermehrt ECM-Proteine, wie Kollagene und Fibronectin und sind so wesentlich für die Fibrogenese und die Entstehung von Granulationsgewebe verantwortlich (Darby *et al.*, 2014). Abschließend erfolgt die Epithelialisierung im Zuge derer die Wunde mit neuen Epithelzellen überzogen wird bis sie vollkommen geschlossen ist (Darby & Hewitson, 2007). Wundheilungs-assoziierte Fibroblasten können entweder durch Epithel-mesenchymale Transition (EMT) zur Epithelialisierung beitragen, werden apoptotisch und sterben ab oder sie kehren zu ihrem ruhenden Phänotyp zurück (Desmouliere *et al.*, 1995; Garbin *et al.*, 1996; Kalluri, 2016). Die jeweiligen zugrundeliegenden Mechanismen sind bislang noch nicht abschließend erforscht.

In Analogie zu dem Postulat „*Tumors: Wounds That Do Not Heal*“ (Dvorak, 1986; 2015) formen auch die Fibroblasten in soliden Tumoren ein aktiviertes Stroma (Kalluri & Zeisberg, 2006). Jedoch geht diese Aktivierung mit einem irreversibel veränderten Phänotyp einher. Neben den oben genannten Aktivierungsmarkern exprimieren Krebs-assoziierte Fibroblasten zudem *Fibroblast Activation Protein* (FAP) (Zi, He, He, Li, Yang, & Cai, 2015a). FAP wird von bis zu 70 % der CAFs exprimiert, während normale, ruhende und damit nicht-aktivierte Fibroblasten keine Expression aufweisen (Kalluri, 2016). Damit kann FAP als derzeit verlässlichster Marker für irreversibel aktivierte Fibroblasten (CAFs) angesehen werden.

Die übrigen zuvor erwähnten Marker identifizieren zumeist nur eine Subpopulation von CAFs, was die Heterogenität der CAFs innerhalb des Stromas unterstreicht (Öhlund *et al.*, 2014; Sugimoto *et al.*, 2014). Zudem ist keiner dieser Marker CAF-spezifisch, sie werden also auch von diversen anderen Zelltypen exprimiert. FSP1 bspw. wird auch von Makrophagen, anderen Immunzellen und einigen Tumorzellen exprimiert (Kikuchi *et al.*, 2006; Österreicher

et al., 2011). Zur molekularen Charakterisierung von CAFs sollte daher abhängig von der Tumorentität immer eine Kombination mehrerer Marker verwendet werden.

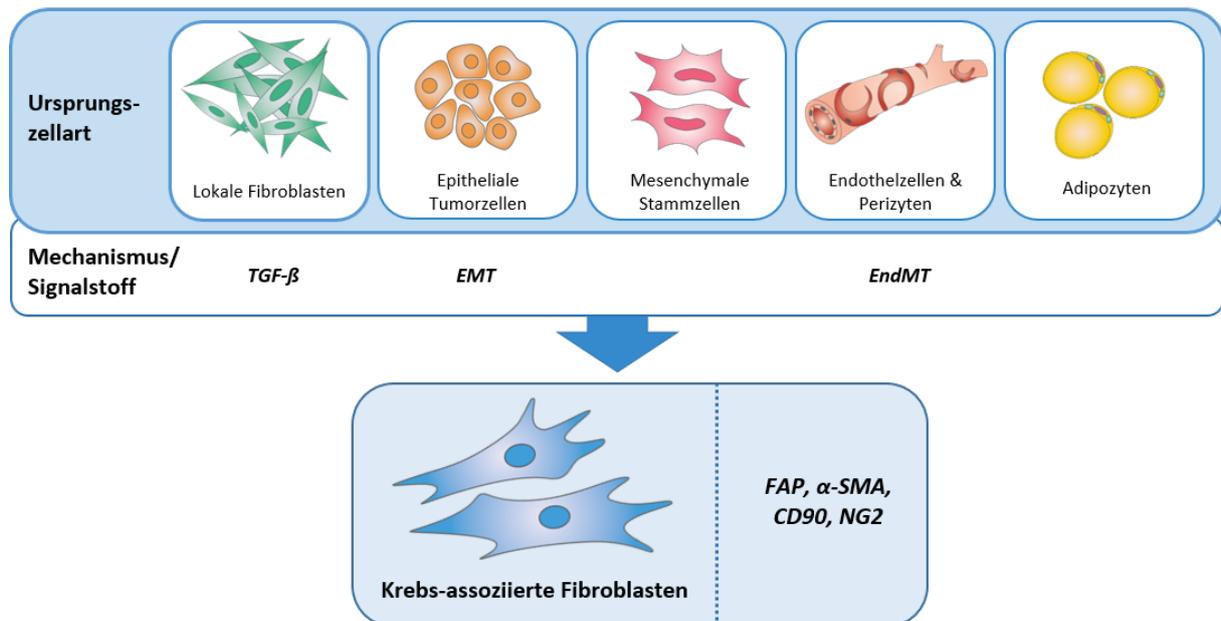


Abbildung 1: Ursprungszelltypen, aus denen CAFs hervorgehen können und die zugehörigen Transformationsmechanismen. Lokale Fibroblasten werden durch tumorbedingte Sekretion von TGF-β aktiviert. Epitheliale Tumorzellen können sich über Epithel-mesenchymale Transition (EMT) zu mesenchymalen Fibroblasten entwickeln. CAFs können aus Endothelzellen (über Endothel-mesenchymale Transition (EndMT)), Perizyten, mesenchymalen Stammzellen oder Adipozyten entstehen. Der aktivierte Phänotyp ist mit der Expression diverser Aktivierungsmarker verbunden: FAP = *Fibroblast Activation Protein*, α-SMA = *α-Smooth Muscle Actin*, NG2 = *Neuron-glial Antigen 1*.

Neben der oben beschriebenen Aktivierung der bereits vorhandenen Fibroblasten können sich CAFs auch aus mesenchymalen Stammzellen (Direkze et al., 2004; Direkze & Alison, 2006; Mishra et al., 2008), Perizyten (Potenta et al., 2008) oder Adipozyten (Jotzu et al., 2010) entwickeln. Außerdem können sie über die sogenannte *Endothelial-to-Mesenchymal Transition* (EndTM) aus Endothelzellen (Zeisberg et al., 2007), oder über die *Epithelial-to-Mesenchymal Transition* (EMT) aus epithelialen Tumorzellen hervorgehen (Abbildung 1) (Kalluri, 2009; Kalluri & Weinberg, 2009).

1.3.4.2 Regulierung der anti-Tumorimmunantwort durch CAFs

CAF's begünstigen durch Sekretion diverser Chemokine und Wachstumsfaktoren wie dem *Hepatocyte Growth Factor* (HGF), TGF-β, *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), IL-2, *Stromal Cell-derived Factor 1* (SDF-1) die Metastasierung, Invasion (Sugihara et al., 2015) und Angiogenese (Goh et al., 2007; Kayamori et al., 2016). Sie beeinflussen Motilität und Eigen-

schaften von Tumorstammzellen (Morrison & Spradling, 2008; Geary *et al.*, 2014) und forcieren die Tumorzellproliferation (Kuperwasser *et al.*, 2004; Harper & Sainson, 2014). Über die Sekretion von HGF sind CAFs in der Lage, Resistenzen gegenüber verschiedenen Chemotherapeutika zu vermitteln (Straussman *et al.*, 2012) und beeinflussen außerdem die Radioresistenz von Tumorzellen (Ji *et al.*, 2015). In einer aktuellen Studie konnte gezeigt werden, dass die pharmakologische Inhibierung von CAFs das Ansprechen auf Chemotherapie verbesserte und mit verminderter Angiogenese einherging (Li *et al.*, 2016).

Zusammengenommen überrascht es nicht, dass die Genexpressionssignatur des Stromas als prognostischer Prädiktor herangezogen werden kann und die Expression typischer CAF-Marker mit schlechterem Therapieansprechen und geringerem Gesamtüberleben einhergeht (Finak *et al.*, 2008; Yamashita *et al.*, 2012; Luo *et al.*, 2015).

Neben Metastasierung und Angiogenese kommt CAFs auch bei der Vermittlung von Immuntoleranz eine wichtige Bedeutung zu. Sie modulieren sowohl die Zellen des angeborenen als auch die des adaptiven Immunsystems. In frühen Stadien der Neoplasie sezernieren CAFs pro-inflammatorische Chemokine, wodurch Immunzellen wie Monozyten, Mastzellen, Neutrophile und TCs angelockt werden (Harper & Sainson, 2014). Gelingt es diesen Zellen jedoch nicht, die Tumorzellen erfolgreich zu eliminieren, kommt es zum *Immune Escape* (vgl. 1.3.3 Tumorummunologie) und damit zur Tumorprogression (Schreiber *et al.*, 2011). Die Tumorzellen reprogrammieren die Fibroblasten, was sich in einem permanent aktivierten Phänotyp äußert (Kalluri, 2016).

Auf diese Weise aktivierte Fibroblasten weisen ein spezielles pro-inflammatorisches NF- κ B-abhängiges Genexpressionsprofil auf (Erez *et al.*, 2010). Das Sekretom beinhaltet die Chemokine CXCL1, CXCL2, CXCL5, CCL3 sowie die pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-6 (Abbildung 2). Durch die Sekretion werden gezielt suppressive Immunzellen rekrutiert, die dann massiv zu einer anti-inflammatorischen Mikroumgebung beitragen (Erez *et al.*, 2010). Curran *et al.* konnten zeigen, dass CAFsIDO exprimieren, wodurch die Expansion von T_{reg} begünstigt (Curran *et al.*, 2014) und die Proliferation von T_{eff} supprimiert wird (Cheng *et al.*, 2016). Außerdem können CAFs, im Gegensatz zu normalen Fibroblasten, durch Sekretion von TGF- β und VEGF die Proliferation von T_{eff} supprimieren und diese durch die Expression von B7-H1 (PD-L1) sogar in die Apoptose treiben (Takahashi *et al.*, 2015).

Unter oben genannten Zytokinen und Chemokinen kommt TGF- β und TNF- α eine besondere Rolle zu. Sowohl TGF- β 1 als auch TGF- β 2 sind in CAFs hochreguliert und werden in großen

Mengen sezerniert (Kuperwasser *et al.*, 2004). So kann durch autokrine Stimulation der aktivierte CAF-Phänotyp aufrechterhalten werden, auch wenn Tumorzellen therapiebedingt eliminiert wurden und so die parakrine Stimulation der CAFs wegfällt.

Parakrine Stimulation

(Tumorzellen, Immunzellen, andere Stromazellen)

Autokrine Stimulation

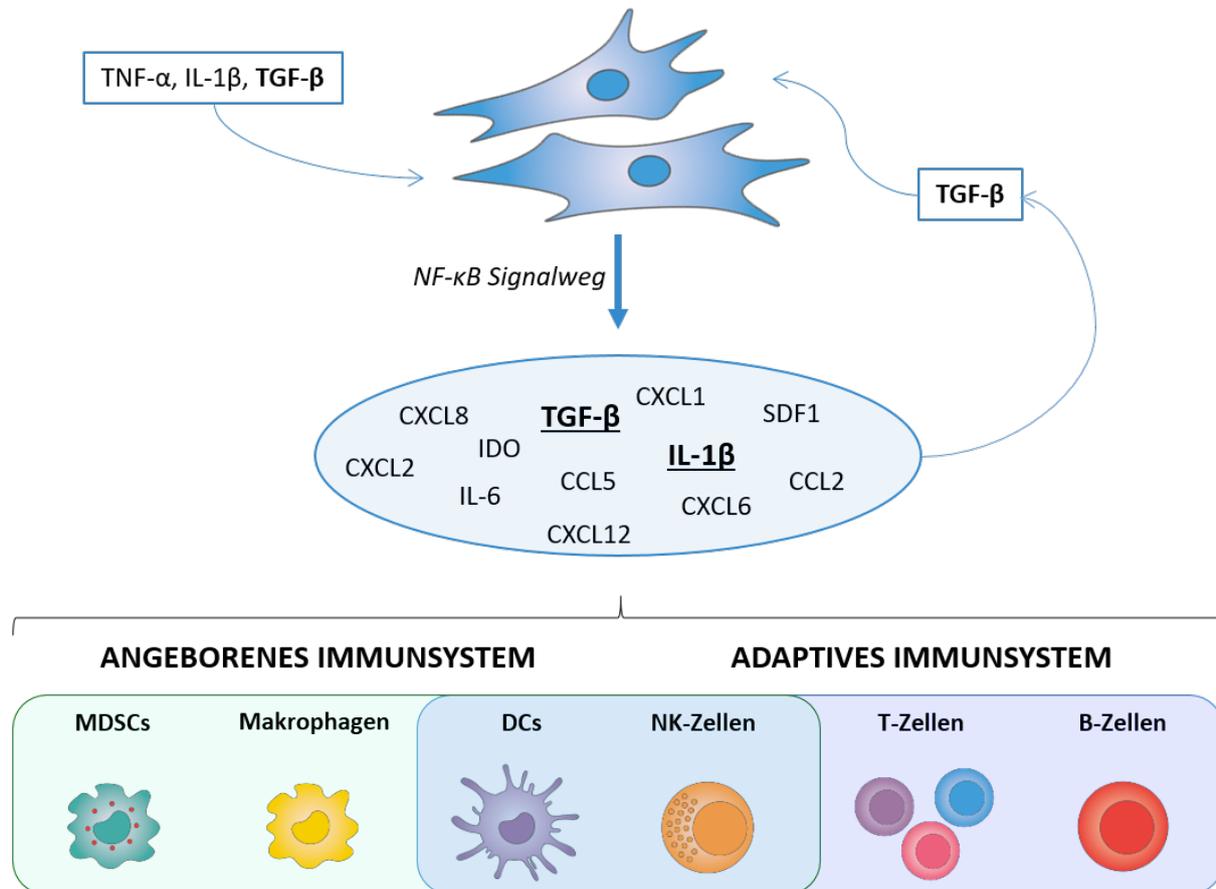


Abbildung 2: Aktivierung von CAFs durch parakrine und autokrine Stimulation

Krebs-assoziierte Fibroblasten (CAFs) werden durch Tumorzellen, Immunzellen und anderer Stromazellen über die Sekretion von IL-1β, TGF-β und TNF-α parakrin stimuliert, wodurch sie ihren aktivierten Phänotyp erhalten. Dieser geht mit der Aktivierung eines speziellen proinflammatorischen NF-κB-abhängigen Geneexpressionsprofils einher, das wiederum die Sekretion diverser Chemokine, IL-1β, TGF-β und TNF-α bedingt. Diese beeinflussen die Zellen des inaten und adaptiven Immunsystems, was zu einer anti-inflammatorischen protumorigenen Mikroumgebung führt. Diese Über autokrine Stimulation mit TNF-α kann so der aktivierte Phänotyp auch nach Wegfall des parakrinen Stimulus aufrechterhalten werden.

Durch parakrine Wirkung von TGF-β wird auch die IFN-γ-Produktion von NKs attenuiert und darüber die T_H1-Differenzierung von T-Zellen beeinträchtigt (Laouar *et al.*, 2005). Außerdem inhibiert TGF-β die Expression der Aktivierungsrezeptoren von NKs (Harper & Sainson, 2014). Auch DCs werden auf verschiedene Art und Weise durch von CAF sekretiertes TGF-β beeinflusst. So kann beispielsweise die Migration von DCs inhibiert werden. Außerdem begünstigen CAFs die Bildung von regulatorischen DCs, die durch eine verminderte Expression von

MHC-II-Rezeptoren sowie kostimulatorischen Molekülen (CD80, CD40 und CD86) charakterisiert sind. Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass CAFs die trans-Differenzierung von CD4⁺ TCs zu suppressiv wirkenden T_{reg} beeinflussen (Hawiger *et al.*, 2001; Curry *et al.*, 2014). Zusammenfassend verdeutlichen diese Ergebnisse, dass CAFs nicht nur, wie lange Zeit in der Forschung angenommen, *Bystander* sind, sondern aktiv zur Modulation eines immunsuppressiven Mikromilieus beitragen. Auf die positiven Effekte einer Therapie-bedingten Eliminierung der CAFs wird unter Punkt 1.4.2 näher eingegangen.

1.4 Immuntherapie

Neben klassischen Therapiekonzepten sind immuntherapeutische Behandlungsansätze die derzeit vielversprechendsten im Kampf gegen Krebserkrankungen und gewinnen zunehmend an klinischer Bedeutung (Mellman *et al.*, 2011). Ziel der Krebsimmuntherapie ist es, die körpereigene Immunabwehr zu reaktivieren und zu verstärken ohne jedoch eine Autoimmunantwort hervorzurufen. Die außergewöhnliche Leistungsfähigkeit, die extrem hohe Spezifität, die systemische Wirkung sowie die Gedächtnisfunktion des Immunsystems sind entscheidende Vorteile gegenüber herkömmlichen Therapieformen. Damit eignet sich die Immuntherapie hervorragend, um Krebszellen spezifisch zu eliminieren und damit dauerhafte Remissionen zu erzielen (Galluzzi *et al.*, 2015).

Generell werden passive und aktive Krebsimmuntherapien unterschieden (Galluzzi *et al.*, 2015). Zur passiven Immuntherapie zählen onkolytische Viren, chimäre Antigenrezeptoren (*Chimeric Antigen Receptors*, CARs), der adoptive (T-)Zelltransfer und im Labor hergestellte tumorspezifische Antikörper (Strebhardt & Ullrich, 2008; Maus *et al.*, 2014). Deren jeweilige Wirkmechanismen unterscheiden sich dabei je nach Zielmolekül. Zum einen können die Tumorzellen selbst oder versorgende Strukturen adressiert werden. Der monoklonale Antikörper (*Monoclonal Antibody*, mAB) Cetuximab (Erbix[®]) beispielsweise inhibiert die Proliferation von Tumorzellen, indem er den EGF-Rezeptor blockiert und so die Bindung endogener Liganden verhindert (Herbst *et al.*, 2001; Humblet, 2004). Bevacizumab (Avastin[®]) dagegen bindet an VEGF und hemmt so die Angiogenese und damit die Nähr- und Sauerstoffversorgung von soliden Tumoren (Willett *et al.*, 2004).

Bei der aktiven Immuntherapie hingegen werden über verschiedene Vakzinierungsstrategien tumorspezifische T-Zellantworten induziert. Dafür werden entweder autologe DCs isoliert, *ex vivo* mit tumorspezifischen Peptiden oder Tumorlysaten beladen und anschließend in den Blutkreislauf des Patienten re-injiziert, oder die Tumorlysate oder Peptide werden in Form

einer Impfung subkutan injiziert (Impfvakzine). In beiden Fällen werden Tumorantigene von APCs prozessiert und autologen T-Zellen präsentiert, was eine tumorspezifische T-Zellantwort auslöst (Guo *et al.*, 2013). Auf die verschiedenen Vakzinierungsstrategien und Impfantigene wird unter Punkt 1.4.1 näher eingegangen. Darüber hinaus zählen auch immunstimulatorische Zytokine wie IFN- α 2b (Intron A[®]) und IL-2 (Proleukin[®]), Inhibitoren des immunsuppressiven Metabolismus wie IDO-Inhibitoren, *Pattern Recognition Receptor* (PRR)-Antagonisten, sogenannte *Immunogenic Cell Death Inducer* und immunmodulierende mABs zur aktiven Immuntherapie (Galluzzi *et al.*, 2015).

Die aktuell größten Hoffnungsträger sind Immuncheckpoint-Inhibitoren, wie Anti-CTLA-4-Antikörper (z.B. Ipilimumab, Yervoy[®]) oder Anti-PD-1-Antikörper (z. B. Nivolumab, Opdivo[®]). Da diese Antikörper zentrale Mechanismen der Immunsuppression inhibieren und damit bereits existierende Immunantworten verstärken bzw. reaktivieren können, sind sie unabhängig von der Tumorentität einsetzbar (Pardoll, 2012). Die Therapie mit Checkpoint-Inhibitoren und die damit einhergehende Modulation des Immunsystems birgt allerdings moderate bis schwer abschätzbare Risiken und Nebenwirkungen. Behandelte Patienten klagen häufig über anhaltende Müdigkeit, Hautausschläge, Juckreiz, Husten, Diarrhoe, Appetitlosigkeit, Obstipation und Gelenkschmerzen (Hamid *et al.*, 2013; Robert *et al.*, 2014). Seltener verursachten die Behandlungen Nephropathie, Myopathie, Sarkoidose oder Leukopenie, die in einigen Fällen sogar tödlich verliefen (Voskens *et al.*, 2013). Laut einer kürzlich veröffentlichten Studie stehen die Checkpoint-Inhibitoren Ipilimumab[®] und Nivolumab[®] überdies im Verdacht, entzündliche Arthritis hervorzurufen (Cappelli *et al.*, 2016).

Wie die zahlreichen immuntherapeutischen Ansätze am besten untereinander und auch mit herkömmlichen Therapien, wie Radiotherapie oder Chemotherapie verbunden werden können, um antagonistische Wirkungen auszuschließen und im besten Fall synergistisch zu wirken sowie die Nebenwirkungen zu minimieren, ist Gegenstand der aktuellen Forschung (Melero *et al.*, 2014; 2015; Sharabi *et al.*, 2015).

1.4.1 Impfantigene und Vakzinierungsstrategien

Die im Zuge der malignen Transformation angehäuften molekularen Veränderungen bedingen ein verändertes Proteinexpressionsprofil der Tumorzellen (Cancer Genome Atlas Network, 2015). Dieses wird im Idealfall von den Immunzellen erkannt und führt zur Induktion einer tumorspezifischen Immunreaktion gegen dieses Antigen (Beckhove *et al.*, 2010; Kreiter *et al.*, 2015).

Es werden zwei Gruppen von Tumorantigenen (*Tumor Antigens*, TAs) unterschieden, die für eine Impfung genutzt werden können: tumorspezifische Antigene (*Tumor-specific Antigens*, TSAs) und Tumor-assoziierte Antigene (*Tumor-associated Antigens*, TAAs). TSAs werden ausschließlich von Tumorzellen exprimiert. Dies können „neue“ Proteine (Neo-Antigene) sein, die als Folge einer Genmutation entstanden sind oder aufgrund einer Infektion mit Onkovi- ren (virale TAs) exprimiert werden. Diese sind in der Lage, besonders starke Immunantworten zu generieren, da spezifische T-Zellen während der Embryogenese nicht der Negativselektion unterlagen (vgl. Punkt 1.3.2 T-Zellvermittelte Immunität). TAAs hingegen werden auch von gesunden Körperzellen exprimiert. Allerdings werden TAAs häufig in anderer Dichte (überexprimierte TAs), am falschen Ort (*Cancer Testis Antigens*, CTAs), in einer anderen Entwicklungsstufe (Differenzierungs- oder onkofetale TAs) exprimiert.

Ob sich ein Antigen als Impfantigen eignet, ist von mehreren Kriterien abhängig, die im Jahr 2009 von Wissenschaftlern des *National Cancer Institut* ausgearbeitet und publiziert wurden und die bis heute als Richtlinie dienen (Cheever *et al.*, 2009). Dazu zählen (in absteigender Relevanz) die therapeutische Funktion (1), die Immunogenität (2), Spezifität/Wirksamkeit (3), Expressionsstärke (Höhe/Homogenität) (4), Stammzell-assoziierte Expression (5), Prozentsatz von Patienten mit Antigen-positiven Tumoren (6), Anzahl der immunogenen Epitope (7) sowie die zelluläre Lokalisation (8) von Antigenen (Cheever *et al.*, 2009). Die Wirksamkeit von Peptidvakzinen basiert primär darauf, dass DCs die verabreichten synthetischen Peptidsequenzen prozessieren und TCs die HLA-präsentierten abnormen Peptide erkennen. Dies führt zu einer stabilen TSA/TAA-spezifischen Immunantwort (Melero *et al.*, 2014; Galluzzi *et al.*, 2015). Während kurze Peptide (*Short Peptides* (8-15 Aminosäuren)) direkt an MHC-Moleküle binden, müssen synthetische lange Peptide (*Synthetic Long Peptides*, SLPs (16-50 Aminosäuren)) zuerst von DCs phagozytiert und TAP-prozessiert werden, ehe sie MHC-gebunden an der Zelloberfläche präsentiert werden können (vgl. 1.3.2 T-Zellvermittelte Immunität). Um die Aktivierung der DCs zu verbessern, wird die Verwendung von sogenannten *Toll-like Receptor Ligands* (TLR-L) in verschiedenen Studien untersucht (Speiser *et al.*, 2005; Sabbatini *et al.*, 2012; Zom *et al.*, 2014; Galluzzi *et al.*, 2015). Diese Liganden werden an die langen Peptide gebunden und konnten so nachweislich eine erhöhte CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellantwort in Krebspatienten induzieren (Zom *et al.*, 2014). Unabhängig von der Modifikation der Peptide und der Art der Vakzine wird in der Klinik die Reifung der DCs außerdem durch Gabe von immunstimulierenden Adjuvantien verstärkt (Melief & van der Burg, 2008).

Aufgrund des Scheiterns diverser vielversprechender Phase III und II Vakzinierungsstudien, wird derzeit zunehmend auf patienten- bzw. tumorspezifische Neoantigene gesetzt (Platten & Offringa, 2015). Allerdings ist die Identifizierung solcher patientenspezifischen Mutationen (individuelles Mutanom) bislang noch sehr aufwendig und kostenintensiv. Hinzu kommt, dass nicht alle Mutationen immunogen sind und zudem die Höhe der induzierten T-Zellantworten stark variieren kann (Robbins *et al.*, 2013; Kreiter *et al.*, 2015). Durch diverse Datenbank-basierte Prädiktionsalgorithmen können zwar MHC-I- und MHC-II-restringierte T-Zellepitope prädiktiert, deren Immunogenität jedoch nicht gewährleistet werden (Peters *et al.*, 2003; Tenzer *et al.*, 2005; Nielsen *et al.*, 2007). Kreiter und Kollegen konnten in einer kürzlich publizierten Studie zeigen, dass die Mehrheit der über DNA/RNA-Sequenzierung detektierten immunogenen Mutationen MHC-II restringiert waren (Platten & Offringa, 2015). Mit einer auf diesen Mutationen basierenden „poly-Neoepitop mRNA-Vakzine“ konnten effektiv CD4⁺ T-Zellantworten induziert werden (Kreiter *et al.*, 2015). Diese Neoantigen-spezifischen CD4⁺ TCs tragen mittelbar zu einer effizienten T-Zellantwort bei, indem sie durch Sekretion von IFN- γ , IL-2 und TNF- α weitere Immunzellen rekrutieren und/oder aktivieren (Braumüller *et al.*, 2013).

Eine weitere potenzielle Quelle von T-Zellantigenen sind die CAFs des tumorsupportiven Stromas solider Tumore. Diese sollten aufgrund ihres veränderten Phänotyps ein Repertoire an neuen CAF-assoziierten Zielantigenen (*CAF-associated Target Antigens*, CAF-TAs) präsentieren und darüber selektiv angreifbar sein (Kakarla *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2014; De Vlieghere *et al.*, 2015). Auf die Vorteile Tumorstroma-assoziiierter Zielstrukturen wird im folgenden Abschnitt näher eingegangen.

1.4.2 CAFs als (immun-)therapeutische Zielstrukturen

Aufgrund ihrer Relevanz für die Entwicklung und Progression von soliden Tumoren und ihren immunsuppressiven Eigenschaften stellen CAFs einen wichtigen, zusätzlichen therapeutischen Angriffspunkt dar. Durch die erfolgreiche Zerstörung der tumorunterstützenden Hauptzellpopulation des Tumorstromas, den CAFs, werden dem Tumor gleichzeitig tumorsupportive und immunsuppressive Signalstoffe entzogen, was zur Beeinträchtigung des Tumors und zur Reaktivierung des Immunsystems führt (Liao *et al.*, 2009; Zhang & Ertl, 2016). Für immuntherapeutische Ansätze ist zudem von besonderer Bedeutung, dass CAFs im Gegensatz zu Tumorzellen keine *Immune-Escape*-Varianten ausbilden und ihre MHC-Rezeptoren nicht herunterregulieren (Zhang, 2008). Durch stabile Expression von MHC-I-

und MHC-II-Molekülen kann so eine essenzielle CD4⁺ T_H-Antwort entstehen (Sun *et al.*, 2008).

Da FAP als derzeit zuverlässigster Marker für CAFs erachtet werden kann, gibt es verschiedene Ansätze, die auf die direkte Eliminierung FAP-positiver (FAP⁺) CAFs abzielen. So konnte gezeigt werden, dass die Eliminierung von CAFs *in vivo* durch eine DNA-Vakzine gegen FAP zu einem Wandel des Immunmikromilieus von einer T_H2 hin zu einer T_H1-Polarisierung führt und zudem mit einer verminderten Rekrutierung von TAMs, MDSCs und T_{reg} assoziiert war (Liao *et al.*, 2009). Auch wurden FAP-reaktive chimäre Antigenrezeptoren verwendet, um TCs zu transduzieren. Im Mausmodell zeigte sich, dass die so modifizierten TCs spezifisch FAP⁺ Zielzellen (CAFs) töten, und dass dies mit einem deutlich besseren Überleben einherging (Karkarla *et al.*, 2013). In anderen Studien mit FAP-CARs hingegen konnten nur minimale anti-Tumoreffekte nachgewiesen werden. Zudem hatte die Behandlung mit FAP-spezifischen TCs letale Knochenmarkstoxizität und Kachexie zur Folge (Tran *et al.*, 2013). Als Ursache hierfür wurde diskutiert, dass FAP auch von mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks exprimiert wird (Mishra *et al.*, 2008; Tran *et al.*, 2013).

In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass die Immunisierung mit Zelllysaten bFGF-aktivierter (α -SMA⁺) Fibroblasten im Mausmodell eine Immunantwort gegen sowohl CAFs als auch Tumorzellen auslöst, die mit späterer Tumorinitiation, signifikant kleineren Tumoren und längerem Gesamtüberleben einherging (Li *et al.*, 2013). Diese tumorsuppressiven Effekte konnten auch in weiteren transgenen Mausmodellen bestätigt werden. Verschiedene Untersuchungen *in vitro* und *in vivo* zeigten, dass sich die gezielte Eliminierung von CAFs zudem positiv auf das Ansprechen auf Radio- und Chemotherapie auswirkt und durch den Wegfall des CAF-induzierten immunsuppressiven Mikromilieus die anti-Tumorimmunantwort positiv beeinflusst wird (Liao *et al.*, 2009; Wen *et al.*, 2010; De Vlieghe *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2016).

Damit ist die additive Eliminierung der CAFs für eine erfolgreiche und dauerhafte Tumorthherapie essenziell und die Entwicklung von gegen CAFs gerichteten therapeutischen Optionen von großer Bedeutung. Allerdings mangelt es derzeit noch an verlässlichen CAF-assoziierten Strukturen bzw. Markern, die adressiert werden können. Die Identifizierung solcher Zielstrukturen ist Gegenstand dieser Dissertation.

1.5 Zielsetzung

Trotz großer Fortschritte in Diagnostik und Therapie von HNSCC ist die Mortalitätsrate bei Patienten mit fortgeschrittenen Tumoren gleichbleibend hoch (Curry *et al.*, 2014). Herkömmliche therapeutische Maßnahmen, wie die operative Resektion und/oder Radiochemotherapie, zielen primär auf die Eliminierung der malignen Tumorzellen ab. Aus eventuell verbleibenden Tumorzellen können sich dann jedoch im weiteren Krankheitsverlauf Rezidive und/oder Metastasen entwickeln, was eine entsprechend schlechtere Prognose mit sich bringt (Marur & Forastiere, 2008). Ausschlaggebend hierbei sind die Zellen des Tumorstromas. Die Hauptzellpopulation des Tumorstromas sind Krebs-assoziierte Fibroblasten (CAFs), die durch Sekretion diverser Signalstoffe ein protumorigenes und immunsuppressives Mikromilieu aufrechterhalten und somit das Tumorwachstum sowie die Entstehung von Rezidiven begünstigen (Kalluri & Zeisberg, 2006). Eine therapiebedingte Eliminierung dieser Zellen verspricht die Bildung von Rezidiven sowie Metastasen zu verringern und gleichzeitig die körpereigene Immunabwehr gegen noch verbleibende Krebszellen zu (re)aktivieren (Karkarla *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2014). CAFs zeichnen sich durch eine permanente Aktivierung aus, welche mit der Expression eines CAF-assoziierten Phänotyps einhergeht (Kalluri & Zeisberg, 2006). Inwieweit dieser Phänotyp in der Lage ist, spontane T-Zellantworten zu induzieren und ob CAFs damit als neue zusätzliche Quelle von T-Zellantigenen dienen können, sollte im Rahmen dieser Dissertation untersucht werden. Nachfolgend sollten physiologisch relevante CAF-assoziierte T-Zellantigene identifiziert und charakterisiert werden. Dazu wurden folgende Punkte adressiert:

- Untersuchung spontaner T-Zellantworten auf autologe Tumorlysate sowie isolierte CAFs
- Systematische Identifizierung von CAF-assoziierten T-Zellantigenen, die patientenindividuelle spontane T-Zellantworten in HNSCC-Patienten induzieren können
- Validierung der putativen T-Zellantigene in einer unabhängigen Kohorte von HNSCC-Patienten und in gesunden tumorfreien Individuen
- Charakterisierung der neuen CAF-assoziierten T-Zellantigene hinsichtlich der mRNA-Expression in Tumoren und gesunden Referenzgeweben unter Verwendung öffentlich verfügbarer RNAseq-Daten der TCGA sowie die Untersuchung der zelltypspezifischen Proteinexpression mittels immunhistochemischer Färbungen.

2 MATERIAL

2.1 Geräte

Tabelle 3: Geräte

Bezeichnung	Bezugsquelle
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent, Santa Clara, US
Brutschrank	Sanyo, Wiesloch, DE
Durchflusszytometer BD FACSCanto™	BD Biosciences, Heidelberg, DE
Durchflusszytometer BD LSRII™	BD Biosciences, Heidelberg, DE
Einfrierbox Cryo Safe™	NeoLab, Heidelberg, DE
ELISA-Reader Tecan Infinite® 200	Tecan, Männedorf, CH
Feinwaage	Sartorius, Göttingen, DE
Gefriermikrotom	Leica Microsystems, Wetzlar, DE
Gefrierschrank (-80 °C)	Sanyo, Wiesloch, DE
Immunospot® S5-System	CTL, Bonn, DE
Kugelmühle (Tissue Lyser LT)	Qiagen, Hilden, DE
Kühl-/Gefrierkombination (4 °C/ -20 °C)	Liebherr, Biberach, DE
MACSMix Rotor	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE
Magnetsystem Dynal® MPC-L	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US
Magnetsystem QuadroMACS	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE
Mikroskop, Modell IX51 (Fluoreszenz)	Olympus, Hamburg, DE
Mikroskop, Modell BX50 (Hellfeld)	Olympus, Hamburg, DE
Mikroskop, Modell CKX41 (Phasenkontrast)	Olympus, Hamburg, DE
Mikroskop Zeiss PALM MicroBeam (LCM)	Zeiss, Jena, DE
pH-Messgerät	EDT Instruments, Dover, GB
Pipetboy	Integra Biosciences, Fernwald, DE
Pipetten (1-10 µl / 10-200 µl /100-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, DE
ProteomeLab™ PF2D	Beckman Coulter, Krefeld, DE
SPEEDVAC Vacuum Concentrator	Bachofer, Reutlingen, DE
Spektralphotometer NanoDrop 2000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US
Sterilwerkbank	Kojair, Vilppula, FI
Stickstofftank MVE Cryosystem 6000	Chart, Georgia, US
TC20™ Automated Cell Counter	Biorad Laboratories Inc., Hercules, US
Tischzentrifuge Minifuge	Hettich, Tuttlingen, DE
Vortex VELP	Scientifica, Usmate, IT
Wasserbad	Medingen Labortechnik, Arnsdorf, DE
Zentrifuge	Heraeus, Hanau, DE

2.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Bezugsquelle
ABgene 96-Well-Platte, 1,2 ml Rundboden (1D PF2D)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US
Abdeckfolie 96-Well-Platte (2D PF2D)	Flexicom, Ahrensburg, DE
Adhäsions-Glasobjektträger HistoBond+	Marienfeld, Lauda-Königshofen, DE
AdhesiveCap 500 opaque	Zeiss, Jena, DE
Amicon® Ultra 4 ml Centrifugal Filters	Merck Millipore, Darmstadt, DE
Cell Counting Slides (Zellzählgerät TC20)	BioRad Laboratories, Hercules, US
DAKO-Pen	DAKO, Hamburg, DE
Deckgläschen	Knittel, Braunschweig, DE
Deep 96-Well-Platte, 2,2 ml Flachboden (2D PF2D)	Treff, Degersheim, DE
Disposable PD-10 Sephadex Desalting Column	Eprogen, Downers Grove, US
ELISPOT-Platte (MAHAS4510 MultiScreen-HA, 0,45 µm)	Merck Milipore, Darmstadt, DE
FACS-Röhrchen	BD Biosciences, Heidelberg, DE
Falcon Tubes (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, AU
Filterpipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Flachbodenplatten (6-, 24-, 96-Well)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, AU
Glaswaren	Schott, Mainz, DE
<i>High Pressure Chromatofocussing (HPCF) Säule 1D</i>	Eprogen, Downers Grove, US
<i>High Pressure Reversed Phase (HPRP) Säule 2D</i>	Eprogen, Downers Grove, US
Klebefolie 96-Well (<i>Sealing Mat</i>)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US
Kryoröhrchen	Nalgene, Rochester, US
Leucosep® Tubes	Greiner Bio-One, Kremsmünster, AU
Multiwell-Objektträger	Marienfeld, Lauda-Königshofen, DE
PEN-Membran-Glasobjektträger	Zeiss, Jena, DE
Pipettenspitzen (0,1-10, 10-200, 100-1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Protein Lobind Tubes (1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg, DE
Reaktionsgefäße (0,5, 1,5, 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Schneidemesser (Kryo-Gewebedünnschnitte)	Leica Microsystems, Wetzlar, DE
Skalpell	Feather, Osaka, JP
Stripetten (5, 10, 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Syringe (50 ml)	B. Braun Melsungen, Melsungen, DE
Sterile Syringe filter (0,22 µm)	Merck Millipore, Darmstadt, DE
Tissue-Tek®	Sakura FinetTek, Torrance, US
Zellkulturschalen, Plastik	Greiner Bio-One, Kremsmünster, AU
Zellkulturflaschen (T25, T75, T175)	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Zellsiebe (40 µm)	BD Biosciences, Heidelberg, DE

2.3 Chemikalien

Tabelle 5: Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
2-Methylbutan	Carl Roth, Karlsruhe, DE
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Invitrogen, Karlsruhe, DE
Aceton	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Acetonitril (HPLC-Grade)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Ammoniumhydrogencarbonat (NH_4HCO_3)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Aqua B. Braun	B. Braun Melsungen, Melsungen, DE
β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt, DE
Bovines Serum Albumin (BSA)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
pH Standards (pH 4.0, 7.5, 10.0)	Sigma Aldrich, Taufkirchen, DE
Chloralhydrat ($\text{C}_2\text{H}_3\text{Cl}_3\text{O}_2$)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Citronensäure-Monohydrat ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Cytoseal™60	Thermo Scientific, Waltham, US
DAKO-Verdünnungslösung	DAKO, Hamburg, DE
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
EDTA (pulverisiert)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Einbettmedium Tissue-Tek®	Sakura Finetek, Alphen aan Den Rijn, NL
Eosin G	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Ethanol, vergällt (98 %)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
FACS Flow, Rinse, Clean	BD Biosciences, Heidelberg, DE
Ficoll®400	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Glycerin (86 %)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Glycerol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Harnstoff	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Hämatoxilin	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Isopropanol (HPLC-Grade)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Kaliumaluminiumsulfat-Dodecahydrat ($\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO_3)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Kresylviolett	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Mayer's Hämaunlösung	Merck, Darmstadt, DE
Methanol (HPLC Grade)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Methylenblau	Merck, Darmstadt, DE
Mowiol® 4-88	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Natriumjodat (NaIO_3)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Octyl- β -D-Glucopyranosid	AppliChem, Darmstadt, DE

Bezeichnung	Hersteller
PBS (pulverisiert)	Biochrom, Berlin, DE
PF2D Start- und Endpuffer	Eprogen, Downers Grove, US
Proteaseinhibitor (P2714)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
SB3-10	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Streptavidin-ALP	Mabtech AB, Nacka Strand, SE
Thioharnstoff	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Trifluoressigsäure (TFA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Tris-Hydrochlorid (HCl), pH 7,8-8,2	Carl Roth, Karlsruhe, DE
TWEEN®20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Urea	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Wasser (HPLC-Grade)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Xylol	Carl Roth, Karlsruhe, DE

2.4 Zellkulturbasismedien, Puffer und Zusätze

Tabelle 6: Zellkulturbasismedien, Puffer und Zusätze

Bezeichnung	Hersteller
AB-Serum, human	Milan Analytica, Rheinfelden, CH
Betaisodona®	Mundipharma, Limburg, DE
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Invitrogen, Karlsruhe, DE
Dulbecco's Phosphat Buffered Saline (DPBS)	Invitrogen, Darmstadt, DE
EDTA Versen (1 %)	Biochrom, Berlin, DE
Fötale Kälberserum (FKS)	Biochrom, Berlin, DE
Sargramostim (Leukine®, GM-CSF); 2,8 x10 ⁵ U/ml	Bayer, Leverkusen, DE
Aldesleukin (Proleukin® S, IL-2); 10x10 ⁶ U/ml	Novartis, Basel, CH
Interleukin 4; 1,25x10 ⁵ U/ml	Milentyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe, DE
RPMI-1640 Medium	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Trypanblau-Lösung (0,4 %)	Biorad Laboratories, Hercules, US
Trypsin-EDTA (0,05 %)	Invitrogen, Karlsruhe, DE
X-Vivo20™	Lonza, Basel, CH

2.5 Puffer, Lösungen und Medien

Tabelle 7: Puffer, Lösungen und Medien

Bezeichnung	Zusatz	Endkonzentration
AB-Lösung	Avidin-DH	2 % (v/v)
	Biotinylierte Peroxidase	2 % (v/v)
	DPBS	96 % (v/v)

Bezeichnung	Zusatz	Endkonzentration
AEC-Lösung	Aqua ^{bidest}	93,46 % (v/v)
	Acetatpuffer (pH ≈ 5,2)	1,87 % (v/v)
	3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC)	2,80 % (v/v)
	Wasserstoffperoxid	1,87 % (v/v)
DC-Medium (für Dendritische Zellen)	X-Vivo20™	50 ml
	GM-CSF (560 Units/ml)	100 µl
	IL-4 (500 Units/ml)	200 µl
DMEM-Vollmedium	DMEM	89 % (v/v)
	FKS (steril filtriert)	10 % (v/v)
	Penicilin/Streptomycin	1 % (v/v)
Einfriermedium	humanes AB-Serum (steril filtriert)	90 % (v/v)
	DMSO	10 % (v/v)
Elvanol	DPBS (pH≈8)	74 ml
	Mowiol® 4-88, bei 50 °C ca. 16 h rühren	20 g
	Glycerin (86 %), bei 50 °C ca. 16 h rühren	46 ml
	20 min. bei 5340 xg zentrifugieren	
Eosin-Färbelösung	Ethanol (70 %)	99 % (v/v)
	Eosin G	1 % (v/v)
FACS-Puffer	DPBS	500 ml
	Bovines Serum Albumin (BSA)	0,5 % (w/v)
	EDTA	2 mM
HISS-Puffer	Natriumchlorid	1 M
	Octyl β-D-Glucopyranosid	0,2 % (w/v)
	Aqua ^{bidest}	ad 200 ml
Hämatoxilin-Färbelösung	Aqua ^{bidest}	2000 ml
	Hämatoxylin	2 g (w/v)
	NaIO ₃	0,4 g (w/v)
	KAl(SO ₄) ₂	100 g (w/v)
	C ₂ H ₃ Cl ₃ O ₂	100 g (w/v)
	C ₆ H ₈ O ₇	2 g (w/v)

Bezeichnung	Zusatz	Endkonzentration
Kresylviolett-Färbelösung	Aqua ^{bidest}	49,5 % (v/v)
	Ethanol	49,5 % (v/v)
	Kresylviolett	1 % (w/v)
MACS-Puffer	DPBS	94,5 % (v/v)
	EDTA	5 % (v/v)
	humanes AB-Serum (steril filtriert)	0,5 % (v/v)
Methylenblau-Färbelösung	Aqua ^{bidest}	99 % (v/v)
	Methylenblau	1 % (w/v)
PBS (10x)	PBS	95,5 g
	Aqua ^{bidest}	ad 1 l
PBS TWEEN®20 (Waschlösung)	Aqua ^{bidest}	90 % (v/v)
	PBS (10 x)	9,95 % (v/v)
	TWEEN®20	0,05 % (v/v)
PF2D-Membranlysepuffer	Urea	5 M
	Thiourea	2 M
	Glycerol	10 % (v/v)
	Tris-HCl (pH 7,8-8,2)	50 mM
	Octyl β-D-Glucopyranosid	2 % (w/v)
	SB3-10	2,5 % (w/v)
	Proteaseinhibitor (P2714)	1 mM
PF2D-Neutralisierungspuffer	Ammoniumhydrogencarbonat	0,4 M
	Aqua ^{bidest}	250 ml
Substratlösung ELISPOT-Assay	Substratpuffer (Stock 25 x)	0,4 % (v/v)
	Reagenz A	0,1 % (v/v)
	Reagenz B	0,1 % (v/v)
	Aqua ^{bidest}	99,92 % (v/v)
TC-Medium (für T-Zellen)	X-Vivo20™	50 ml
	Interleukin-2 (100 Units/ml)	50 µl
	Interleukin-4 (560 Units/ml)	24 µl

2.6 Kits

Tabelle 8: Kits

Bezeichnung	Bezugsquelle
AEC Peroxidase (HRP) Substrate Kit	Vector Laboratories, US
Agilent RNA 600 Nano Kit	Agilent Technologies, Santa Clara, US
AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kit	Qiagen, Hilden, DE
Compensation Bead Kit (anti-Mouse Ig, κ/Negative Ctrl)	BD Biosciences, Heidelberg, DE
Compensation Bead Kit (ArC™ Amine Reactive)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US
Dynabeads - Untouched Human T Cell Kit	Invitrogen, Karlsruhe, DE
EPCAM Microbeads Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE
LIVE/DEAD® Fixable Yellow Dead Cell Stain Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US
Micro BCA™ Protein Assay	Pierce, Rockford, US
RNase-free DNase Set	Qiagen, Hilden, DE
RNeasy Micro Kit	Qiagen, Hilden, DE
Vectastain Elite ABC Kit (Maus)	Vector Laboratories, Burlingame, US
Vectastain Elite ABC Kit (Kaninchen)	Vector Laboratories, Burlingame, US

2.7 Antikörper

2.7.1 Primärantikörper für die Immunhistochemie

Tabelle 9: Primärantikörper für die Immunhistochemie

Reaktivität	Spezies	Klon	Isotyp	Verdünnung (Konzentration)	Hersteller (Bestellnummer)
DNAJB11	Kaninchen	polykl.	IgG	1:100 (1 µg/ml)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE (# HPA010814)
FAP	Kaninchen	polykl.	IgG	1:200 (1,5 µg/ml)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE (# HPA059739)
HIST2H2AC	Kaninchen	polykl.	IgG	1:50 (20 µg/ml)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE (# HPA2108068)
HLA-ABC Antigen	Maus	W6/32	IgG2a,k	1:100 (0,9 µg/ml)	DAKO, Hamburg, DE (# R7000)
NANS	Kaninchen	polykl.	IgG	1:100 (1 µg/ml)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE (# HPA019223)
THBS2	Kaninchen	polykl.	IgG	1:100 (4 µg/ml)	Abcam, Cambridge, GB (# ab84469)
TXNDC17	Kaninchen	polykl.	IgG	1:100 (1 µg/ml)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE (# HPA022931)
Vimentin	Huhn	polykl.	IgY	1:100 (200 µg/ml)	Abcam, Cambridge, GB (# ab24525)
Zytokeratin	Maus	AE/AE3	IgG1	1:50 (0,2 µg/ml)	PROGEN, Heidelberg, DE (# 61835)
Zytokeratin (HMW)	Maus	34βE12	IgG1,k	1:50 (0,36 µg/ml)	DAKO, Hamburg, DE (# M0630)

HLA = Humanes Leukozytenantigen, HMW = *High Molecular Weight*, polykl. = polyklonal

2.7.2 Isotypkontrollen für die Immunhistochemie und Immunfluoreszenz

Tabelle 10: Isotypkontrollen für die Immunhistochemie

Reaktivität	Spezies	Isotyp	Klon	Hersteller (Bestellnummer)
Human	Maus	IgG	ICIGG1	Abcam, Cambridge, GB (# ab91353)
Human	Kaninchen	IgG (aus Serum)	N/A	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE (# I5006)

2.7.3 Fluorochrom-konjugierte Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenz

Tabelle 11: Fluorochrom-konjugierte Sekundärantikörper

Reaktivität	Spezies	Fluorophor	Verdünnung (Konzentration)	Hersteller (Bestellnummer)
Maus IgG (H+L)	Huhn	AlexaFluor®647	1:500 (4 µg/ml)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US (# A-21463)
Huhn IgY (H+L)	Ziege	AlexaFluor®488	1:500 (4 µg/ml)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US (# A-11039)
Kaninchen IgG (H+L)	Ziege	AlexaFluor®647	1:500 (4 µg/ml)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US (# A-11008)
Kaninchen IgG (H+L)	Ziege	AlexaFluor®555	1:500 (4 µg/ml)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US (# A-21428)

2.7.4 FACS-Antikörper

Tabelle 12: FACS-Antikörper und zugehörige Isotypkontrollen

Reaktivität	Spezies	Klon	Isotyp	Verdünnung (Konzentration)	Hersteller (Bestellnummer)
Vimentin-FITC	Maus	V9	IgG1,k	1:20 (25 µg/ml)	eBioscience, Frankfurt a.M., DE (# 11-9897-80)
Isotyp (IgG1)-FITC	Maus	poly	IgG1,k	1:20 (25 µg/ml)	eBioscience, Frankfurt a. M., DE (# 11-4714)
EPCAM-PE-Cy7	Maus	B17	IgG1	1:20 (0,06 µg/ml)	eBioscience, Frankfurt a. M., DE (# 25-9326-41)
Isotyp (IgG1)-PE-Cy7	Maus	poly	IgG1	1:300 (0,06 µg/ml)	eBioscience, Frankfurt a. M., DE (# 25-474-41)
FAP-APC	Maus	poly	IgG1	10 µl/1x10 ⁶ Zellen	R&D Systems, Wiesbaden, DE (# FAB3715A)
Isotyp (IgG1)-APC	Maus	poly	IgG1	10 µl/1x10 ⁷ Zellen	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE (# 130-092-214)
α-SMA-APC	Maus	1A4	IgG2a	10 µl/1x10 ⁶ Zellen	R&D Systems, Wiesbaden, DE (# IC4020A)
Isotyp (IgG2a)-APC	Maus	poly	IgG2a	10 µl/1x10 ⁶ Zellen	R&D Systems, Wiesbaden, DE (# IC003A)
HLA-ABC Antigen	Maus	W6/32	IgG2a,k	1:100 (0,9 µg/ml)	DAKO, Hamburg, DE (# R7000)
Isotyp	Maus	OX-34	IgG2a	1:110 (0,9 µg/ml)	Acris Antibodies, Herford, DE (# SM11P)
Anti-Maus IgG (H+L)-RPE	Ziege	poly	Ig	1:100 (15 µg/ml)	Jackson ImmunoResearch, US (# 115-116-146)

2.7.5 Antikörper für den *BeadSort*

Tabelle 13: Antikörper für die Aufreinigung der Dendritischen Zellen

Reaktivität	Spezies	Klon	Isotyp	Verdünnung (Konzentration)	Hersteller (Bestellnummer)
CD56	Maus	C218	IgG1, k	20 µg/100 µl Beads	Beckman Coulter, Krefeld, DE (# IM1844)
CD3	Maus	OKT-2	IgG2a	4 µg/100 µl Beads	Dr. Gerd Moldenhauer, DE (Core Facility Antikörper, DKFZ)
CD19	Maus	HD37	IgG2	4 µg/100 µl Beads	Dr. Gerd Moldenhauer, DE (Core Facility Antikörper, DKFZ)

2.7.6 Antikörper für den IFN-γ-ELISPOT-Assay

Tabelle 14: Antikörper für das Coaten der ELISPOT-Platte und die Entwicklungsreaktion

Reaktivität	Spezies	Klon	Isotyp	Verdünnung (Konzentration)	Hersteller (Bestellnummer)
IFN-γ	Maus	1-D1K	N/A	1:1000 (1 µg/ml)	Mabtec AB, Nacka Strand, SE (# 3420-3-1000)
IFN-γ (Biotin)	Maus	7-B61	N/A	1:1000 (1 µg/ml)	Mabtec AB, Nacka Strand, SE (# 3420-6-1000)

2.8 Synthetisch hergestellte lange Peptide

Tabelle 15: Synthetisch hergestellte lange Peptide

Gen	Peptid	Aminosäuresequenz	Länge [AS]
<i>CAP1</i>	CAP1	HLSAVSESIQALGWVAMAPKPGPYVKEMNDAAMFYTNRVLKEYKDV	46
<i>CFL1</i>	CFL1	FIFWAPESAPLKSMMIYASSKDAIKKKLTGIKHELQ	36
<i>CMPK1</i>	CMPK1	VPVEITISLLKREMDQTMAANAQKNKFLIDGFPR	34
<i>COL5A2</i>	COL5A2_1	NRDIWKPAQCQICVCDN	17
<i>COL5A2</i>	COL5A2_2	MTFLRLLSKEASQNTYICKNSVGYMDDQAKNLKAVVLKGANLDIK	48
<i>COX5A</i>	COX5A	IYPYVIQELRPTLNELGISTP	21
<i>DNAJB11</i>	DNAJB11	IPRGSDIIVDLEVTLEEVYAGNFVEVVRNKPVARQAP	37
<i>FABP5</i>	FABP5	RWRLVDSKGFDEYMKELGVGIALRKMGMAMAKPDCIITCDGKNLTI	45
<i>FAP</i>	FAP_1	KLWRYSYTATYYIYDLSNGEFVVRGNEPRPIQYLCW	36
<i>FAP</i>	FAP_2	KLLYAVYRKLGVYEVEDQITAVRKFIE	27
<i>GGH</i>	GGH	APYEWKNLDGISHAPNAVKTAIFYLAEFFVNEA	32
<i>GLRX</i>	GLRX	GARTVPRVFIGKDCIGGCSDLVSLQ	25
<i>GLT25D1</i>	GLT25D1	RLMNLMRDVEREGLDWDLIYVGRKRMQVEHPEKAVPRVRLVEADYSYWTV	51
<i>GSTO1</i>	GSTO1_1	EVININLNKKNPEWFFKKNPFGLVPVLE	27
<i>GSTO1</i>	GSTO1_2	KLEEVLTNKKTTFF	14
<i>H2AFZ</i>	H2AFZ	HLQLAIRGDEELDSLKA	18
<i>HIST2H2AC</i>	HIST2H2AC	LAGNAARDNKKTRIIPRHLQLAIRNDEELNKLKLGK	35
<i>HPRT1</i>	HPRT1	RTPRSVGYKPDFVGFEPDKFVVG	25
<i>HSP90AA1</i>	HSP90AA1	IMDNCEELIPEYLNFRGVVDSDELPLNISREMLQSQSKILKVKRNLVKK	50

Gen	Peptid	Aminosäuresequenz	Länge [AS]
<i>HSP90B1</i>	HSP90B1_1	LTVKIKCDKEKNLLHVTDGVMGTREELVKNL	32
<i>HSP90B1</i>	HSP90B1_2	EFSVIADPRGNTLGRGTTITLVL	23
<i>HSP90B1</i>	HSP90B1_3	QQHKLLKVIKKLVRKTLDMIKKIADD	27
<i>HSP90B1</i>	HSP90B1_4	DMLRRIKEDEDDKTVLDLAV	20
<i>KHSRP</i>	KHSRP	VPGPAPAPAAPPAQGEPPQPPTGQSDYTKAWEEYKKGQQPQQPGA	48
<i>MTPN</i>	MTPN	HITPLLSAVYEGHVSCVKLLLSKGADKT	28
<i>NANS</i>	NANS	ILTMDMLTVKVGEPKGYPPEDIFNLVGGKVLVTVVEEDDTIMEELV	45
<i>NPTN</i>	NPTN	ILAEIIILVVIIVVYEKRKRKRPDEVPDDDEPAGPMKTNSTN	40
<i>PAFAH1B3</i>	PAFAH1B3_1	VADSKDKEPEVVFIDSLVQLMHQCEIWRELFSPHLALNFG	41
<i>PAFAH1B3</i>	PAFAH1B3_2	RALHSLLLRLLAQDQ	15
<i>PALLD</i>	PALLD_1	AVNALGLPKGVTPAGFPKASRTARIASDEEIQGTKDAVIQ	41
<i>PALLD</i>	PALLD_2	KIYWFKDQKQJSPKSDHYTIQRDLDTGTCSLH	31
<i>PFN1</i>	PFN1	KTLVLLMGKEGVHGGLINKKCYEMA	25
<i>PRDX4</i>	PRDX4	YLVFFFYPLDFTFVCPTEIIAFGDRL	26
<i>RCN3</i>	RCN3	LLLLLRHGAQKQKPSPDAGPHGQGRVHQAPLSDAPHDDAHGNFQ	44
<i>RTCB</i>	RTCB	TMGTCSYVLTGTEQGMTETFGTTCHGAGRALSRAKSRR	38
<i>SET</i>	SET	FFQKRSELIAKIPNFWVTTFFVNHPQVSALLGEEDEEALHYLTRVE	45
<i>SH3BGRL</i>	SH3BGRL	RENVPENSRPATGYPLPPQIFNES	24
<i>SLC4A7</i>	SLC4A7	GLSVFMTSVLKFIPMPVLYGVFLYMGVSSLKGIQLFDRIKLFGMMPAKHQPD	51
<i>SLK</i>	SLK	TSQLLQHPFVTVDNKNPIRELIAEAKAEVTEEVEDGKE	38
<i>TACSTD2</i>	TACSTD2	VVVALVAGMAVLVITNRRKSGKYKKVEIKELG	32
<i>THBS2</i>	THBS2	KSRGTLLALEGPGLSQRQFEIVSNGPADTLDLTYWIDGTRHVVSLQDVLG	50
<i>TPM4</i>	TPM4	EAEKAADESERGMKVIENRAMK	22
<i>TXNDC17</i>	TXNDC17	VTAVPTLLKYGTPQKLVESE	20
<i>UBAP2L</i>	UBAP2L	LLHAYPPQVYGYDDLQMLQTRFPLDYYSIPFPTPTTPTLGRDGSL	45

AS = Aminosäure

2.9 Biologisches Material

2.9.1 Ethikvotum

Die in der hier vorliegenden Arbeit verwendeten Gewebe- und Blutproben stammen aus dem Bestand der Arbeitsgruppe Molekulare Zellbiologie (Hals-Nasen-Ohrenklinik, Universitätsklinikum Heidelberg) oder aus der NCT-Gewebebank Heidelberg. Die Patienten wurden am Universitätsklinikum Heidelberg operiert und haben der Verwendung ihres biologischen Materials vorab schriftlich zugestimmt. Überdies liegt eine Genehmigung der Ethikkommission der medizinischen Fakultät Heidelberg für die Nutzung des Patientengewebes sowie der daraus generierten Zelllinien und des Patientenbluts vor. Die in dieser Arbeit verwendeten Patientenkollektive sind nachfolgend detailliert aufgelistet.

2.9.2 Studienkollektive

2.9.2.1 Patientenkollektiv für die PF2D-ELISPOT-Analysen

Tabelle 16: Studienkollektiv bestehend aus vier HNSCC-Patienten, deren PBMCs und Tumorgewebe für die PF2D-IFN- γ -ELISPOT-Analysen verwendet wurden.

Patienten-ID	Tumorklassifikation	TNM-Stadium	Alter bei Erstdiagnose
HNO432	Hypopharynx	IVa	59
HNO467	Hypopharynx	III	44
HNO722	Oropharynx	IVa	64
HNO741	Larynx	IVa	54

2.9.2.2 Patientenkollektiv für die LCM

Tabelle 17: Studienkollektiv aus elf HNSCC-Patienten, deren Tumorstroma oder dysplasiefreie Normalstromagewebe mikrodissiziert und mittels mRNA-Expressionanalysen untersucht wurden.

Patienten-ID	Lokalisation	TNM-Stadium	Histopathologische Beurteilung	Isolierte Gewebeareale
HNO485y	Oropharynx	N/A	PEK	Tumor-/Tumorstromaareale
HNO543	Mundhöhle	III	PEK	Tumor-/Tumorstromaareale
HNO281b	Larynx	II	PEK	Tumor-/Tumorstromaareale
HNO269b	Larynx	III	PEK	Tumor-/Tumorstromaareale
NSH1	Mundhöhle	I	dysplasiefreies PE	Lamina propria
NSH2	Larynx	IVa	dysplasiefreies PE	Lamina propria
NSH5	Mundhöhle	IVa	dysplasiefreies PE	Lamina propria
NSH9	Hypopharynx	IVa	dysplasiefreies PE	Lamina propria
NSH13	Mundhöhle	IVa	dysplasiefreies PE	Lamina propria
NSH14	Mundhöhle	II	dysplasiefreies PE	Lamina propria
NSH21	Mundhöhle	III	dysplasiefreies PE	Lamina propria

PE = Plattenepithel, PEK = Plattenepithelkarzinom

2.9.2.3 Patientenkollektive für die IFN- γ -ELISPOT-Assays

Tabelle 18: Kollektiv bestehend aus HNSCC-Patienten, deren PBMCs für die Validierung der CAF-assoziierten T-Zellantigene im IFN- γ -ELISPOT-Assay verwendet wurden (n = 19).

Charakteristika			
	Median (\pm SD)	Spanne	
Alter (Jahre)	62 \pm 8,5	47-63	
	Frequenz	Prozent (%)	
Geschlecht	m = 17; w = 2	m = 85; w = 15	
Patienten-ID	Alter (Jahre)	Geschlecht	Tumorlokalisation
HNO558	70	m	Mundhöhle
HNO612	56	m	Oropharynx
HNO632	62	m	Larynx
HNO634	59	m	Larynx
HNO649	72	m	Mundhöhle
HNO657	57	m	Mundhöhle
HNO680	65	w	Larynx
HNO681	63	m	Larynx
HNO700	78	m	Larynx
HNO718	58	m	Oropharynx
HNO730	83	m	Larynx
HNO733	65	m	Larynx
HNO737	60	m	Mundhöhle
HNO750	68	w	Nasopharynx
HNO775	55	m	Mundhöhle
HNO779	47	m	Oropharynx
HNO784	59	m	Mundhöhle
HNO785	58	m	Oropharynx
HNO786	73	m	Hypopharynx

ID = Identifikationsnummer, m = männlich, SD = *Standard Deviation* (Standardabweichung), w = weiblich

Tabelle 19: Kollektiv bestehend aus tumorfreien gesunden Individuen, deren PBMCs für die Validierung der CAF-assoziierten T-Zellantigene im IFN- γ -ELISPOT-Assay verwendet wurden (n = 9).

Charakteristika		
	Median (\pm SD)	Spanne
Alter (Jahre)	60 \pm 3,4	(54-64)
	Frequenz	Verhältnis
Geschlecht	m = 6 ; w = 3	m = 2/3 ; w = 1/3
Patienten-ID	Alter (Jahre)	Geschlecht
HD1	57	m
HD2	63	m
HD3	64	m
HD4	54	w
HD5	58	w
HD6	64	m
HD7	58	m
HD8	59	w
HD9	63	m

HD = *Healthy Donor* (Gesunder Spender), ID = Identifikationsnummer, m = männlich, w = weiblich, SD = *Standard Deviation* (Standardabweichung)

2.9.3 Primäre humane Zelllinien

Bei allen im Rahmen dieser Arbeit verwendeten HNSCC-Kulturen handelt es sich um authentifizierte Kurzzeitzellkulturen, die in der AG Molekulare Zellbiologie etabliert wurden. Die humanen Gingivafibroblasten wurden uns freundlicherweise von der AG Orale Biotechnologie (Prof. Dr. Pascal Tomakidi) des Universitätsklinikums Freiburg zur Verfügung gestellt.

Tabelle 20: Humane primäre Zellkulturen, die für IFN- γ -ELISPOT Assays, PF2D-Analysen und Microarray-Analysen verwendet wurden. Krebs-assoziierte Fibroblasten (CAFs) und Tumorzellen (TUCs) wurden aus HNSCC-Tumorgeweben verschiedener Lokalisationen gewonnen und Gingivafibroblasten aus der Gingiva gesunder Spender.

ID	Passage	Ursprungsgewebe	Isolierter Zelltyp
#24GF/OB	p6	Gingiva	NFs
#28GF/OB	p6	Gingiva	NFs
#39GF/OB	p5	Gingiva	NFs
GF1/OB	p9	Gingiva	NFs
GF2/OB	p8	Gingiva	NFs
GF224	p6	Gingiva	NFs
GF243	p11	Gingiva	NFs
GF214	p5	Gingiva	NFs
GF247	p8	Gingiva	NFs

ID	Passage	Ursprungsgewebe	Isolierter Zelltyp
GF3/OB	p7	Gingiva	NFs
HNO210	p51	Oropharynx	TUCs
HNO210	p5	Oropharynx	CAFs
HNO212	p58	Mundhöhle	TUCs
HNO212	p3	Mundhöhle	CAFs
HNO258	p50	Mundhöhle	TUCs
HNO258	p3	Mundhöhle	CAFs
HNO387	p44	Oropharynx	TUCs
HNO387	p4	Oropharynx	CAFs
HNO388	p52	Nasopharynx	TUCs
HNO388	p6	Nasopharynx	CAFs
HNO399	p50	Mundhöhle	TUCs
HNO399	p3	Mundhöhle	CAFs
HNO404	p41	Oropharynx	TUCs
HNO404	p3	Oropharynx	CAFs
HNO407	p50	Oropharynx	TUCs
HNO407	p2	Oropharynx	CAFs
HNO413	p51	Oropharynx	TUCs
HNO413	p2	Oropharynx	CAFs
HNO432	p56	Hypopharynx	TUCs
HNO432	p2	Hypopharynx	CAFs
HNO443	p50	Oropharynx	TUCs
HNO443	p3	Oropharynx	CAFs
HNO467	p58	Hypopharynx	TUCs
HNO467	p4	Hypopharynx	CAFs
HNO722	p25	Oropharynx	TUCs
HNO722	p2	Oropharynx	CAFs
HNO741	p22	Larynx	TUCs
HNO741	p2	Larynx	CAFs

CAFs = *Cancer-associated Fibroblasts* (Krebs-assoziierte Fibroblasten), NFs = *Normal Gingiva-derived Fibroblasts* (Gingivafibroblasten), p = Passage, TUCs = *Tumor Cells* (HNSCC-Tumorzellen)

2.9.4 Software

Tabelle 21: Verwendete Software

Bezeichnung	Bezugsquelle
BD FACSDiva™	BD Biosciences, Heidelberg, DE
Cell Quest 3.3	BD Biosciences, Heidelberg, DE
cellSens Dimension	Olympus, Tokio, JP

Bezeichnung	Bezugsquelle
FlowJo v7.6.5	TreeStar, San Carlo, US
Gold	Beckman Coulter, Krefeld, DE
GraphPad Prism 7.0a	GraphPad Software, La Jolla, US
Magellan 3.0	Tecan, Crailsheim, DE
Microsoft Office (Word, Excel, PowerPoint)	Microsoft, Redmond, US
Papers	Labtiva, Cambridge, US
R Studio	The R Foundation for Statistical Computing, US

2.9.5 Datenbanken

Tabelle 22: Öffentlich zugängliche Datenbanken

Bezeichnung	Internetpräsenz
Compartments – Subcellular Location Database	www.compartments.jensenlab.org
GeneCards – Human Gene Database	www.genecards.org
The Human Protein Atlas (HPA)	www.proteinatlas.org
Immune Epitope Database and Analysis Resource (IEDB)	www.iedb.org
PubMed – National Center for Biotechnology Information (NCBI)	www.ncbi.nlm.nih.gov
The Cancer Genome Atlas (TCGA)	www.cancergenome.nih.gov
UniProt	www.uniprot.org

3 METHODEN

3.1 Zellbiologische Methoden

Sämtliche Arbeitsschritte mit Zellkulturen wurden unter der sterilen Werkbank mit sterilen bzw. autoklavierten Verbrauchsmaterialien durchgeführt. Zudem wurden ausschließlich sterile Medien, Zusätze, Puffer und Lösungen verwendet. Diese wurden, falls nicht anders angegeben, vor dem Einsatz auf Raumtemperatur (RT) erwärmt. Sämtliche Zentrifugationsschritte erfolgten für 10 min. bei 300 xg und RT.

3.1.1 Kultivierungsbedingungen

Für die Kultivierung der primären humanen Gingivafibroblasten sowie der HNSCC-Zellkulturen wurde DMEM-Vollmedium verwendet. Die T-Zellen und Dendritischen Zellen wurden in entsprechend mit Zytokinen versetztem X-Vivo20™-Medium kultiviert (Tabelle 6) Alle Kurzzeitkulturen wurden im Brutschrank bei 37 °C in Sauerstoff-gesättigter 5%iger CO₂-Atmosphäre inkubiert.

3.1.2 Kultivierung adhärenter Zellkulturen

Die Subkultivierung wurde von Eigenschaften wie Wachstumsgeschwindigkeit, Metabolismus und der Fähigkeit zur Kontakthemmung der verschiedenen primären Zellkulturen abhängig gemacht. Die Zellen wurden zunächst mit einem Phasenkontrastmikroskop begutachtet, um einen Eindruck über die Vitalität und Konfluenz zu gewinnen. Bei einer Konfluenz von 80-90 % erfolgte das Splitten. Dazu wurde das verbrauchte Medium verworfen und der Zellrasen einmal mit 5 ml DPBS/EDTA-Lösung gewaschen. Die adhären HNSCC-Tumorzellkulturen wurden anschließend zusätzlich für 10 bis 30 min. mit 5 ml DPBS/EDTA-Lösung inkubiert. Nach Entfernen der DPBS/EDTA-Lösung wurden 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung (0,05 %) auf den Monolayer gegeben und für 2-min. im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch starkes Klopfen der Flaschen auf festen Untergrund und unter Sichtkontrolle vom Flaschenboden gelöst. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 8 ml FKS-haltigem Medium abgestoppt. Noch am Flaschenboden haftende Zellen wurden mit Druck vom Flaschenboden gespült und durch Resuspendieren vereinzelt. Von dieser Zellsuspension ausgehend wurden dann $0,5-1 \times 10^4$ lebende Zellen in eine neue T75-Zellkulturflasche ausgesät. Das Kultivierungsvolumen betrug dabei 12 ml DMEM-Vollmedium.

3.1.3 Herstellung von Zellpellets

Für die weiteren Untersuchungen der adhärennten Zellen mittels IFN- γ -ELISPOT-Assay, PF2D ProteomeLab™ System sowie für die Extraktion von RNA für die Microarray-Expressionsanalysen wurden Zellpellets hergestellt. Dazu wurden die Zellen geerntet (Punkt 3.1.2). Um Rückstände des Mediums vollständig zu entfernen, wurden die Zellen dreimal mit 10 ml sterilem DPBS gewaschen. Dazu wurde die Zellsuspension in ein Falcon-Röhrchen überführt und zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet erneut in 10 ml DPBS resuspendiert. Vor dem letzten Zentrifugationsschritt wurde die Lebendzellzahl bestimmt (Punkt 3.1.5) und die gewünschte Zellzahl eingestellt. Der Überstand wurde sorgfältig abgenommen und das Pellet bei -80 °C gelagert.

3.1.4 Kryokonservierung und Inkulturnahme

Zur Kryokonservierung der Zellen wurde eine konfluente Zellkulturflasche geerntet (Punkt 3.1.2). Die Enzymreaktion wurde hierbei jedoch mit kaltem FKS-haltigem DMEM-Vollmedium abgestoppt. Anschließend wurde die Zellzahl bestimmt (Punkt 3.1.5). Die Zellsuspension wurde zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1 ml DMSO-haltigem Einfriermedium resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Dieses wurde zunächst bei -80 °C über Nacht in einer Einfrierbox eingefroren und dann zur mittel- und langfristigen Konservierung in flüssigem Stickstoff bei -196 °C aufbewahrt.

Zur Wiederinkulturnahme der eingefrorenen und im Stickstofftank gelagerten Zellen wurden diese zügig bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut bis nur noch ein kleiner Eiskristall sichtbar war. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml warmem DMEM-Vollmedium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt. Um tote Zellen und Reste des toxischen Einfriermediums zu entfernen, wurde das Medium am Folgetag gewechselt.

3.1.5 Bestimmung der Lebendzellzahl

Die Zellzahl und -vitalität wurde mittels *TC20™ Automated Cell Counter* bestimmt. Hierfür wurde die Zellsuspension 1:1 mit einer 0,4%igen Trypanblau-Lösung verdünnt und in eine spezielle Zählkammer (*Cell Counting Slides*) pipettiert. Der Trypanblaufarbstoff dringt in alle apoptotischen Zellen mit geschädigter Membran ein. Diese erscheinen dann unter dem Mikroskop blau, während lebende, vitale Zellen weiß erscheinen. Das Gerät zählt die Zellen und bestimmt den Anteil der lebenden und toten Zellen.

3.2 Immunhistologie

Die Immunhistologie ist eine der wichtigsten Methoden in der histopathologischen Diagnostik. Durch immunohistochemische Färbungen lassen sich charakteristische Expressionsmuster sowie die Lokalisation von Proteinen und anderen Strukturen auf Kryogewebedünnschnitten visualisieren. Im ersten Schritt bindet der Primärantikörper an einen definierten Proteinbereich (Epitop) des nachzuweisenden Antigens. Im zweiten Schritt wird der entstandene Antigen-Antikörper-Komplex durch die Verwendung eines Sekundärantikörpers nachgewiesen. Zur Visualisierung kann ein biotinylierter Sekundärantikörper, an den dann ein Komplex aus Avidin und Biotin-gekoppelter Peroxidase H bindet, verwendet werden. Die Farbreaktion wird dabei durch die Umsetzung des Enzymsubstrates (Wasserstoffperoxid) durch die Peroxidase H katalysiert (Chi & Chandy, 2007). Eine alternative Methode ist die Immunfluoreszenz. Dabei werden Fluorochrom-konjugierte Sekundärantikörper verwendet. Dies hat den Vorteil, dass mehrere Antigene gleichzeitig nachgewiesen werden können, während bei der Immunhistochemie zumeist nur ein Antigen detektiert werden kann. Die Visualisierung der Fluorochrom-konjugierten Antikörper erfolgt mittels Fluoreszenzmikroskopie. Hier werden die Fluorochrome über Laser angeregt und über spezielle UV-Filter das emittierte Licht definierter Wellenlänge detektiert.

3.2.1 Kryokonservierung von humanen Gewebeproben

Die Gewebestücke wurden unmittelbar nach der chirurgischen Resektion in ca. 0,5 cm³ große Stücke zerteilt und in -80 °C kaltem 2-Methylbutan schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C in der Gewebebank der AG Molekulare Zellbiologie.

3.2.2 Anfertigung von Kryo-Gewebedünnschnitten

Zur Anfertigung serieller Gewebedünnschnitte wurde das bei -80 °C gelagerte Tumorstück im Gefriermikrotom bei -25 °C luftblasenfrei in *Tissue-Tek*[®] eingebettet. Zur Verifizierung und Qualitätskontrolle wurde zu Beginn ein Schnitt mit Methylenblau-Lösung angefärbt und begutachtet. Am Ende jeder Schnittserie wurde zusätzlich je ein Hämatoxilin-Eosin(HE)-Schnitt angefertigt (Punkt 3.2.3). Für immunhistologische Färbungen wurden stets Gewebeschnitte mit einer Schnittdicke von 5 µm angefertigt. Dabei wurden immer jeweils zwei Schnitte auf einem Objektträger (OT) platziert. Diese wurden über Nacht getrocknet, anschließend für 10 min. in -20 °C kaltem Aceton fixiert und dann bei -80 °C gelagert.

3.2.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Zur histopathologischen Beurteilung des Gewebes wurde der letzte Objektträger einer Schnittserie mittels Hämatoxylin-Eosin(HE)-Färbung gefärbt. Diese ist die gebräuchlichste Übersichtsfärbung in der Histopathologie, da mit ihr die verschiedenen Gewebestrukturen und Differenzierungsmuster dargestellt werden können. Die angefertigten Gewebedünnschnitte wurden zuerst für eine Minute in Hämatoxylin-Lösung getaucht, gründlich mit lauwarmem Leitungswasser gespült, dann für fünf Sekunden in 1%iger Eosin-Färbelösung gegengefärbt und schließlich kurz mit destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte entwässert. Hierzu wurden die Objektträger zuerst in eine aufsteigende Ethanolreihe (70 %, 99 %, 100 %) getaucht und abschließend zweimal in 100%igem Xylol geschwenkt. Nach dem Trocknen der Schnitte wurden die Präparate mit *Cytoseal™60* überschichtet und mit einem Deckglas eingedeckt. Die gefärbten HNSCC-Tumorgewebe wurden freundlicherweise von einem Pathologen der NCT-Gewebebank (Dr. med. Carolin Mogler) hinsichtlich des Tumor- und Stromaanteils sowie Immuzellinfiltraten, drüsenhaltigen oder nekrotischen Arealen beurteilt. Für alle weiteren Untersuchungen (Immunhistochemie, IFN- γ -ELISPOT-Analysen, mRNA-Extraktion) wurden nur solche Gewebestücke eingeschlossen, die mehr als 60 % vitalen Tumoranteil aufwiesen.

3.2.4 Immunhistochemische Färbungen

Die acetontfixierten und bei -80 °C gelagerten OT wurden zügig auf einer 37 °C warmen Heizplatte aufgetaut. Das sollte die Bildung von Kondenswasser und der damit verbundenen Degenerierung des Gewebeschnitts vorbeugen. Der jeweils zweite Schnitt auf dem OT diente als Negativkontrolle. Die Gewebedünnschnitte wurden mit einem DAKO-Pen umrandet. Der Primärantikörper und die Isotypkontrolle in entsprechenden Verdünnungen und Konzentrationen (Tabelle 9) wurden in DAKO-Verdünnungslösung verdünnt und je 40 μ l der Färbelösung auf den Schnitt pipettiert. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei RT in der Feuchtkammer, um ein Austrocknen der Schnitte zu unterbinden. Die OT wurden dreimal 5 min. in Waschlösung gewaschen. In der Zwischenzeit wurde der entsprechende biotinylierte Sekundärantikörper 1:200 in DPBS verdünnt, mit Serum derselben Spezies (beides im *Vectastain Elite ABC Kit* enthalten) versetzt und je 40 μ l dieser Lösung auf die Schnitte pipettiert. Das Serum dient der Sättigung von Bindestellen und soll damit unspezifische Bindungen reduzieren. Nach 30-minütiger Inkubation wurden die Schnitte erneut dreimal 5 min. gewaschen. Die AB-Lösung wurde 30 min. zuvor angesetzt, um die Bindung von Avidin (Rea-

genz A) an die biotinylierte Peroxidase H (Reagenz B) zu gewährleisten. Es wurden je 40 µl dieser AB-Lösung pro Gewebeschnitt pipettiert und für 25 min. bei RT inkubiert. Dabei bindet Avidin an den biotinylierten Sekundärantikörper. Die Schnitte wurden erneut dreimal 5 min. gewaschen. Dann erfolgte die Visualisierung durch Zugabe von 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) und Wasserstoffperoxid. Hierbei setzt die Peroxidase H das AEC mit Hilfe des Wasserstoffperoxids in einen rötlichen Farbstoff um. Die Gewebeschnitte wurden unter lichtmikroskopischer Sichtkontrolle solange inkubiert bis eine optimale Färbeintensität erreicht war. Die Entwicklungszeit richtete sich dabei nach der Isotypkontrolle, die keine Färbung zeigen sollte. Die Reaktion wurde mit Aqua^{bidest} gestoppt, die Zellkerne mit Hämatoxylin-Lösung gegengefärbt und die Schnitte mit Elvanol luftblasenfrei eingedeckt. Repräsentative Gewebeausschnitte wurden am Folgetag mit Hilfe eines Hellfeldmikroskops und der Software *cellSens Dimension* begutachtet.

3.2.5 Herstellung von Multiwell-Objektträgern für die Immunzytochemie

Zur immunhistochemischen Charakterisierung der adhärent wachsenden primären HNSCC-Zellkulturen wurden spezielle Multiwell-Objektträger verwendet. Die Zellen wurden wie unter Punkt 3.1.2 beschrieben geerntet, gründlich resuspendiert und je ein Tropfen der Zellsuspension auf ein Reaktionsfeld pipettiert. Die Zellen adhärieren auf den speziell beschichteten Reaktionsfeldern. Am Folgetag wurde das Medium entfernt, die OT zweimal in einer Färbeküvette mit DPBS gewaschen und getrocknet. Anschließend erfolgte die Fixierung der Zellen für 10 min. in -20 °C kaltem Aceton. Die OT wurden bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.2.6 Mehrfach-Immunfluoreszenzfärbung von Multiwell-Objektträgern

Analog zur Immunhistochemie können auch in der Immunfluoreszenz Proteine auf Geweben oder fixierten Zellen visualisiert werden. Die Immunfluoreszenz ermöglicht durch die Verwendung verschiedener Fluorochrom-konjugierter Sekundärantikörper die Detektion mehrerer Zielproteine in einer Zelle beziehungsweise einem Gewebe. Hier wurden Multiwell-Objektträger verwendet, um primäre Tumorzellkulturen sowie Krebs-assoziierte Fibroblasten mit einer Kombination aus Vimentin und Zytokeratin zu färben oder um die identifizierten Antigene in den Fibroblasten nachzuweisen. Sämtliche Arbeitsschritte wie das Auftauen, die Waschschrte und das Eindecken wurden analog zur Immunhistochemie (Punkt 3.2.4) durchgeführt.

Es wurden jeweils zwei parallel liegende Reaktionsfelder mit DAKO-Pen umrandet. Die jeweiligen Isotypkontrollen befanden sich auf demselben Multiwell-OT. Pro Reaktionsfeld wurden 20 µl der Antikörperlösung pipettiert. Diese bestand aus einem Mix der entsprechenden Antikörper oder Isotypkontrollen in DAKO-Verdünnungslösung angesetzt. Nach 1 Stunde Inkubation bei RT wurden die OT gewaschen, um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen. Währenddessen wurden die Fluorochrom-konjugierten Sekundärantikörper 1:500 in einer zuvor angesetzten DAPI/DPBS-Lösung (1:1.000) verdünnt. Die DAPI/DPBS-Lösung dient der Färbung der Zellkerne. Die Inkubation der Sekundärantikörperlösung (1 h bei RT) sowie die Waschschriffe erfolgten im Dunkeln, um ein Ausbleichen der Fluorochrome zu vermeiden. Die Schnitte wurden mit Elvanol überschichtet, mit einem Deckglas eingedeckt und über Nacht im Dunkeln gelagert. Am Folgetag wurden die Schnitte mittels Fluoreszenzmikroskop und der *cellSens Dimension* Software mikroskopiert.

3.3 Laser Capture Microdissection (LCM)

Die *Laser Capture Microdissection* (LCM) ermöglicht das hochpräzise Ausschneiden und die anschließende Analyse von definierten Zellpopulationen aus Kryo-Gewebedünnschnitten. Hierfür wurde das *PALM MicroBeam System* von Carl Zeiss verwendet (Espina *et al.*, 2006). Die Mikrodissektion wurde in der Serviceeinheit Lichtmikroskopie der *Core Facility* Bildgebung und Zytometrie (DKFZ Heidelberg) durchgeführt.

Es wurden HNSCC-Tumorproben (Tumor und Tumorstromaareale) sowie die Lamina propria dysplasiefreier Normalschleimhaut mikrodissektiert. Ziel der LCM war es, Unterschiede in den Genexpressionsprofilen von Normalstroma und Tumorstroma auf Gewebeebene zu identifizieren. Die mRNA aus den mikrodissektierten Gewebefragmenten wurde isoliert und mittels Microarray-Analysen die Genexpression untersucht. Die resultierenden Expressionsdaten wurden für Intersektionsstudien herangezogen, welche die Basis für die Auswahl Tumorstroma-assoziiierter T-Zellantigene bilden sollten. Die Abfolge der einzelnen Arbeitsschritte ist in Abbildung 3 schematisch dargestellt und wird nachfolgend detailliert beschrieben.

Die vier untersuchten HNSCC-Tumore wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von Josefine Sippel in der AG Molekulare Zellbiologie mikrodissektiert. Die LCM der sieben Normalstroma-Gewebeproben sowie die gemeinsame Analyse der gesamten Microarray-Expressionsdaten wurde im Rahmen der hier vorliegenden Doktorarbeit durchgeführt.

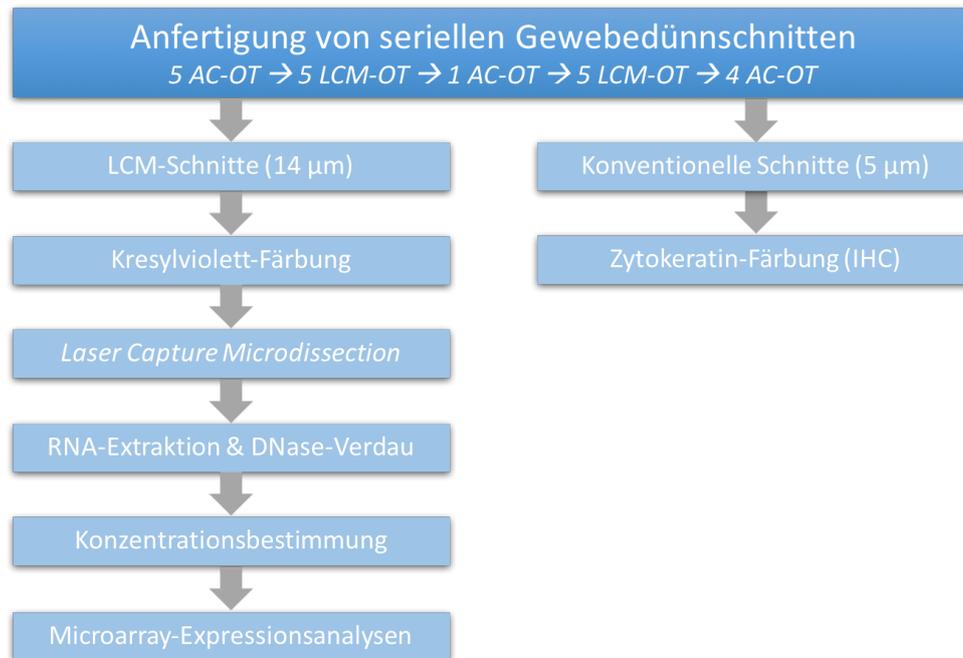


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Workflows der LCM-basierten Expressionsanalysen.

AC-OT: Aceton-fixierte Objektträger für anschließende immunhistochemische Färbungen (IHC), LCM-OT: PEN-Objektträger für die anschließende *Laser Capture Microdissection* (LCM).

3.3.1 Anfertigung von Kryo-Gewebedünnschnitten für die LCM

Für die LCM wurden Gewebedünnschnitte mit einer Schnittdicke von 14 µm angefertigt. Dazu wurden spezielle Polyethylen-Naphtalat-(PEN)-Objektträger verwendet. Diese wurden vorab für 30 min. mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm bestrahlt. Dies diente zum einen der Sterilisierung der Objektträger und zum anderen hat die Bestrahlung zur Folge, dass die Polyethylen-Naphtalat-Schicht hydrophiler wird und sich die Adhäsion der Gewebeschnitte erhöht. Die OT wurden im Mikrotom auf -20 °C heruntergekühlt und die Gewebedünnschnitte aufgezogen. Anschließend wurden die Schnitte zuerst für 5 min. im Gefriermikrotom getrocknet und dann zügig mit *RNAlater* überschichtet, um RNasen zu inhibieren (Inkubation 10 min., RT). Das *RNAlater* wurde abgekippt und je zwei OT Rücken an Rücken in einem Falcon (50 ml) platziert. Der Deckel wurde mit Parafilm umwickelt. Das sollte der Bildung von Kondenswasser beim Auftauen der Schnitte und der damit verbundenen Aktivität von RNasen vorbeugen. Bis zur LCM lagerten die Schnitte bei -80 °C.

Zusätzlich zu den 14-µm-Schnitten wurden in definierten Abständen Gewebedünnschnitte mit einer Schnittdicke von 5 µm auf konventionelle OT aufgezogen und acetonfixiert (Punkt 3.2.2). Diese wurden mittels immunhistochemischer Färbungen mit pan-Zytokeratin-Antikörpern gefärbt (Punkt 3.2.4). Die gefärbten Gewebe wurden eingescannt und die Bilder

ausgedruckt (Abbildung 4). Beim Dissektiervorgang wurden diese Bilder herangezogen, um die Tumor- von den Tumorstroma-Arealen sowie die Lamina propria von der aufliegenden Epithelzellschicht besser unterscheiden zu können und damit eine maximale Reinheit der dissektierten Areale zu gewährleisten.

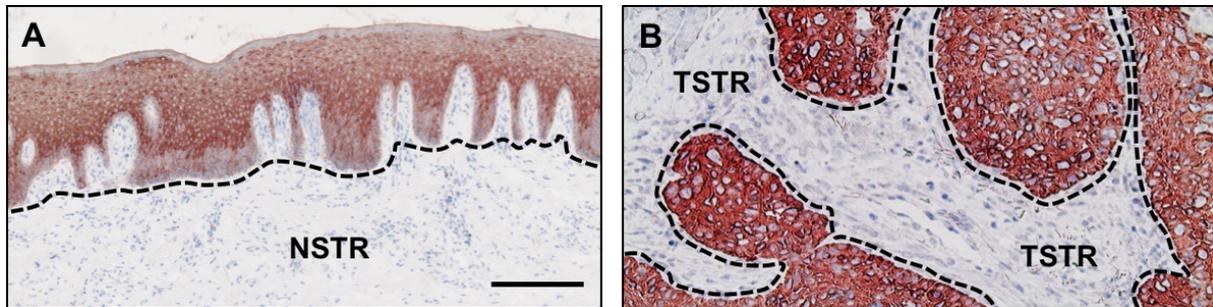


Abbildung 4: Zytokeratinfärbungen von Kryo-Gewebedünnschnitten.

A| Dysplasiefreies mehrschichtiges unverhorntes Plattenepithelgewebe (NSH21) mit angrenzender Lamina propria (Normalstroma = NSTR) und **B|** Plattenepithelkarzinomgewebe (HNO269b) gefärbt mit dem pan-Zytokeratin-Antikörper Cyt I & II (AE1+AE3). Visualisierung der mittels Laserstrahl dissektierten Areale (gestrichelte Linie). Messbalken = 100 μ m.

3.3.2 Kresylviolett-Färbung

Um die unterschiedlichen Gewebestrukturen auf den Gewebeschnitten auch während der Dissektion besser unterscheiden zu können und die Gewebe zusätzlich zu entwässern, wurden die LCM-Gewebeschnitte unmittelbar vor der Dissektion mit Kresylviolett gefärbt. Kresylviolett färbt die Zellkerne blauviolett. Damit lassen sich die kernarmen Stromaareale von den kernreichen Tumorarealen unterscheiden sowie respektive die kernarme Lamina propria von der aufliegenden Epithelzellschicht abgrenzen. Für die Färbung wurde je ein OT aus einem Falcon genommen und unverzüglich für 3 min. in 70%igem Ethanol entwässert. Um das *Tissue-Tek*[®] und das restliche RNA later zu entfernen, wurden die Schnitte für 15 s in 50%igem Ethanol gewaschen. Im Anschluss wurden sie für 30 s in Kresylviolett-Lösung getaucht. Zuletzt wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 100 %) überschüssiger Farbstoff entfernt und die Schnitte entwässert. Die getrockneten Schnitte wurden unmittelbar danach mikrodisektiert.

3.3.3 Laser Capture Microdissektion mittels PALM MicroBeam System

Das verwendete *PALM MicroBeam System* basiert auf der kontaktfreien Lasermikrodisektion. Der Kresylviolett-gefärbte OT wurde eingescannt und anschließend wurden auf dem Bildschirm manuell die *Regions of Interest* (ROIs) auf dem Kryo-Gewebedünnschnitt markiert (Abbildung 5 A). Bei Unsicherheiten wurden hier die eingescannten Zytokeratin-Färbungen

herangezogen. Mit Hilfe eines softwaregesteuerten Laserstrahls wurden dann die definierten Regionen ausgeschnitten (Abbildung 5 B). Hierbei vaporisiert der Laser sowohl die unter dem Gewebeschnitt liegende PEN-Membran als auch die Zellen in seiner Brennebene. Durch einen weiteren Laserimpuls wurde das Mikrodissektat in den adhäsiven Deckel eines speziellen Reaktionsgefäßes (*AdhesiveCap*) katapultiert (Abbildung 5 C) (Espina *et al.*, 2006; Vogel *et al.*, 2007).

Unmittelbar nach der LCM wurde die mRNA aus den Gewebeschnittfragmenten extrahiert und die Probe einem zusätzlichen DNase-Verdau unterzogen (Punkt 3.6.1). Die Reinheit und Konzentration der Proben wurde mittels *Agilent 2100 Bioanalyzer* bestimmt (Punkt 3.6.1). Bis zu den Microarray-Analysen lagerte die extrahierte mRNA bei -80 °C.

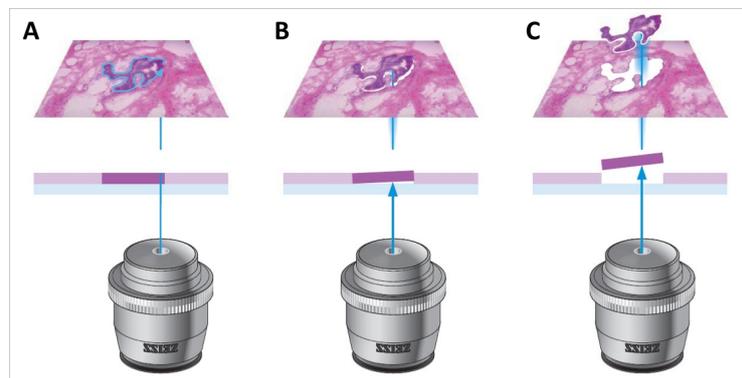


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Mikrodissektionsvorgangs.

A | Markieren der zu dissektierenden Gewebeareale. **B** | Ausschneiden der definierten Region mittels Softwaregesteuertem Laserstrahl. **C** | Ausgeschnittenes Gewebefragment wird über einen zweiten Laserimpuls in den speziell beschichteten Deckel (*AdhesiveCap*) eines Reaktionsgefäßes katapultiert.

Bildquelle: http://www.zeiss.de/microscopy/de_de/produkte/laser-mikrodissektion/microbeam.html.

3.4 Proteinbiochemische Methoden

3.4.1 Zweidimensionale Proteinfraktionierung mittels *ProteomeLab™ PF2D System*

Die Proteinfraktionierung wurde mittels *ProteomeLab™ PF2D System* durchgeführt. Dieses von der Firma Beckman Coulter entwickelte säulenbasierte Flüssigkeitschromatographie-System erlaubt die vollautomatisierte Auftrennung von komplexen Proteingemischen über zwei aufeinanderfolgende Dimensionen. In der ersten Dimension (1D) wurden die Proteingemische durch die Methode der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*High Performance Chromatofocusing*, HPLC) gemäß ihrem Isoelektrischen Punkt (pI) fraktioniert und anschließend in der zweiten Dimension (2D) durch Umkehrphasenchromatographie (*Reversed Phase Chromatography*, RPC) nach Hydrophobizität in 40 Subfraktionen aufgetrennt.

Das jeweils erstellte UV-Chromatogramm lässt hierbei Rückschlüsse auf die Proteinkonzentrationen der einzelnen Fraktionen zu. Nachfolgend wurden die so erhaltenen Fraktionen im IFN- γ -ELISPOT Assay untersucht, um gezielt T-Zellantworten auf die fraktionierten Proteinlysate zu detektieren. Die darin enthaltenen potenziellen T-Zellantigene wurden dann abschließend massenspektrometrisch identifiziert (Beckhove *et al.*, 2010). Diese Methode wurde in der hier vorliegenden Arbeit genutzt, um CAF-assoziierte T-Zellantigene zu identifizieren (Abbildung 6).

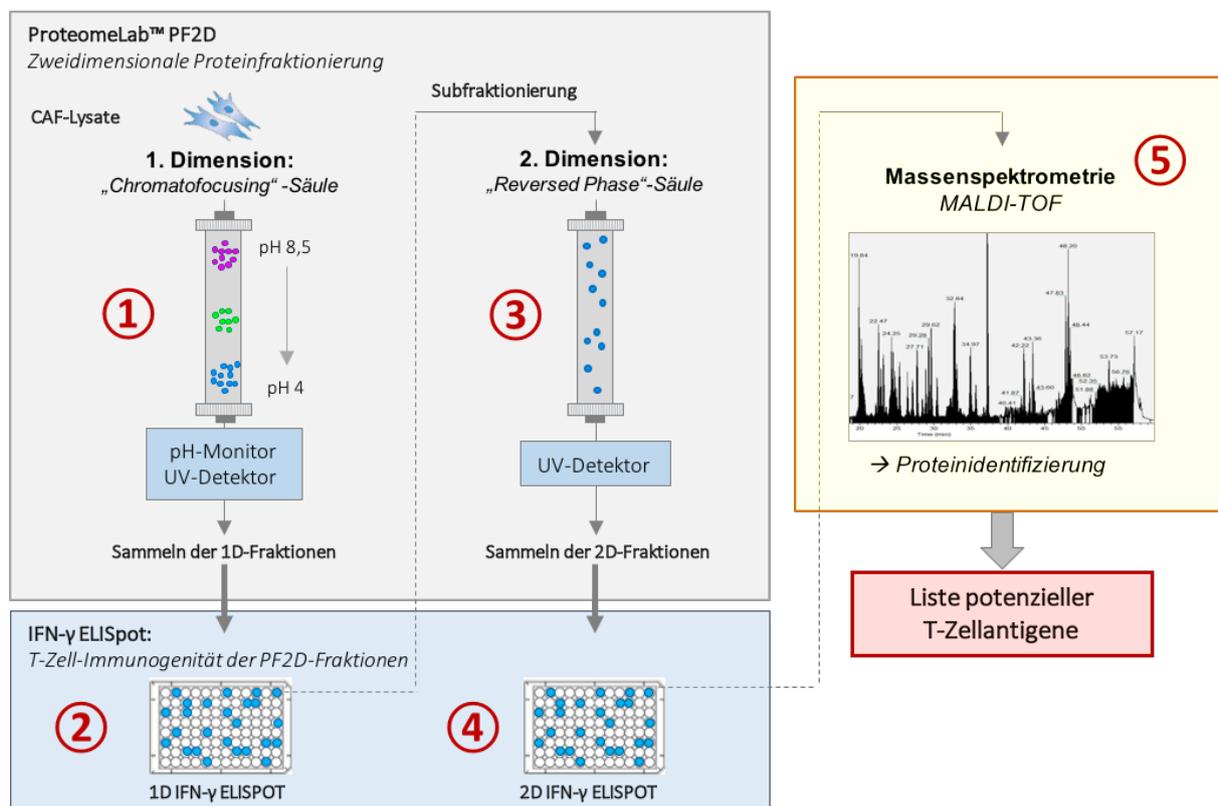


Abbildung 6: Schematische Darstellung der PF2D-ELISPOT-Methodik.

① Auftrennung des CAF-Proteinlysats in der 1. Dimension nach dem isoelektrischen Punkt in mehrere Proteinfractionen. ② Untersuchung der T-Zellreaktivität gegen diese Fraktionen im IFN- γ -ELISPOT-Assay mit autologen T-Zellen. ③ Subfraktionierung signifikanter Fraktionen in der 2. Dimension über eine Umkehrphasenchromatographie (*Reversed Phase High Pressure Liquid Chromatography*). ④ Testung der Subfraktionen mittels IFN- γ -ELISPOT-Assay. ⑤ Massenspektrometrische Identifizierung der in den Fraktionen enthaltenen Proteine, gegen die eine signifikante T-Zellantwort induziert werden konnte.

3.4.1.1 Proteinextraktion

Für die PF2D-Analysen wurden primäre Zellkulturen Krebs-assoziiierter Fibroblasten (CAFs) und der korrespondierenden Tumorzellen (TUCs) desselben Patienten verwendet. Zuvor gereinigten Zellpellets wurden mechanisch lysiert und anschließend in 2,5 ml kaltem PF2D-Membranlysepuffer resuspendiert. Durch die im Puffer enthaltenen Proteaseinhibitoren und

reduzierenden Agenzien werden die Proteine stabilisiert und die enthaltenen Detergenzien sorgen für die Lösung der Membranproteine. Um nicht-lysierte Zellfragmente zu entfernen, wurde das Lysat in *Protein LoBind*-Reaktionsgefäße überführt und zentrifugiert (60 min./16.000 xg). Der proteinhaltige Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Pellet mit den Zelltrümmern wurde verworfen. Da die im Membranlysepuffer enthaltenen Detergenzien die Fraktionierung der Proteine in der 1D nach ihrem pI beeinträchtigen, erfolgte ein Umpuffern und Entsalzen des Proteinlysats in den PF2D-Startpuffer. Dazu wurden 2,5 ml der Proteinlösung auf eine zuvor mit 25 ml Startpuffer äquilibrierte *Disposable PD-10 Sephadex Desalting Column* gegeben. Durch das Prinzip der Gelfiltration wurden die im Membranlysepuffer enthaltenen Salze in den Poren der Säule zurückgehalten, während die Proteine durch Zugabe von 3,5 ml Startpuffer eluiert werden konnten.

3.4.1.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Micro-BCA™ Protein Assay

Die Konzentrationsbestimmung der PF2D-Proteinlysate erfolgte mittels *Micro-BCA™ Protein Assay Kit*. Die Reaktion läuft in zwei Schritten ab. Im ersten Schritt werden Kupfer(II)-Ionen von Proteinen (Peptidbindungen) in alkalischer Lösung zu Kupfer(I)-Ionen reduziert. Im zweiten Reaktionsschritt bilden diese dann einen violetten Chelatkomplex mit der namensgebenden Bicinchoninsäure (*Bicinchoninic Acid*, BCA). Diese absorbiert Licht der Wellenlänge 562 nm, was mittels Tecan Infinite® 200 detektiert werden kann. Über eine Standardreihe definierter Konzentrationen kann später die Konzentration der Probe berechnet werden. Die verwendete Standardreihe wurde aus mitgeliefertem bovinem Serumalbumin (1 mg/ml) hergestellt und bestand aus den Ansätzen: 40 µg/ml, 20 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml, 2,5 µg/ml, 1,0 µg/ml, 0,5 µg/ml, 0 µg/ml. Die Proteinstandards sowie die zu messenden Proben wurden nach Herstellerangaben in 10%igem PF2D-Startpuffer verdünnt. Es wurden jeweils 100 µl der Standards bzw. der Proben (1:10, 1:100, 1:500, 1:1.000) in Duplikaten in eine 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert und zügig 100 µl BCA-Arbeitslösung pro Well pipettiert. Nach 30-minütiger Inkubation bei 60 °C im Wasserbad erfolgte die Messung mit dem Tecan Infinite® 200. Durch lineare Regression der Werte der Standardkurve wurde die Formel zur Berechnung der Proteinkonzentration der Probe ermittelt. Pro PF2D-Lauf wurden 2,5 mg Protein in 5,5 ml PF2D-Startpuffer gelöst.

3.4.1.3 Erste Dimension: Auftrennung nach dem *pI* der enthaltenen Proteine

Zunächst wurde die *High Pressure Chromatofocusing* (HPLC) 1D-Säule für 2 h mit 100%igem Startpuffer (pH \approx 8.5) äquilibriert (Flussrate von 0,2 ml/min.). Anschließend wurde die Probe (2,5 mg Protein gelöst in 5,5 ml PF2D-Startpuffer) in die Probenschleife injiziert und ein automatisiertes Programm gestartet, wodurch die Proteinlösung auf die Säule geladen und durch eine vorab definierte Programmabfolge die Zugabe der einzelnen Puffer geregelt wurde (Tabelle 23).

Tabelle 23: Programm zur automatisierten Zugabe der 1D-Pufferlösungen

Puffer/Lösung	Dauer
Startpuffer	1-35 min.
Endpuffer	36-130 min.
HISS-Puffer	130-175 min.
HPLC-Wasser	175-219 min.

Der Wechsel von Startpuffer (pH \approx 8.5) zu Endpuffer (pH \approx 4,0) erzeugte einen pH-Gradienten. Durch diesen Gradienten eluieren die an das Trägermaterial der Säule gebundenen Proteine gemäß ihres isoelektrischen Punkts von der Säule und wurden in 0,3-pH-Wert-Schritten am Säulenausgang gesammelt. Der pH-Wert der eluierten Proteinfractionen sowie das Volumen der gesammelten Fraktionen, der Säulendruck und die UV-Absorption ($\lambda = 280$ nm) wurden automatisch detektiert. Basierend auf diesen Daten wurde ein 1D-Verlaufsprotokoll erstellt, das in einem Chromatogramm visualisiert wurde. Anhanddessen wurde überprüft, ob der Lauf einwandfrei verlaufen war und wieviel μ l der jeweiligen Fraktion gesammelt wurden.

Aufgrund der limitierten Verfügbarkeit von Patientenblut wurden basierend auf dem 1D-Chromatogramm definierte Fraktionen ausgewählt, die anschließend im IFN- γ -ELISPOT-Assay getestet wurden. Mit diesem immunologischen Assay sollte nun untersucht werden, ob die in den ausgewählten 1D-Fractionen enthaltenen Proteine eine T-Zellantwort auslösen können und damit potenzielle T-Zellantigene darstellen. Aufgrund der hohen Salzkonzentrationen und der Verdünnung der 1D-Fractionen mussten diese mittels *Amicon® Ultra 4 mL Centrifugal Filter* umgepuffert werden. Die gereinigten Proteinlösungen wurden in spezielle *Protein-LoBind*-Reaktionsgefäße überführt und bis zum IFN- γ -ELISPOT-Assay bei -80 °C gelagert.

3.4.1.4 Zweite Dimension: Auftrennung nach Hydrophobizität

ELISPOT-positive 1D-Fractionen wurden anschließend in der 2D subfraktioniert. Hier wurden die Proteine mittels Umkehrphasenchromatographie (*Reversed Phase Chromatography*) gemäß ihrer Hydrophobizität (Größe) aufgetrennt. Hierfür wurde eine spezielle Kieselgelsäule (stationäre Phase) verwendet.

Im ersten Schritt wurden alle Lösungen hergestellt. Sowohl das verwendete HPLC-Wasser als auch das Acetonitril wurden vorab mit Trifluoressigsäure (TFA) versetzt. Die eingebaute Säule wurde mit Acetonitril/TFA (0,8 %) für 5 min. und anschließend für 10 min. bei 50 °C mit HPLC-Wasser/TFA (0,1 %) äquilibriert. Währenddessen wurden manuell über die Software die 1D-Fractionen ausgewählt, die im IFN- γ -ELISPOT-Assay signifikante T-Zellantworten auslösen konnten und im Folgenden weiter subfraktioniert werden sollten. Das System wurde gestartet und die erste 1D-Fraktion vollautomatisiert aus der Platte gezogen, in den Proben Schlauch injiziert und auf die 2D-Säule geladen. Gemäß einem zuvor definierten Gradienten (Tabelle 24), bestehend aus HPLC-Wasser und Acetonitril, wurden die Proteine von der Säule eluiert.

Tabelle 24: Programm zur automatisierten Zugabe der 2D-Pufferlösungen

Puffer/Lösung	Dauer
HPLC-Wasser (0,1 % TFA)	0-2 min.
Linearer Gradient: HPLC-Wasser (0,1 % TFA)/Acetonitril (0,08 % TFA)	2-32 min.
Acetonitril (0,08 % TFA)	32-36 min.
HPLC-Wasser (0,1 % TFA)	36-45 min.

Die Proteinkonzentration jeder 2D-Fraktion wurde am Ende der Säule in erster Näherung über einen UV-Detektor ($\lambda = 214 \text{ nm}$) detektiert und die Proben in Intervallen von 0,6 min. automatisiert in 2D-Platten gesammelt. Nach dem Lauf wurde zu jeder Fraktion 40 μl Ammoniumhydrogencarbonat (NH_4HCO_3 , 0,4 M) pipettiert, um die Fraktionen zu neutralisieren und die saure Proteolyse zu unterbinden. Aufgrund der limitierten Verfügbarkeit des Patientenblutes für die immunologischen Analysen wurden mit Hilfe der Software *ProteoVue* relevante 2D-Fractionen für die weitere Analyse ausgewählt. Dazu wurden die UV-Chromatogramme analysiert, mit vorangegangenen Läufen abgeglichen und distinkte Peaks ausgewählt. Für den IFN- γ -ELISPOT-Assay wurden anschließend 100 μl pro 2D-Fraktion in *Protein-LoBind*-Reaktionsgefäße überführt und in einem *SPEEDVAC Vacuum Concentrator* auf ein Restvolumen von 20 μl eingengt. Die verbleibenden 200 μl der jeweiligen Fraktion

wurden für die massenspektrometrische Analyse verwendet. Diese Proben wurden vollständig eingeeingt.

3.4.1.5 Massenspektrometrische Analyse der PF2D-Fraktionen

Die Identifizierung und Größenbestimmung der in den ELISPOT-positiven 2D-Fraktionen enthaltenen Proteine erfolgten mittels massenspektrometrischer Analysen. Dazu wurde die Methode der *Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry* (LC-ESI-MS/MS) verwendet. Die in den Proben enthaltenen Proteine wurden mit der Protease Trypsin verdaut. Die absoluten Massen der so entstandenen Peptide wurden mittels *LTQ Orbitrap XL Mass Spectrometer* gemessen und anschließend mit der MASCOT-Datenbank abgeglichen und so identifiziert. Die MS-Analysen wurden von der Serviceeinheit Proteomanalyse der *Core Facility* Genom und Proteom (DKFZ Heidelberg) durchgeführt.

3.4.2 HLA-basierte Peptidprädiktion und Peptidsynthese

Für die Validierung der potenziellen massenspektrometrisch identifizierten T-Zellantigene im IFN- γ -ELISPOT-Assay wurden synthetische lange Peptide (*Synthetic Long Peptides*, SLPs) (ca. 50 Aminosäuren) verwendet. Im Gegensatz zu häufig verwendeten kurzen Peptiden werden die SLPs von DCs TAP-prozessiert und können mehrere HLA-Typen gleichzeitig abdecken. Die Aminosäure-Referenzsequenz wurde über die Onlinedatenbank *The Universal Protein Resource* (uniprot.org) ermittelt. Basierend auf dieser Sequenz wurden über einen speziellen Algorithmus (*T Cell Epitope Prediction Tool* der Datenbank *Immune Epitope Database and Analysis Resource*, IEDB) die HLA-I-T-Zell-Epitopdichte prädiktiert. Parameter wie der proteosomale Abbau, der TAP-Transport und die MHC-I-Komplex-Bindung wurden ebenso wie die HLA-Typ-Verteilung in der deutschen Bevölkerung berücksichtigt.

Tabelle 25: Prozentuale Verteilung der HLA-Typen in der deutschen Bevölkerung basierend auf der *Allele Frequency Net Database* (Gonzalez-Galarza et al., 2015).

HLA-Allel	Häufigkeit in Deutschland [in %]	Priorität
A*02	49,9	1
A*03	28,6	2
A*01	27,7	3
B*07	24,5	4
A*24	18,1	5
A*11	10,0	6

Je nach Häufigkeit wurden absteigende Prioritäten vergeben (Tabelle 25). Mittels des IEDB Tools wurde die gesamte Aminosäuresequenz in 9mere unterteilt. Basierend auf hinterlegten Daten zur Bindungsaffinität von T-Zellen wurde jedem 9mer ein MHC IC₅₀-Wert zugeordnet. Dieser Wert gibt Auskunft über die Bindungsstärke und -wahrscheinlichkeit. Dabei gilt: Je geringer der IC₅₀-Wert, desto höher ist die Bindungsaffinität. Für die weiteren Analysen wurden Peptide mit einem hohen bis mittleren IC₅₀-Wert ausgewählt (IC₅₀ < 50 nM hohe Affinität; MHC-IC₅₀ < 1.000 nM mittlere Affinität). Die Peptidsynthese erfolgte mittels Festphasensynthese nach Merrifield (Pipkorn *et al.*, 2014) durch die *Core Facility* Genom und Proteom (DKFZ Heidelberg).

3.5 Immunbiologische Methoden

3.5.1 Depletion von Tumorzellen mittels magnetischer Zellsortierung

Für die magnetische Zellsortierung (*Magnetic Activated Cell Sorting*, MACS) werden supermagnetische Partikel (*MicroBeads*) eingesetzt, die mit hochspezifischen Antikörpern konjugiert sind. Diese Antikörper sind gegen zelltypspezifische Oberflächenmarker gerichtet und ermöglichen so die Selektion oder Depletion bestimmter Zelltypen aus einem Zellgemisch.

Um die Immunogenität der CAFs in einem IFN- γ -ELISPOT-Assay zu untersuchen, wurden zunächst die in der Zellsuspension enthaltenen Tumorzellen depletiert. Dazu wurden EPCAM-*MicroBeads* gegen das tumorzellspezifische Oberflächenprotein CD326 (*Epithelial Cell Adhesion Molecule*, EPCAM) verwendet. Die Kurzzeitkulturen wurden geerntet (Punkt 3.1.2), zweimal mit DPBS gewaschen (Zentrifugation für 10 min. bei 300 xg) und die Zellzahl bestimmt. Bis zu 5×10^7 Zellen wurden in 300 μ l MACS-Puffer resuspendiert. Um unspezifische Bindungen der Antikörper an den Fc-Rezeptor zu unterbinden, wurde der Suspension 100 μ l *FcR-Blocking Reagent* zugegeben. Anschließend wurden 100 μ l der EPCAM-spezifischen *MicroBeads* zugegeben und alles sorgfältig resuspendiert. Nach 30-minütiger Inkubation bei 4 °C im *MACSMix* Rotor wurden die Zellen mit 10 ml MACS-Puffer gewaschen und das Pellet in 500 μ l MACS-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf eine spezielle LM-Säule gegeben, die in das Magnetsystem *QuadroMACS* eingescannt war. Die *MicroBead*-gebundenen EPCAM-positiven Tumorzellen wurden vom Magneten zurückgehalten und der Durchfluss, der die ungebundenen (EPCAM-negativen) Fibroblasten enthielt, wurde gesammelt. Die Säule wurde noch zweimal mit MACS-Puffer gespült (Durchfluss enthielt weitere Fibroblasten). Die gesammelten Fibroblasten wurden noch zweimal mit DPBS gewaschen und die Zellzahl bestimmt. Ein Teil der Zellen wurde für anschließende FACS-Analysen ver-

wendet, um die Reinheit der Zellsuspension zu überprüfen (Punkt 3.5.4). Aus den restlichen Zellen wurde ein Zellpellet ($> 1 \times 10^7$) für den IFN- γ -ELISPOT-Assay hergestellt, das bei -80°C eingefroren wurde.

3.5.2 Isolierung von humanen mononukleären Zellen aus peripherem Blut

Die mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*, PBMCs) von Patienten und gesunden Spendern wurden über eine Dichtegradientenzentrifugation durch ein hydrophiles Kolloid aus Saccharose-Epichlorhydrin-Kopolymeren (Ficoll® 400) aufgereinigt. Dazu wurden 15 ml Ficoll® 400 in ein 50 ml Leucosep® Tube pipettiert und bei 300 xg für 5 min. zentrifugiert. Je 20 ml venöses Vollblut wurden mit 15 ml DPBS vermischt, behutsam auf den Filter des Leucosep®-Tubes pipettiert und ohne Bremse zentrifugiert (700 xg/ 20 min./ RT). Aufgrund der unterschiedlichen Dichte der verschiedenen Bestandteile des Blutes lassen sich diese entlang eines Gradienten auftrennen. Granulozyten und Erythrozyten sedimentieren am schnellsten und setzen sich am Boden des Tubes ab, das zellfreie Blutplasma bildet die oberste Schicht. Die PBMCs (Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten) reichern sich aufgrund ihrer spezifischen Dichte an der Phasengrenze zwischen Ficoll und Plasma an und wurden mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgenommen. Die Zellsuspension wurde anschließend zweimal mit je 50 ml DPBS gewaschen (Zentrifugation bei 340 xg, 10 min., RT) und die Zellzahl bestimmt (Punkt 3.1.5). Die isolierten PBMCs wurden nun entweder direkt in Kultur genommen oder je 1×10^7 PBMCs in 1 ml Einfriermedium (humanes AB-Serum/10 % DMSO) resuspendiert und in einer Einfrierbox bei -80°C eingefroren. Die mittel- und langfristige Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

3.5.3 Untersuchung antigenspezifischer T-Zellantworten

Die Quantifizierung der reaktiven antigenspezifischen TCs in einer Probe erfolgte mittels IFN- γ -ELISPOT-Assay.

Dafür wurden aus dem Blut isolierte PBMCs (Punkt 3.5.2) in X-Vivo20™ Medium resuspendiert und auf Zellkulturpetrischalen überführt. Nach 1-stündiger Inkubation im Brutschrank setzten sich die Monozyten (darin auch die DCs enthalten) ab und adhärirten am Schalenboden. Die restlichen Lymphozyten (darunter auch die TCs) befanden sich im Überstand. Der Überstand wurde gesammelt und der Schalenboden behutsam mit 5 ml X-Vivo20™ gespült. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (300 xg, 10 min., RT) und das Pellet in 5 ml T-Zellmedium resuspendiert und auf eine neue Petrischale gegeben. Die adhärennten Mo-

nozyten wurden mit 5 ml DC-Medium überschichtet. Die so getrennten DCs sowie TCs wurden für 5 bis 7 Tage im Brutschrank inkubiert, wobei nach 3 bis 4 Tagen jeweils 3 ml frisches TC- oder DC-Medium zugegeben wurden.

3.5.3.1 Anreicherung von T-Zellen aus PBMCs über einen Negativ-BeadSort

Um die Reaktivität der TCs im IFN- γ -ELISPOT-Assay untersuchen zu können, wurden diese im ersten Schritt von den anderen in den PBMCs enthaltenen Lymphozyten (B-Zellen, DCs, NKs) getrennt. Um gezielt TCs anzureichern, deren Funktionalität jedoch nicht durch einen *BeadSort* zu beeinflussen, wurde ein *Negativ-BeadSort* durchgeführt. Hierzu wurde das *Dynabeads® untouched™ human T cells Kit* verwendet. Das Prinzip beruht darauf, dass über einen im Kit enthaltenen definierten Antikörper-Mix (CD14, CD16a, CD16b, CD19, CD36, CD56, CDw123 und CD235a) alle ungewünschten Zellpopulationen aus der Zellsuspension entfernt und dadurch TCs angereichert werden.

Nach der 5- bis 7-tägigen Inkubation der TC-Suspension wurden die Zellen (BCs, NKs und TCs) behutsam aus den Petrischalen gespült und zentrifugiert (300 xg, 10 min., RT). Die Zellen wurden mit 5 ml MACS-Puffer gewaschen und die Zellzahl bestimmt (Punkt 3.1.5). Je 1×10^7 Zellen wurden in 100 μ l MACS-Puffer resuspendiert. Diese Suspension wurde dann mit je 20 μ l des definierten Antikörper-Mix inkubiert (20 min., 4 °C, MACSMix Rotor). Anschließend wurden nicht-gebundene Antikörper durch zweimaliges Waschen mit 2 ml MACS-Puffer entfernt. Pro 1×10^7 Zellen wurden 100 μ l *Dynabeads* in 900 μ l MACS-Puffer verdünnt und das Zellpellet gründlich darin resuspendiert und inkubiert (15 min., RT). Die *Beads* binden nun selektiv an die mit Antikörper markierten Zellen. Nach der Inkubation wurde 5 ml MACS-Puffer zugegeben, gründlich gemischt und die Suspension für 2 min. in das Magnetsystem *Dynal® MPC-L* eingespannt. Dabei werden von den *Beads* gebundene Zellen durch das magnetische Feld an die Wand des Reaktionsgefäßes gezogen. Die nicht-gebundenen TCs (*untouched T cells*) wurden nun mit einer Pasteurpipette in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die T-Zellsuspension wurde zentrifugiert (300 xg, 10 min., RT) und in 1 ml warmem X-Vivo20™ resuspendiert. Anschließend wurde die Zellzahl bestimmt und die Zellen unmittelbar für die IFN- γ -ELISPOT-Assays verwendet.

3.5.3.2 Anreicherung von Dendritischen Zellen

Analog zu den TCs wurden auch die DCs durch einen *Negativ-BeadSort* angereichert. Dazu wurden je 100 μ l *Pan-mouse-IgG-Dynabeads* mit entweder 4 μ l anti-CD3, 4 μ l anti-CD19 oder

20 µl anti-CD56 konjugiert. Dazu wurden die Antikörper mit den Beads gemischt und die drei unterschiedlichen Ansätze separat inkubiert (20 min., 4 °C, MACSMix Rotor). Anschließend wurden die drei Ansätze vereinigt und nicht an *Beads* gebundene Antikörper durch zweimaliges Waschen mit je 5 ml X-Vivo20™ entfernt. Dazu wurden die Reaktionsgefäße in das Magnetsystem eingespannt und der Überstand entfernt. Die *Bead*-konjugierten Antikörper wurden in 300 µl MACS-Puffer resuspendiert. Parallel wurden die DCs mit Druck von den Petrischalen gespült und die Zellsuspension zentrifugiert (300 xg, 10 min., RT). Das Zellpellet wurde dann in den 300 µl des zuvor vorbereiteten *Bead*-konjugierten Antikörper-Mix inkubiert (20 min., 4 °C, Rotor). Die Zellsuspension wurde mit 5 ml MACS-Puffer aufgefüllt, gründlich gemischt und das Reaktionsgefäß in den Magneten gespannt und 2 min. inkubiert. Die an die magnetischen *Beads* gekoppelten CD3-, CD4- und CD56-positiven Zellen wurden nun an die Wand des Reaktionsgefäßes gezogen und die sich im Überstand befindenden DCs mit einer Pasteurpipette in ein neues Falcon überführt, abzentrifugiert (300 xg, 10 min., RT) und in 1 ml frischem X-Vivo20™ resuspendiert. Abschließend wurde die Zellzahl bestimmt.

3.5.3.3 IFN- γ -ELISPOT-Assay

Mit dem IFN- γ -ELISPOT-Assay lassen sich sehr sensitiv antigenspezifische TCs nachweisen. Hierzu wurden zuerst Lymphozyten aus peripherem humanem Blut isoliert (Punkt 3.5.2). Anschließend wurden über einen *Negativ-BeadSort* die TCs (Punkt 3.5.3.1) und die DCs (Punkt 3.5.3.2) angereichert. Die antigenpräsentierenden DCs wurden dann, je nach Fragestellung, entweder mit autologen Tumorgewebelysaten, Zelllysaten, den PF2D-Fractionen oder aber mit den synthetischen langen Peptiden sowie verschiedenen Kontrollpeptiden beladen. Nachdem die DCs die Proteine/Peptide internalisiert und prozessiert hatten, wurden diese über MHC-Moleküle den zugegebenen autologen T-Zellen präsentiert. T-Zellen, die nun ein präsentiertes Antigen (wieder)erkannten, wurden aktiviert und sezernierten Effektormoleküle wie Perforin und Interferon- γ . Letzteres wurde dann indirekt über eine ELISA-Reaktion nachgewiesen. Dazu wurde die Membran der ELISPOT-Platte zuerst mit einem anti-IFN- γ -Antikörper gecoatet. Dieser bindet das von den T-Zellen sekretierte IFN- γ . Anschließend wurde die Membran mit einem biotinylierten zweiten anti-IFN- γ -Antikörper inkubiert. Dann wurde alkalische Phosphatase(ALP)-gekoppeltes Streptavidin zugegeben, das mit hoher Affinität an das Biotin des Sekundärantikörpers bindet. Zur Visualisierung wurde im letzten Schritt das Substrat zugegeben. Das Enzym (ALP) katalysiert nun die Umsetzung des Substrats, was zur Entstehung eines unlöslichen blauen Farbstoffs führt. So werden ge-

nau an den Stellen auf der Membran, an denen eine T-Zelle IFN- γ sekretiert hat, blaue Punkte (engl.: *Spots*) sichtbar. Diese lassen sich dann maschinell detektieren und erlauben damit die Quantifizierung von antigenspezifischen T-Zellen.

Vor dem eigentlichen Versuch wurde die ELISPOT-Platte vorbereitet. Dazu wurden pro 96-Well-Platte 10 ml DPBS mit 100 μ l anti-IFN- γ -Antikörper gründlich gemischt. Mit einer Multi-Kanalpipette wurden je 100 μ l dieser Antikörper-Lösung pro Well pipettiert und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde nicht-gebundener Antikörper von der Platte gewaschen (3 x mit 150 μ l Waschlösung/Well, 2 x mit 150 μ l DPBS/Well). Um unspezifische Bindungen zu verhindern, wurden noch freie Bindestellen geblockt. Dazu wurde RPMI-Medium mit 10 % humanem AB-Serum versetzt, je 100 μ l/Well pipettiert und für 1 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss wurde die Platte erneut dreimal mit Waschpuffer und zweimal mit DPBS gewaschen.

Für den eigentlichen ELISPOT-Assay wurden stets TCs und DCs im Verhältnis 1:5 eingesetzt (500.000 DCs: 100.000 TCs). Es wurden je 500.000 DCs pro Well ausgesät und mit jeweils 20 μ g Testpeptid, Gewebe- oder Zelllysate beladen. Als Negativkontrollen wurden die DCs mit PBMC-Lysat, IgG-Peptid und mit TCs allein inkubiert. Als Positivkontrolle wurden die DCs mit einem Mix aus Cytomegalovirus (CMV) und dem Hexonprotein des humanen Adenovirus (AdV) sowie Staphylokokken Enterotoxin B (SEB) beladen. Die Prozessierung und Präsentation der langen Peptide erfolgten bei 37 °C über Nacht. Am nächsten Tag wurden je 500.000 TCs zugegeben und für 40 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Zum Stoppen des Assays wurde die Platte zuerst ausgeklopft und dann viermal mit 200 μ l Waschpuffer gewaschen. Um die restlichen sich auf der Membran befindlichen Zellen zu lysieren, wurden diese mit 200 μ l/Well Aqua^{bidest.} für 1 min. inkubiert. Die Zellfragmente wurden durch dreimaliges Waschen mit 150 μ l/Well Waschpuffer entfernt. Im Anschluss wurde der biotinylierte anti-IFN- γ -Antikörper 1:1.000 in DPBS verdünnt und steril filtriert, um den Hintergrund zu minimieren. Dann wurden je 100 μ l dieser Lösung pro Well pipettiert. Nach 90-minütiger Inkubation bei 37 °C wurde die Membran wie zuvor gewaschen und mit je 100 μ l/Well Streptavidin-gekoppelte ALP (1:1.000 in DPBS verdünnt) inkubiert (45 min., 37 °C). Nach einem erneuten Waschschriff erfolgte die Zugabe des Substrats (100 μ l/Well). Die Entwicklung erfolgte bei RT im Dunkeln. Die Farbreaktion wurde durch regelmäßige Sichtkontrollen beobachtet und nach 20 bis 40 min. abgestoppt. Dazu wurde die Substratlösung von der Platte gekippt und die Membran viermal mit 200 μ l/Well Aqua^{bidest.} gewaschen. Im letzten Schritt wurde die

Platte gründlich ausgeklopft, der Plastikdeckel abgezogen und die Plattenmembran mindestens 24 Stunden getrocknet. Die Quantifizierung der antigenspezifischen TCs erfolgte mit dem Gerät Immunospot® S5-System der Firma CTL.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten IFN- γ -ELISPOT-Assays wurden mit Unterstützung der Arbeitsgruppe von Prof. Philipp Beckhove (Translationale Immunologie, DKFZ Heidelberg) durchgeführt.

3.5.4 Durchflusszytometrische Zellanalysen

Die Durchflusszytometrie (*Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS*) ermöglicht die Charakterisierung und quantitative Analyse von Einzelzellen. Das Prinzip basiert auf der Markierung von verschiedenen Zellbestandteilen wie Oberflächenmolekülen, intrazellulären Proteinen, Peptiden oder DNA mit spezifischen Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern. Während der Messung wurden die Zellen hydrodynamisch fokussiert und passierten dann einzeln einen Laserstrahl, durch den die gekoppelten Fluorochrome angeregt werden. Die Emission sowie die Lichtstreuung wurden im Anschluss detektiert. Das Vorwärtsstreulicht (*Forward Scatter, FSC*) ist in erster Näherung ein Maß für die Zellgröße, das Seitwärtsstreulicht (*Sideward Scatter, SSC*) korreliert mit der Granularität der Zellen. Das emittierte Fluoreszenzlicht wurde durch einen Fotomultiplier detektiert. Die Messungen wurden am *BD FACSCanto™* oder am *BD LSRII™* Durchflusszytometer (BD Biosciences) durchgeführt. Für die Auswertung der Rohdaten wurde die Software *FlowJo* (TreeStar) verwendet.

Für die FACS-Analysen der adhärennten Zellkulturen wurden diese, wie unter Punkt 3.1.2 beschrieben, geerntet. Um Zellaggregate zu entfernen, wurde die Zellsuspension anschließend durch ein Zellsieb (40 μm) filtriert und die Zellzahl bestimmt (Punkt 3.1.5). Um Tumorzellen zu detektieren, wurde der Marker EPCAM verwendet. Um CAFs und deren Aktivierungsstatus zu überprüfen, wurde eine Kombination der Marker Vimentin, FAP und α -SMA eingesetzt (Tabelle 12). Für die FACS-Färbungen erfolgten alle Arbeitsschritte auf Eis und mit gekühltem FACS-Puffer. Zentrifugiert wurde immer bei 400 xg für 2 min. bei 4 °C. Pro FACS-Ansatz (Autofluoreszenz, Isotypkontrolle, Antikörper) wurden jeweils 1×10^5 Zellen in ein FACS-Röhrchen überführt, die Zellen dreimal mit 2 ml FACS-Puffer gewaschen und der Überstand verworfen. Um den Anteil der toten Zellen auszuschließen, wurde das *LIVE/DEAD® Fixable Yellow Dead Cell Stain Kit* verwendet. Das Prinzip beruht darauf, dass der Farbstoff (Pacific Orange™, PO) nur in apoptotische Zellen mit geschädigter Zellmembran eindringt. PO wurde 1:1.000 in FACS-Puffer verdünnt, das Pellet in 50 μl dieser Lösung resuspendiert

und für 10 min. bei 4 °C inkubiert. Um Reste des Farbstoffes zu entfernen, wurden die Zellen zweimal mit je 1 ml FACS-Puffer gewaschen. Die Antikörper und Isotypkontrollen wurden in der entsprechenden Konzentration (Tabelle 12) in 50 µl FACS-Puffer verdünnt und das Zellpellet darin resuspendiert. Nach 30-minütiger Inkubation bei 4 °C im Dunkeln wurden die Zellen dreimal mit je 1 ml FACS-Puffer gewaschen (300 xg, 2 min., 10 °C). Anschließend wurden die Zellpellets in je 150 µl FACS-Puffer resuspendiert und bis zur Messung bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt.

Sollte mehr als ein Fluorochrom detektiert werden, musste die Überlappung der jeweiligen Spektren kompensiert werden. Dazu wurde ein spezielles *Compensation Bead Kit* nach Herstellerangaben verwendet. Für die Kompensation des Kanals, in dem PO gemessen wurde, wurden spezielle *ArC™ Amine Reactive Compensation Beads* ebenfalls nach Herstellerangaben verwendet. Die Kompensation erfolgte automatisiert über die BD FACSDiva™ Software am Durchflusszytometer.

3.6 Molekularbiologische Methoden

3.6.1 RNA-Extraktion und DNase-Verdau

Für die Microarray-basierten mRNA-Expressionsanalysen musste vorab die RNA extrahiert werden. Dazu wurden die *RNeasy Kits* der Firma Qiagen verwendet. Die Gesamt-RNA der geernteten Zellpellets der primären Zellkulturen wurden mit Hilfe des *RNeasy Mini Kits* isoliert. Aufgrund der sehr geringen Zellzahlen wurde für die mikrodisektierten Gewebefragmente der Normalstroma-, Tumorstroma- und Tumorproben das *RNeasy Micro Kit* verwendet. Die beiden Kits unterscheiden sich lediglich in der Verwendung der Säulen und werden deshalb im Folgenden zusammen beschrieben. Die geernteten Zellen ($< 1 \times 10^7$ Zellen/Pellet) bzw. mikrodisektierten Gewebefragmente ($< 20 \mu\text{g}$) wurden in 350 µl mit β -Mercaptoethanol (β -ME) versetztem RLT-Puffer unverzüglich und sorgfältig resuspendiert. Um die DNA zu fällen, wurde zu den Lysaten 350 µl 70%iger Ethanol pipettiert und resuspendiert. Anschließend wurde das Lysat auf eine *RNeasy Mini Spin Column* bzw. *RNeasy MinElute Spin Column* gegeben und zentrifugiert (15 s, 8.000 xg, RT). Der Durchfluss wurde verworfen. Die an die Säulenmembran gebundene RNA wurde einmal mit 700 µl RW1-Puffer gewaschen. Nun wurden DNA-Fragmente, die sich noch auf der Säulenmembran befanden, mittels DNasen verdaut. Dazu wurde 10 µl DNase-I-Stammlösung in 70 µl RDD-Puffer verdünnt und auf die Säule pipettiert. Nach 15-minütiger Inkubation bei RT wurde die Membran erneut mit 700 µl RW1-Puffer und anschließend einmal mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen (15 s, 8.000 xg, RT).

Der Durchfluss wurde jeweils verworfen. Die Säule wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die RNA mit 30 µl RNase-freiem Wasser von der Säule eluiert (1 min., 8.000 xg).

Im Falle der kryokonservierten HNO-Gewebe sowie der Normalgewebe wurde die Gesamt-RNA mittels *AllPrep® DNA/RNA/Protein Mini Kit* (Qiagen) extrahiert. Es wurden nur solche Gewebe aufgearbeitet, deren Qualität durch einen Pathologen der NCT-Gewebebank (Dr. med. Carolin Mogler) verifiziert worden war. Das gefrorene Gewebestück wurde unverzüglich mit 600 µl RLT-Puffer + β-ME in der Kugelmühle *Tissue Lyser LT* bei 20 Hz für 5 min. mechanisch homogenisiert. Das Lysat wurde exakt nach Angaben des *AllPrep® DNA/RNA/Protein Mini Kit*-Handbuches (September 2011) weiterverarbeitet. Die genomische DNA wurde bei 4 °C gelagert, das Proteinlysat sowie die RNA bei -80 °C.

Die Konzentration wurde mittels Spektralphotometer *NanoDrop 2000* ermittelt, die Qualität der isolierten RNA mittels Bioanalyser 2100. Das System basiert auf einer Kapillarelektrophorese und ermöglicht die Auftrennung der einzelnen RNA-Fragmente. Die aufgetrennten RNAs werden dann durch den eingelagerten Farbstoff detektiert und als Gelähnliche Bilder und Chromatogramme ausgegeben. Die quantitative Bestimmung erfolgte über einen RNA-Standard mit RNA-Fragmenten bekannter Größe. Aus diesen Daten wurde per Software die *RNA Integrity Number (RIN)* bestimmt. Die Werte bewegten sich zwischen 1 und 10. Für die weiteren Analysen wurden nur Proben mit einer $RIN \geq 7$ eingesetzt.

3.6.2 Microarray-Analysen

Die Microarray-Analysen wurden von der Serviceeinheit Microarray der *Core Facility* Genom und Proteom (DKFZ Heidelberg) durchgeführt. Je 500 ng RNA wurden vorab einer internen Qualitätskontrolle mittels *NanoDrop 2000* und *Agilent 2100 Bioanalyser* unterzogen (3.6.1). Die Messung wurde nach Herstellerangaben des *Illumina Whole-Genome Expression BeadChips® Sentrix Array (HumanHT-12 v4 Expression BeadChip Kits)* durchgeführt, was die Untersuchung der mRNA-Expression von 31.000 Genen gleichzeitig ermöglicht. Die statistische Auswertung der Microarrays erfolgte mit der *R* Programmiersoftware (*r-project.org*). Die Rohdaten (Fluoreszenzintensität) wurden zuerst quantilnormalisiert, anschließend \log_2 -transformiert und medianzentriert.

3.7 Statistische Datenauswertung und Visualisierung

Die statistische Auswertung der experimentell erhobenen Daten wurde mit den Softwareprogrammen *Excel 2010*, *GraphPad Prism* und *R Studio* durchgeführt. Die angewendeten sta-

tistischen Befehle waren „Mittelwert“, „Median“, „Standardabweichung“ und „Studentischer t-Test“. Es wurde je nach Ausgangsdatensatz zwischen gepaartem und ungepaartem bzw. einseitigem und zweiseitigem t-Test unterschieden. Das Signifikanzniveau wurde in allen Fällen auf 5 % gesetzt, d.h. $\alpha < 0,05$ wurde als signifikant gewertet. In den Abbildungen wurde das Signifikanzniveau folgendermaßen dargestellt: * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. Wurden die Daten in einem Box-Whiskers-Plot dargestellt, so wurden hier der Mittelwert und das 5 - 95 %ige Konfidenzintervall (KI) angezeigt. Für die statistische Auswertung der IFN- γ -ELISPOT-Assays (*Spot Counts*) wurde der Standardfehler des Mittelwerts (*Standard Error of the Mean, SEM*) berechnet.

Die mikroskopischen Bilder wurden mit Hilfe der Software *cellSens Dimension* aufgenommen. Für die Zusammenstellungen der grafischen Darstellungen und der mikroskopischen Bilder wurden die Programme *PowerPoint*, *Adobe Photoshop CS3* und *Adobe Illustrator* verwendet. Die Rohdaten der FACS-Analysen wurden mit der Software *FlowJo* (TreeStar) ausgewertet und visualisiert. Zur Verwaltung der zitierten Literatur, der Zitationen selbst und der Erstellung des Literaturverzeichnisses wurde die Software *Papers* (ReadCube) verwendet.

4 ERGEBNISSE

In der hier vorliegenden Arbeit wurde zunächst untersucht, ob Krebs-assoziierte Fibroblasten Zielstrukturen spontaner T-Zellantworten darstellen und damit neben den klassischen Tumorantigenen als neue zusätzliche Zielstrukturen für T-Zell-basierte Immuntherapien dienen könnten. Mit Fokus auf die therapeutische Anwendung dieser Zielstrukturen sollten dann mit der PF2D-ELISPOT-Methode systematisch potenzielle CAF-assoziierte Antigene identifiziert werden. Nachfolgend wurden diese Antigene hinsichtlich ihres Potenzials T-Zellantworten zu induzieren in einer Kohorte gesunder Spender und Tumorpatienten verifiziert. Abschließend wurden die vielversprechendsten Kandidaten bezüglich ihrer mRNA- und Proteinexpression in HNSCC-Tumorgeweben sowie Vergleichsgeweben gesunder Individuen untersucht.

4.1 Vergleichende Untersuchungen von Tumor und Tumorstroma bei der Induktion spontaner T-Zellimmunantworten

Für HNSCC-Tumore sowie für viele weitere Tumorentitäten konnte bereits gezeigt werden, dass die Infiltration von T-Zellen mit einem signifikant besseren Überleben einhergeht (Halliday *et al.*, 1995; Kerr *et al.*, 1998; Inoue *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2003; Pagès *et al.*, 2005; Carreras *et al.*, 2006; Galon *et al.*, 2006; Lohr *et al.*, 2011; Mahmoud *et al.*, 2011; Azimi *et al.*, 2012; Rusakiewicz *et al.*, 2013). Als verantwortlich für dieses Phänomen gilt unter anderem die TC-basierte anti-Tumorimmunantwort, die zur Eliminierung der Zielzellen führt. In den meisten Untersuchungen werden Tumor-assoziierte oder zunehmend die aufgrund von Mutationen entstandenen Tumor-spezifischen Neoantigene identifiziert. Unser Ziel hingegen war es, zu untersuchen, ob reaktive TCs gegen Tumorstroma-assoziierte Zielstrukturen nachweisbar sind und diese „Stroma-antigene“ anschließend zu identifizieren.

Um dieser Fragestellung systematisch nachzugehen, wurde zunächst mittels IFN- γ -ELISPOT-Assay untersucht, ob reaktive TCs gegen den kompletten Tumor (Tumor- inklusive Tumorstromaareale) vorhanden sind. Anschließend wurden sowohl reine Tumorzellen (TUCs) als auch Krebs-assoziierte Fibroblasten (CAFs) mittels Gewebeexplantation aus diesen Tumoren isoliert und eingehend charakterisiert. Schließlich wurde vergleichend untersucht, welche Rolle die jeweilige Zellpopulation (CAFs und TUCs) bei der Induktion von spontanen T-Zellimmunantworten spielen. Die Vorgehensweise ist in Abbildung 7 skizziert. Das verwendete Kollektiv bestand aus Geweben und kultivierten Zellen von insgesamt vier

HNSCC-Tumorpatienten (Tabelle 16). Limitierende Faktoren bei der Patientenauswahl waren die Verfügbarkeit von ausreichenden Mengen Tumorgewebe sowie größerer Mengen Blut für die immunologischen Untersuchungen, und dass sich ausreichend viele CAFs und TUCs aus den Geweben isolieren ließen.

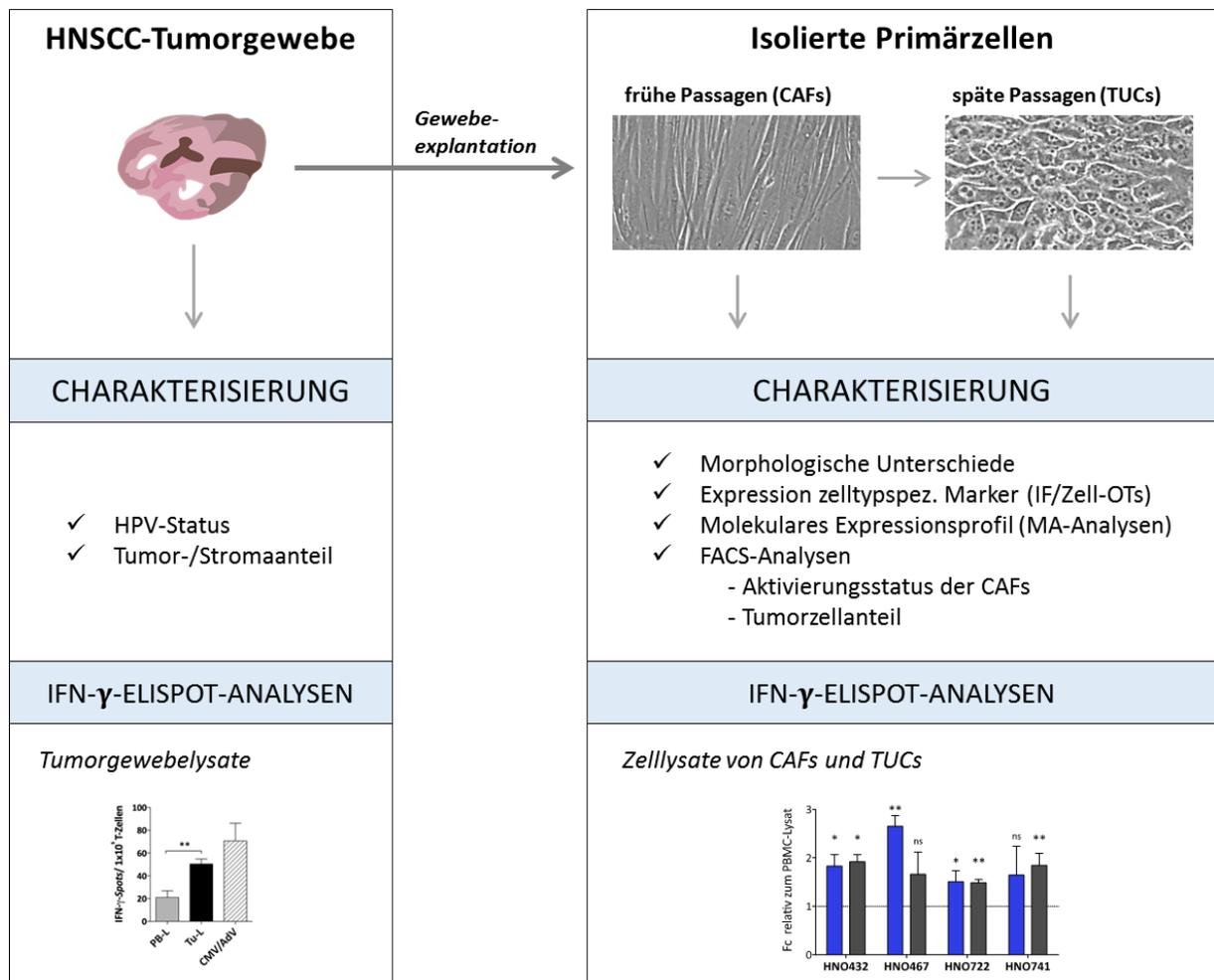


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Vorgehensweise des ersten Versuchsteils.

Für die vergleichenden Analysen der T-Zellantworten auf Tumorzellen und Stromazellen wurden die operativ entnommenen HNSCC-Patiententumore geteilt und ein Teil des Gewebes für die anschließende Analyse des HPV-Status, des Tumor- und Stromaanteils sowie des Aktivierungsstatus des Tumorstromas kryokonserviert. Aus einem weiteren Teil wurden mittels Gewebeeexplantation Zellen isoliert. Die so gewonnenen CAFs und TUCs wurden hinsichtlich ihrer Morphologie, ihres zelltypspezifischen molekularen Profils und der Expression spezifischer Marker charakterisiert. Anschließend wurden die Tumorgewebe und die daraus isolierten Zellen hinsichtlich ihres Potenzials, T-Zellimmunantworten zu induzieren in einem autologen Setting untersucht. CAFs = Krebs-assoziierte Fibroblasten, IF = Immunfluoreszenzfärbungen, HPV = Humane Papillomaviren, OTs = Objektträger, TUCs = Tumorzellen.

4.1.1 Spontane T-Zellimmunantworten gegen HNSCC-Tumorlysate

Um der Frage nachzugehen, ob auch die Zellen des Tumorstromas Zielstrukturen spontaner T-Zellimmunantworten darstellen, wurden HNSCC-Gewebe ausgewählt, die über ein substantielles Tumorstroma verfügten. Der Tumor- und respektive Tumorstromaanteil der ver-

wendeten Gewebe wurde vorab mittels immunhistochemischer Färbungen gegen Zytokeratine visualisiert und nachfolgend histopathologisch beurteilt. Wie die repräsentativen Zytokeratinfärbungen (Abbildung 8 A-D) zeigen, verfügten alle untersuchten Tumore über ausreichende Tumor- (T) sowie Tumorstromaanteile (S). Da die Expression von MHC-I-Molekülen *in vivo* für die Antigenerkennung und die T-Zellantwort unerlässlich ist, wurde diese zusätzlich über einen gegen die Loci HLA-A, -B, -C gerichteten Antikörper detektiert. Sowohl die Tumorzellen als auch die Krebs-assoziierten Fibroblasten des Tumorstromas wiesen ein homogenes Expressionsmuster auf (Anhang Abbildung 30).

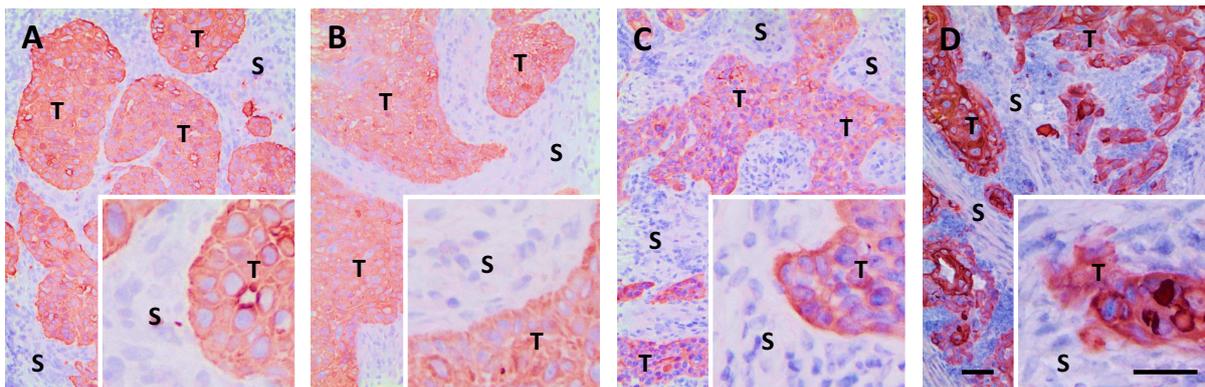


Abbildung 8: Immunhistochemische Färbungen gegen Zytokeratine auf Gewebedünnschnitten.

A| HNO432, **B|** HNO467, **C|** HNO722 und **D|** HNO741 gefärbt mit dem Panzytokeratin-Antikörper Cyt I&II (AE1/AE3). T = Tumoreareale, S = Tumorstromaareale. Messbalken = 50 µm.

Um sicherzustellen, dass gemessene T-Zellimmunantworten nicht durch virale Proteine induziert werden, wurde zusätzlich der HPV-Status der Patienten sowohl auf DNA- als auch auf Proteinebene über eine p16-Färbung verifiziert (Daten nicht gezeigt). Alle der hier verwendeten Gewebeproben waren negativ für HPV Typ16 und Typ18.

Nach der Charakterisierung wurden die Tumorgewebe lysiert und mittels IFN- γ -ELISPOT-Assay untersucht. Dazu wurden die isolierten DCs mit den Gewebelysaten gepulst und anschließend die autologen TCs zugegeben. Dabei wurde nicht zwischen CD4⁺ und CD8⁺ TCs unterschieden, sondern die gesamte T-Zellimmunantwort abgefragt. Bei den HNSCC-Tumorpatienten HNO432, HNO467 und HNO722 ließen sich signifikante T-Zellantworten gegen autologes Tumorlysate nachweisen (Abbildung 9 A-C). Im Vergleich zur Negativkontrolle (PBMC-Lysat) konnten bis zu dreimal mehr reaktive TCs detektiert werden. Bei Patient HNO741 konnte verglichen mit der Negativkontrolle keine signifikante T-Zellantwort nachgewiesen werden (Abbildung 9 D). Dass prinzipiell reaktive TCs vorhanden waren, konnte durch die mitgeführte Positivkontrolle CMV/AdV bestätigt werden.

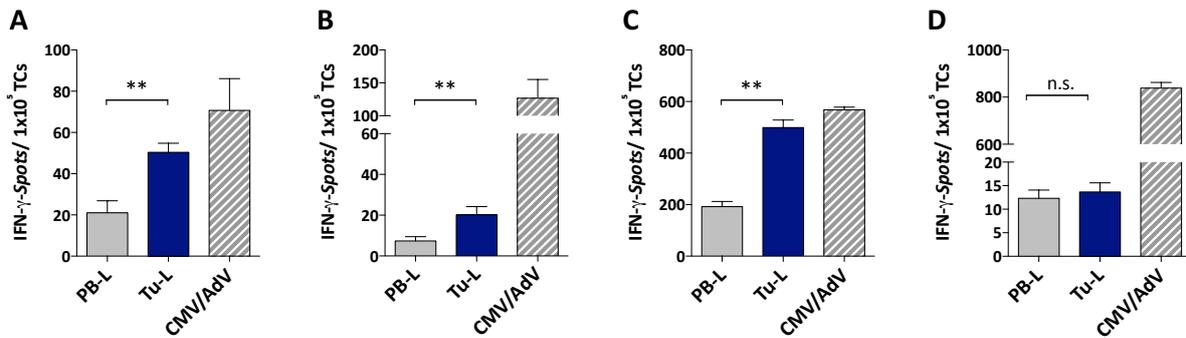


Abbildung 9: Spontane T-Zellimmunantworten von HNSCC-Tumorpatienten gegen autologes Tumorlysat.

T-Zellimmunantworten von Patient **A**| HNO432, **B**| HNO467, **C**| HNO722 und **D**| HNO741 gegen autologe Tumorlysate (Tu-L) verglichen mit der Negativkontrolle PBMC-Lysat (PB-L). Die Tumorlysate wurden mit autologen DCs inkubiert und anschließend autologe T-Zellen (TCs) zugegeben und die Anzahl reaktiver TCs (IFN- γ -Spots/1x10⁵ TCs) in Triplikaten detektiert. Als Positivkontrolle wurden DCs mit einem Mix aus CMV/AdV beladen. Balken repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM. ** = p < 0,01, n.s. = nicht signifikant.

Ob die detektierten T-Zellantworten nun primär durch Tumor-assoziierte Antigene induziert wurden, oder ob auch Tumorstroma-assoziierte Antigene eine Rolle spielen, sollte im nächsten Abschnitt eingehend untersucht werden.

4.1.2 Charakterisierung der primären HNSCC-Zellkulturen

Um nun vergleichend untersuchen zu können, ob und wenn ja, welche Rolle CAFs im Vergleich zu Tumorzellen bei der Induktion spontaner T-Zellantworten spielen, mussten die beiden Zellpopulationen separat untersucht werden. Dazu wurden CAFs und korrespondierende Tumorzellen mittels Gewebeexplantation aus frisch resezierten Tumorgeweben isoliert. Die gewonnenen Zellen stammten aus dem Bestand der AG Molekulare Zellbiologie und wurden vor den immunologischen Analysen eingehend charakterisiert.

4.1.2.1 Morphologische Unterschiede zwischen TUCs und CAFs

Die frühen Passagen bestanden zunächst fast ausschließlich aus Zellen, die eine für aktivierte Fibroblasten charakteristische spindel- bis sternartige Morphologie aufwiesen (Abbildung 10, obere Bildreihe) (Kalluri, 2016). Nach mehreren Wochen der Kultivierung wurden erste morphologische Veränderungen des Monolayers sichtbar. Zuerst bildeten sich kleine Inseln, die aus pflastersteinartig wachsenden Zellen bestanden. Diese Inseln vergrößerten sich sukzessive, während die umgebenden Fibroblasten zuerst seneszent und dann apoptotisch wurden. Die späten Passagen hingegen wiesen ausschließlich eine für Zellen epithelialen Ursprungs typische, pflastersteinartige Morphologie auf (Abbildung 10, untere Bildreihe) und zeichneten sich zudem durch unbegrenzte Teilungsfähigkeit aus.

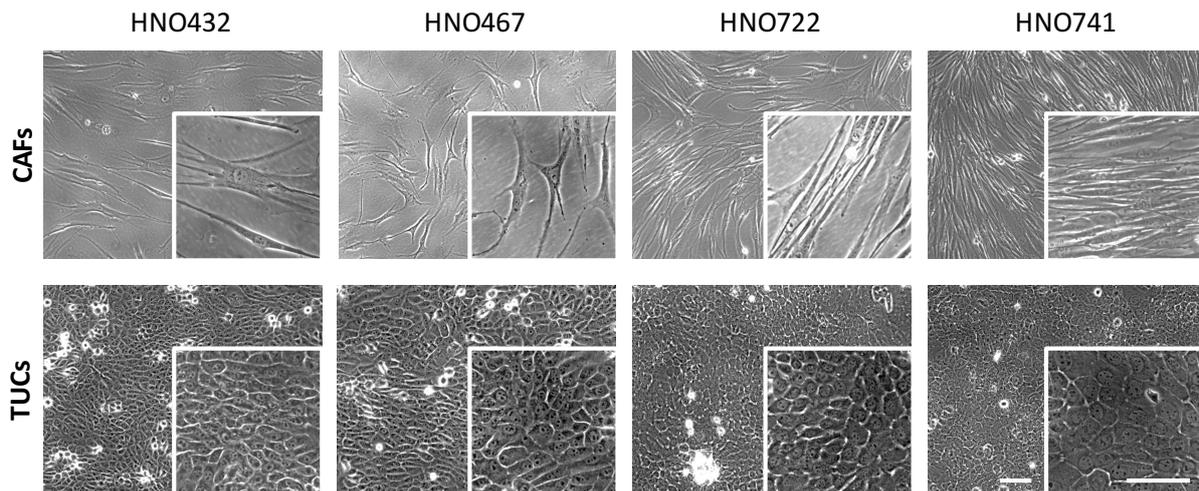


Abbildung 10: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen der HNSCC-Zellkulturen.

Aus Tumorgewebe von HNO432 (p7, p57), HNO467 (p9, p61), HNO722 (p4, p28), HNO741 (p2, p25) isolierte Krebs-assoziierte Fibroblasten (CAFs) mit einer stern- bis spindelartigen Morphologie (obere Reihe) sowie Tumorzellen (TUCs) mit einer pflastersteinartigen Morphologie (untere Reihe). Messbalken = 50 µm.

Abhängig von der jeweiligen Kultur konnte sich der beschriebene Umwandlungsprozess über mehrere Wochen bis Monate erstrecken, weswegen die späten Passagen erst dann als Tumorzellkulturen bezeichnet wurden, wenn der Umwandlungsprozess vollständig vollzogen war. Dies konnte frühestens ab > p18 beobachtet werden. Für CAFs hingegen galt, dass die Kultur aus spindel- bzw. sternartigen Zellen bestehen musste und sich noch keine Tumorzellinseln gebildet hatten, was bis einschließlich Passage neun gewährleistet werden konnte. Zusammenfassend legten diese Beobachtungen den Schluss nahe, dass es sich bei den frühen Passagen hauptsächlich um Krebs-assoziierte Fibroblasten und bei den späten Passagen um reine HNSCC-Tumorzellkulturen handelte.

Zur experimentellen Verifizierung dieser Einschätzung wurden anschließend molekularbiologische Analysen der frühen und späten Passagen durchgeführt.

4.1.2.2 Untersuchungen des molekularen Expressionsprofils der CAFs und TUCs

Diese Beobachtungen sollten nun auf molekularer Ebene mittels mRNA-Expressionsanalysen (Microarray-Analysen) verifiziert werden. Um die Aussagekraft der statistischen Auswertung zu erhöhen, konnten zusätzlich zu den bislang untersuchten vier HNSCC-Zelllinien CAFs und TUCs von weiteren elf HNSCC-Patienten (jeweils in frühen, überwiegend aus Fibroblasten bestehenden Passagen und korrespondierenden TUCs, die sich wie zuvor beschrieben erst in fortgeschrittenen Passagen durchsetzten) gewonnen und in die Analysen eingeschlossen werden. Die hier verwendeten Passagenzahlen sind in Tabelle 20 aufgelistet.

Die Expressionsdaten (Rohintensitäten) wurden quantilnormalisiert, \log_2 -transformiert und mittels Hauptkomponentenanalyse (*Principal Component Analysis*, PCA) analysiert (Abbildung 11 A). Dieses Verfahren der multivariaten Statistik ermöglicht es, die Komplexität umfangreicher Datensätze zu reduzieren, indem die Anzahl der möglichen korrelierenden Variablen (hier 31.323 Gene) auf wenige möglichst aussagekräftige Linearkombinationen (hier zwei Dimensionen (PC1 und PC2)) genähert wird, wobei die PC1 den größten Unterschied widerspiegelt. Letztlich wurden die Proben so anhand ihrer Expressionsprofile gruppiert, ohne dass benutzerbedingt Einfluss auf die Gruppenzugehörigkeit genommen wurde. Dabei fiel zunächst auf, dass die 30 Proben in zwei gleichgroße Gruppen auftrennten. Die überwiegend aus CAFs bestehenden frühen Passagen unterschieden sich in ihrem Expressionsprofil deutlich von den TUCs und bildeten in der PC1 zwei distinkte Gruppen. Die relativ große gruppeninterne Streuung in der PC2 (die allerdings weitaus weniger aussagekräftig ist) kann auf die interindividuelle Heterogenität zurückgeführt werden. Diese scheint bei den TUCs marginal ausgeprägter als bei den CAFs, was auf den individuellen Mutationsspektren der Tumoren beruhen könnte. Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$; kein *Fold Change* (FC)) konnten in 32,4 % (10.159) aller Gene detektiert werden. 4.774 davon zeigten in CAFs eine signifikant höhere Expression ($p < 0,05$; $\log_2FC > 0$). Darunter befanden sich Gene, deren Expression typisch für Fibroblasten bzw. aktivierte Fibroblasten ist, wie Vimentin, Fibronectin (Abbildung 11 B), Kollagene, Matrixmetalloproteinasen, Tenascin C, SPARC, Versican oder bFGF und CXCL10 (Erez *et al.*, 2010; Kalluri, 2016). 5.385 Gene waren stärker in den TUCs ($p < 0,05$; $\log_2FC < 0$) exprimiert. Hierunter befanden sich typische Epithelzellmarker wie Zytokeratine (*KRT5*, *KRT14*) und Tumorzellmarker wie das *Epithelial Cell Adhesion Molecule* (*EPCAM*) (Abbildung 11 C) oder der *Epidermal Growth Factor Receptor* (*EGFR*).

Um über das jeweilige Genexpressionsprofil Rückschlüsse auf die Anreicherung bestimmter molekularer Prozesse und damit auch auf den Zelltyp ziehen zu können, wurden *Gene-Ontologie*-(GO)-Termanalysen durchgeführt. Hierfür wurde die Webapplikation „*GOrilla*“ verwendet (Eden *et al.*, 2009). Dabei wurden jeweils die differentiell zwischen den beiden Gruppen exprimierten Gene einbezogen ($p < 0,05$; $\log_2FC > 0,5$) und hinsichtlich einer Anreicherung in der Kategorie „*Biological Process*“ untersucht. Während in den CAFs Gene angereichert waren, die bei Prozessen wie „*Extracellular Matrix Organization*“, „*Collagen Catabolic Process*“, „*Response to Wounding*“ oder „*Regulation of Angiogenesis*“ eine Rolle spielen (Abbildung 11 D), was wiederum den aktivierten Phänotyp bestätigte, waren in den

TUCs Gene angereichert, die mit „*Epithelium Development*“, „*Epithelial Cell Differentiation*“ oder „*Keratinization*“ in Zusammenhang stehen (Abbildung 11 E) und damit den epithelialen Zellursprung unterstreichen.

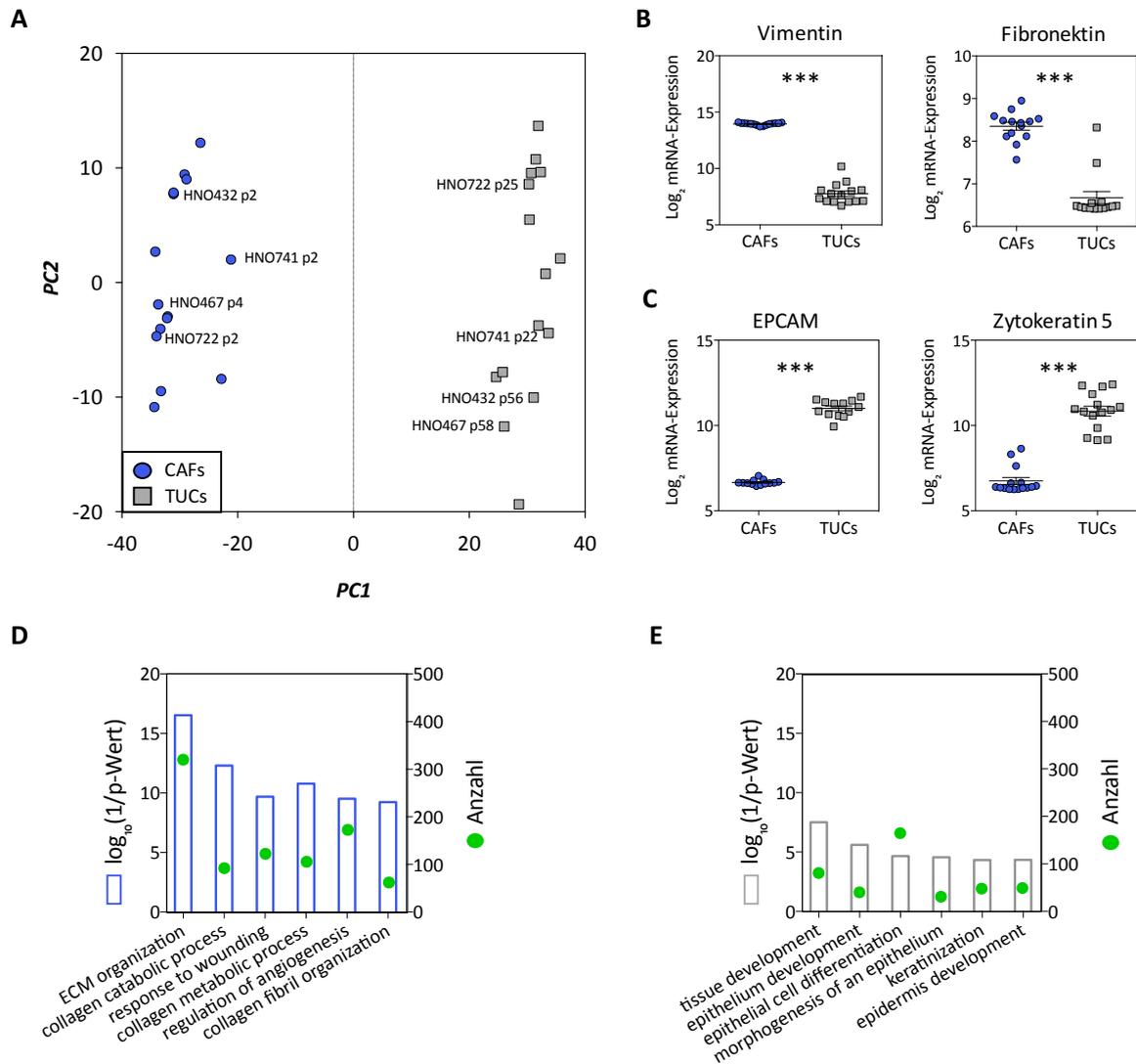


Abbildung 11: Microarray-Analysen von CAFs und korrespondierenden TUCs von 15 HNSCC-Tumorpatienten.
A | *Principal Component Analysis* (PCA)-Plot von 30 Proben: 15 isolierte Krebs-assoziierten Fibroblasten (CAF) und 15 korrespondierende Tumorzellen (TUC). Die für die PF2D-ELISPOT-Analysen verwendeten CAFs und TUCs sind durch die HNO-Kennung hervorgehoben. **B** | und **C** | *Scatter*-Plots des log₂-transformierten Expressionsniveaus von repräsentativen CAF-assoziierten Genen (Vimentin, Fibronektin) sowie von repräsentativen TUC-assoziierten Genen (EPCAM, Zytokeratin 5) in TUCs und CAFs. **D** | und **E** | Angereicherte Prozesse für die *Gene Ontology* (GO)-Term-Kategorie „biologischer Prozess“ für die stärker in den frühen Passagen exprimierten Gene (D) und für die in den späten Passagen stärker exprimierten Gene (E). Balken repräsentieren das Signifikanzniveau (log₁₀ (1/p-Wert)) und die grünen Punkte die Anzahl der in dem entsprechenden GO-Term enthaltenen Gene. *** p < 0,001.

Damit wird deutlich, dass der größte Unterschied zwischen allen 30 Proben (PC1) auf den zelltypspezifischen Expressionsprofilen beruht, und dass die frühen Passagen ein für Fib-

roblasten charakteristisches, und die pflastersteinartigen Kulturen aus den höheren Passagen ein für Epithelzellen charakteristisches Expressionsprofil aufweisen.

4.1.2.3 Untersuchung der Expression zelltypspezifischer Marker

Abschließend wurden die CAFs und TUCs hinsichtlich der Expression von Vimentin und Zytokeratinen auf Proteinebene untersucht. Dazu wurden die Zellen auf Multiwell-Objekträger ausgesät und mittels Mehrfach-Immunfluoreszenzfärbungen gegen Vimentin und Zytokeratine untersucht. Vimentin ist ein Typ III-Intermediärfilament aus der Gruppe der Desmine, wird von allen Zellen mesenchymalen Ursprungs exprimiert und dient damit als Marker für Fibroblasten (Chang *et al.*, 2002). Die Expression von Zytokeratinen (ebenfalls Intermediärfilamente) hingegen ist auf Epithelzellen sowie Epithelneoplasien beschränkt (Henzen-Logmans *et al.*, 1987). Aufgrunddessen wird die Zytokeratinexpression vielfach in der Routinediagnostik zur Detektion von epithelialen Tumorzellen eingesetzt (Moll *et al.*, 1982; Cooper *et al.*, 1985; Chu *et al.*, 2000). Da sich für alle CAFs und TUCs jeweils ein identisches Bild bot, sind die Ergebnisse in Abbildung 12 exemplarisch für die CAFs und TUCs von Patient HNO432 gezeigt.

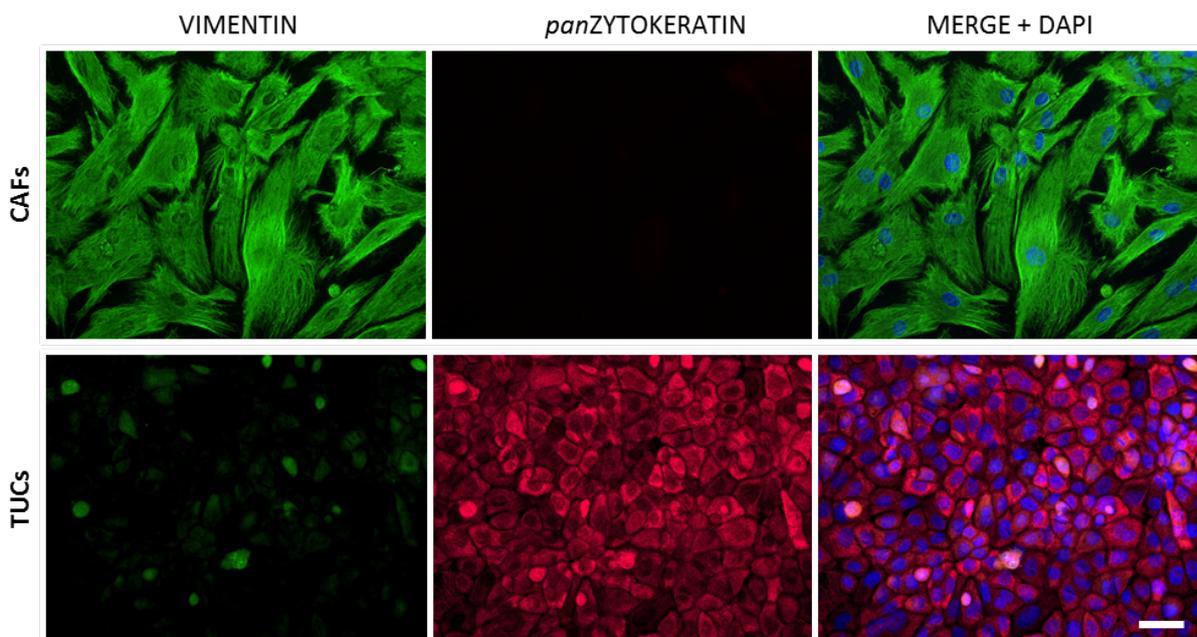


Abbildung 12: Repräsentative Mehrfach-Immunfluoreszenzfärbungen gegen Vimentin und Zytokeratine.

Multiwell-Objekträger bewachsen mit CAFs (p6) und TUCs (p56) und anschließend mittels Mehrfach-Immunfluoreszenzfärbung gegen Vimentin und Zytokeratine (Panzytokeratin-Antikörper Cyt I&II (AE1/AE3)) gefärbt. Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. CAFs = Krebs-assoziierte Fibroblasten, TUCs = Tumorzellen. Messbalken = 50 µm.

Zur weiteren Absicherung wurden die von uns verwendeten Zellen authentifiziert, indem deren DNA mit der isolierten Tumorgewebe-DNA und der DNA aus dem Patientenblut verglichen wurde. Dies wurde von der „Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen“ (DSMZ) des Leibniz-Instituts durchgeführt. So konnte zum einen sichergestellt werden, dass die verwendeten Zellen „*unique*“, d.h. nicht mit anderen Kulturen kreuzkontaminiert waren, und zum anderen, dass das verwendete Blut, das Tumorgewebe sowie die isolierten Zellen autolog waren, also von ein und demselben Spender stammten. Dies war insbesondere für die anschließenden immunologischen Untersuchungen von großer Bedeutung.

4.1.2.4 Aktivierungsstatus der Krebs-assoziierten Fibroblasten *in vitro*

Krebs-assoziierte Fibroblasten zeichnen sich *in vivo* durch einen sogenannten *aktivierten* Phänotyp aus (Kalluri & Zeisberg, 2006). Im Tumorgewebe wird dieser über parakrine Stimulation von Tumorzellen und diversen infiltrierenden Immunzellen vermittelt (Harper & Sainson, 2014). Daneben können einmal aktivierte Fibroblasten ihren Phänotyp auch durch autokrine Stimulation mittels TGF- β aufrechterhalten (Kuperwasser *et al.*, 2004). Dieser aktivierte Zustand diskriminiert CAFs von ruhenden lokalen Fibroblasten und geht mit der Expression verschiedener Aktivierungsmarker und somit vermutlich auch mit der Präsentation CAF-assoziiierter Antigene einher (Kalluri, 2016). Die aktuell robustesten und am häufigsten genutzten Marker, um den Aktivierungszustand von CAFs abzubilden, sind α -SMA und das *Fibroblast Activation Protein* (FAP) (Dolznic *et al.*, 2005; Kalluri & Zeisberg, 2006; Zi, He, He, Li, Yang, & Cai, 2015b). Da isolierten CAFs *in vitro* parakrine Stimuli fehlen, könnte der aktivierte Phänotyp und damit einhergehend auch die Antigenpräsentation beeinträchtigt werden. Um den Aktivierungsstatus der CAFs auf Einzelzellebene zu überprüfen, wurden FACS-Analysen durchgeführt. Dazu wurde die α -SMA- und FAP-Proteinexpression relativ zur jeweiligen Isotypkontrolle bestimmt (gezeigt für HNO467 p10 in Abbildung 13 A).

In Abhängigkeit des verwendeten Markers zeigte sich ein unterschiedlich hoher Anteil an aktivierten Fibroblasten (Abbildung 13 B). Dabei waren prozentual mehr Zellen positiv für α -SMA (42,8 % bis 99,5 %) als für FAP (16,1 % bis 32,3 %). FAP wurde zudem schwächer exprimiert (geringere mittlere Fluoreszenzintensität (MFI)). Auffällig war überdies, dass die Population der α -SMA⁺ Zellen zwei Gruppen bildete (Abbildung 13 A). Eine mit einer mittleren Fluoreszenzintensität (erster Peak des Histogramms) und eine mit einer höheren Intensität (zweiter Peak).

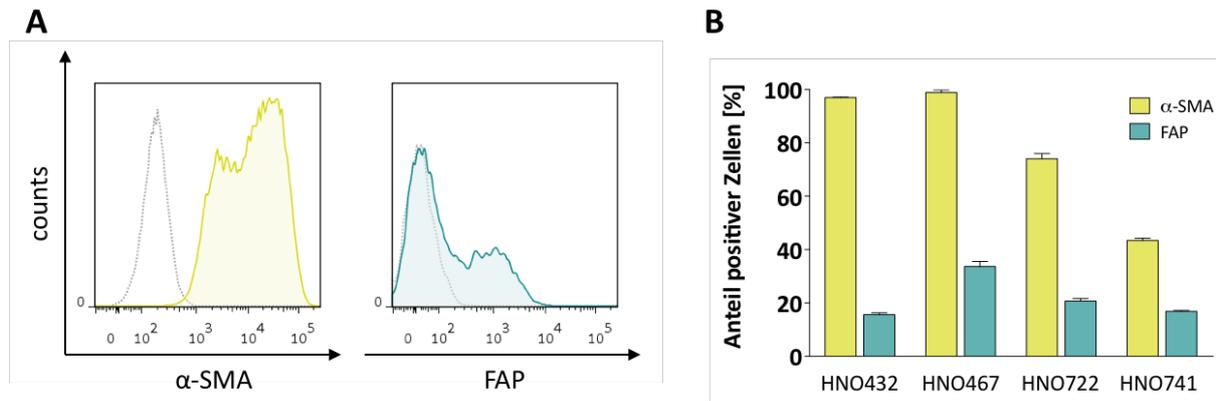


Abbildung 13: Analyse des Aktivierungsstatus von CAFs mittels FACS.

A | Histogramme zeigen exemplarisch für CAFs von HNO467 die Verteilung der α -SMA⁺ (links, gelb) und FAP⁺ Zellen (rechts, türkis) (durchgezogene Linien) jeweils im Vergleich zu den Isotypkontrollen (grau gepunktete Linien). Skala der x-Achse: Fluoreszenzintensität. Skala der y-Achse: gezählte Zellen (*counts*). **B** | Kumulative Daten der vier untersuchten CAF-Kulturen HNO432 p6, HNO467 p10, HNO722 p7 und HNO741 p5. Prozentualer Anteil der α -SMA⁺ Zellen (gelb) und der FAP⁺ Zellen (türkis) in Triplikaten. Balken entsprechen dem Mittelwert \pm SEM in Triplikaten. α -SMA = α Smooth Muscle Actin, FAP = Fibroblast Activation Protein.

Trotz der Unterschiede legt dieses Ergebnis nahe, dass es sich bei den vier primären CAF-Kulturen um Fibroblasten mit einem aktivierten Phänotyp handelt, und dass die autokrine Stimulation ausreichend ist, um den CAF-assoziierten Phänotyp auch *ex vivo* aufrecht zu erhalten.

4.1.2.5 Detektion EPCAM-positiver Zellen in CAF-Kulturen

Wie anhand der Morphologie, der mRNA- und Proteinexpressionsanalysen gezeigt werden konnte, bestanden die frühen Passagen überwiegend aus aktivierten Fibroblasten. Die Tatsache, dass sich aus diesen Kulturen im weiteren Verlauf reproduzierbar immortale HNSCC-Tumorzellkulturen entwickeln konnten, legt zwingend nahe, dass auch in den frühen Passagen Tumorzellen enthalten sein müssen. Der Anteil der TUCs an der Gesamtzellpopulation scheint allerdings so gering zu sein, dass er keine erkennbaren Auswirkungen auf das mRNA-Expressionsprofil der CAF-Population hat und somit über globale Microarray-Expressionsanalysen nicht zu detektieren war.

Um dennoch einen Eindruck über den prozentualen Tumorzellanteil auf Einzelzellebene zu gewinnen, wurden wiederholt FACS-Analysen durchgeführt. Dazu wurde das *Epithelial Cell Adhesion Molecule* (EPCAM) verwendet. EPCAM ist ein Transmembranglykoprotein, das auch zur Diagnostik von Tumoren epithelialen Ursprungs sowie als therapeutisches Target eingesetzt wird (Gires & Bauerle, 2010; van der Gun *et al.*, 2010).

Der prozentuale Anteil der EPCAM⁺ Zellen wurde jeweils relativ zur Isotypkontrolle berechnet (Abbildung 14 A). In den frühen Passagen (HNO432 p4, HNO467 p6, HNO722 p6, HNO741 p4) aller vier untersuchten Kulturen war der Anteil EPCAM⁺ Zellen mit 0,1 bis 2,4 % sehr gering. Zudem konnte gezeigt werden, dass der Anteil der EPCAM⁺ Zellen auch über die Subkultivierung hinweg (von p4 bis p10) konstant bei < 1 % blieb und erst ab Passage 25 ein Anstieg zu verzeichnen war (Anhang Abbildung 31). Dementgegen bestanden alle späten Passagen (HNO432 und HNO467 > p50, HNO722 und HNO741 > p25) zu 100 % aus EPCAM⁺ Zellen (Abbildung 14 B).

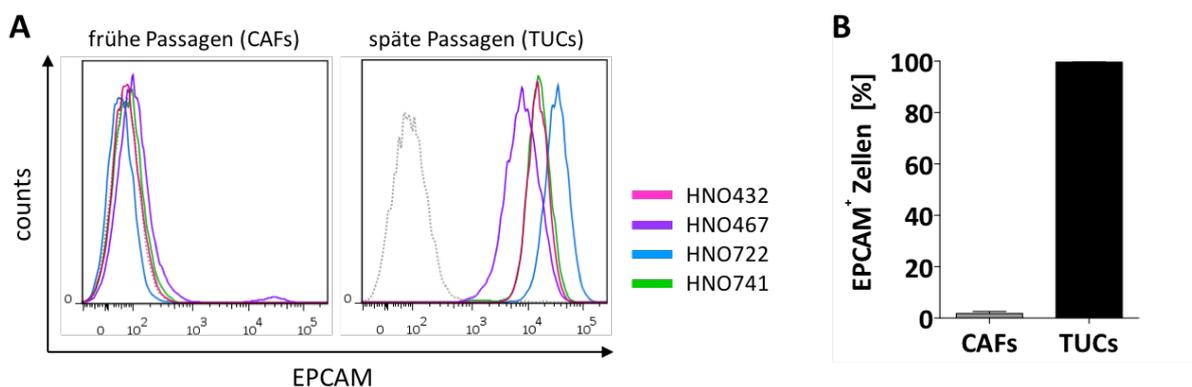


Abbildung 14: Bestimmung des Anteils EPCAM-positiver Zellen in frühen und späten Passagen.

A| Die Histogramme zeigen die Verteilung der EPCAM⁺ Zellen (durchgezogene Linien) im Vergleich zu den Isotypkontrollen (gepunktete Linien) für HNO432 p57 (pink), HNO467 p63 (violett), HNO722 pp27 (blau) und HNO741 p25 (grün). Links für die frühen Passagen (CAFs), rechts für die späten Passagen (TUCs). Skala der x-Achse beschreibt die Fluoreszenzintensität, die Skala der y-Achse beschreibt die gezählten Zellen. **B|** Kumulative Daten aller vier untersuchten Kulturen. Balken entsprechen dem Mittelwert ± SEM in Triplikaten des prozentualen Anteils der EPCAM⁺ Zellen in den vier frühen Passagen (CAFs) und vier späten Passagen (TUCs).

Insgesamt lassen diese umfassenden Analysen darauf schließen, dass es sich bei den aus HNSCC-Tumorgeweben isolierten Zellen im zeitlichen Verlauf um zwei distinkte Zelltypen handelt: die frühen Passagen bestehen fast ausschließlich aus aktivierten Fibroblasten und weisen eine typische spindel- bis sternartige Morphologie auf, während die späten Passagen ausschließlich pflastersteinartig wachsen, was charakteristisch für Zellen epithelialen Ursprungs ist. Weiter bestätigten die gemeinsamen mRNA-Expressionsanalysen von insgesamt 15 frühen (Passagenzahl: < p6) und 15 korrespondierenden späten Passagen (Passagenzahl: > p25), dass unabhängig von den interindividuellen Unterschieden die Zellen in diesen Passagen zwei distinkte Gruppen bildeten. Die jeweils differentiell exprimierten Gene und die damit verbundene Anreicherung bestimmter biologischer Prozesse (GO-Terms) sind charakteristisch für Fibroblasten bzw. Epithelzellen. Zudem konnte bei 100 % der Zellen in den

späten Passagen der Tumorzellmarker EPCAM nachgewiesen werden und sie zeichnen sich durch unbegrenzte Teilungsfähigkeit aus, während die frühen Passagen *ex vivo* nach einiger Zeit der Kultivierung in die Apoptose gehen. Der für Krebs-assoziierte Fibroblasten typische aktivierte Phänotyp konnte über die Expression der klassischen Aktivierungsmarker α -SMA und FAP mittels FACS-Analysen verifiziert werden. Damit kann zusammenfassend davon ausgegangen werden, dass es sich bei den frühen Passagen um hochangereicherte Kulturen Krebs-assoziiierter Fibroblasten (CAFs) mit einem aktivierten Phänotyp handelt und bei den späten Passagen um reine HNSCC-Tumorzellkulturen.

4.1.3 CAFs als potenzielle Zielstrukturen spontaner T-Zellantworten

In den folgenden Untersuchungen sollte die Frage beantwortet werden, ob die T-Zellaktivierung allein durch immunogene Zielstrukturen der Tumorzellen (Tumor-assoziierte Antigene) ausgelöst wurde, oder ob auch die CAFs – und damit CAF-assoziierte Antigene – eine Rolle bei der T-Zellaktivierung spielten. Dazu wurden die korrespondierenden CAFs und TUCs mittels IFN- γ -ELISPOT-Assay getestet.

Wie die FACS-Analysen der CAFs gezeigt haben, befinden sich einige wenige Tumorzellen (0,1-2,4 %, vgl. Abbildung 14) in den CAF-Kulturen. Um die Reinheit auf ein Maximum zu erhöhen und damit auszuschließen, dass die T-Zellimmunantwort durch verbleibende Tumorzellen induziert wurden, wurden zu den sehr frühen Passagen verwendet (HNO432 p4, HNO467 p6, HNO722 p6, HNO741 p4) und darüber hinaus eventuell enthaltene TUCs über einen EPCAM-*BeadSort* eliminiert. Die Reinheit der CAF-Kulturen wurde anschließend mittels FACS-Analysen überprüft. Es zeigte sich, dass alle Kulturen nach dem *BeadSort* eine Reinheit von 99,8-99,9 % aufwiesen (Anhang, Abbildung 32).

Die Zellslysate dieser hochreinen CAF-Zellsuspensionen wurden dann im IFN- γ -ELISPOT-Assay getestet. Da davon auszugehen ist, dass die bei den Tumorgewebelysaten detektierten T-Zellantworten zumindest in Teilen von den Tumorzellen induziert wurden, wurden die jeweiligen korrespondierenden Tumorzellslysate zum Vergleich mitgetestet.

In einem autologen Versuchsaufbau wurden DCs mit CAF- oder TUC-Lysaten beladen und anschließend mit T-Zellen ko-kultiviert. Als Negativkontrolle wurden DCs mit PBMC-Lysat inkubiert, als Positivkontrolle wurde CMV/AdV verwendet (exemplarisch dargestellt für Patient HNO722 Abbildung 15 A). Dabei wurde auch in diesem Experiment nicht zwischen der Antwort CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen unterschieden, sondern wie bei den Gewebelysaten die gesamte T-Zellantwort abgefragt. Sowohl Tumorzellen als auch CAFs induzierten bei allen

Patienten, verglichen mit der jeweiligen Kontrolle, deutliche, wenn auch nicht in allen Fällen signifikante T-Zellantworten (Abbildung 15 C). Interessanterweise konnte dabei kein signifikanter Unterschied zwischen den CAF-induzierten und der durch die Tumorzellen hervorgerufenen T-Zellimmunantworten gemessen werden (Abbildung 15 B).

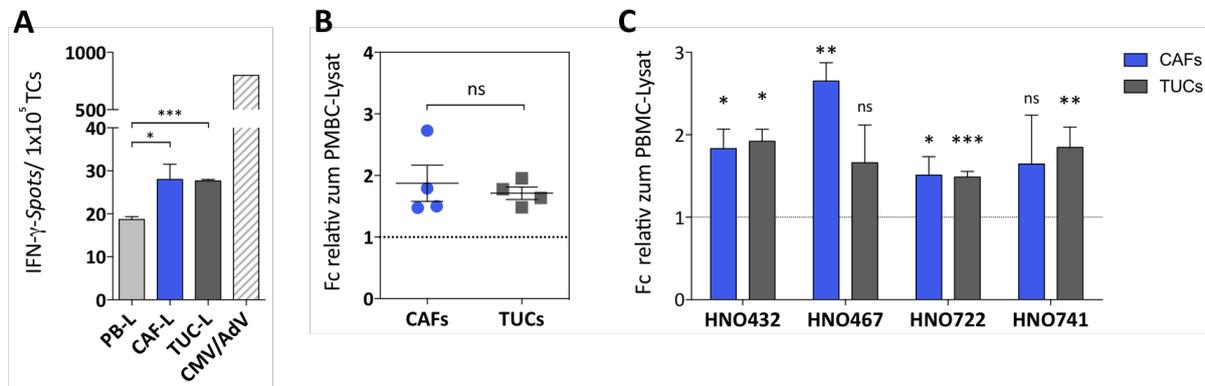


Abbildung 15: IFN- γ -ELISPOT-Assay der CAF- und TUC-Lysate von HNO432, HNO467, HNO722 und HNO741.

Die CAF-Lysate (CAF-L; blau) und Tumorzelllysate (TUC-L; grau) wurden mit DCs inkubiert, autologe T-Zellen (TCs) zugegeben und anschließend die Anzahl reaktiver TCs (IFN- γ -Spots/ 1×10^5 TCs) in Triplikaten detektiert. Als Negativkontrolle wurde PBMC-Lysat (PB-L; grau) verwendet, als Positivkontrolle eine Mischung aus CMV/AdV (hellgrau). **A** | Repräsentative ELISPOT-Analyse von HNO722 (CAFs p6, TUCs p27). Balken entsprechen dem Mittelwert \pm SEM der Triplikate. **B** | Kumulative Daten aufgetragen nach CAFs und TUCs. Skala der y-Achse: *Fold Change* (FC) relativ zum jeweiligen Kontrolllysat (PBMC-Lysat). **C** | Kumulative Daten geordnet nach Patienten. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, n.s. = nicht signifikant.

Bei genauerer Betrachtung der patientenspezifischen T-Zellantworten fiel auf, dass signifikante T-Zellantworten immer von mindestens einer der isolierten Zellpopulationen (TUCs oder CAFs) induziert worden waren (Abbildung 15 C). Bei Patient HNO467 beispielsweise konnten die Tumorzelllysate eine erhöhte aber keine signifikante T-Zellantwort auslösen, wohingegen die in den CAF-Lysaten enthaltenen Antigene eine T-Zellantwort induzierten. Bei Patient HNO741 ergab sich ein umgekehrtes Bild. Hier induzierten nur die Tumorzellen eine signifikante spontane T-Zellantwort.

Zusammenfassend unterstreichen diese Ergebnisse, dass auch CAFs Antigene enthalten, die zur T-Zellreaktion gegen den Tumor beitragen könnten. Im Weiteren sollten diese immunogenen Zielstrukturen mittels PF2D-ELISPOT-Methode identifiziert werden.

4.2 Identifizierung CAF-assoziiertes Antigene

Zur systematischen Identifizierung von CAF-assoziierten T-Zellantigenen (CAF-TAs) wurde die Proteom-basierte PF2D-Methode gewählt. Mittels derer konnten bereits Tumorantigene verschiedener Tumorentitäten (kolorektale Karzinome und Glioblastome) identifiziert wer-

den. Um speziell CAF-assoziierte Antigene identifizieren zu können, wurde hier jedoch nicht das gesamte Tumorgewebelysat verwendet, sondern die Lysate von den isolierten und vorab charakterisierten CAFs eingesetzt. Die im CAF-Lysat enthaltenen Proteine wurden in der 1. Dimension (1D) nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI) fraktioniert und die gesammelten Fraktionen dann im IFN- γ -ELISPOT-Assay untersucht. Fraktionen, die signifikante T-Zellantworten induzierten, wurden anschließend in der zweiten Dimension (2D) über eine Umkehrphasenchromatografie weiter subfraktioniert. Diese Subfraktionen wurden erneut in einem IFN- γ -ELISPOT-Assay getestet. Signifikante 2D-Fraktionen wurden dann massenspektrometrisch analysiert, um die enthaltenen potenziell immunogenen Kandidatenproteine zu identifizieren.

4.2.1 PF2D-Proteomfraktionierung

Die CAF-Proteinlysate aller vier Patienten wurden zunächst in der 1D aufgetrennt. Anhand des Chromatogramms des 1D-Laufs wurden relevante Fraktionen ausgewählt und anschließend im IFN- γ -ELISPOT-Assay getestet. Das Ergebnis des IFN- γ -ELISPOT-Assays der 1D-Proteinfraktionen ist exemplarisch für die CAFs von Patient HNO432 in Abbildung 16 A dargestellt. Elf der getesteten 19 1D-Proteinfraktionen lösten signifikante T-Zellantworten aus. Im Vergleich zur Kontrolle (PBMC-Lysat) konnten bis zu zehnmal mehr reaktive TCs detektiert werden (Abbildung 16 B). Auch bei den getesteten 1D-Proteinfraktionen der übrigen drei Patienten konnten signifikante T-Zellantworten gegen die CAF-Fraktionen nachgewiesen werden (HNO467: 3/18; HNO722: 6/22; HNO741: 5/21). Auffälligerweise konnten hier weniger 1D-Fraktionen signifikante TC-Antworten auslösen (geringe Anzahl blau markierter Punkte) und zudem lagen die Mittelwerte über alle Fraktionen bei HNO467, HNO722 und HNO741 nur bei etwa 1,5, was bedeutet, dass im Mittel etwa 1,5-mal mehr reaktive TCs im Vergleich zu Kontrolle nachgewiesen werden konnten (Abbildung 16 B).

Jede 1D-Fraktion, die im 1D IFN- γ -ELISPOT-Assay eine signifikante T-Zellantwort ausgelöst hatte, wurde anschließend in der 2D über eine HPRP-Säule in 40 Subfraktionen aufgetrennt. Aufgrund der limitierten Verfügbarkeit des Patientenblutes konnten nicht alle 40 Subfraktionen getestet werden. Deshalb wurde mittels der Software „ProteoVue“ das Peakmuster des 2D-UV-Chromatogramms herangezogen, markante Peaks ausgewählt und die entsprechenden Fraktionen gepoolt und im 2D-IFN- γ -ELISPOT-Assay getestet (Abbildung 16 C und D).

Auch hier lösten viele CAF-Fraktionen im Vergleich zur Negativkontrolle (PBMC-Lysat) eine signifikante T-Zellantwort aus (Abbildung 16 C und D). Bei genauerer Betrachtung der Daten

fiel auf, dass einige 1D-Fraktionen, die eine starke T-Zellantwort induzierten (bspw. F15) nach weiterer Subfraktionierung keine signifikanten Antworten mehr auslösen konnten (2D-Fraktion 15-1, 15-2). Umgekehrt wurde auch beobachtet, dass schwach immunogene 1D-Fraktionen (F18) in der 2D hochsignifikante T-Zellreaktivität auslösten (F18-1, F18-2).

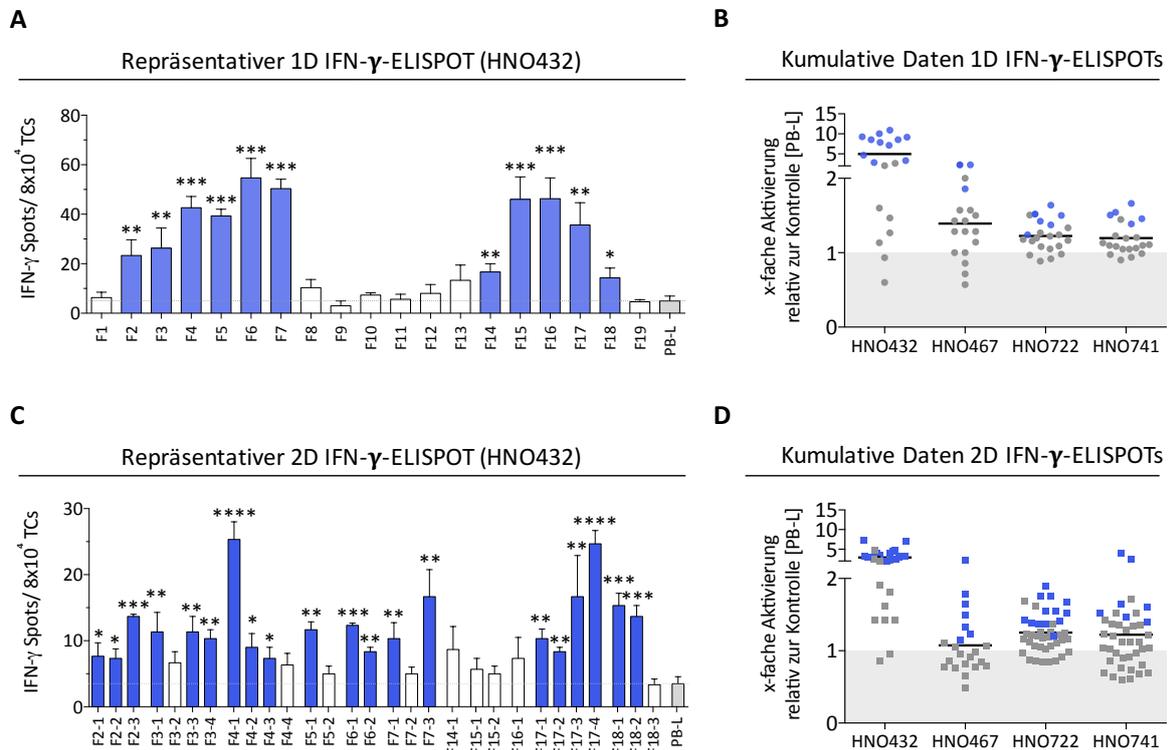


Abbildung 16: IFN- γ -ELISPOT Assays der 1. und 2. Dimensionsfraktionen.

A | und **C** | repräsentative Ergebnisse des IFN- γ -ELISPOT-Assays der 1D (**A**) und 2D (**C**) PF2D-Fraktionen von CAFs des Patienten HNO432. Die Fraktionen wurden mit DCs inkubiert, autologe T-Zellen (TCs) zugegeben und anschließend die Anzahl reaktiver TCs (IFN- γ -Spots/ 1×10^4 TCs) in Triplikaten detektiert. Balken entsprechen dem Mittelwert \pm SEM der Triplikate. Fraktionen, die im Vergleich zur Kontrolle, PBMC-Lysat (PB-L, grau) signifikante T-Zellantworten induzieren konnten, sind blau hinterlegt. * = $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. **B** | und **D** | kumulative Darstellung der T-Zellantworten gegen die 1D PF2D-Fraktionen (**B**) und der 2D-PF2D-Fraktionen von CAFs (**D**) der Patienten HNO432, HNO467, HNO722 und HNO741. Punkte/Quadrate repräsentieren Quotienten aus dem Mittelwert (Triplikate) der Anzahl reaktiver TCs (IFN- γ -Spots/ 1×10^4 TCs) gegen die PF2D-Fraktionen und dem PB-L. Signifikante und damit weiter für die 2D ausgewählte 1D-Fraktionen sind durch blaue Kreise markiert (**B**). Blaue Quadrate: Signifikante 2D-Fraktionen, die massenspektrometrisch untersucht wurden (**D**).

Vergleicht man die Daten der 1D- und 2D-ELISPOTs eines jeden Patienten miteinander, fiel zudem auf, dass sich die Mittelwerte nicht signifikant unterschieden (Anhang Abbildung 33 A-D). Die absolute Höhe der gemessenen TC-Aktivierungen relativ zur PBMC-Kontrolle also in der 1D und 2D vergleichbar war.

Im nächsten Schritt sollten nun die Proteine, die diese TC-Antworten auslösten, identifiziert werden. Hierfür wurden alle signifikanten 2D-Fraktionen (Abbildung 16 D, blau hervorgehobene Quadrate) massenspektrometrisch analysiert.

4.2.2 Massenspektrometrische Proteinidentifizierung der immunogenen 2D-Fractionen

Die Fraktionierung des CAF-Proteoms in Verbindung mit den IFN- γ -ELISPOT-Assays diente der Reduktion der komplexen Proteingemische und der gleichzeitigen Anreicherung von potenziellen CAF-Antigenen. Um nun herauszufinden, welche Proteine für die gemessenen T-Zellantworten verantwortlich waren, wurden die entsprechenden immunogenen Fraktionen massenspektrometrisch analysiert und eine Liste potenzieller CAF-Antigene erstellt. Dazu wurden die Fraktionen mittels Vakuumentrifuge komplett getrocknet und an die AG Schnölzer (*Core Facility* Genom und Proteom, DKFZ Heidelberg) gesendet. Dort wurden die Proben zuerst tryptisch verdaut, d.h. die enthaltenen Proteine in Peptidgemische fragmentiert. Diese Peptidfragmente wurden dann mittels *Peptide Mass Fingerprint* (PMF) identifiziert. Die *Core Facility* nutzt zur Messung die Flüssigkeitschromatographie-Elektrosprayionisierung Tandem Massenspektrometrie (LC-ESI-MS/MS). Ausgegeben wurden die Massenspektren (entsprechend den Aminosäuresequenzen) der einzelnen Peptide. Diese wurden dann mit einer speziellen Datenbank, die die Sequenzen aller theoretisch durch einen tryptischen Verdau möglichen Sequenzen enthält, abgeglichen. Die Software *Mascot* analysierte nun, wie oft eine Sequenz detektiert wurde (engl.: *Match*) und wie hoch die Wahrscheinlichkeit ist, dass diese Sequenz dem per Algorithmus zugeordneten Protein entspricht (Sequenzabdeckung, engl.: *Sequence Coverage*). Um die Wahrscheinlichkeit zu maximieren, dass ein betreffendes Protein auch wirklich detektiert wurde, wurden für die folgenden Analysen nur Proteine ausgewertet, deren Sequenz mindesten zweimal detektiert wurde ($Match \geq 2$) und eine Sequenzabdeckung von über 10 % ($Coverage > 10$) aufwiesen. Eine Übersicht der Ergebnisse ist in Tabelle 26 zusammengefasst.

Tabelle 26: Übersicht der massenspektrometrisch identifizierten Proteine.

Patient	Analysierte 2D-Fractionen	Identifizierte Proteine (100 %)	Anzahl der Duplikate (%)	Abzüglich in mehreren Fraktionen gefundene Proteine (%)
HNO432	20	472	58 (12,3 %)	414 (87,7 %)
HNO467	7	358	36 (10,1 %)	322 (89,9 %)
HNO722	13	939	102 (10,9 %)	837 (90,8 %)
HNO741	7	359	33 (9,2 %)	326 (89,2 %)
Summe	47	2128	229 (10,8 %)	1899 (98,2 %)

Insgesamt konnten aus den 47 signifikanten 2D-CAF-Fractionen 2.128 Proteine identifiziert werden. 10,8 % der Proteine wurden in mehreren der analysierten Fraktionen gleichzeitig

gefunden (Duplikate). Duplikate wurden jeweils eliminiert, sodass sich die Anzahl der Proteine von 2.128 auf 1.899 reduzierte. In dieser Zahl enthalten waren allerdings noch solche Proteine, die in mehreren Patienten gleichzeitig nachgewiesen werden konnten. Abschließend wurden auch diese Duplikate entfernt. Dies resultierte in insgesamt 852 verschiedenen Proteinen, die putativ für die detektierte T-Zellaktivierung verantwortlich sein konnten.

Um nun zu überprüfen, welche der 852 identifizierten Proteine für die T-Zellreaktivität verantwortlich waren, wurden immunogene T-Zellepitope für diese Proteine vorhergesagt, synthetische Peptide hergestellt und diese dann hinsichtlich ihrer Immunogenität verifiziert.

4.3 Auswahl potenzieller CAF-assoziiierter T-Zellantigene

Aufgrund der großen Menge potenzieller Kandidaten verbunden mit der limitierten Verfügbarkeit des Patientenblutes musste für die weiteren immunologischen Untersuchungen eine Auswahl getroffen werden. Da sich Krebs-assoziierte Fibroblasten nur marginal von ihren gesunden Antagonisten unterscheiden, stellte die Auswahl von CAF-assoziierten Antigenen, die nicht auch von normalen Fibroblasten präsentiert werden eine besondere Herausforderung dar. Speziell zur Umsetzung dieser Kriterien wurde ein Microarray-Datensatz erstellt. Der Datensatz enthielt die mRNA-Expressionsdaten von Geweben (mikrodissektiertes Tumorstroma (TSTR) und Normalstroma (NSTR)) sowie analog dazu verschiedenen isolierte Zelltypen (CAFs, TUCs, normale Fibroblasten).

4.3.1 Erstellung eines Microarray-Datensatzes zur Anreicherung CAF-assoziiierter Gene

4.3.1.1 „in situ“-Charakterisierung des Tumorstromas

Das Kollektiv bestand aus sieben tumorfernen dysplasiefreien Normalstromaprobe(n) (NSTR) sowie vier Tumorgewebe(n) von diagnostizierten Plattenepithelkarzinomen des Kopfhalsbereichs (HNSCC-Tumore) (Tabelle 17). Alle elf Proben wurden zuvor histopathologisch beurteilt. Zudem wurde bei der Auswahl der Tumore für die Dissektion darauf geachtet, dass diese ein aktiviertes Tumorstroma aufwiesen. Dies konnte bei allen vier Tumoren über die FAP-Expression verifiziert werden (Anhang Abbildung 34 A-D).

Zur Dissektion des Normalstromas wurde dysplasiefreies, mehrschichtiges unverhorntes Plattenepithel mit angrenzender Lamina propria verwendet. Die Lamina propria bezeichnet die dünne Bindegewebsschicht, die sich direkt unterhalb eines Epithels befindet. Sie besteht neben Drüsen, Nerven, Blut- und Lymphgefäßen hauptsächlich aus Fibrozyten, die ruhende inaktive Form der Fibroblasten (Pschyrembel, 2014). Damit stellt die Lamina propria das

bestmögliche Vergleichsgewebe zu hauptsächlich aus aktivierten Fibroblasten bestehendem Tumorstroma dar.

Die *Laser Capture Microdissection* (LCM) ermöglichte es dabei, definierte Regionen (Tumor- und Tumorstromaareale sowie die Lamina propria) hochpräzise auszuschneiden (siehe auch Methoden Punkt 3.3). Anschließend wurde die mRNA aus den gesammelten Gewebefragmenten isoliert und mittels Microarray differentiell exprimierte Gene zwischen Tumorstroma und Normalstroma untersucht. Da die Tumorstromaareale verglichen mit den Tumorearealen sehr viel weniger Zellen pro Fläche und damit auch weniger RNA enthielten, mussten erheblich größere Tumorstroma- als Tumoreareale dissektiert werden. Die RNA-Ausbeuten der Lamina propria waren teilweise sogar so gering, dass einige Proben für die Microarray-Analysen gepoolt werden mussten. Das Ausweichen auf eine andere Arrayplattform, die mit deutlich geringeren RNA-Mengen ausgekommen wäre, war nicht möglich, da die Tumor- und Tumorstromaareale bereits auf der *Illumina Whole-Genome Expression Bead Chips® Sentrix Array*-Plattform durchgeführt worden waren und es so zu möglichen *Batch*-Effekten hätte kommen können. Um das zu umgehen, wurde die isolierte mRNA von NSH5 und NSH21 sowie die RNA der Proben NSH1, NSH13 und NSH9 gepoolt.

Die normalisierten und \log_2 -transformierten Rohdaten wurden unter Betrachtung der Expression aller Gene in einem *t-distributed Stochastic Neighbor Embedding* (t-SNE)-Diagramm visualisiert (Abbildung 17). Diese statistische Methode ermöglicht es, multidimensionale Datensätze zu visualisieren, indem „x“ Dimensionen (hier die mRNA-Expression von $x = 31.323$ Genen) auf einen zweidimensionalen Raum (t-SNE1 und t-SNE2) reduziert werden, wobei letztlich die Proben mit ähnlichen Expressionsprofilen näher beieinanderliegen. Dabei fiel zunächst auf, dass die dissektierten Tumorproben eine Gruppe bildeten und die dissektierten Stromaproben (Normalstroma (NSTR) sowie Tumorstroma (TSTR)) eine zweite (Abbildung 17). Die Expressionsprofile der Tumorstroma- und Normalstromaproben schienen sich, verglichen mit den Tumorproben, deutlich weniger voneinander zu unterscheiden; sie sind „*Stochastic Neighbors*“, was möglicherweise auf den gleichen mesenchymalen Ursprungszelltyp zurückzuführen ist. Eine vergleichende mRNA-Expressionsanalyse von Tumor und Tumorstroma mittels gepaartem studentischem t-Test ergab statistisch signifikante Unterschiede in 4.896 Genen (15,6 %). Eine Tumorstroma-assoziierte Überexpression wurde in 2.212 (7,06 %) Genen detektiert. Viele der in diesen Untersuchungen identifizierten Gene konnten bereits in LCM-basierten Stromaanalysen anderer Tumorentitäten, wie Brustkarzi-

nomen (Winslow, 2015) oder dem nichtkleinzelligen Lungenkarzinom (*Non-small Cell Lung Cancer*, NSCLC) (Edlund *et al.*, 2012) als Tumorstroma-assoziiert identifiziert werden. Sie kodieren für Matrixproteine wie Kollagene (*COL1A1*, *COL5A1*), Laminin (*LAMA4*), Fibronektin (*FBN1*) und Matrixmetalloproteinasen (*MMP2*, *MMP23*). Zudem waren im Tumorstroma Gene angereichert, die mit einem inflammatorischen Mikromilieu assoziiert sind, wie das Chemokin CXCL12 und Granzym A (*GZMA*). Auf der anderen Seite kodierten die in den dissezierten Tumorarealen angereicherten Gene Proteine, die das molekulare Profil von Tumoren epithelialen Ursprungs repräsentieren. Hierunter befanden sich epithelzelltypische Gene, wie diverse Zytokeratine (*KRT14*, *KRT5*), Desmoglein 1 (*DSG1*), Claudin 12 (*CLDN12*) und der Plattenepithelkarzinom-Marker EPCAM. Die gefundenen Gensignaturen für Tumor und Tumorstroma stimmten mit bereits für andere Tumorentitäten publizierten Daten überein, was bestätigt, dass die LCM-Methodik technisch funktioniert, um zelltypspezifisch exprimierte Gene anzureichern.

Für die Identifizierung von Tumorstroma-assoziierten Genen war jedoch ein weiterer Vergleich erforderlich: die differentiell zwischen Tumorstroma und Normalstroma exprimierten Gene. Dazu wurde der Datensatz um die Analyse von dysplasiefreier Normalschleimhaut (Normalstroma, Lamina propria) ergänzt. Die vergleichenden Analysen der Normalstroma- und Tumorstromaprobe mittels ungepaartem studentischem t-Test ergaben statistisch signifikante Unterschiede in 2.298 Genen (7,3 %), wobei 1.356 Gene (4,3 %) eine stärkere Expression im Tumorstroma aufwiesen. Diese Gene kodieren Matrixproteine, wie Typ VIII und Typ X Kollagene (*COL8A1*, *COL10A1* und *COL10A2*). Die Expression von Typ VIII Kollagenen in Mastzellen ist mit „*Tissue Remodeling*“ und Fibrose assoziiert (Rüger *et al.*, 1994). In Tumoren wird Fibrose als Desmoplasie bezeichnet, also der Akkumulation von aktivierten Fibroblasten (CAFs) einhergehend mit einer erhöhten Expression von ECM-Proteinen, wie Kollagenen und Matrixmetalloproteinasen (*MMP3* und *MMP11*) (Kalluri & Zeisberg, 2006; Hansen *et al.*, 2016), die ebenfalls in den Tumorstromaprobe angereichert waren. Dies legt nahe, dass es sich bei den dissezierten Tumorstromaarealen um, im Vergleich zu Normalstroma, aktiviertes Tumorstroma handelt. Weiter befanden sich unter den Tumorstroma-assoziierten Genen, solche, die mit Entzündungs- und Wundheilungsprozessen assoziiert sind und auf ein inflammatorisches Mikromilieu schließen lassen, wie die IFN- γ -induzierten Chemokine CXCL9 und CXCL10. Diese werden unter anderem von Fibroblasten, Endothelzellen und Monocyten sekretiert und wirken als Lockstoff für T-Zellen und andere Immunzellen

(Luster & Ravetch, 1987; Liu *et al.*, 2011). Daneben wurden auch Gene identifiziert, die auf eine erhöhte Immunzellinfiltration und -aktivität schließen lassen, wie beispielsweise die Immuncheckpoint-Proteine CTLA-4 und CD278 (*ICOS*), die essenziell für die Aktivierung und die Funktion von T-Zellen sind (Dong *et al.*, 2001; Rudd & Schneider, 2003).

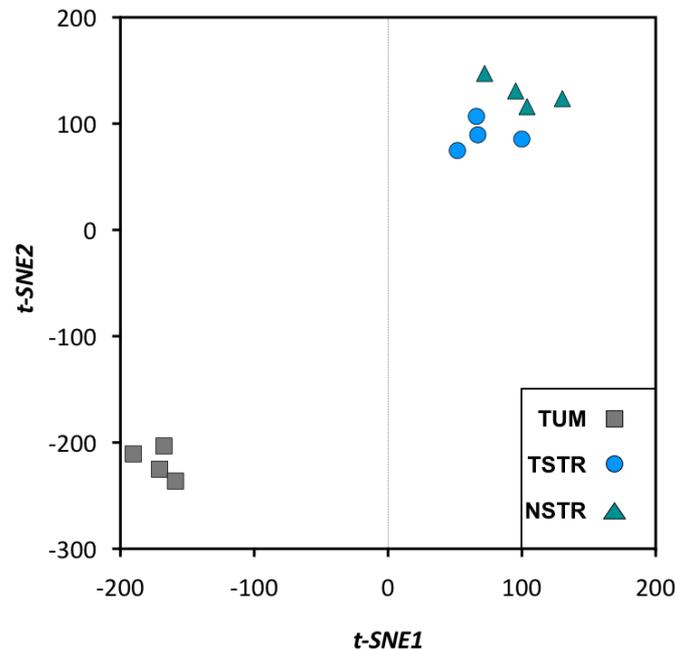


Abbildung 17: mRNA-Expressionsanalysen der mikrodissektierten Normalstromagewebe-, Tumorstroma- und Tumorgewebe. Normalisierte und \log_2 -transformierte mRNA-Rohexpressionsdaten der Microarray-Analysen der dissektierten Normalstromaareale aus der Lamina propria (NSTR, grüne Dreiecke) und der aus Plattenepithelkarzinomen isolierten Tumorstromaareale (TSTR, blaue Kreise) sowie Tumorareale (graue Quadrate) visualisiert mittels *t-distributed Stochastic Neighbor Embedding* (t-SNE)-Diagramm. Hierbei bilden Proben, die ein ähnliches mRNA-Expressionsprofil aufweisen, Gruppen.

Zusammenfassend haben die mRNA-Expressionsanalysen der diskettierten Tumorgewebe gezeigt, dass die analysierten Areale ein für Tumorzellen bzw. Tumorstromazellen charakteristisches Expressionsprofil aufweisen. Weiter spiegeln die im Tumorstroma, verglichen mit dem Normalstroma, stärker exprimierte Gene einen aktivierten, pro-inflammatorischen Phänotyp wider und lassen vermuten, dass dieser mit der Expression Tumorstroma-spezifischer Antigene einhergeht.

4.3.1.2 „in vitro“-Charakterisierung der isolierten CAFs und TUCs

Da wir uns bei der Identifizierung von Tumorstroma-assoziierten T-Zellantigenen auf die Hauptzellpopulation des Tumorstromas, die CAFs, fokussiert haben, wurde der *in situ*-Datensatz durch einen *in vitro*-Datensatz komplettiert, indem die Expressionsprofile von isolierten normalen Fibroblasten (NFs) mit denen der Krebs-assoziierten Fibroblasten auf Zellebene verglichen wurden. Dies diente der spezifischen Anreicherung von CAF-assoziierten

Genen verbunden mit der Verringerung, der durch die in den Geweben enthaltenen Immunzellen verursachten Expressionsunterschiede.

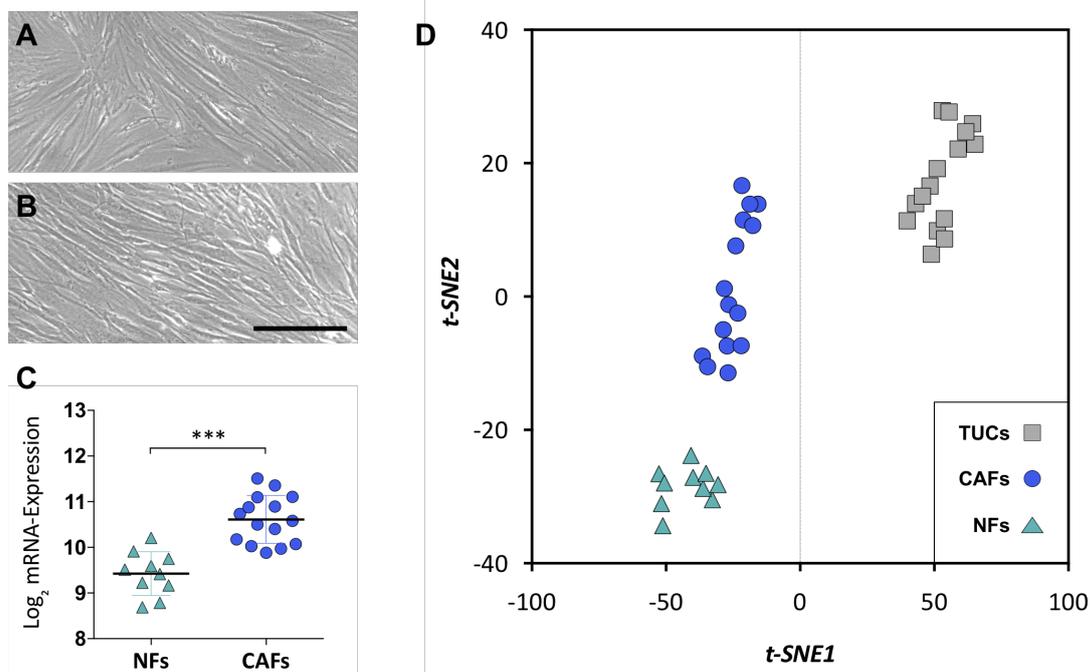


Abbildung 18: Charakterisierung der NFs, CAFs und korrespondierenden TUCs.

A| Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen der Gingivafibroblasten (NFs) und **B|** der Krebs-assoziierten Fibroblasten (CAFs). **C|** Scatter Plots (Median mit Standardabweichung) des \log_2 -transformierten mRNA-Expressionsniveaus des *Fibroblast Activation Protein* (FAP) in NFs und CAFs, *** = $p < 0,001$. **C|** Normalisierte und \log_2 -transformierte mRNA-Rohexpressionsdaten der Microarray-Analysen der isolierten normalen Gingivafibroblasten (NFs, grüne Dreiecke) der Krebs-assoziierten Fibroblasten (CAFs, blaue Kreise) und korrespondierenden Tumorzellen (TUCs, graue Quadrate) dargestellt in einem *t-distributed Stochastic Neighbor Embedding* (t-SNE)-Diagramm. Messbalken = 100 μm .

Dazu wurde der bereits erhobene Microarray-Datensatz der 15 CAFs und korrespondierenden 15 TUCs (Abbildung 11) um die mRNA-Expressionsdaten isolierter Gingivafibroblasten (NFs) von 10 gesunden Spendern erweitert. Diese wurden freundlicherweise von Prof. Tomakidi (Orale Biotechnologie, Universitätsklinikum Freiburg) zur Verfügung gestellt. Die mRNA-Expressionsdaten der NFs wurden zusammen mit denen der CAFs und TUCs normalisiert und unter Betrachtung der Expression aller Gene ebenfalls in einem t-SNE-Diagramm visualisiert.

Morphologisch ließen sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen den CAFs und ihren normalen Gegenspielern erkennen (Abbildung 18 A und B), jedoch unterschieden sie sich beispielsweise signifikant in der Expression von FAP und damit in ihrem Aktivierungsstatus (Abbildung 18 C). Analog zu den Expressionsanalysen der Gewebe erfolgte auch hier die Auftrennung in drei Gruppen, wobei NFs und CAFs, verglichen mit den Tumorzellen, ein ähnli-

cheres Expressionsprofil aufwiesen aber dennoch in zwei distinkte Gruppen auftrennten (Abbildung 18 D).

Zwischen CAFs und NFs waren 8.057 Gene differentiell exprimiert, davon waren 4.291 Gene in CAFs höher exprimiert, wohingegen zwischen TUCs und CAFs 10.159 Gene eine statistisch signifikante differentielle Expression zeigten. Dies ist insofern nicht verwunderlich, da Tumorzellen epithelialen Ursprungs sind, während NFs und CAFs beides Zellen mesenchymalen Ursprungs sind und sich lediglich durch ihren Aktivierungsstatus unterscheiden sollten (Kalluri, 2016). Die von CAFs (verglichen mit NFs, $p < 0,05$; $\log_2 FC > 0$) überexprimierten Gene sind vor allem immunstimulatorische Chemokine, Zytokine und deren Rezeptoren, Matrixmetalloproteinasen sowie der Aktivierungsmarker FAP. Diese Gene spiegeln den aktivierten Phänotyp wider und gehen vermutlich mit der Expression potenzieller T-Zellantigene einher.

4.3.2 Intersektionsbasierter Filterprozess zur Auswahl CAF-assoziiertes T-Zellantigens

Um potenzielle CAF-assoziierte Antigene für weiterführende immunologische Analysen auszuwählen, wurden basierend auf den *in situ* und *in vitro* erhobenen mRNA-Expressionsdaten Intersektionsstudien durchgeführt (Abbildung 19). Dazu wurden nicht alle Gene in die Studien einbezogen, sondern nur die Expressionsdaten der 854 Gene, deren Proteine zuvor über die PF2D-ELISPOT-Methode als potenziell immunogen identifiziert werden konnten.

Diesen 854 Proteinen wurde mittels des *Gen ID Conversion Tools* der Datenbank *DAVID Bioinformatic Resources* (Huang *et al.*, 2009) das entsprechende Gensymbol (*Official Gene Symbol*) zugewiesen.

Für die Intersektion wurden drei Gruppen (I. - III.) definiert. Gruppe I (gelb) enthielt Gene, die gleichzeitig Tumorstroma- und CAF-assoziiert exprimiert werden ($p > 0,05$; kein FC). Damit konnten rein Gewebe-assoziierte Gene und solche, deren Expression durch die Kultivierung induziert wurde, ausgeschlossen werden. Insgesamt beinhaltete Gruppe I damit 375 Gene. Gruppe II (blau) beinhaltete Gene, die höher im Tumorstroma exprimiert wurden als im Normalstroma ($p \leq 0,1$; $\log_2 FC > 0,5$) und demnach Tumorstroma-assoziierte Gene. Dies waren insgesamt 36 von 854 Genen. In Gruppe III (grün) waren solche Gene angereichert, die auf zellulärer Ebene eine höhere Expression in den CAFs verglichen mit den normalen Gingivafibroblasten aufwiesen ($p \leq 0,1$; $\log_2 FC > 0,5$). Dies waren insgesamt 32 Gene.

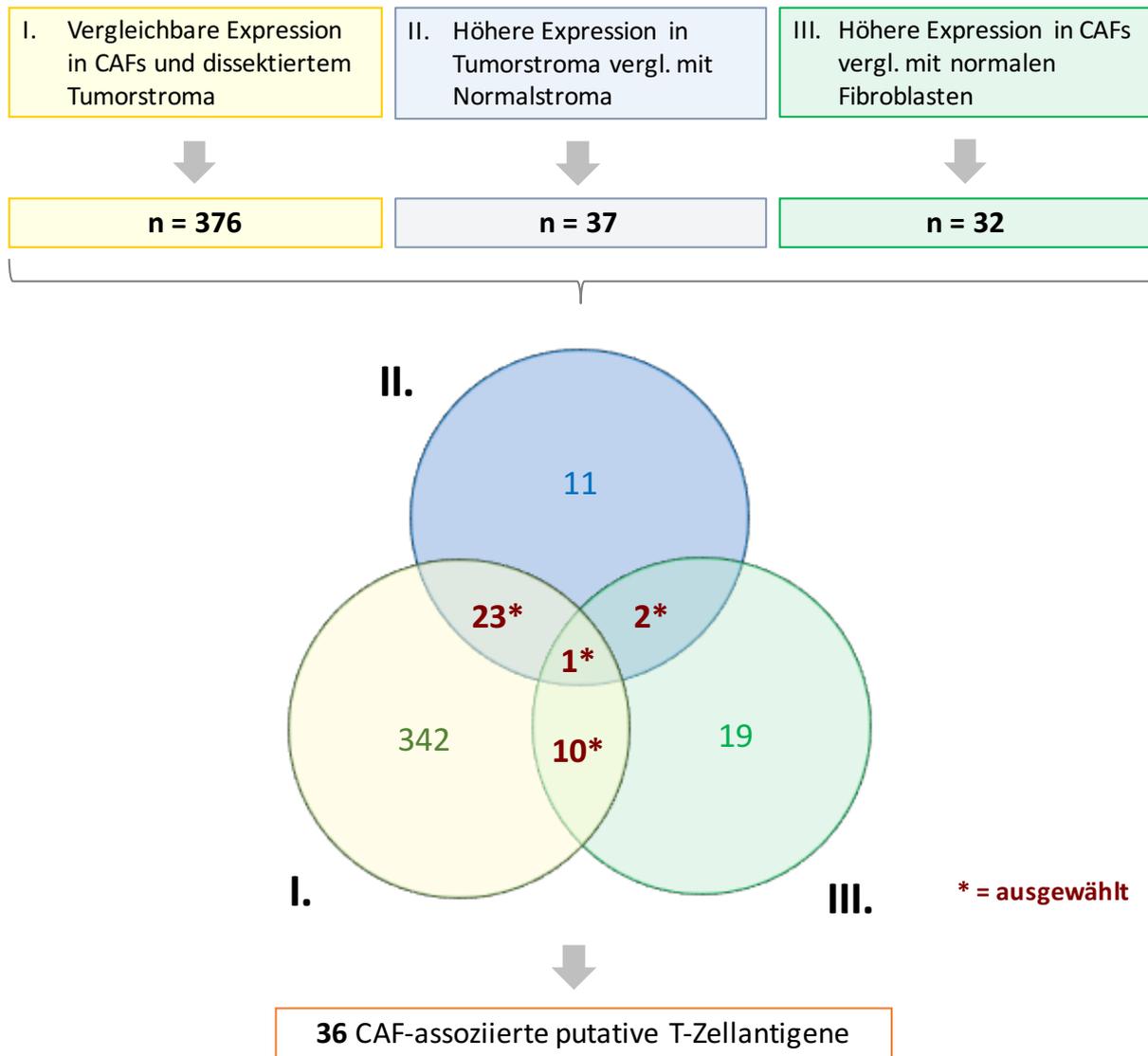


Abbildung 19: Intersektionsstudien zur Auswahl von CAF-assoziierten Antigenen für weiterführende immunologische Analysen.

Basierend auf den LCM-Expressionsdaten wurden drei Gruppen gebildet (I. – III.), aber nur die Gene betrachtet, die mittels Massenspektrometrie in den immunogenen Fraktionen nachgewiesen worden waren. Gruppe I (gelb) enthielt Gene, die eine vergleichbare Expression in CAFs und Tumorstroma aufwiesen (n = 376 Gene), Gruppe II (blau) enthielt Gene, die höher im Tumorstroma als im Normalstroma exprimiert waren (n = 36) und Gruppe III (grün) enthielt Gene, die höher in CAFs als in normalen Gingivafibroblasten exprimiert wurden (n = 32). Von diesen Genen ausgehend wurden dann Schnittmengen gebildet, was zur Auswahl von insgesamt 36 putativen CAF-assoziierten T-Zellantigenen führte.

Aus diesen drei Gruppen wurden nun die Schnittmengen (Intersektionen) gebildet. Die absolute Schnittmenge ergab dabei nur ein einziges Gen; das *Fibroblast Activation Protein* (FAP). FAP erfüllt damit alle vorgegebenen Kriterien und wurde ausgewählt. Interessanterweise ist FAP *der* Marker für aktivierte Fibroblasten und bestätigt damit die Qualität unserer Analyse. Um die Anzahl der potenziellen Antigene zu erhöhen, wurden zudem Teilmengen ausgewählt. Also solche Gene, die als Schnittmenge von mindestens zwei Gruppen auftauchten

und damit zwei der definierten Kriterien erfüllten. Die Schnittmenge zwischen Gruppe I und II ergab 23 (+ FAP), zwischen I und III ergab 10 (+ FAP) und zwischen II und III ergab 2 (+ FAP). Damit wurde die Anzahl der putativen CAF-assoziierten T-Zellantigene von 854 auf 36 reduziert.

Eine Übersicht der massenspektrometrisch identifizierten und per Filterprozess ausgewählten Gene bzw. Proteine, den dazugehörigen Proteinnamen sowie die Größe der Proteine ist in Tabelle 27 aufgelistet. Durch diesen intersektionsbasierten Filterprozess konnten sogenannte Haushaltsgene ausgeschlossen und die Anzahl rein Fibroblasten-spezifisch exprimierter Gene minimiert werden, was die Anreicherung von CAF-spezifischen Genen zur Folge hatte.

Tabelle 27: Übersicht der CAF-assoziierten Kandidatenproteine

Gen-Symbol	Proteinname	UniProt	Größe [kDa]	Länge [AS]
CAP1	Adenylate Cyclase-Associated Protein 1	Q01518	51,9	474
CFL1	Cofilin 1	P23528	18,0	165
CMPK1	Cytidine Monophosphate (UMP-CMP) Kinase 1	P30085	22,2	196
COL5A2	Collagen, Type V, Alpha 2	P05997	144,9	1499
COX5A	Cytochrome C Oxidase Subunit Va	P20674	16,8	150
DNAJB11	DnaJ (Hsp40) Homolog, Subfamily B, Member 11	Q9UBS4	40,5	358
FABP5	Fatty Acid Binding Protein 5	Q01469	15,2	135
FAP	Fibroblast Activation Protein, Alpha	Q12884	87,7	760
GGH	Gamma-Glutamyl Hydrolase	Q92820	36,0	318
GLRX	Glutaredoxin (Thioltransferase)	P35754	11,8	106
GLT25D1	Collagen Beta(1-O)Galactosyltransferase 1	Q6IPW8	71,6	585
GSTO1	Glutathione S-Transferase Omega 1	P78417	27,6	241
H2AFZ	H2A Histone Family, Member Z	POC0S5	13,6	128
HIST2H2AC	Histone Cluster 2, H2ac	Q16777	14,0	128
HPRT1	Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1	P00492	24,6	218
HSP90AA1	Heat Shock Protein 90kDa Alpha, Class A Member 1	P07900	84,7	732
HSP90B1	Heat Shock Protein 90kDa Beta (Grp94), Member 1	P14625	92,5	803
KHSRP	KH-Type Splicing Regulatory Protein	Q92945	73,1	711
MTPN	Myotrophin	P58546	12,9	118
NANS	N-Acetylneuraminic Acid Synthase	Q9NR45	40,3	359
NPTN	Stromal Cell Derived Factor Receptor 1 (SDFR1)	Q9Y639	44,4	398
PAFAH1B3	Platelet-Activating Factor Acetylhydrolase 1b, Subunit 3	Q15102	25,7	231
PALLD	Palladin, Cytoskeletal Associated Protein	Q8WX93	150,6	1383
PFN1	Profilin 1	P07737	15,1	140
PRDX4	Peroxiredoxin 4	Q13162	30,5	271
RCN3	Reticulocalbin 3, EF-Hand Calcium Binding Domain	Q96D15	37,5	328
RTCB	RNA 2',3'-Cyclic Phosphate And 5'-OH Ligase	Q9Y3I0	55,2	505
SET	SET Nuclear Proto-Oncogene	Q01105	33,5	290

Gen-Symbol	Proteinname	UniProt	Größe [kDa]	Länge [AS]
SH3BGRL	SH3 Domain Binding Glutamate-Rich Protein Like	O75368	12,8	114
SLC4A7	Solute Carrier Family 4, Sodium Bicarbonate Cotransporter, Member 7	Q9Y6M7	136,0	1214
SLK	CTCL Tumor Antigen Se20-9	Q9H2G2	142,7	1235
TACSTD2	Tumor-Associated Calcium Signal Transducer 2	P09758	35,7	323
THBS2	Thrombospondin 2	P35442	130,0	1172
TPM4	Tropomyosin 4	P67936	28,5	284
TXNDC17	Thioredoxin Domain Containing 17	Q9BRA2	13,9	123
UBAP2L	Ubiquitin Associated Protein 2-Like	Q14157	114,5	1087

AS = Aminosäuren, kDa = Kilodalton

4.4 Peptidsynthese und Immunogenitätsanalyse ausgewählter CAF-Antigene in den Ursprungspatienten

4.4.1 Prädiktion HLA-restringierter Peptide

Im nächsten Schritt sollte überprüft werden, ob die 36 ausgewählten CAF-Antigene T-Zellantworten induzieren können. Dazu wurden etwa 50 Aminosäuren (AS) lange Abschnitte der gesamten AS-Sequenz als synthetisches Peptid hergestellt. Diese AS-Abschnitte wurden zuvor mittels spezieller datenbankgestützter Vorhersagealgorithmen (*T Cell Epitope Prediction Tool* der Datenbank *Immune Epitope Database and Analysis Resource*, IEDB) ausgewählt. Hierfür wurde die MHC-Bindungsaffinität des Peptids an den MHC-Rezeptor vorhergesagt. Anschließend wurden – basierend auf der AS-Sequenz des Proteins – die Bereiche ausgewählt, die mit der höchsten Wahrscheinlichkeit über MHC-I-Moleküle präsentiert werden und die stärkste Bindungsaffinität aufwiesen.

Praktisch schiebt die Software ein Fenster von neun AS über die gesamte Sequenz, unterteilt diese so in aufeinanderfolgende Nonamere (AS-Position 1-9, 2-10, 3-11, ...) und weist dann jedem Nonamer einen MHC-IC₅₀-Wert zu. Dieser Wert wird basierend auf in der Datenbank hinterlegten, bekannten HLA-bindenden Peptiden berechnet und bezieht die zuvor ausgewählten HLA-Typen mit ein (hier die fünf häufigsten HLA-Typen in der deutschen Bevölkerung, Tabelle 25). Dabei gilt: je geringer der MHC-IC₅₀-Wert, desto höher die Bindungsaffinität. Die Software gibt nun für jeden der fünf HLA-Typen eine Liste mit allen Nonameren und den dazugehörigen MHC-IC₅₀-Werten aus. Basierend auf dieser Liste sollte nun der AS-Bereich (50mer) eines Proteins identifiziert werden, der die höchste Bindungsaffinität (MHC-IC₅₀-Wert) aufweist und gleichzeitig die meisten HLA-Typen (Anzahl der Peptide) abdeckt. Zuerst wurde ein Schwellenwert für den MHC-IC₅₀-Wert von < 1000 festgelegt.

Dann wurde ein Fenster von 50 AS über die Sequenz geschoben und der Mittelwert der zugeordneten MHC-IC₅₀-Werte, die unter dem Schwellenwert (< 1000) lagen, bestimmt. Anschließend wurde jedem Mittelwert ein „Rang“ zugeordnet. Dieser wurde berechnet, indem der Mittelwert über je 50 AS in Relation zum Mittelwert aller Mittelwerte gesetzt wurde. Je geringer der MHC IC₅₀-Wert, desto geringer fiel der Rang aus (0,1 bis 1,0). Zudem wurde eine zweite Größe miteinbezogen: die Anzahl der Nonamere innerhalb des 50mers mit einem MHC-IC₅₀-Wert < 1000. Auch hier wurde ein Rang vergeben. Je größer die Anzahl, desto geringer der Rang (0,1 bis 1,0). Diese beiden Ränge wurden addiert (kombinierter Rang) und der AS-Abschnitt ausgewählt, der die geringsten Werte aufwies (Abbildung 20).

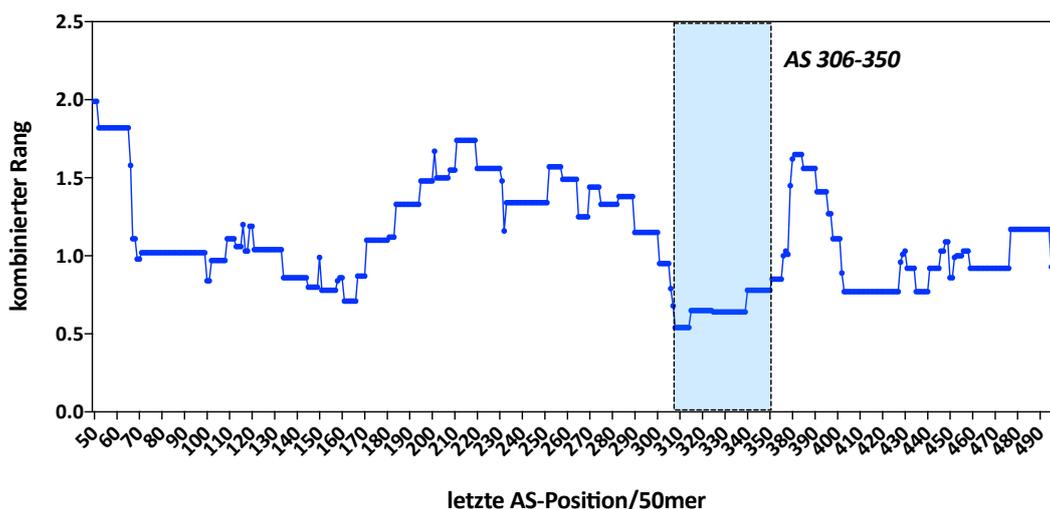


Abbildung 20: Schematische Darstellung zur Identifizierung immunogener T-Zellepitope für NANS.

Die blauen Punkte stellen jeweils den kombinierten Rang des vorangegangenen 50mers dar. Ausgewählt wurde der Sequenzabschnitt, der die geringsten Werte des kombinierten Rangs aufweist (AS-Position 306-350, blauer Kasten). AS = Aminosäure.

Für die Kandidaten COL5A2, FAP, GSTO1, HSP90B1, PALLD und PAFAH1B3 wurde jeweils mehr als ein Peptid konstruiert, da diese Proteine aufgrund ihrer Größe mehrere immunogene Regionen aufwiesen (geringer kombinierter Rang). Insgesamt wurden daher basierend auf dieser Methode von 36 CAF-TAs 44 Peptide prädiziert (Tabelle 15). Die AS-Sequenzen wurden mittels Festphasensynthese nach Merrifield durch die *Core Facility* Genom und Proteom (DKFZ Heidelberg) hergestellt.

4.4.2 Immunogenitätsanalyse ausgewählter Peptide in den Ursprungspatienten

Ob diese konstruierten Peptide T-Zellantworten auslösen können, wurde zunächst in den vier Ursprungspatienten untersucht, in deren immunogenen 2D-PF2D CAF-Fractionen sie ini-

tial identifiziert worden waren. Dazu wurden DCs mit den zuvor synthetisierten Peptiden beladen und anschließend die autologen TCs hinzugegeben. Die reaktiven IFN- γ -sekretierenden TCs wurden detektiert und die Höhe der TC-Antworten mit der auf das IgG verglichen.

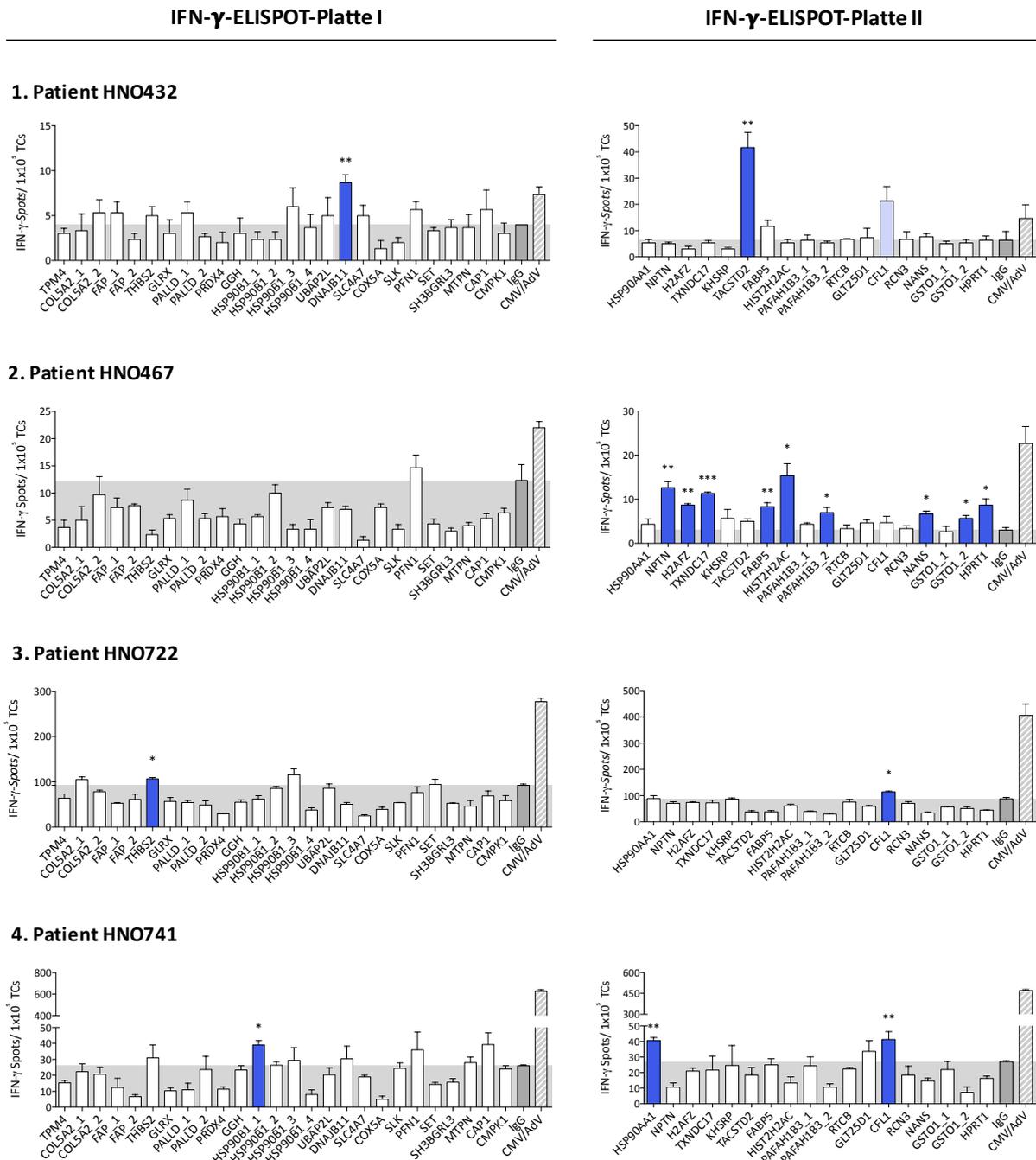


Abbildung 21: Immunogenitätsanalyse ausgewählter CAF-assoziiierter Peptide im IFN- γ -ELISPOT-Assay.

T-Zellantworten gegen die 44 CAF-assoziierten Peptide in den Ursprungspatienten HNO432, HNO467, HNO722 und HNO741. Auf der linken Seite ist jeweils Platte I dargestellt und auf der rechten Seite Platte II. Die Peptide wurden mit DCs inkubiert, auf zwei ELISPOT-Platten verteilt, anschließend autologe T-Zellen (TCs) zugegeben und die Anzahl reaktiver TCs (IFN- γ -Spots/ 1×10^5 TCs) in Triplikaten detektiert. Balken entsprechen dem Mittelwert \pm SEM. Peptide, die im Vergleich zum IgG-Kontrollpeptid (grau) signifikante T-Zellantworten (* = $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) induzieren konnten, sind blau hinterlegt.

Aufgrund der großen Anzahl an ausgewählten Kandidaten ($n = 44$) reichten die isolierten PBMCs (TCs und DCs) aus dem Patientenblut einer Abnahme nicht aus. Um die Peptide aber dennoch in einem Experiment und mit dem gleichen T-Zellpool untersuchen zu können, wurden die isolierten PBMCs von mehreren Blutabnahmezeitpunkten vereinigt und zusammen verwendet. Dies sollte gewährleisten, dass die T-Zellantworten eines Patienten auf den beiden ELISPOT-Platten (Abbildung 21, Platte I und Platte II) vergleichbar waren.

Die absolute Höhe der T-Zellantworten variierte allerdings stark zwischen den vier Patienten. Während sich die IFN- γ -Spotzahlen bei HNO432, HNO467 und HNO741 zwischen 10 und 20-30 bewegten, waren sie bei HNO722 deutlich höher (> 100). Patient HNO432 (Abbildung 21) zeigte gegen zwei der Peptide (TACSTD2 und DNAJB11) sehr starke T-Zellantworten. Gegen TACSTD2 ist diese sogar deutlich höher als die gegen die Positivkontrolle CMV/AdV.

Auch das Peptid Cofilin 1 (CFL1) löste eine deutliche T-Zellantwort aus, die aber aufgrund der Varianz der Triplikate nicht signifikant war (Abbildung 21, HNO432, Platte II). Bei Patient HNO467 konnten signifikante T-Zellantworten gegen neun von 15 Peptiden detektiert werden (Abbildung 21, Patient HNO467, Platte II). Interessanterweise konnte bei diesem Patienten auch initial bei der Untersuchung des gesamten CAF-Lysats die meisten reaktiven T-Zellen detektiert werden (vgl. Abbildung 15 D). HNO722 und HNO741 hingegen zeigten initial geringere Antworten auf die getesteten autologen CAF-Lysate (vgl. Abbildung 15 D). Damit einhergehend konnten jeweils nur zwei Peptide signifikante T-Zellimmunantworten induzieren, wobei CFL1 in beiden Patienten zur Aktivierung der T-Zellen führte (Abbildung 21, Patienten HNO722 und HNO741, Platte II).

Insgesamt konnten 15 der 44 Kandidatenpeptide in mindestens einem der vier HNSCC-Patienten signifikante T-Zellimmunantworten auslösen und wurden damit weiterverfolgt. Gegen die restlichen 29 Peptide konnten keine reaktiven antigenspezifischen T-Zellen nachgewiesen werden. Diese wurden von den weiteren Analysen ausgeschlossen.

4.5 T-Zellimmunantworten immunogener CAF-assoziiertes Antigene in gesunden Individuen und weiteren HNSCC-Tumorpatienten

4.5.1 Untersuchung von T-Zellantworten gegen CAF-Antigene in gesunden Individuen

Für die Nutzung der identifizierten CAF-assoziierten T-Zellepitope im Rahmen immuntherapeutischer Anwendungen ist es essenziell abzuklären, ob diese Peptide ausschließlich Tumor- bzw. Tumorstroma-spezifische TCs stimulieren oder *per se* immunogen sind. Falls die

ausgewählten Peptide T-Zellreaktionen in gesunden Spendern induzieren sollten, sind diese als Impfantigen ungeeignet, da deren Applikation zu starken Nebenwirkungen und Autoimmunreaktionen führen könnten. Um dies abzuklären, wurden spezifische TC-Immunantworten von neun tumorfreien gesunden Spendern untersucht.

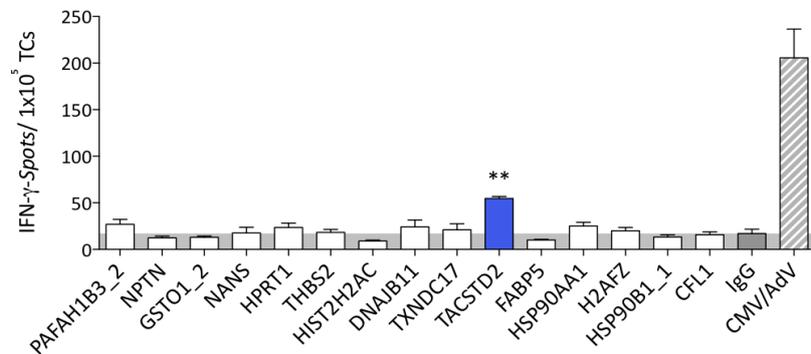


Abbildung 22: Exemplarischer ELISPOT-Assay von HD1.

TC-Antworten von HD1 gegen 15 Peptide. Peptide wurden mit autologen DCs und TCs inkubiert und die Anzahl reaktiver TCs (IFN- γ -Spots/ 1×10^5 TCs) in Triplikaten detektiert. Balken entsprechen dem Mittelwert \pm SEM. Peptide, die verglichen mit dem IgG-Kontrollpeptid (grau) signifikante T-Zellantworten (** = $p < 0,01$) induzieren konnten, sind blau hinterlegt. HD = *Healthy Donor* (gesunder Spender).

Das Kollektiv wurde hinsichtlich Alter und Geschlechterverteilung entsprechend denjenigen der HNSCC-Tumorpatienten zusammengestellt. Der Altersdurchschnitt lag bei 60 Jahren ($\pm 3,6$) und das Verhältnis von Frauen zu Männern bei 1:2 (Tabelle 19). Die PBMCs wurden aus dem Blut von gesunden Spendern isoliert und mittels IFN- γ -ELISPOT-Assay die Anzahl der reaktiven TCs sowie die Frequenz der Antworten untersucht. Nach *ex vivo*-Stimulation von DCs mit den 15 CAF-Peptiden erfolgte die Zugabe der autologen TCs und die Bestimmung der antigenspezifischen TCs über die IFN- γ -Sekretion. Das Ergebnis eines IFN- γ -ELISPOT-Assays ist stellvertretend für den gesunden Spender HD1 in Abbildung 22 dargestellt. Da die gemessenen absoluten *Spot*zahlen zwischen den Individuen sehr unterschiedlich waren, war der direkte Vergleich der IFN- γ -ELISPOT-Assays nicht möglich. Zur Visualisierung der Ergebnisse wurden die Daten daher kumulativ dargestellt (Abbildung 23 A). Dazu wurde für jeden Donor der Quotient aus IFN- γ -*Spot*zahl des Peptids und *Spot*zahl des IgG-Kontrollpeptids errechnet (Einzelpunkte). War dieser Wert $\geq 1,5$ und im Vergleich zum IgG signifikant (studentischer t-Test, $p < 0,05$), wurde die Reaktion als T-Zellantwort gewertet. Zusammengefasst lösten zehn von 15 Peptiden (PAFAH1B3_2, NPTN, GSTO1_2, NANS, HPRT1, THSB2, HIST2H2AC und DNAJB11) in keinem (0 %) der gesunden Spender signifikante und zugleich 1,5-fach erhöhte T-Zellantworten aus und TXNDC17 nur in einem von neun ge-

sunden Spendern (vgl. Abbildung 22). Die in den Ursprungspatienten detektierten spezifischen TCs gegen diese zehn Peptide scheinen also Tumorstroma-spezifisch zu sein. Um dies weiter zu erhärten, wurden diese zehn Peptide im Folgenden in einer Kohorte bestehend aus 19 zusätzlichen HNSCC-Tumorpatienten weiter untersucht. Fünf der 15 Peptide (FABP5, HSP90AA1, H2AFZ, HSP90B1_1, CFL1) wurden ausgeschlossen, da diese signifikante und bis zu dreifach erhöhte T-Zellantworten in bis zu 30 % der gesunden Spender auslösten und damit davon ausgegangen werden kann, dass diese *in vitro* detektierten T-Zellreaktionen nicht Tumorstroma-spezifisch waren.

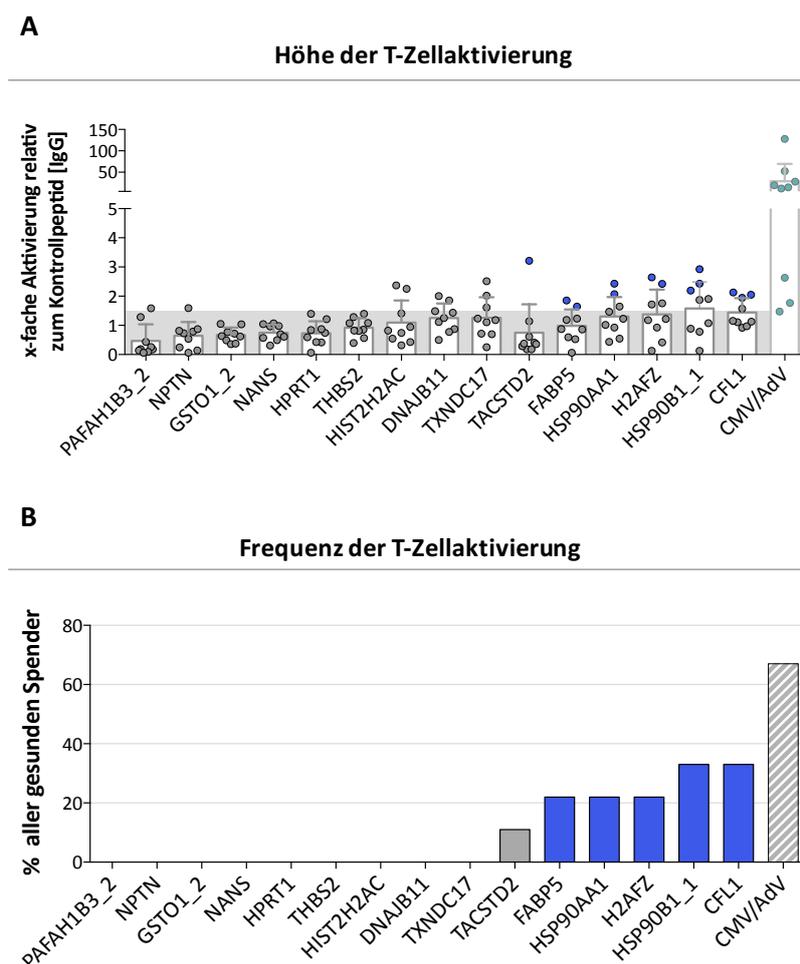


Abbildung 23: T-Zellantworten gegen die Kandidatenpeptide in gesunden Spendern.

A] Kumulative Daten der T-Zellreaktionen von neun gesunden Spendern gegen 15 CAF-assoziierte Peptide sortiert nach aufsteigender Höhe der mittleren T-Zellaktivierung. Jeder Einzelpunkt repräsentiert den Quotienten der IFN- γ -Spotanzahl des getesteten Peptids relativ zum Kontrollpeptid (IgG). Balken entsprechen den Mittelwerten \pm SEM über alle Spender. Peptide, die im Vergleich zum Kontrollpeptid IgG signifikante T-Zellantworten ($p < 0,05$) induzieren konnten und zudem eine Aktivierung von $\geq 1,5$ (graue horizontale Linie) zeigten, sind blau markiert. **B]** Frequenz antigenspezifischer T-Zellen von gesunden Spendern ($n = 9$) in Prozent. Die Balken repräsentieren den prozentualen Anteil der gesunden Spender, die eine T-Zellantwort gegen das Peptid zeigten. Peptide, die in > 20 % der Donoren eine T-Zellantwort auslösten, sind blau markiert.

4.5.2 Untersuchung von T-Zellimmunantworten gegen CAF-assoziierte Peptide in weiteren HNSCC-Tumorpatienten

Für die potenzielle klinische Anwendung ist es von großer Bedeutung, ob es sich um patientenindividuelle Antigene handelt, die somit für die Behandlung des jeweiligen Ursprungspatienten im Rahmen eines personalisierten Therapiekonzepts eingesetzt werden könnten, oder ob diese Antigene auch T-Zellantworten in weiteren Tumorpatienten auslösen und damit die Option einer breiteren Anwendung beinhalten. Um dieser Frage nachzugehen, wurde nun die Peptid-induzierte T-Zellreaktivität in einer Kohorte von 19 zusätzlichen Patienten mit diagnostiziertem Plattenepithelkarzinomen verschiedener Lokalisation des Kopf-Halsbereichs (Tabelle 18) mittels IFN- γ -ELISPOT-Assay untersucht. Die Blutabnahmen erfolgten intraoperativ bei Resektion des Primärtumors.

Nachdem fünf der 15 CAF-assoziierten Peptide zuvor ausgeschlossen worden waren, da diese auch bei gesunden Individuen zu T-Zellantworten führten, wurden die verbleibenden zehn Kandidatenpeptide getestet. Dabei wurde untersucht, ob und, wenn ja, wie häufig diese Peptide signifikante T-Zellreaktionen auslösten. Dazu wurden die DCs mit dem jeweiligen Kandidatenpeptid bzw. den Kontrollpeptiden (IgG oder CMV/AdV) gepulst und anschließend die Reaktivität der autologen TCs detektiert. Dies ist exemplarisch für Tumorpatient HNO700 in Abbildung 24 dargestellt.

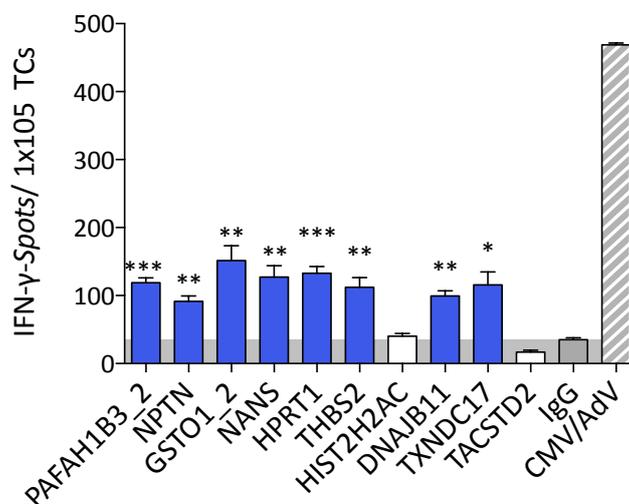


Abbildung 24: Repräsentativer IFN- γ -ELISPOT des HNSCC-Tumorpatienten HNO700.

Detektion der reaktiven T-Zellen (TCs) gegen zehn CAF-assoziierte Peptide exemplarisch gezeigt für Patient HNO700. Die DCs wurden mit Peptiden gepulst, anschließend autologe TCs zugegeben und die Anzahl der antigenspezifischen TCs (IFN- γ -Spots/1x10⁵ TCs) in Triplikaten detektiert. Balken entsprechen dem Mittelwert \pm SEM. Peptide, die im Vergleich zum IgG-Kontrollpeptid (grau) signifikante T-Zellimmunantworten induzieren konnten, sind blau hinterlegt. CMV/AdV = Positivkontrolle, * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

Bei diesem Patienten konnten für acht von zehn Peptiden reaktive T-Zellen detektiert werden, deren IFN- γ -Sekretion im Vergleich zum IgG-Kontrollpeptid signifikant erhöht war. Aufgrund der hohen Diskrepanzen der absoluten IFN- γ -Spotzahlen zwischen den einzelnen Patienten und der Anzahl der untersuchten Patienten (n = 19) wurden auch diese Daten, analog zu den gesunden Spendern, kumulativ dargestellt (Abbildung 25 A und B).

Bemerkenswerterweise konnten bei allen zehn getesteten Peptiden signifikante und im Vergleich zum IgG-Kontrollpeptid 1,5-mal höhere TC-Antworten in den Tumorpatienten detektiert werden (Abbildung 25 A). Berücksichtigt man dabei die Toleranzgrenze, die mit einem $p < 0,05$ verbunden mit einer 1,5-fach erhöhten IFN- γ -Spotzahl vergleichsweise streng gewählt wurde, ist dieses Ergebnis umso beeindruckender. Bei einem mildereren Schwellenwert (bspw. allein $p < 0,05$ ohne Berücksichtigung der x-fachen Änderung) wären deutlich mehr Patienten als „Responder“ gewertet worden.

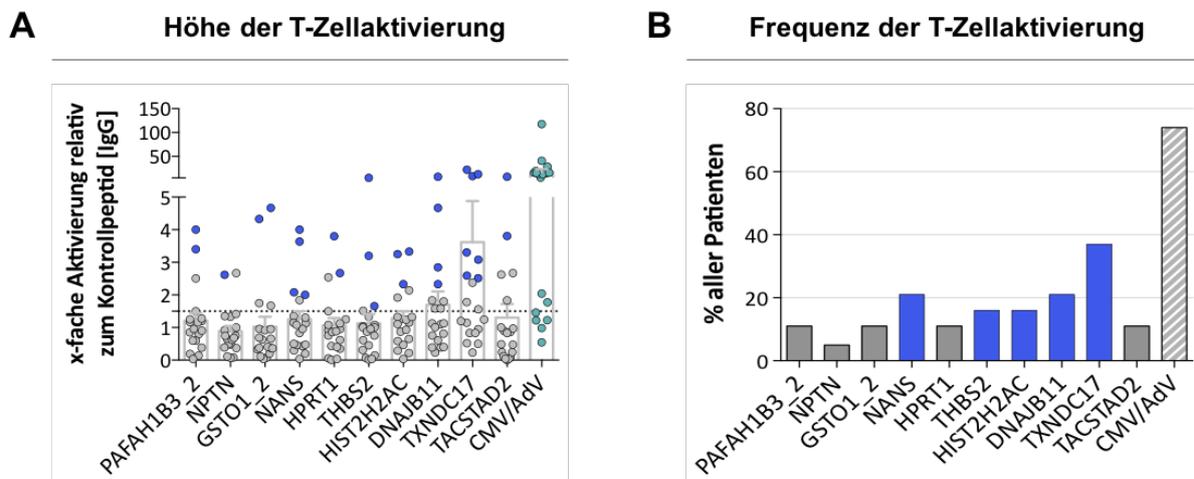


Abbildung 25: Untersuchung von peptidinduzierten T-Zellimmunantworten in HNSCC-Patienten.

A| Kumulative Daten der T-Zellaktivierung von 19 HNO-Tumorpatienten gegen zehn CAF-assoziierte Antigene. Jeder Einzelpunkt repräsentiert den Quotienten der IFN- γ -Spotanzahl des getesteten Peptids relativ zum IgG-Kontrollpeptid. Balken entsprechen den Mittelwerten \pm SEM über alle Patienten. Peptide, die im Vergleich zu IgG signifikante T-Zellantworten ($p < 0,05$) induzieren konnten und zudem eine Aktivierung von $\geq 1,5$ (graue horizontale Linie) zeigten, sind blau markiert. **B|** Frequenz signifikanter T-Zellantworten der 19 Patienten in Prozent (%). Balken repräsentieren den prozentualen Anteil der Patienten, die eine T-Zellantwort gegen das Peptid zeigten. Peptide, die in $> 20\%$ der Patienten zu einer signifikanten T-Zellantwort führten, sind blau markiert.

Auch die absolute Anzahl war mit bis zu 12,8-mal mehr reaktiven TCs vergleichsweise hoch (Abbildung 25 A). Da die Peptide in den zuvor getesteten gesunden Spendern keinerlei T-Zellaktivierung induzierten, scheint diese Reaktion Tumorstroma-spezifisch zu sein. Die Frequenz der T-Zellaktivierung hingegen war sehr unterschiedlich (Abbildung 25 B). Das NPTN-Peptid beispielsweise konnte nur bei 5 % (1/19) der Patienten eine Antwort auslösen,

wohingegen bei fast 40 % (7/19) der Patienten TXNDC17-spezifische TCs detektiert werden konnten (Abbildung 25 B).

Um ausschließen zu können, dass Tumorpatienten, oder respektive gesunde Spender generell eine höhere Immunantwort zeigen, wurde in jedem Versuchsansatz die Positivkontrolle CMV/AdV mitgeführt. Hier konnten zwischen gesunden Spendern und HNSCC-Tumorpatienten keine signifikanten Unterschiede in den T-Zellantworten detektiert werden. Tendenziell zeigten die gesunden Spender sogar eine höhere T-Zellreaktivität gegen das Kontrollpeptid (Anhang Abbildung 35). Da es für die potenzielle therapeutische Anwendung dieser Peptide von Bedeutung ist, dass Tumore einer breiteren Patientengruppe adressiert werden können, wurden die fünf Kandidatenpeptide ausgewählt, die signifikante T-Zellantworten bei mehr als 10 % der Tumorpatienten auslösten (Abbildung 25 B; blaue Balken). Diese waren NANS, THBS2, HIST2H2AC, DNAJB11 und TXNDC17.

Zusammenfassend konnten wir für zehn der 15 Kandidatenpeptide signifikante und deutlich erhöhte antigenspezifische T-Zellaktivierungen nachweisen. Die Peptide DNAJB11, NANS, HIST2H2AC, THBS2 und TXNDC17 waren sogar in der Lage, T-Zellantworten in 10 bis 40 % der Patienten zu induzieren, weswegen die Ursprungproteine dieser fünf Peptide abschließend hinsichtlich ihrer mRNA- und Proteinexpression in HNSCC-Tumorgewebe und Normalgewebe untersucht wurden.

4.6 Charakterisierung der CAF-assoziierten T-Zellantigene

Ehe die verbleibenden fünf immunogenen T-Zellantigene hinsichtlich ihrer Proteinexpression in Tumor- und Normalgewebe sowie in CAFs untersucht wurden, sollten diese in folgendem Passus kurz vorgestellt werden. Dabei wurde anhand von Datenbankrecherchen die physiologische Funktion sowie die zu erwartende subzelluläre Lokalisation der Proteine skizziert. Ein Überblick über die subzelluläre Lokalisation ist in Abbildung 26 schematisch dargestellt.

Das Protein ***DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member B11 (DNAJB11)*** ist ein Co-Chaperon des Hsp70-Orthologs BiP von *Escherichia coli* (Binder *et al.*, 2014). DNAJB11 bindet neu-translatierte, noch nicht gefaltete Proteine und verhindert so deren Aggregation (Shen & Hendershot, 2005). Aufgrund seiner Funktion als Co-Chaperon, ist seine Proteinexpression hauptsächlich auf das raue Endoplasmatische Retikulum (ER) begrenzt (Yu *et al.*, 2000).

NANS kodiert das im Zytosol aktive Enzym **N-Acetylneuraminsäuresynthase**, das die Biosynthese von Sialinsäure N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) aus N-Acetylmannosamin-6-phosphat oder Mannose-6-Phosphat katalysiert (Lawrence *et al.*, 2000).

Das Gen **HIST2H2AC** kodiert das **Typ 2C Histon H2A** und wird damit ausschließlich im Nukleus exprimiert (Binder *et al.*, 2014). Histone sind basische Proteine, die für die Verpackung der DNA im Zellkern eukaryotischer Zellen verantwortlich sind.

THBS2 kodiert eine Untereinheit des als Homotrimer vorkommenden Proteins **Thrombospondin 2 (TSP2)**. Thrombospondine sind evolutionär hochkonservierte kalziumbindende Glykoproteine, die sekretiert werden und mit anderen Proteinen der Extrazellulärmatrix interagieren (Bornstein, 1995). Damit sind sie hauptsächlich im Extrazellulärraum, im Zytosol und im ER lokalisiert (Binder *et al.*, 2014).

Das Gen **TXNDC17** kodiert das 14 kDa große Protein **Thioredoxin domain-containing protein 17 (TRP14)** (Binder *et al.*, 2014; Uhlen *et al.*, 2015). Das Protein beinhaltet eine Thioredoxin-Domäne, die wiederum zwei Cysteinreste beinhaltet, welche die Redoxaktivität bedingt. Thioredoxine sind vorwiegend im Zytosol aktiv (Binder *et al.*, 2014) und fungieren dort unter anderem als Wachstumsfaktoren, Antioxidantien oder Transkriptionsfaktoren (Jeong, 2003).

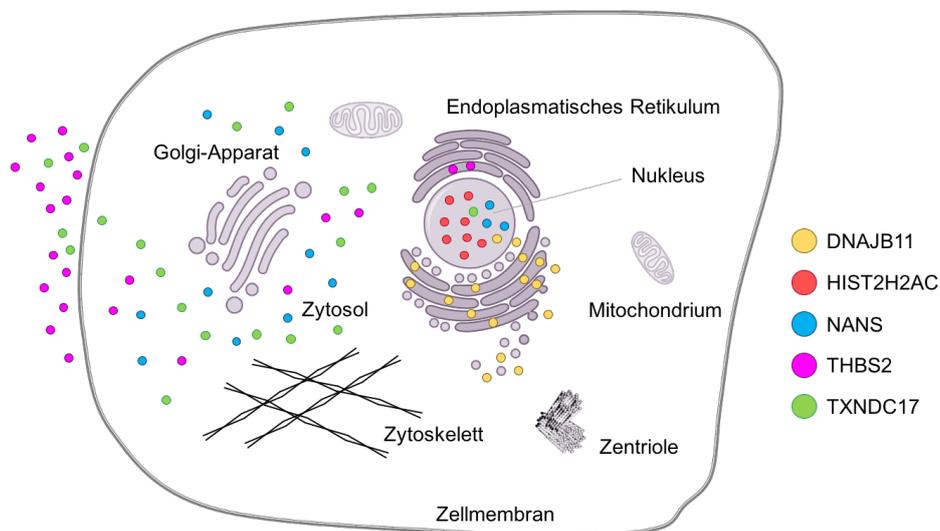


Abbildung 26: Subzellulären Lokalisation der neu identifizierten CAF-assoziierten Antigene.

Die Proteine weisen unterschiedliche subzelluläre Lokalisationen auf. Die Proteinexpression des Co-Chaperons DNAJB11 (gelb) ist auf das raue Endoplasmatische Retikulum und vereinzelt auf den Nukleus begrenzt, die des Histons HIST2H2AC (rot) ausschließlich auf den Nukleus. Das Enzyms NANS ist im Zytosol und teilweise auch im Zellkern lokalisiert. THBS2 (pink) wird hauptsächlich sekretiert, kommt aber in geringen Mengen auch im Zytosol sowie im glatten ER vor. TXNDC17 (blau) hingegen wird hauptsächlich im Zytosol exprimiert und zu geringen Mengen sekretiert. Die Lokalisationen wurden über die Datenbanken „UniProt“ (uniprot.org) und „COMPARTMENTS“ (compartments.jensenlab.org) ermittelt.

4.6.1 mRNA-Expressionsanalyse in HNSCC-Tumorgewebe & Normalschleimhautproben

Für die Eignung eines Tumorantigens als Impfantigen hat das *National Cancer Institute* (NCI) im Jahr 2009 einige Kriterien zusammengefasst an denen sich Wissenschaftler bis heute bei

der Beurteilung von Antigenen orientieren. Neben der Immunogenität kommt dabei auch der Expressionsstärke des potenziellen Impfantigens in Tumoren und Normalgeweben ein hoher Stellenwert zu (Cheever *et al.*, 2009).

Mit *DNAJB11*, *HIST2H2AC*, *NANS*, *THBS2* und *TXNDC17* ist es gelungen, fünf immunogene Peptide zu identifizieren, die Stroma-assoziierte TC-Antworten bei HNSCC-Tumorpatienten induzieren, nicht jedoch bei gesunden Individuen. Im Folgenden sollte nun die mRNA-Expressionsstärke des jeweiligen Antigens mittels *in silico* Analysen von zwei unabhängigen, öffentlich verfügbaren Datensätzen untersucht werden.

Der erste Datensatz stammte von der *Gene Expression Omnibus* (GEO)-Datenbank des *National Center for Biotechnology and Information* (NCBI) und beinhaltete 57 *Oral Squamous Cell Carcinoma* (OSCC)-Proben und 22 dysplasiefreie Schleimhautproben von tumorfreien Individuen (GSE25099) (Peng *et al.*, 2011). Die Rohdaten (Expressionsintensitäten) wurden normalisiert, \log_2 -transformiert und medianzentriert.

Die Gene *DNAJB11*, *NANS*, *THBS2* und *TXNDC17* zeigten signifikant höhere mRNA-Expressionslevel in den Tumorgeweben verglichen mit den Normalschleimhautproben (Abbildung 27 A, C, F, H). Verglichen mit der medianen Expression aller Gene (medianzentrierte Darstellung), lag die Expression bei den Tumorproben über der medianen Expression, wohingegen die Expression der Kandidatengene in den Normalschleimhautproben darunterlag. Dies konnte für alle fünf Gene beobachtet werden, am stärksten ausgeprägt jedoch bei *NANS* und *THBS2* (Abbildung 27 C und F). Für *HIST2H2AC* lagen in diesem Datensatz keine mRNA-Expressionsdaten vor, weswegen darüber keine Aussagen getroffen werden konnte.

Anschließend sollten die mRNA-Expressionslevel von *DNAJB11*, *NANS*, *HIST2H2AC*, *THBS2* und *TXNDC17* in einem zweiten, unabhängigen Datensatz validiert werden. Dazu wurde der Datensatz der TCGA (*The Cancer Genome Project*) verwendet. Auch hier wurden die Rohdaten (Expressionsintensitäten) von der Onlineplattform heruntergeladen, normalisiert und \log_2 -transformiert. Insgesamt beinhaltete der Datensatz für die Tumorentität HNSCC 528 Proben. Um den Datensatz so homogen wie möglich zu gestalten, wurden nur Stadium IVa Tumore ein-, und außerdem alle HPV-assoziierten Tumore ausgeschlossen, da diese hinsichtlich ihrer Genexpression eine distinkte Gruppe bilden (Agrawal *et al.*, 2011). Letztlich beinhaltete der verwendete Datensatz die mRNA-Expressionsdaten von 219 HPV-negativen Stadium IVa HNSCC und 30 gepaarten dysplasiefreien Normalschleimhautproben.

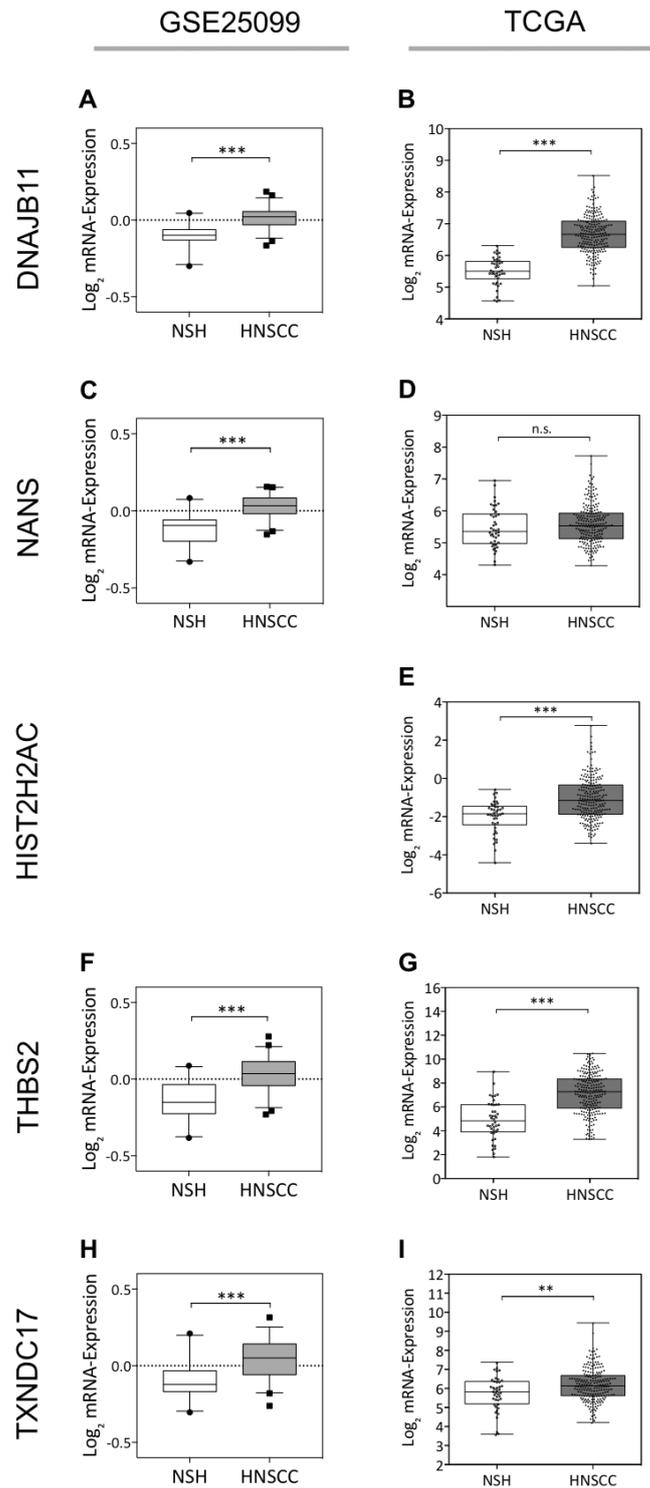


Abbildung 27: *in silico*-Analyse der mRNA-Expression von DNAJB11, NANS, HIST2H2AC, THBS2 und TXNDC17. Datensatz GSE25099 (linke Spalte): *Box-Whisker-Plots* (5-95 % KI) der log₂-transformierten, medianzentrierten mRNA-Expressionsintensitäten von DNAJB11 (A), NANS (B), THBS2 (F) und TXNDC17 (H) in Normalschleimhautproben (NSH) und *Oral suamous cell carcinoma* (OSCC)-Proben (A, C, F, H). **B|** Datensatz der TCGA (rechte Spalte): kombinierte Darstellung des *Scatter-Plots* und des *Box-Plots* der log₂-transformierten mRNA-Expressionsintensitäten von DNAJB11 (B), NANS (D), HIST2H2AC (E), THBS2 (G) und TXNDC17 (I) in NSHs und HNSCC. ** = p < 0,01, *** = p < 0,001, KI = Konfidenzintervall, n.s. = nicht signifikant.

Für *DNAJB11*, *HIST2H2AC*, *THBS2* und *TXNDC17* konnte in diesem größeren Datensatz das signifikant höhere Expressionslevel im Tumor verglichen mit den Normalschleimhautproben bestätigt werden (Abbildung 27 B, E, G, und I). Für NANS hingegen konnte lediglich ein Trend hin zu einem höheren mRNA-Expressionslevel im Vergleich zu dem der Normalschleimhaut nachgewiesen werden (Abbildung 27 D). Die marginalen Unterschiede zwischen den Datensätzen könnten darauf zurückzuführen sein, dass im ersten Datensatz nur eine HNSCC-Subgruppe betrachtet wurde, nämlich OSCCs und zudem die Anzahl der untersuchten Tumore deutlich kleiner war ($n = 57$ zu $n = 219$). Überdies wiesen die Tumore verschiedene Stadien auf und es war nicht untersucht worden, ob eine HPV-Infektion vorlag (Peng *et al.*, 2011). Auch unterschieden sich die beiden Datensätze bezüglich der Herkunft der Normalproben. Die Schleimhäute des GSE25099-Datensatzes stammten von tumorfreien Individuen, während die Proben der TCGA tumorferne Schleimhäute von Tumorpatienten darstellen. Dabei konnte nicht zweifelsfrei ausgeschlossen werden, dass ggf. Entzündungen oder bereits leichte Epitheldysplasien vorhanden waren.

4.6.2 Proteinexpressionsanalysen von DNAJB11, NANS, HIST2H2AC, THBS2 und HIST2H2AC in dysplasiefreier Normalschleimhaut und HNSCC-Tumorgewebe

Auch wenn die mRNA-Expression für die allermeisten Gene mit der Proteinexpression korreliert (Vogel & Marcotte, 2012; Uhlen *et al.*, 2015), sollte abschließend die Proteinexpression der neuen CAF-TAs anhand exemplarischer immunhistochemischer Färbungen in HNSCC-Tumorgewebe und Normalstromaproben untersucht werden. IHC-Färbungen erlauben es zudem, den Zelltyp, der den Anstieg des mittleren mRNA-Expressionslevels verursachte, zu identifizieren. Dies ist besonders im Kontext der Expression von Tumorstroma-assoziierten Antigenen von Bedeutung. Letztlich sollte so verifiziert werden, dass die ausgewählten CAF-assoziierten Antigene auch auf Proteinebene eine Tumorstroma-assoziierte Expression aufweisen. Im Zuge dieser Untersuchungen sollte zudem die subzelluläre Lokalisation der Proteine *in situ* untersucht werden.

Insgesamt wurden die Färbungen an jeweils fünf HNSCC-Tumorgewebe und drei Kryogewebedünnschnitten von dysplasiefreien Normalschleimhautproben mit ausreichenden Tumorstromaanteilen, und respektive ausreichender Lamina propria durchgeführt.

Alle ausgewählten Kandidatenantigene konnten auf Proteinebene in den Tumorgewebe detektiert werden. Interessanterweise zeigten alle fünf über den Filterprozess ausgewählten CAF-TAs eine erhöhte Expression in den Tumorstromaarealen (Abbildung 28). Im Falle von

DNAJB11 (Abbildung 28 B und C) und THBS2 (Abbildung 28 K und L) und schien diese sogar auf das Stroma limitiert zu sein. Für NANS (Abbildung 28 E und F) HIST2H2AC (Abbildung 28 H und I) und TXNDC17 (Abbildung 28 N und O) hingegen konnte zusätzlich in den Tumorearealen eine schwache (NANS, TXNDC17) bis mittelstarke (HIST2H2AC) Expression detektiert werden. Die Antigene DNAJB11, NANS, THBS2 und TXNDC17 zeigten analog zu den mRNA-Expressionsdaten (GSE25099) keine Expression in der Lamina propria der gesunden Vergleichsgewebe (Abbildung 28 A, D, G, J, M). Dies legt nahe, dass die Antigenexpression Tumorstroma-assoziiert ist. Einzig das im Zellkern lokalisierte Histon H2AC Typ2 zeigte auch eine starke Expression in allen drei untersuchten Normalschleimhaut-Kryogewebedünnschnitten und wird sowohl von den Zellen der Lamina propria als auch von den Zellen der aufliegenden Epithelzellschicht exprimiert (Abbildung 28 G). Zudem legen diese Färbungen nahe, dass auch die infiltrierenden Immunzellen der Tumorgewebe HIST2H2AC exprimieren.

Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen, wurde in den zuvor analysierten mRNA-Expressionsdaten eine signifikant höhere Expression von HIST2H2AC in den Tumorgeweben detektiert (vgl. Abbildung 27 E). Dieser Unterschied könnte mit der erhöhten Immunzellinfiltration in HNO-Tumoren gegenüber Normalschleimhaut in Zusammenhang stehen. Die Datenbank *The Human Protein Atlas* (HPA) gibt für HIST2H2AC eine erhöhte mRNA-Expression für Zellen des Immunsystems an (Uhlen *et al.*, 2015). Da dieses Antigen auch eine vergleichsweise starke Expression in tumorfreien Vergleichsgeweben aufwies, scheint es kein CAF-assoziiertes Antigen zu sein und wurde folglich von den weiteren Analysen ausgeschlossen.

Für NANS hingegen konnte im Studienkollektiv der TCGA kein Unterschied in der Expression zwischen Normalschleimhaut und Tumor detektiert werden (vgl. Abbildung 27 D). Die IHC-Färbungen hingegen zeigten deutlich, dass NANS auf Proteinebene in den Tumorgeweben exprimiert wird (Abbildung 28 E und F). Wobei bei genauerer Betrachtung der NANS exprimierenden Zellen im Stroma auffiel, dass neben den spindelförmigen CAFs vor allem die Zellnester innerhalb des Tumorstromas eine starke NANS-Expression aufweisen (Anhang Abbildung 36). Die Lokalisation in den Tumorstromaarealen sowie die Akkumulation dieser Zellen in Nestern und Morphologie (kleinere Kerne, starke Hämalaunfärbung) deuten darauf hin, dass es sich bei dieser Zellpopulation um Lymphozyten handelt. Diese konnte auch von einem Pathologen bestätigt werden.

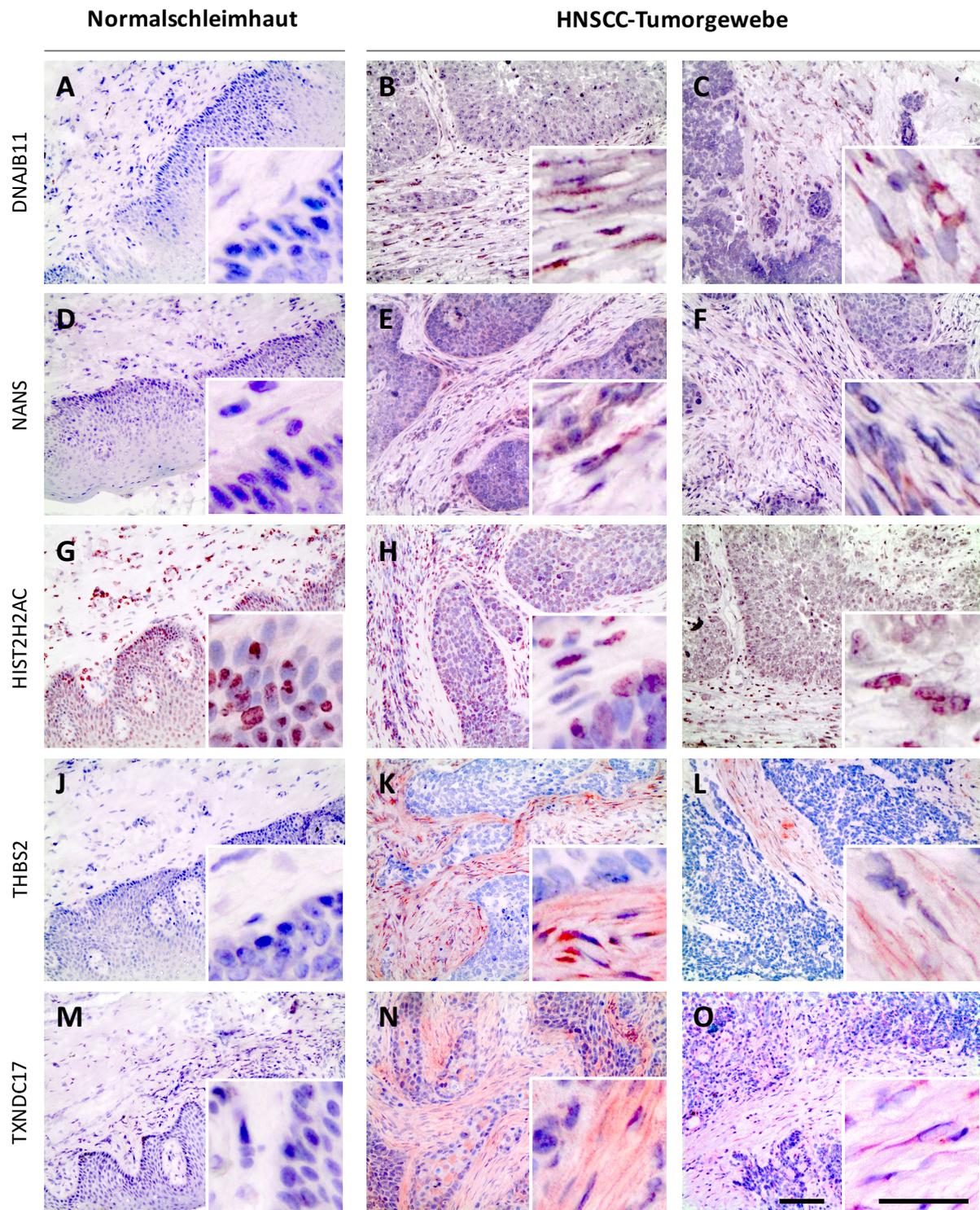


Abbildung 28: Repräsentative immunohistochemische Färbungen von dysplasiefreier Normalschleimhaut und HNSCC-Tumorgeweben gegen ausgewählte immunogene CAF-TAs.

Immunohistochemische Färbungen gegen die Kandidatenantigene DNAJB11 (A-C), NANS (E-F), HIST2H2AC (G-I), THBS2 (J-L) und TXNDC17 (M-O). In der ersten Spalte sind die Färbungen von dysplasiefreien Normalschleimhautproben mit angrenzender Lamina propria dargestellt und in der zweiten und dritten Spalte repräsentative Ausschnitte von HNSCC-Tumorgeweben. Messbalken = 50 µm.

Die Diskrepanz zwischen den TCGA-Daten und der Proteinexpression könnte darauf zurückzuführen sein, dass NANS nur von einer Subgruppe HNSCC exprimiert wird, oder dass die von der TCGA analysierten Tumore über einen zu geringen Tumorstromaanteil verfügen.

Zusammenfassend konnten die Proteinexpressionsanalysen eine Tumor-assoziierte Expression der Antigene bestätigen. Weiter legen die IHC-Färbungen nahe, dass es sich dabei vornehmlich um Zellen des Tumorstromas handelt. Ob es tatsächlich die tumorsupportiven CAFs sind, die diese Antigene exprimieren, sollte abschließend für die Kandidaten DNAJB11, NANS, THBS2 und TXNDC17 über Mehrfach-Immunfluoreszenzfärbungen von isolierten CAFs weiter verifiziert werden. Zudem konnte so parallel untersucht werden, ob die betreffenden Antigene von allen CAFs oder nur von einer CAF-Subpopulation exprimiert werden. Dies wurde exemplarisch anhand der CAFs von HNSCC-Patient HNO467 untersucht.

Dabei zeigte sich, dass die verbleibenden vier Kandidatenantigene (DNAJB11, NANS, THBS2 und TXNDC17) von CAFs auch auf Proteinebene exprimiert werden (Abbildung 29 A-D). Überdies war die Expression des betreffenden Antigens nicht etwa auf eine CAF-Subpopulation beschränkt, sondern betraf alle untersuchten CAFs. Für das Co-Chaperon DNAJB11 beschränkte sich die subzelluläre Expression in Übereinstimmung mit den Angaben der Datenbanken „UniProt“ und „COMPARTMENTS“ vorwiegend auf Membran und Lumen des ERs sowie auf den Nukleus (Abbildung 29 A).

Für das Enzym N-Acetylneuraminsäuresynthase (NANS) war basierend auf der Datenbankrecherche eine starke Expression im Zytosol und eine schwächere im Nukleus zu erwarten. Auch hier konnte dieses subzelluläre Expressionsmuster beobachtet werden, allerdings wurde hier tendenziell eine stärkere Expression im Zellkern detektiert, wohingegen das Zytosol eine vergleichsweise schwache NANS-Expression zeigte (Abbildung 29 B). Thrombospondin 2 (THBS2) ist subzellulär im ER sowie dem Zytosol der CAFs angereichert (Abbildung 29 C). Dieses Expressionsmuster stimmt mit dem in den Gewebeschnitten beobachteten überein (vgl. Abbildung 28 K und L).

Auch die prädizierte Proteinexpression von TRP14 (TXNDC17) stimmt mit der hier visualisierten überein. Die TXNDC17-Expression ist ausschließlich auf das Zytosol der CAFs beschränkt (Abbildung 29 D). Durch die Doppelfärbung mit dem Intermediärfilament Vimentin wird das besonders deutlich, da die Zytosolfärbung über das Zytoskelett hinausgeht (Abbildung 29 D, MERGE).

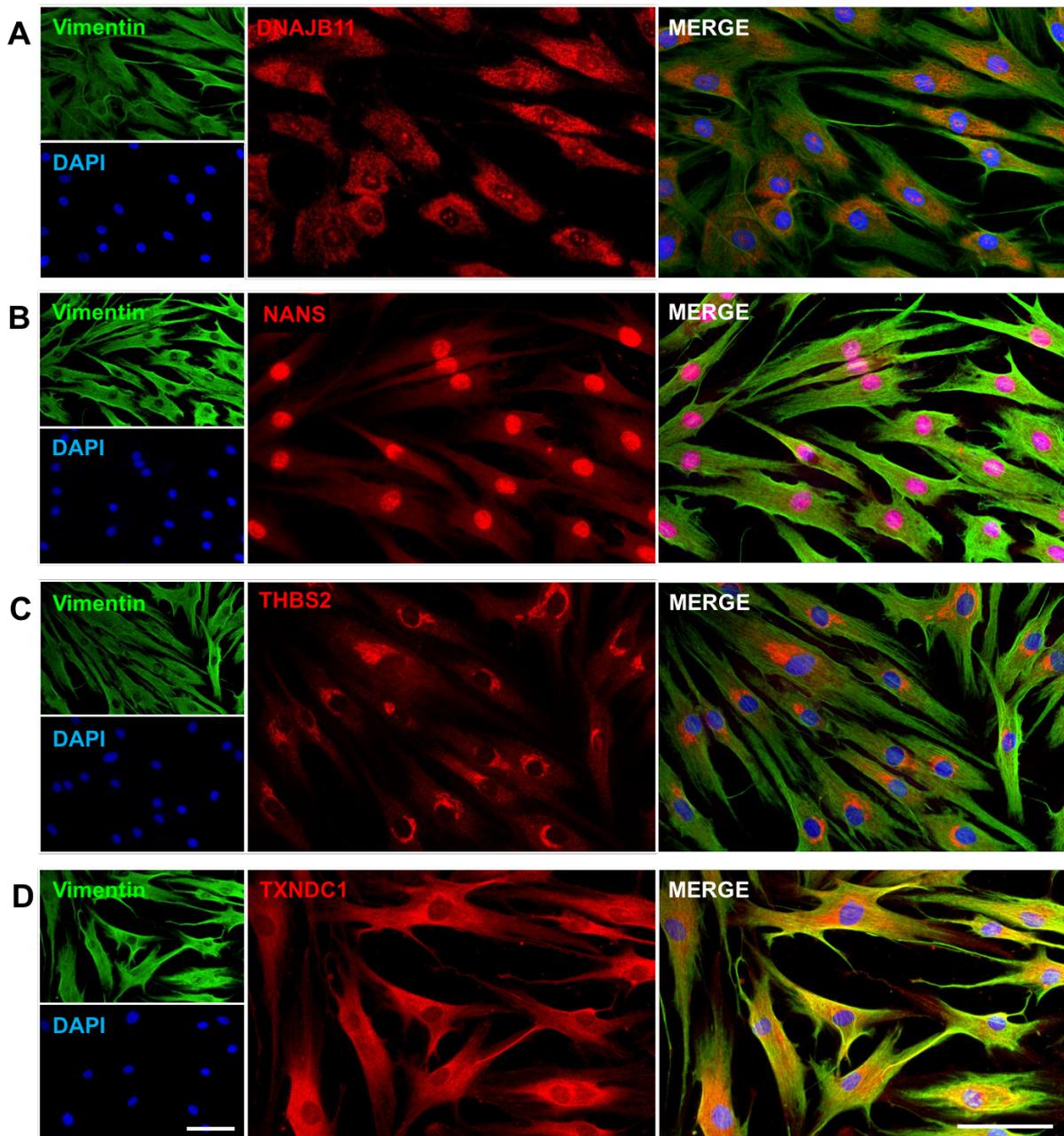


Abbildung 29: Repräsentative Mehrfach-Immunfluoreszenzfärbungen ausgewählter CAF-Antigene an CAFs.

Repräsentative Einzelkanalaufnahmen der Färbungen gegen den Fibroblastenmarker Vimentin (grün) und das entsprechende Antigen (rot) der Krebs-assoziierten Fibroblasten (CAFs) von Patient HNO467. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. MERGE zeigt die Überlagerung aller Kanäle. **A** | DNAJB11, **B** | NANS, **C** | THBS2 und **D** | TXNDC17. Messbalken = 100 μ m.

Abschließend konnte damit eindrücklich gezeigt werden, dass die durch den mRNA-basierten Filterprozess ausgewählten neuen CAF-Antigene auch auf Proteinebene eine CAF-assoziierte Expression aufweisen.

5 DISKUSSION

“When a plant goes to seed, its seeds are carried in all directions, [...] but they can only live and grow if they fall on congenial soil.” » Stephen Paget «

Nachdem sich Krebsforscher ursprünglich ausschließlich auf die Erforschung der malignen Tumorzellen fokussierten, postulierte der britische Krebsforscher Stephen Paget in den späten 1880er Jahren die „*Seed and Soil*“-Hypothese, wonach es erst zur Tumorigenese und Metastasierung kommt, wenn Tumorzellen (*Seeds*, engl. Samen) auf eine geeignete Mikroumgebung (*Soil*, engl. Nährboden) treffen (Paget, 1889). Seine Hypothese wurde seither durch zahlreiche Forschungsergebnisse bekräftigt und gilt damit weithin als gesichert (Fidler, 2003; Kalluri & Zeisberg, 2006; Hanahan & Weinberg, 2011; Langley & Fidler, 2011; Kalluri, 2016). Die Erforschung der tumorsupportiven Mikroumgebung stellt heute eine wichtige Säule der Krebsforschung dar, die wesentlich zum Verständnis der komplexen Tumorigenese und Metastasierung beiträgt und auch zunehmend an therapeutischer Relevanz gewinnt (Hanahan & Weinberg, 2011; Salo *et al.*, 2014).

Besonders Tumore, die aus Epithelzellen hervorgehen, wie HNSCC, Brust-, Lungen-, und Adenokarzinome zeichnen sich histopathologisch durch ein substantielles, desmoplastisches Tumorstroma aus, welches die Tumorzellinseln umgibt und Tumorwachstum, -progression und Metastasierung beeinflusst. Dieses Tumorstroma ist definiert als alle nicht malignen Zellen eines Tumors und inkludiert die Endothelzellen der Blut- und Lymphgefäße, Perizyten, Immunzellen, die Extrazellulärmatrix sowie Krebs-assoziierte Fibroblasten (CAFs) (Joyce & Pollard, 2009; Bremnes *et al.*, 2011). Letztere stellen mit bis zu 80 % die Hauptzellpopulation des Tumorstromas solider Tumore dar und sind durch einen permanent aktivierten Phänotyp gekennzeichnet (Sappino *et al.*, 1988; Garin-Chesa *et al.*, 1990), der grundsätzlich vergleichbar ist mit dem Fibrose-assoziierten Fibroblasten (FAFs) (Zeisberg *et al.*, 2000; LeBleu *et al.*, 2013; Tampe & Zeisberg, 2014). Dieser irreversibel aktivierte Zustand unterscheidet CAFs zum einen von naiven, ruhenden Gewebefibroblasten. Zum anderen aber auch von reversibel aktivierten Wundheilungs-assoziierten Fibroblasten, deren Aktivierungszustand umkehrbar ist (Kalluri, 2016).

Die Aktivierung geht mit der Expression diverser Aktivierungsmarker sowie mit einem speziellen sekretorischen Phänotyp einher (Erez *et al.*, 2010; Kalluri, 2016). Dabei existiert eine Vielzahl von Markern zur Identifizierung von aktivierten Fibroblasten, wie Vimentin, Desmin,

α -SMA, FAP, PDGF α/β , NG2 oder CD90 (Kalluri & Zeisberg, 2006; Sugimoto *et al.*, 2014). Jedoch ist keiner dieser Marker spezifisch für Fibroblasten im Allgemeinen oder aktivierte Fibroblasten im Speziellen. Zudem exprimiert kein Fibroblast zeitgleich alle dieser Marker, sondern immer eine Kombination, was die Heterogenität der CAFs verdeutlicht (Öhlund *et al.*, 2014; Sugimoto *et al.*, 2014). Inwieweit das Aktivierungsmarker-Expressionsprofil überdies mit den Funktionen der jeweiligen Subtypen in Zusammenhang steht, ist derzeit noch völlig unklar und Gegenstand weiterer Forschung. Jedoch können basierend auf der aktuellen Literatur α -SMA und FAP als robusteste Marker zur Identifizierung von aktivierten Fibroblasten angesehen werden, wobei FAP weiter *aktivierte* von *irreversibel aktivierten* Fibroblasten diskriminieren, und damit Wundheilungs-assoziierte Myofibroblasten von CAFs bzw. FAFs unterscheiden soll (Kalluri, 2016). Dies spiegelt sich auch darin wider, dass die meisten therapeutischen Ansätze zur Bekämpfung von CAF auf FAP als Zielmolekül beruhen (Li *et al.*, 2013; Tran *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2015; Zhang & Ertl, 2016). Beispielsweise wird an FAP-spezifischen monoklonalen Antikörpern (Sibrotuzimab) (Hofheinz *et al.*, 2003), an FAP-inhibierenden Peptiden (PT-630) (Santos *et al.*, 2009) oder an FAP-spezifischen T-Zelltherapien (FAP-CARs) (Wang *et al.*, 2014) geforscht. Damit weisen die meisten Veröffentlichungen keine direkte Immunogenität der CAFs nach, sondern zeigen indirekt, dass die Eliminierung immunsuppressiv wirkender, aktivierter FAP-positiver CAFs sich positiv auf die Induktion einer Anti-Tumorimmunantwort auswirken kann.

Allerdings gibt es erste Untersuchungen, die zeigen, dass das Protein FAP selbst immunogenes Potential besitzt und damit nicht nur als Aktivierungsmarker, sondern darüber hinaus auch als Antigen fungieren kann (Fassnacht, 2005). Neben FAP scheinen derzeit jedoch noch keinerlei immunogene CAF-spezifische Strukturen bekannt zu sein, die für die gezielte Eliminierung dieser tumorsupportiven Zellpopulation genutzt werden könnten. Dies könnte auf den Mangel an geeigneten Methoden zur Identifizierung CAF-spezifischer Zielstrukturen zurückzuführen sein und resultiert letztlich darin, dass die meisten Ansätze CAFs therapeutisch zu bekämpfen, scheitern.

Da bereits hinreichend belegt werden konnte, dass die Eliminierung von CAFs dem Tumor zum einen den Nährboden für Proliferation, Angiogenese und Metastasierung nimmt und darüber hinaus auch zur Reaktivierung der Immunzellen führt (Zhang, 2008; Chen *et al.*, 2015; Zhang & Ertl, 2016), war die Identifikation neuer CAF-assoziiierter immunogener Zielstrukturen Ziel der hier vorliegenden Arbeit. Dazu wurde ein neuartiger Ansatz gewählt. Die-

ser beruhte auf der Kombination der bereits 2010 publizierten PF2D-ELISPOT-Methode (Beckhove *et al.*, 2010) mit einem auf Arraydaten basierenden Filterprozess zur gezielten Anreicherung von CAF-assoziierten Zielstrukturen. Basierend darauf gelang es uns vier Antigene (NANS, DNAJB11, THBS2 und TXNDC17) zu identifizieren, deren Expression weitgehend auf das Tumorstoma begrenzt ist (i), die T-Zellen aus der Peripherie von Tumorpatienten aktivieren (ii), jedoch keine Reaktivität in gesunden Spendern hervorrufen (iii) und die damit neben FAP neue immunogene Strukturen des aktivierten Tumorstomas darstellen.

5.1 Krebs-assoziierte Fibroblasten als Zielstruktur für eine T-Zell-basierte Immuntherapie

5.1.1 Verifizierung des *in vitro*-Aktivierungsstatus der verwendeten CAF-Kulturen

Um die Frage beantworten zu können, ob spontane T-Zellantworten gegen CAFs existieren, um anschließend CAF-assoziierte T-Zellantigene zu identifizieren, wurden CAFs und korrespondierende Tumorzellen im ersten Schritt mittels Gewebeexplantation aus HNSCC-Geweben isoliert.

Die Kulturen zeigten zunächst eine für aktivierte Fibroblasten typische kreuz- bzw. sternartige Morphologie. Dieser Phänotyp wird als ein Unterscheidungsmerkmal gegenüber ruhenden Fibroblasten, die einen stark elongierten Phänotyp aufweisen, beschrieben und ist auf die Remodellierung des Zytoskeletts zurückzuführen (Kalluri & Zeisberg, 2006). Diese scheint auf der vermehrten Expression des Aktinfilaments α -SMA zu basieren, wodurch die kontraktile Aktivität der Fibroblasten gesteigert wird (Hinz *et al.*, 2001).

Ein weiteres Merkmal aktivierter Fibroblasten ist die verstärkte Expression von ECM-Proteinen, wie Tenascin C, Typ-I Kollagenen, Fibronectin, Osteonectin (*SPARC*), Matrixmetalloproteinasen (MMPs) sowie die Expression von bFGF und CXCL10 (Pietras & Östman, 2010; Hanahan & Coussens, 2012). Dieses Genexpressionprofil konnte über vergleichende Microarray-Analysen von insgesamt 15 CAF- und korrespondierenden Tumorzellkulturen bestätigt werden. Zudem spiegelten die durchgeführten *GOterm*-Analysen durch Anreicherung der Prozess „*Response to Wounding*“, „*Regulation of Angiogenesis*“ oder „*ECM Organization*“ den aktivierten CAF-Phänotyp wider. Die differenziell von den Tumorzellen exprimierten Gene hingegen entfielen auf Kategorien wie „*Epithelium Development*“, „*Keratinization*“ und „*Epithelial Cell Differentiation*“ und beinhalteten für HNSCC typische Zytokeratine (*KRT5*,

KRT14) und epitheliale Tumorzellmarker wie das *Epithelial Cell Adhesion Molecule (EPCAM)* oder den *Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)*.

Weiter wurde der Aktivierungszustand der CAFs über die Expression typischer Aktivierungsmarker auf Einzelzellebene mittels FACS-Analysen verifiziert. Wie einführend erwähnt, zeichnen sich aktivierte Wundheilungs-assoziierte Fibroblasten (Myofibroblasten) sowie CAFs durch die Expression von α -SMA aus (Darby *et al.*, 1990; Rønnov-Jessen *et al.*, 1996; Chang *et al.*, 2002; Tomasek *et al.*, 2002). 42,8 bis 99,5 % der von uns untersuchten CAFs waren positiv für diesen Marker und damit in einem aktivierten Zustand. Allerdings gibt es in der Literatur Hinweise darauf, dass isolierte Fibroblasten verschiedenster Herkunft *in vitro* dazu neigen, ihre α -SMA-Expression zu steigern (Serini & Gabbiani, 1999). Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass die erhöhte α -SMA-Expression auf dieses *in vitro*-Phänomen zurückzuführen ist, wurde zusätzlich die Expression von FAP untersucht. Insgesamt exprimierten 16,1 bis 32,3 % der isolierten CAFs FAP. Damit wird FAP im Vergleich zu α -SMA von deutlich weniger CAFs exprimiert. Glaubt man dem Postulat von Raghu Kalluri, wonach FAP aktivierte von irreversibel aktivierten Fibroblasten diskriminiert (Kalluri, 2016), wäre es durchaus möglich, dass der Anteil FAP-positiver Fibroblasten den irreversibel aktivierten Phänotyp repräsentiert.

Für die Frage, wie dieser über die Kultivierung hinweg auch *ex vivo* – ohne den direkten Einfluss von Tumorzellen – aufrechterhalten werden konnte, gibt es verschiedene Erklärungsansätze. Laut aktuellen Studien kann der irreversibel aktivierte Phänotyp durch genetische sowie epigenetische Veränderungen bedingt sein (Gonda *et al.*, 2010; Kalluri, 2016). Basierend auf Analysen des Stromagenoms von HNO- (Weber *et al.*, 2007), Brust- (Patocs *et al.*, 2007), Ovarial- (Tuhkanen *et al.*, 2006), Prostata- (Condon, 2005), Blasen- (Paterson *et al.*, 2003), Colon- (Bian *et al.*, 2007) und Pankreastumoren (Mahadevan & Hoff, 2007) konnten somatische Mutationen sowie *Loss of Heterozygosity* (LOH) identifiziert werden, die in einigen Fällen sogar rein stromaspezifisch waren. Dementgegen konnten andere Studien keine signifikante Anzahl an somatischen Mutationen oder LOH in Brust- und Ovarialkarzinom-assoziierten CAFs detektieren (Qiu *et al.*, 2008). Zudem wird derzeit auch der Einfluss epigenetischer Veränderungen auf den irreversiblen Aktivierungsstatus von Fibroblasten im Kontext von Fibrosen und Krebs erforscht (Bechtel *et al.*, 2010; Zeisberg & Zeisberg, 2013; Tampe & Zeisberg, 2014; Li *et al.*, 2015). Dabei konnten Promotorhypermethylierungen in insgesamt zwölf Genen nachgewiesen werden, die die Genexpression beeinflussen und da-

mit mutmaßlich für die Aktivierung der Fibroblasten verantwortlich zu sein scheinen, und überdies zur Fibrogenese beitragen (Bechtel *et al.*, 2010; Zeisberg & Zeisberg, 2013). Eine weitere Gruppe verglich das Methylierungsprofil von normalen Fibroblasten mit dem von Kolonkarzinom-assoziierten CAFs. Auch hier fanden die Wissenschaftler differenziell methylierte Promotorregionen, die CAF-spezifisch waren (Mrazek *et al.*, 2014). Inwieweit genetische und/oder epigenetische Veränderungen tatsächlich den irreversibel aktivierten Phänotyp von CAFs bedingen, kann basierend auf der aktuellen Datenlage nicht abschließend beantwortet werden.

Insgesamt konnten wir zeigen, dass die von uns verwendeten CAF-Kulturen die Kriterien von aktivierten Fibroblasten erfüllen. Das damit verbundene, veränderte Expressionsprofil sollte sich in einem veränderten HLA-Peptidom widerspiegeln, über das – so unsere Arbeitshypothese – die CAFs selektiv angreifbar sind.

5.1.2 Induktion von spontanen T-Zellantworten durch CAF-assoziierte Antigene

Der nächste Schritt auf dem Weg zur Identifizierung von CAF-assoziierten T-Zellantigenen (CAF-TAs) bestand darin, zu überprüfen, ob die von uns verwendeten CAFs generell spontane T-Zellantworten *in vitro* induzieren können und damit als Antigenquelle in Frage kommen. Analog dazu wurden auch die Zellysate der korrespondierenden Tumorzellen untersucht, da davon auszugehen ist, dass die initial detektierte T-Zellantwort gegen das Gewebelysat entweder Tumor- oder Tumorstroma-vermittelt sein sollte.

Um also CAFs hinsichtlich ihres Potenzials, spontane T-Zellantworten zu induzieren, zu untersuchen, wurden zunächst die Lysate der aktivierten CAFs im Vergleich zu Lysaten der korrespondierenden Tumorzellen mittels IFN- γ -ELISPOT-Assay in einem autologen Versuchsaufbau getestet. Da die Tumorzellkulturen über einen längeren Kultivierungszeitraum hinweg aus den CAF-Kulturen hervorgehen, muss davon ausgegangen werden, dass auch in den frühen CAF-Kulturen Tumorzellen enthalten sind. Zwar ergaben exemplarische Analysen, dass der Tumorzellanteil frühestens ab Passage 12 zu steigen beginnt, um dies jedoch im Einzelfall abzusichern, wurde vorab ein EPCAM-*Beadsort* durchgeführt und anschließend der prozentuale Anteil der Tumorzellen bestimmt. Die Analysen ergaben, dass der Anteil an Tumorzellen in den für den ELISPOT verwendeten CAF-Passagen (< p7) lediglich 0,2 % betrug. Die Tumorzellkulturen hingegen wiesen 100 % EPCAM-positive Zellen auf.

Es zeigte sich, dass die von uns verwendeten CAF-Lysate spontane IFN- γ -T-Zellantworten induzieren konnten. Interessanterweise unterschieden diese sich in ihrer Stärke (Frequenz der

reaktiven IFN- γ -sekretierenden T-Zellen) nicht signifikant von der durch die korrespondierenden Tumorzellen induzierten T-Zellantworten. Zwar war die Anzahl der untersuchten Patienten ($n = 4$) gering, jedoch gibt dieses Ergebnis einen ersten Hinweis darauf, dass neben den Tumorzellen (Tumor-assoziierte Antigene) auch CAFs – und damit CAF-assoziierte Antigene – zur T-Zellreaktion gegen den Tumor beitragen können. Einhergehend mit den Forschungsergebnissen anderer Gruppen kann also davon ausgegangen werden, dass CAFs durchaus in der Lage sind, T-Zellantworten zu induzieren. So zeigten *in vivo*-Mausexperimente, dass die Vakzinierung mit CAF-Zelllysaten spontane CD8-T-Zellantworten induzierte, was mit einer Reduzierung der CAFs in den Maustumoren sowie einer erhöhten anti-Tumorimmunantwort einherging (Li *et al.*, 2013; Ohshio *et al.*, 2015).

Dass die T-Zellreaktionen gegen die CAF-Lysate von (nach dem EPCAM-*Beadsort*) verbleibenden Tumorzellen induziert wurden, ist eher unwahrscheinlich, da dann die gemessene T-Zellantworten gegen die Tumorzelllysate aufgrund der Akkumulation Tumor-assoziiierter Antigene deutlich höher hätte ausfallen müssen.

Insgesamt unterstreichen diese Forschungsergebnisse, dass nicht nur reaktive T-Zellen gegen Tumor-assoziierte Antigene existieren, sondern auch solche, die gegen CAF-assoziierte Antigene gerichtet sind.

5.1.3 Die Rolle von FAP bei der Induktion spontaner T-Zellantworten

Wie bereits erwähnt, ist bei der Induktion von spontanen T-Zellantworten vermutlich der Aktivierungsstatus bzw. die Expression von damit einhergehenden Proteinen ausschlaggebend. Interessanterweise detektierten wir die stärkste T-Zellantwort gegen das CAF-Lysat, das prozentual die meisten aktivierten Fibroblasten (FAP⁺) enthielt (HNO467-CAFs). Ob und wenn Ja, inwieweit die FAP-Expression mit der induzierten T-Zellantwort korreliert, konnte basierend auf unseren Analysen nicht beantwortet werden. Jedoch zeigten Untersuchungen von Gilboa und Kollegen, dass mit FAP-mRNA transfizierte DCs CD4- und CD8-vermittelte T-Zellantworten induzieren konnten, wohingegen die mit irrelevanter mRNA transfizierten DCs keine T-Zellantworten auslösten (Fassnacht, 2005; Lee *et al.*, 2005). Damit scheint der FAP-Expression eine gewisse Relevanz bei der Induktion einer CAF-vermittelten TC-Antwort zuzukommen. Dass FAP allerdings das einzige CAF-assoziierte Antigen ist, scheint unwahrscheinlich. Vielmehr kann davon ausgegangen werden, dass die T-Zellantwort durch eine Mischung verschiedener – derzeit noch unbekannter – CAF-TAs induziert wurde.

Welches Potenzial solche CAF-assoziierten Antigene haben bzw. welchen Beitrag die antigenspezifischen T-Zellen letztlich zur anti-Tumorimmunantwort *in vivo* leisten können, ist noch weitgehend unerforscht. Dass die T-Zellvermittelte Eliminierung von CAFs *in vivo* funktioniert, konnte durch Verwendung von FAP-reaktiven chimären Antigenrezeptoren eindrücklich demonstriert werden. In transgenen Mausmodellen konnten so modifizierten TCs spezifisch FAP⁺ CAFs töten, was mit Reduktion der Tumormasse und mit einem deutlich verbesserten Überleben der Tiere einherging (Kakarla *et al.*, 2013). Leider induzieren solche allein gegen FAP gerichteten Therapien bereits in murinen Modellen schwere Knochenmarkstoxizitäten (Tran *et al.*, 2013), was mit der FAP-Expression von mesenchymalen Stammzellen erklärt werden könnte. Die eingangs erwähnten Vakzinierungsversuche mit kompletten CAF-Lysaten verursachten hingegen keine Nebenwirkungen (Li *et al.*, 2013; Ohshio *et al.*, 2015).

Zusammengenommen verdeutlichen diese Ergebnisse, dass die Eliminierung der tumorsupportiven CAFs *per se* positive Effekte erzielen kann, es derzeit jedoch noch an Kenntnissen über geeignete CAF-spezifische Zielstrukturen mangelt. Der Identifizierung ebensolcher Zielstrukturen, die darüber hinaus immunogenes Potenzial aufweisen, widmet sich diese Forschungsarbeit.

5.2 Anreicherung und Identifizierung neuer CAF-assoziiierter Antigene

5.2.1 Anreicherung über die PF2D-ELISPOT-Methode

Bislang wurden, abgesehen von FAP (Fassnacht, 2005), in der Literatur keine CAF-assoziierten Antigene identifiziert, was wahrscheinlich hauptsächlich auf den Mangel an geeigneten Methoden zurückgeführt werden kann. Denn dass CAFs durchaus immunogenes Potenzial besitzen, legen unsere Untersuchungen sowie die Untersuchungen von Li *et al.* nahe (Li *et al.*, 2013; Ohshio *et al.*, 2015). Ihre Untersuchungen an murinen Tumormodellen (CT26 Colon Carcinoma (Balb/c), LL/2 Lewis Lung Carcinoma (C57)) zeigten, dass die Vakzinierung mit Zelllysaten von aktivierten (FAP⁺ und α -SMA⁺) Fibroblasten sich positiv auf das Tumorwachstum und das Gesamtüberleben auswirkte. Überdies konnten die Autoren zeigen, dass dafür neben der humoren Immunabwehr vor allem T-Effektorzellen verantwortlich waren (Li *et al.*, 2013). Um nun gezielt CAF-assoziierte Antigene zu identifizieren, haben wir einen neuartigen Ansatz gewählt. Dabei wurde die bereits im Jahr 2010 publizierte PF2D-ELISPOT-Methode (Beckhove *et al.*, 2010) mit einem auf Arraydaten basierenden Filterprozess kombiniert.

Durch Fraktionierung des kompletten CAF-Proteinlysats und anschließender Untersuchung, ob T-Zellantworten gegen die einzelnen Subfraktionen bestehen, gelang es uns, das komplexe CAF-Proteom zu reduzieren und parallel die immunogenen Bestandteile der CAFs anzureichern.

Bei allen Patienten induzierten zahlreiche 1D-PF2D-Fraktionen im IFN- γ -ELISPOT-Assay spontane T-Zellantworten. In solchen signifikant positiven Fraktionen waren immunogene Peptide angereichert. Auch bei Patient HNO741, bei dem initial lediglich eine erhöhte jedoch keine signifikante T-Zellantwort gegen das komplette CAF-Lysat nachgewiesen werden konnte, waren nach der Auftrennung des CAF-Proteoms signifikante T-Zellantworten gegen 5/21 getesteten Fraktionen zu detektieren. Ein möglicher Erklärungsansatz stellt die geringe Anzahl der Replikate ($n = 3$) dar. Damit konnten etwaige Ausreiser nicht ausgeschlossen werden, was zu einer erhöhten Standardabweichung führte und damit die Signifikanz beeinflusste. Eine Erhöhung der Replikate auf vier oder fünf könnte hierbei Abhilfe schaffen. Eine weitere mögliche Erklärung dafür besteht darin, dass Blut von verschiedenen Abnahmen verwendet wurde und in den isolierten T-Zellen des initialen ELISPOT-Assays vergleichsweise mehr regulatorische T-Zellen enthalten waren, die die Aktivierung der T-Gedächtniszellen supprimierten (Côté *et al.*, 2011; McNally *et al.*, 2011).

Die signifikanten 1D-Fraktionen wurden nachfolgend in der 2. Dimension in jeweils 40 Subfraktionen aufgetrennt und die 2D-Fraktionen erneut im IFN- γ -ELISPOT-Assay untersucht. Interessanterweise zeigte sich hier, dass einige der signifikanten 1D-Fraktionen in der 2D keine signifikanten T-Zellantworten mehr auslösten. Eine mögliche Ursache dafür könnte sein, dass in der 1D-Fraktion mehrere schwach immunogene Antigene enthalten waren und die gemessene T-Zellantwort kumulativ induziert worden war. Durch die Subfraktionierung in der 2D wurden die Antigene so stark verdünnt, dass die Konzentration nicht mehr ausreichte, um eine signifikante T-Zellaktivierung hervorzurufen. Hinzu kommt, dass bedauerlicherweise nicht alle 40 Subfraktionen getestet werden konnten, da die Verfügbarkeit des Patientenblutes limitiert war und damit verbunden keine ausreichenden Mengen an DCs und TCs zur Verfügung standen. Insgesamt könnte das dazu geführt haben, dass einige Antigene, die initial in den Gewebe-, Zell- und 1D-PF2D-Lysaten T-Zellantworten auslösten, ausgeschlossen worden waren. Dass diese Beobachtung hingegen auf die unterschiedliche Zusammensetzung der T-Zellen zurückzuführen ist, kann weitestgehend ausgeschlossen werden, da für die Testung der 1D- und 2D-Fraktionen jeweils die Proben verschiedener Blutabnahmen gepoolt

worden waren. So konnte gewährleistet werden, dass die 1D- und 2D-Fraktionen jeweils mit demselben Pool an T-Zellen untersucht wurden.

Weiter fiel auf, dass sich die T-Zellantworten der 1D- und 2D-Fraktionen der einzelnen Patienten nicht signifikant unterschieden; die absolute Höhe der gemessenen T-Zellaktivierung also vergleichbar waren. Jedoch kam es von der 1D zur 2D zu einer Anreicherung von signifikanten Fraktionen, was insgesamt für die Anreicherung von T-Zellantigenen spricht und darüber hinaus auch die Funktionalität der verwendeten Methode bestätigte.

5.2.2 Filterprozess zur Anreicherung CAF-assoziiert exprimierter Strukturen

Die Identifizierung von speziell CAF-assoziierten Strukturen aus den umfangreichen Kandidatenlisten stellte eine besondere Herausforderung dar, da CAFs sich einzig durch den Aktivierungszustand von ihren normalen ruhenden Gegenspielern unterscheiden (Kalluri, 2016). Zwar ist bekannt, dass sich dieser aktivierte Phänotyp in der Expression diverser Marker widerspiegelt (Sund & Kalluri, 2009), jedoch sollten diese, da sie auch von gesunden Körperzellen exprimiert werden, *per se* keine T-Zellreaktionen hervorrufen. Deswegen wäre eine rein auf Literatur basierende Auswahl hier nicht zielführend gewesen. Dies zeigten auch die Analysen von Fassnacht *et al.* zur Identifizierung von Stroma-assoziierten Antigenen (Fassnacht, 2005). Die Gruppe wählte bekannte CAF- bzw. Tumorstroma-assoziiert exprimierte Gene basierend auf der Literatur aus und untersuchte deren immunogenes Potenzial indem sie DCs mit der mRNA der Kandidaten transduzierten und nachfolgend die T-Zellantworten untersuchten. Neben FAP beinhaltete die Auswahl MMP9, MMP14 und LAMP1, jedoch konnten letztlich nur FAP-reaktive T-Zellen nachgewiesen werden (Fassnacht, 2005).

Die Grundlange unserer Auswahl bildete die Kombination zweier Datensätze: Der LCM-basierter *in situ*-Datensatz, der die Expressionsdaten von dissezierten Tumorstroma-, Tumor-, sowie Normalstromaproben enthielt und analog dazu der eingangs bereits beschriebene *in vitro* mRNA-Expressionsdatensatz bestehend aus 15 CAFs und korrespondierenden Tumorzellkulturen. Dieser wurde um insgesamt 10 Gingivafibroblastenkulturen erweitert. Zwar existieren einige öffentlich verfügbare LCM-basierte *in situ*-Datensätze, jedoch waren diese für unsere Belange nicht nutzbar, da die meisten Autoren sich entweder auf dissezierte Tumoreale (Hasina *et al.*, 2008), den Unterschied zwischen Tumorealen und normalen Epithelien oder auf den Unterschied zwischen Tumor- und Tumorstromaarealen (Edlund *et al.*, 2012) fokussierten. Die wenigen öffentlich verfügbaren Datensätze, die zusätzlich Expressionsanalysen von dysplasiefreien Normalstromaproben enthielten, untersuchten ande-

re Tumorentitäten wie Brust- (Oh *et al.*, 2015) oder Kolonkarzinome (Calon *et al.*, 2015) und waren damit für die Auswahl von Tumorstroma-assoziierten Antigenen in HNSCC ebenfalls ungeeignet.

Dennoch wurden einiger dieser Analysen herangezogen, um einen ersten Eindruck über Stroma-assoziiert exprimierte Gene zu erhalten. In Übereinstimmung mit diesen Datensätzen konnten auch wir eine Anreicherung von Tumorstroma-assoziierten Genen erzielen. Das bestätigt zum einen, dass die Durchführung der LCM methodisch funktioniert hat, und dass wir dadurch, obwohl unser Datensatz eher klein war, in der Lage waren gezielt Stroma-assoziierte Gene anzureichern. Darüber hinaus zeigen diese Analysen auch, dass einige dieser Stroma-assoziierten Gene gleichermaßen in verschiedenen Tumorentitäten identifiziert werden konnten. Damit scheinen die Tumorstromata unterschiedlicher Tumorentitäten gewisse Ähnlichkeiten aufzuweisen. Inwieweit diese therapeutisch nutzbar sind, ist allerdings noch unzureichend erforscht.

Basierend auf den präprozessierten mRNA-Expressionsdaten wurden drei Vergleiche untersucht und diese in die Intersektion einbezogen. Alle Gene, die in den CAFs und im Tumorstroma gleichermaßen exprimiert waren, bildeten die erste Gruppe (22.435 Gene, 71 % bei $p > 0,05$, kein FC). Da das Tumorstroma neben den CAFs auch Immunzellen, Endothelzellen, Perizyten und Extrazellulärmatrix enthält, diente dieser erste Vergleich dem Ausschluss der damit assoziierten Gene und parallel der Anreicherung von gemeinsam in CAFs und Stroma exprimierten Genen. Allerdings beinhaltete diese Gruppe noch ubiquitär exprimierte Gene. In der zweiten Gruppe (TSTR vs. NSTR) wurden dann solche Gene ausgeschlossen, die zwar Stroma-spezifisch nicht aber Tumorstroma-spezifisch exprimiert wurden (5.650 differentiell exprimierte Gene (18,1 %) bei $p < 0,1$). Um auszuschließen, dass dieser Unterschied zwischen Tumorstroma- und Normalstroma allein durch die erhöhte Immunzellinfiltration, die bei HNSCC häufig auf das Tumorstroma begrenzt ist, bedingt wurde, wurde ein weiterer Vergleich hinzugezogen. Der Vergleich CAFs versus NFs (10.390 differentiell exprimierte Gene (33,24 %) bei $p < 0,1$). Dieser spiegelt zum einen den aktivierten Phänotyp wieder und zusätzlich konnten mit dieser Intersektion Immunzell-assoziierte Gene ausgeschlossen werden, die in den *in situ*-Analysen enthalten waren.

Insgesamt wurden die Schwellenwerte für die differentielle Expression mit $p \leq 0,1$ und \log_2 FC $> 0,5$ relativ moderat gewählt. Dem lag zugrunde, dass in die Intersektion nur die 852 Gene einbezogen wurden, die massenspektrometrisch identifiziert worden waren. Durch die

Intersektionen reduzierte sich die Liste drastisch auf 36 potentielle Kandidaten. Interessanterweise waren unter diesen, mit Ausnahme von FAP, keine der typischen Aktivierungsmarker, wie α -SMA, NG2 oder CD90. Zudem ist FAP als einziges Protein die absolute Schnittmenge. Diese Beobachtung gilt allerdings nur, wenn man sich auf die 852 putativ immunogenen Proteine beschränkt, betrachtet man hingegen alle differenziell exprimierten Gene, dann inkludierten diese auch weitere bereits bekannte Aktivierungsmarker. Dies bestätigt unsere Vorgehensweise in zweierlei Hinsicht: Erstens gilt FAP als *der* Marker für irreversibel aktivierte Fibroblasten (Kalluri, 2016) und zweitens ist FAP aktuell das einzig bekannte CAF-assoziierte Antigen (Fassnacht, 2005). Dies legt nahe, dass erstens CAF-assoziierte Gene angereichert wurden und diese zweitens immunogen zu sein scheinen. Neben FAP wiesen weitere Kandidaten eine bekannte Assoziation mit aktivierten Fibroblasten bzw. Tumorstroma auf, wie beispielsweise Thrombosponin 2 (*THBS2*), *Stromal Cell-derived Factor Receptor 1 (SDFR1)*, Palladin (*PALLD*) (Azatov *et al.*, 2016), Profilin (*PFN1*) oder Cofilin 1 (*CLF1*) (Ho *et al.*, 2014). Deren immunogenes Potenzial ist aktuell allerdings noch unerforscht. Die restlichen Kandidaten hingegen waren im Kontext von Fibroblasten gänzlich unbeschrieben.

Die abschließenden immunhistochemischen Färbungen der Antigene (auf die im weiteren Verlauf noch näher eingegangen wird) konnte für alle der verifizierten Antigene eine CAF-assoziierte Expression bestätigen. Diese war jedoch nur im Fall von *THBS2* und *DNAJB11* auf das Tumorstroma begrenzt. Antigene wie *NANS*, *TXNDC17* oder *HIST2H2AC* hingegen wurden auch von den Tumorzellen selbst exprimiert. Diese Beobachtung zeigt, dass es auch mit unserer Methode nicht gelungen ist, rein CAF-spezifisch exprimierte T-Zellantigene zu identifizieren. Für die Anwendung des jeweiligen Peptids im Rahmen einer Vakzinierung ist die ubiquitäre Expression des Antigens im Tumor und im Stroma jedoch von großem Vorteil, da so parallel beide Zellpopulationen adressiert werden könnten.

Denkbare Abwandlungen unserer Methode wären beispielsweise, den Gradienten der Massenspektrometrie von einer Stunde auf drei Stunden zu verlängern, um mehr potenzielle immunogene Kandidaten identifizieren zu können, die dann in den Filterprozess einfließen könnten. Eine weitere, umgekehrte Herangehensweise könnte sein, basierend auf den Intersektionsstudien CAF-spezifisch exprimierte Gene zu identifizieren und anschließend deren immunogenes Potenzial über eine mRNA-Bibliothek zu verifizieren.

Darüber hinaus kann dieser, in erster Linie für die Auswahl potentieller CAF-Antigene aus

den massenspektrometrisch identifizierten Kandidaten, erstellte Datensatz für vielfältige weitere Fragestellungen genutzt werden. Beispielsweise könnten darauf basierend weitere CAF-Marker identifiziert werden, die dann analog zu FAP hinsichtlich ihrer therapeutischen Eignung geprüft werden könnten. Vorstellbar wären hier, je nach Art des Zielmoleküls, CAF-spezifische chimäre Antigenrezeptoren (CAF-CARs), monoklonale Antikörpertherapien oder inhibierende Peptide. Neben therapeutisch relevanten Zielmolekülen können mit Hilfe dieses Datensatzes auch Stroma-assoziierte prognostische Marker identifiziert werden. Darüber hinaus eignet er sich aber auch zur Untersuchung von Ko-Expressionsnetzwerken zwischen Tumor- und Tumorstroma oder zur Aufklärung von assoziierten Signalwegen. Eine gemeinsame Auswertung der Rohdaten mit den Rohdaten anderer Datensätzen, könnte ein erster Schritt in Richtung einer Tumorstromasignatur sein, die Aufschluss über die Gemeinsamkeiten des Tumorstromas verschiedener Tumorentitäten geben könnte.

5.3 Eignung der identifizierten Kandidaten als neue CAF-TAs

Zur Validierung dieser 36 Kandidaten wurden insgesamt 44 SLPs (50 AS) synthetisiert. Viele Studien beschränken sich dabei auf den häufigsten HLA-Typ HLA-A*02 (49,9 %), was jedoch den Kreis der späteren Patienten enorm einschränkt. Um dies zu umgehen, wurden die hier verwendeten Peptide basierend auf den fünf häufigsten HLA-Typen in Deutschland (Tabelle 25) prädiziert.

Die Validierung in den Ursprungspatienten HNO432, HNO467, HNO722 und HNO741 ergab signifikante T-Zellreaktionen gegen 15 der 44 Peptide. Dieses Ergebnis unterstreicht, dass die Stroma- bzw. CAF-assoziierte Expression eines Gens/Proteins eine zwingende aber keineswegs hinreichende Bedingung darstellt, um als Stroma-assoziiertes Antigen gelten zu können. Nur 15 der getesteten 44 Peptide konnten T-Zellantworten induzieren. Zudem konnte keines dieser 15 Peptide in mehr als einem Ursprungspatienten T-Zellantworten auslösen, obgleich die ausgewählten Kandidaten in immunogenen Fraktionen aller Patienten identifiziert worden waren. Dieses Ergebnis zeigt, dass auch wenn Proteine von Tumoren aller Patienten exprimiert werden, es nicht zwangsweise bedeuten muss, dass diese auch in allen Patienten messbare T-Zellantworten induzieren können und damit *per se* immunogen sind. Dies ist ein erster Hinweis darauf, dass nicht nur Tumor-assoziierte Antigene patientenindividuelle Antworten induzieren können, sondern auch CAF-assoziierte Antigene. Diese Ergebnisse lassen die Mutmaßung zu, dass, um in einer breiteren Patientengruppe wirksam zu sein, auch eine CAF-Peptidvakzine verschiedene Antigene adressieren sollte.

Interessanterweise vermochte auch die von uns (basierend auf dem Prädiktionsalgorithmus der Datenbank IEDB) vorhergesagte FAP-Peptidsequenz keine T-Zellantwort zu induzieren. Dies ist wahrscheinlich auf die Sequenz des Peptids zurückzuführen, die nicht ausreichend immunogen zu sein scheint. Dass FAP keine antigene Struktur darstellt, kann basierend auf den bereits erwähnten Forschungsergebnissen von Fassnacht *et al.* weitestgehend ausgeschlossen werden. Diese Gruppe transfizierte DCs mit u.a. FAP-mRNA und konnten darüber eine gezielte Aktivierung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen nachweisen (Fassnacht, 2005). Dass auch für weitere Kandidaten AS-Sequenzen prädiziert wurden, die sequenzbedingt keine T-Zellantworten auslösen können, kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden.

Die 15 Peptide, die T-Zellantworten auslösten, wurden jedoch anschließend weiter untersucht. Letztlich verblieben fünf Peptide/Antigene, die T-Zellantworten in 15 bis 37 % der HNSCC-Tumorpatienten induzierten, gegen die jedoch in gesunden Individuen (0 %) keine reaktiven T-Zellen nachgewiesen werden konnten. Damit ist es unserer Arbeitsgruppe erstmals gelungen, über FAP hinaus immunogene Bestandteile des Tumorstromas zu identifizieren, die nicht von gesunden, tumorfreien Individuen erkannt werden.

5.3.1 Immunogenität, Expression und physiologische Funktion der Antigene

Die Expression der allermeisten in den vergangenen Jahren identifizierten immunogenen Antigene ist auf maligne Tumorzellen beschränkt. Damit sind auch die Richtlinien zur Beurteilung von Antigenen auf Tumorantigene zugeschnitten (Cheever *et al.*, 2009) und eignen sich dadurch nur bedingt zur Beurteilung Tumorstroma-assoziiertes Antigene. Dennoch wurde versucht, einige der Kriterien nach Cheever *et al.* zu berücksichtigen. Nachfolgend werden die verbleibenden fünf Antigene hinsichtlich ihrer Immunogenität, ihres Expressionslevels im Tumor, ihrer Spezifität (hier die Stroma- bzw. CAF-assoziierten Expression) sowie hinsichtlich deren pathophysiologischer Funktion in der Tumorigenese näher beleuchtet. Basierend auf diesen Kriterien werden die fünf Antigene nachfolgend nach absteigender Relevanz diskutiert: TXNDC17 > DNAJB11 > NANS > THBS2 > HIST2H2AC.

5.3.1.1 Untersuchungen zu TXNDC17

Das Gen TXNDC17 kodiert das 14 kDa große Protein *Thioredoxin domain-containing protein 17* (TRP14). Namensgebend ist die zwei Cysteinreste beinhaltende Thioredoxin-Domäne, welche die Redoxaktivität bedingt (Collet & Messens, 2010). TRP14 wurde erst kürzlich iden-

tifiziert und wird funktionell der Familie der Thioredoxine (Trx) zugeordnet (Jeong *et al.*, 2004). Diese zeichnen sich durch ein katalytisches Zentrum mit einer konservierten Aminosäuresequenz aus (-Trp-Cys-Gly-Pro-Cys-Lys-). Durch reversible Oxidation der beiden Cysteine (Trx-(SH)₂) entsteht eine Disulfidbrücke (Trx-S₂), wodurch das jeweilige Substrat reduziert wird. Die oxidierte Thioredoxinform (Trx-S₂) kann anschließend durch eine Thioredoxinreduktase (TrxR) und NADPH wieder zu Trx-(SH)₂ reduziert werden und erlangt so ihre Reaktivität zurück (Collet & Messens, 2010). Da bislang noch unklar ist, welches die genauen Substrate von TRP14 sind, wird im Folgenden lediglich auf die biologische Aktivität von Thioredoxinen im Allgemeinen eingegangen.

Das Peptid TXNDC17 wurde hinsichtlich seiner Immunogenität in 19 HNSCC-Tumorpatienten und neun gesunden Spendern untersucht. Dieses Peptid induzierte eine hochfrequente Ansprechrate von fast 40 %. Zudem war die Anzahl der detektierten reaktiven T-Zellen verglichen mit dem Kontrollpeptid IgG bei einigen Patienten 40-fach höher. Damit stellt das TXNDC17-Peptid hinsichtlich der Immunogenität das vielversprechendste der hier untersuchten Antigene dar.

Auch die Expressionsanalysen der beiden *in situ*-Datensätze ergaben eine deutlich erhöhte Expression im Tumor verglichen mit den Normalschleimhautproben. Erhöhte Thioredoxinlevel konnten bereits in mehreren Tumorentitäten nachgewiesen werden und sind mit beschleunigtem Zellwachstum und Chemoresistenz assoziiert und gehen mit schlechterem Gesamtüberleben einher (Yamada *et al.*, 1996; Powis *et al.*, 2000). Dies konnte kürzlich auch für TXNDC17 in Ovarialkarzinomen bestätigt werden. Hier waren erhöhte TXNDC17-mRNA-Expressionslevel *in situ* und *in vitro* mit Chemoresistenz assoziiert und gingen mit einer signifikant schlechteren Prognose einher (Zhang *et al.*, 2015; 2016). Diese Beobachtungen sind auf die physiologische Funktion der Thioredoxine zurückzuführen. Intrazellulär fungieren sie als Wachstumsfaktoren sowie Antioxidantien und regulieren wichtige zelluläre Prozesse wie die Transkription oder die Apoptose (Jeong, 2003). Daneben werden Thioredoxine auch über einen bislang unbekanntem Mechanismus sekretiert. Für Lymphozyten (Ericson *et al.*, 1992), Hepatozyten (Rubartelli *et al.*, 1995) sowie für Fibroblasten und Tumorzellen (Rubartelli *et al.*, 1992; Powis *et al.*, 2000) konnte überdies para- und autokrine Wachstumsstimulation nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass auch CAFs erhöhte Thioredoxinlevel aufweisen und über parakrine Stimulation das Tumorzellwachstum aktiv beeinflussen könnten. Damit

einhergehend zeigten auch unsere IHC-Färbungen, dass TXNDC17 nicht nur von den Tumorzellen selbst exprimiert wird, sondern auch von den Stromazellen. TXNDC17-reaktive T-Zellen sollten also auf beide Zellpopulationen wirken können.

Aufgrund der Relevanz von Thioredoxinen für das Tumorstadium werden diese aktuell bereits als therapeutische Zielstrukturen diskutiert (Biaglow & Miller, 2014). Die therapeutische Nutzung eines TXNDC17-Peptids könnte hierbei eine zusätzliche Möglichkeit darstellen.

Insgesamt ist es uns mit TXNDC17 gelungen ein Antigen zu identifizieren, das hochfrequente T-Zellantworten in HNSCC-Patienten nicht aber in gesunden Spendern induziert. Allerdings handelt es sich dabei nicht um ein CAF-spezifisch exprimiertes Antigen, sondern um ein sogenanntes *Shared Antigen*, das sowohl von Tumorzellen als auch von CAFs exprimiert wird.

5.3.1.2 Untersuchungen zu DNAJB11

DNAJB11 (*DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member B11*) fungiert als Co-Chaperon des Hsp70-Orthologs BiP von *Escherichia coli* (Binder *et al.*, 2014) und ist auch unter den Proteinnamen ERdj3 oder HEDJ bekannt (Yu *et al.*, 2000). DNAJB11 bindet neu-translatierte, noch ungefaltete Proteine und schützt diese so vor der Aggregation. Dieser stabilisierte DNAJB11-Proteinkomplex wird dann von BiP erkannt und die korrekte Proteinfaltung vollzogen (Shen & Hendershot, 2005).

Die Immunogenitätsanalyse des DNAJB11-Peptids zeigte in 19 getesteten HNSCC-Patienten eine Ansprechrate von > 20 %, wobei die Anzahl der reaktiven T-Zellen, verglichen mit dem IgG-Kontrollpeptid, bis zu 40-fach erhöht war. Dementgegen konnte in keinem der getesteten gesunden Individuen DNAJB11-spezifische T-Zellantworten nachgewiesen werden.

Neben der Immunogenität sind das Expressionslevel sowie die Anzahl der Antigen-positiven Zellen in einem Tumor ausschlaggebend für die Eignung eines Antigens (Cheever *et al.*, 2009). Für DNAJB11 ergaben die von uns durchgeführten *in silico*-Analysen von zwei unabhängigen mRNA-Datensätzen eine signifikant höhere Expression im Tumorgewebe verglichen mit Normalschleimhaut. In Übereinstimmung mit unseren *in silico*-Analysen, zeigen auch Untersuchungen von Magentumoren, dass diese sich durch ein erhöhtes Expressionslevel von ER-Chaperonen auszeichnen (Tsutsumi *et al.*, 2006). Durch *in vitro*-Experimente fanden die Autoren zudem heraus, dass Magentumorzellen sich durch gesteigerte Chaperonlevel vor therapeutisch induzierter Apoptose schützen können (Tsutsumi *et al.*, 2006). Erklärt werden können erhöhte Chaperonlevel damit, dass bei zellulärem Stress, das Level von sekretorischen Proteinen innerhalb des ERs ansteigt, was letztlich dazu führt, dass die Expression von

Chaperonen sowie Co-Chaperonen drastisch gesteigert wird (Lee, 2001). Inwieweit sich auch die tumorsupportiven CAFs diesen Mechanismus zunutze machen, bleibt unbeantwortet. Es wäre aber durchaus denkbar, da auch aktivierte Fibroblasten im Tumor zellulärem Stress ausgesetzt sind und als Konsequenz die Expression von Chaperonen und Co-Chaperonen steigern könnten. Damit einhergehend bestätigten auch die IHC-Färbungen der HNSCC-Gewebe eine Tumorstroma-assoziierte Expression von DNAJB11. Interessanterweise wiesen die analysierten Tumore eine klar Tumorstroma-assoziierte DNAJB11-Expression auf. Die Tumorzellen der untersuchten HNSCC-Gewebe hingegen zeigten keine Färbung, obwohl aufgrund der Literatur eine Tumorzell-assoziierte DNAJB11-Expression zu erwarten gewesen wäre. Inwieweit sich diese Ergebnisse erhärten lassen, müssen weitere Färbungen an einem größeren Kollektiv zeigen.

Die *Lamina propria* der untersuchten Normalschleimhäute wiesen keine DNAJB11-Expression auf. Damit erfüllt DNAJB11 ein weiteres Kriterium nach Cheever *et al.* (Cheever *et al.*, 2009), wonach DNAJB11 tumorspezifisch exprimiert wird.

Dass es tatsächlich die CAFs sind, die DNAJB11 exprimieren, konnte letztlich durch Immunfluoreszenzfärbungen bestätigt werden. Mittels dieser Methode konnte auch die subzelluläre Lokalisation bestätigt werden, die sich weitgehend auf das Lumen des rauen ERs beschränkt.

Dass sich DNAJB11 grundsätzlich als Zielstruktur eignet, zeigen Studien, die durch gezielte Inhibierung von Chaperonen die Tumorzellproliferation supprimieren konnten (Wen & Damania, 2010). Auch im Kontext immuntherapeutischer Anwendungen werden Chaperon-Inhibitoren diskutiert (Neckers & Workman, 2012). In Melanomen konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die gezielte Inhibierung des Chaperons Hsp90 durch den Hsp90-Inhibitor iHSP90 eine verstärkte intrazelluläre Antigenexpression und überdies auch eine erhöhte MHC-I- und MHC-II-Expression der Tumorzellen zur Folge hatte (Haggerty *et al.*, 2014). Zusammengenommen führt dies zu einer erhöhten Antigenpräsentation und damit verbunden zur Induktion einer erhöhten tumorspezifischen T-Zellantwort (Haggerty *et al.*, 2012; 2014). Die Frage, inwieweit auch Co-Chaperone wie DNAJB11 hierbei eine Rolle spielen, und ob sich auch die Zellen des tumorsupportiven Stromas als Zielstrukturen von Chaperoninhibitoren eignen, bleibt weiter offen.

Insgesamt wäre aufgrund der Überexpression von DNAJB11 in Tumoren und der Immunogenität des DNAJB11-Peptids eine therapeutische Nutzung desselben durchaus denkbar.

5.3.1.3 Untersuchungen zu NANS

NANS kodiert das im Zytosol aktive Enzym N-Acetylneuraminsäuresynthase, das die Biosynthese der Sialinsäure N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) aus N-Acetylmannosamin-6-phosphat oder Mannose-6-Phosphat katalysiert (Lawrence *et al.*, 2000). Sialinsäuren sind Monosaccharide, die als terminale Komponente von Glykoproteinen einen wichtigen Bestandteil der Glykokalyx eukaryotischer Zellen bilden. Dort verhindern sie den Abbau der extraterminalen Proteindomänen und spielen überdies eine wichtige Rolle bei Zell-Zell- bzw. Rezeptor-Liganden-Interaktionen (Bi & Baum, 2009).

Analog zu DNAJB11 wurde auch das NANS-Peptid zunächst in einer Kohorte gesunder Spender (n = 9) getestet. Im IFN- γ -ELISPOT-Assay ließen sich bei tumorfreien Individuen keine reaktiven T-Zellen nachweisen, wohingegen das NANS-Peptid in > 20 % der HNSCC-Tumorpatienten eine T-Zellantwort auslöste. Insgesamt induzierte das NANS-Peptid verglichen mit dem DNAJB11-Peptid aber eine geringere T-Zellantwort. Die Anzahl der reaktiven T-Zellen lag hier, relativ zur Kontrolle betrachtet, maximal 4-mal höher.

Die anschließenden *in silico*-Untersuchungen der NANS-Expression in HNSCC-Tumoren und Normalschleimhautproben zeigten für den TCGA-Datensatz keine signifikant erhöhte Expression in den Tumorgeweben. Dementgegen konnten in den Tumoren des zweiten öffentlich verfügbaren Datensatzes, verglichen mit der Normalschleimhaut, deutlich erhöhte NANS-Expressionslevel nachgewiesen werden. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen ist auch in der Literatur beschrieben, dass Tumorzellen vermehrt Neu5Ac exprimieren (Go *et al.*, 2007). Die Autoren konnten nachweisen, dass Tumorzellen unter *in vitro*-Hypoxiebedingungen die *de novo*-Synthese von freien Sialinsäuren wie Neu5Ac und sowie an der Sialinsäurebiosynthese beteiligter Enzyme verstärken (Go *et al.*, 2007). Solche erhöhten Mengen Sialinsäure im Tumor gehen zudem mit erhöhter interzellulärer Adhäsion einher und können damit zur Angiogenese und Metastasierung beitragen (Dimitroff *et al.*, 1999). Untersuchungen, inwieweit sich eine gesteigerte Sialinsäuresynthese auf CAFs auswirkt, fehlen aber aktuell noch. Die IHC-Färbungen bestätigten jedoch eine Stroma-assoziierte Expression von NANS. Diese schien allerdings nicht auf CAFs limitiert zu sein. Histopathologische Untersuchungen ergaben, dass auch die im Tumorstroma akkumulierten Lymphozyten eine verstärkte NANS-Expression aufwiesen. Damit einhergehend spielen Sialinsäuren auch im Kontext der Immunologie eine bedeutende Rolle. So sind beispielsweise DCs stark mit Sialinsäuren dekoriert, wobei der Abbau zur Reifung der DCs führt (Videira *et al.*, 2007). Bei

T-Zellen geht der Abbau von Sialinsäuren zudem mit einer erhöhten Expression von MHC-I- und MHC-II-Rezeptoren sowie kostimulatorischen Molekülen einher und bedingt so eine erhöhte Aktivierung von antigenspezifischen CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen (Silva *et al.*, 2015). Inwieweit eine erhöhte Synthese von Sialinsäuren bei Tumorzellen oder auch Krebs-assoziierten Fibroblasten in Zusammenhang mit verminderter MHC-Expression steht, ist derzeit noch offen.

Erste Hinweise, dass die NANS-Expression in Fibroblasten eine wichtige Rolle spielt, gibt eine kürzlich in Nature erschienene Arbeit. Die Autoren identifizierten bei einer Gruppe Individuen mit *Intellectual Development Disorder* (IDD) biallelische Mutationen im NANS-Gen (van Karnebeek *et al.*, 2016). Bei menschlichen Individuen steht diese Krankheit mit Entwicklungsstörungen und Skelettanomalien in Zusammenhang (Luckasson *et al.*, 2001). In den Fibroblasten der untersuchten Patienten, verglichen mit denen der gesunden Eltern, wurden reduzierte Mengen des Enzyms NANS detektiert und damit einhergehend ein erhöhtes Level des Substrats N-Acetylmannosamin-6-Phosphat im Blut (van Karnebeek *et al.*, 2016). Damit einhergehend resultierte der *Knockdown* von NANS in Zebrafischembryos in einer abnormen Skelettentwicklung (van Karnebeek *et al.*, 2016). NANS scheint also auch in den mesenchymalen Zellen des Knochenmarks exprimiert zu sein und damit neben der Modulation von Zelladhäsion und Rezeptor-Liganden-Interaktionen auch eine Funktion bei der Knochenentwicklung zu haben. Hier werden gewisse Parallelen zu FAP deutlich, das ebenfalls von den mesenchymalen Zellen des Knochenmarks exprimiert wird (Mishra *et al.*, 2008; Tran *et al.*, 2013).

Ob NANS in Krebs-assoziierten Fibroblasten stärker exprimiert ist und ob dies physiologische Konsequenzen nach sich zieht, konnte basierend auf der aktuellen Literatur nicht abschließend geklärt werden. Unabhängig davon zeigen unsere Analysen jedoch, dass NANS sowohl von CAFs als auch von Tumorzellen exprimiert wird. Ob sich diese Beobachtungen auch in einem größeren Patientenkollektiv bestätigen lassen, müssen künftige Untersuchungen zeigen, beispielsweise im Rahmen einer IHC-Färbung eines TMAs mit HNSCC-Gewebe. Falls sich in einem größeren Kollektiv verifizieren lässt, dass NANS auch von Tumorzellen exprimiert wird, so könnten NANS-spezifische T-Zellen neben den tumorsupportiven CAFs auch die Tumorzellen selbst adressieren.

5.3.1.4 Untersuchungen zu THBS2

Die Immunogenitätsanalysen des THBS2-Peptids lieferten die Höhe der T-Zellantworten betreffend mit DNAJB11 und NANS vergleichbare Ergebnisse. Bei 16 % der getesteten Tumorpatienten konnten reaktive T-Zellen gegen das THBS2-Peptid nachgewiesen werden. Analog zu den anderen fünf Peptiden induzierte auch das THBS2-Peptid in keinem (0/9) der tumorfreien Individuen eine signifikante T-Zellantwort.

Die mRNA-Expressionsanalysen zeigten in beiden unabhängigen *in silico*-Analysen, dass THBS2 signifikant höher in Tumoren exprimiert wird als in den normalen Vergleichsgeweben. Die IHC-Färbungen zeigten eine sehr starke, homogene Färbung, die ausschließlich auf die Tumorstromaareale limitiert war. Damit ist THBS2 das einzige Antigen, das rein Stromaspezifisch exprimiert zu sein scheint. Die erhöhten THBS2-mRNA-Expressionlevel im Tumor sind also rein durch Stromazellen bedingt. Das Expressionsmuster kann auf die physiologische Funktion von THBS2 zurückgeführt werden. Thrombospondine sind evolutionär konservierte kalziumbindende Glykoproteine, die sekretiert werden und mit anderen Proteinen der Extrazellulärmatrix interagieren (Bornstein, 2001). Damit sind sie hauptsächlich im Extrazellulärraum, im Zytosol und im ER lokalisiert (Binder *et al.*, 2014). Thrombospondin 2 (TSP2) zählt – aufgrund der funktionellen Ähnlichkeit – ebenso wie SPARC, Tenascin C oder Osteopontin zu den matrizellulären Proteinen. Diese werden hauptsächlich von Fibroblasten während der Entwicklung, des Wachstums und bei Gewebsverletzungen exprimiert. In Übereinstimmung mit den von uns durchgeführten Expressionsanalysen werden sie von normalen ausdifferenzierten Geweben nur in sehr geringen Mengen exprimiert (Bornstein, 2001). Gemeinsames Merkmal matrizellulärer Proteine ist, dass sie mit bestimmten Oberflächenrezeptoren, Chemokinen, Wachstumsfaktoren und Proteasen interagieren und darüber hinaus ganz unterschiedliche biologische Funktionen erfüllen können (Bornstein, 1995). So spielt TSP2 eine wichtige Rolle bei der Zell-Matrix-Adhäsion, Wundheilung, Entzündungsprozessen und fungiert überdies als Angiogenesehemmer (Bornstein, 1995; 2001). Es konnte gezeigt werden, dass Fibroblasten von TSP2-defizienten Mäusen eine verminderte Adhäsionsfähigkeit besaßen. Diese Fibroblasten sekretierten verglichen mit normalen Fibroblasten erhöhte Mengen der Matrixmetalloproteinase 2 (MMP2) (Kyriakides *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2000). Die Autoren konnten den zugrundeliegenden Mechanismus aufdecken, der darauf basiert, dass Thrombospondin 2 normalerweise MMP2 bindet, was die lysozymale Degradierung dieses Komplexes zur Folge hat (Yang *et al.*, 2001). Bei Verlust von TSP2

werden also erhöhte Mengen MMP2 sekretiert, was dann die Zell-Matrix-Interaktion beeinträchtigt. Damit einhergehend konnte gezeigt werden, dass die Vektor-induzierte Überexpression von TSP2 in Tumorzellen mit verringerter Dichte und Größe von Blutgefäßen im murinen Modell einherging – eine erhöhte TSP2-Expression also antiangiogene Wirkung hat (Streit *et al.*, 1999). In nachfolgenden Experimenten gelang es den Autoren, Fibroblasten retroviral zu transduzieren, sodass diese vermehrt TSP2 exprimierten. Diese wurden dann auf künstliche Biopolymergerüste ausgesät und in Mäuse transplantiert, was zu erhöhten TSP2-Mengen im Blut führte. Das Ergebnis war, dass die erhöhten Mengen des zirkulierenden TSP2 sowohl das Tumorwachstum als auch die Angiogenese inhibierte (Streit *et al.*, 2002). Damit stellt Thrombospondin 2 ein vielversprechendes Molekül für eine anti-angiogene Zelltherapie dar. Vor diesem Hintergrund muss allerdings in Betracht gezogen werden, dass sich die gezielte T-Zell-basierte Eliminierung von TSP2-positiven CAFs ggf. positiv auf die Angiogenese auswirken könnte und damit letztlich die Tumorprogression fördern könnte.

5.3.1.5 Untersuchungen zu HIST2H2AC

Das Gen HIST2H2AC kodiert das Histon H2A Typ 2C, welches zusammen mit drei weiteren Histonen (H2B, H3, H4) ein Histonoktamer bildet und damit die Verpackungseinheit der DNA, das Nukleosom, darstellt. Damit erklärt sich auch die subzelluläre Lokalisation von HIST2H2AC im Zellkern (Binder *et al.*, 2014). Durch vielfältige Histonmodifikationen, wie Methylierung, Phosphorylierung oder Acetylierung wird die Transkription von Genen reguliert.

Das HIST2H2AC-Peptid induzierte in > 16 % der Tumorpatienten eine Antwort, wobei die Anzahl der reaktiven T-Zellen pro Patient geringer ausfiel als bei NANS oder DNAJB11. Im Vergleich zum IgG-Kontrollpeptid wurden durch das HIST2H2AC-Peptid durchschnittlich dreimal soviel TCs induziert. Analog zu allen zuvor diskutierten Peptiden konnten auch für HIST2H2AC in keinem der gesunden Spender reaktive TCs nachgewiesen werden.

Obwohl die physiologische Funktion von HIST2H2AC nahelegt, dass dieses Gen in allen teilungsaktiven Zellen exprimiert wird, gibt die Datenbank *The Human Protein Atlas* für dieses Gen lediglich eine Expression von mesenchymalen Zellen des Knochenmarks sowie Immunzellen an (Uhlen *et al.*, 2015). Dass wir für dieses Gen basierend auf unserem Filterprozess eine CAF-assoziierte Expression gefunden haben, geht mit diesen Ergebnissen und mit den Analysen von Direkze und Mishra einher, wonach die Progenitorzellen von Krebs-assoziierten Fibroblasten unter anderem mesenchymale Stammzellen des Knochenmarks sein können (Direkze *et al.*, 2004; Direkze & Alison, 2006; Mishra *et al.*, 2008).

Die mRNA-Expressionsanalysen des TCGA-Datensatzes ergaben eine signifikant erhöhte HIST2H2AC-Expression in den HNSCC-Geweben verglichen mit den Normalstromaproben. Dies könnte mit der erhöhten proliferativen Aktivität der Tumorzellen erklärt werden. Ob eine erhöhte Proliferationsrate tatsächlich mit einer erhöhten Histonexpression einhergeht, ist wissenschaftlich allerdings nicht bewiesen. Die IHC-Färbungen bestätigten das erwartete subzelluläre Expressionsmuster. Dabei zeigte sich eine homogene Kernfärbung sowohl der Tumorzellen als auch der Zellen des Tumorstromas. Jedoch konnte das erhöhte HIST2H2AC-mRNA-Expressionslevel in Tumoren verglichen mit Normalgewebe auf Proteinebene nicht bestätigt werden. In den untersuchten Normalschleimhäuten wurde HIST2H2AC sowohl von den Kernen der Epithelschicht als auch von den Zellen der darunterliegenden Lamina propria exprimiert. Die Unterschiede zwischen der mRNA- und Proteinexpression könnten auf die zum Teil starke Immuzellinfiltration von HNSCC-Geweben verglichen mit den Normalschleimhautproben zurückzuführen sein. Was bedeuten würde, dass die erhöhte HIST2H2AC-mRNA-Expression in den HNSCC-Tumorgeweben auf eine erhöhte Immuzellinfiltration zurückzuführen wäre. Da die Expression von HIST2H2AC nicht Tumorstromaspezifisch ist, es zudem auch in den Zellen der gesunden Vergleichsgewebe exprimiert wird und die physiologische Funktion als eines der *Core*-Histone eine ubiquitäre Expression in allen Körpergeweben erwarten lässt, muss die Anwendung des HIST2H2AC-Peptids als therapeutisches Zielmolekül stark in Frage gestellt werden.

6 AUSBLICK

Weitere Schritte in der Charakterisierung, der von uns indentifizierten Tumorstroma-assoziierten Zielstrukturen, sind die Art der T-Zellantwort, die Peptidspezifität sowie die reaktiven T-Zellsubpopulationen mittels *Cytokine Secretion Assay* und anschließenden FACS-Analysen zu verifizieren. Die aktivierten CAF-spezifischen T-Zellen werden dann über einen FACS-*Sort* gesammelt, expandiert und schließlich über T-Zellrezeptorsequenzierung charakterisiert. Hierzu könnten zum einen TILs von frisch resezierten HNSCC-Tumorgeweben zum Einsatz kommen und vergleichend dazu solche, die aus PBMCs isoliert wurden.

Aufgrund der Tatsache, dass CAFs verschiedener Tumorentitäten (NSCLC, Brustkrebs, CRC) den aktivierten Phänotyp teilen, wäre es durchaus denkbar, dass diese Peptide auch bei Patienten mit anderen Tumoren T-Zellantworten induzieren. Dies könnte über weitere IFN- γ -Assays abgeklärt werden. In diesem Kontext wäre zudem interessant, die neuen Peptide einerseits als Peptidmix zu testen, um so eine Verstärkung der CAF-spezifischen T-Zellantworten zu induzieren und andererseits im Vergleich zu bekannten Antigenen.

Zudem sollten die vier vielversprechendsten Antigene weiter hinsichtlich ihrer Relevanz als künftiges Impfantigen untersucht werden. Hierzu kann auf die von Cheever *et al.*, 2009 postulierten Kriterien zurückgegriffen werden. Dabei können die Expressionsstärke sowie die Stroma-assoziierte Expression mittel immunhistochemischer Färbungen eines TMAs von HNSCC-Geweben von Primärtumoren und Metastasen untersucht werden sowie weitere Normalschleimhäute. Auch ist es empfehlenswert, die mRNA- und/oder Proteinexpression in diversen Normalgeweben (Haut, Gehirn, Lunge, Leber, usw.) sowie mesenchymalen Stammzellen zu untersuchen.

Weiter stellen vergleichende Analysen des MHC-I Peptidoms zwischen TUCs und CAFs eine wichtige Ergänzung zu den hier vorgelegten Daten dar. Basierend auf den Ergebnissen zusammen mit dem bereits etablierten Microarray-Datensatz könnte die CAF-Spezifität der Kandidaten verifiziert werden und darüber hinaus weitere CAFs-, TUC- sowie „*Shared Antigens*“ identifiziert werden.

7 DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei all denjenigen bedanken, die mich bei der Erstellung meiner Doktorarbeit wissenschaftlich sowie persönlich unterstützt und begleitet haben.

Allen voran möchte ich mich herzlichst bei meiner Doktormutter **Frau Prof. Dr. Christel Herold-Mende** bedanken, die mich in allen Phasen dieser Arbeit begleitet und unterstützt hat. Ihre außerordentliche fachliche Kompetenz und der konstruktive wissenschaftliche Austausch haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Dankbar anerkennen möchte ich auch, dass sie stets an mich als Wissenschaftlerin geglaubt hat und mich durch ihre warmherzige Art und ihren Optimismus gerade in schwierigen Phasen motiviert hat.

Herrn **Prof. Dr. Philipp Beckhove** danke ich herzlichst für die Bereitstellung des Themas und für die Übernahme des Erstgutachtens sowie für die wertvollen, konstruktiven Diskussionsbeiträge und die Unterstützung beim Verfassen des Papers. Seine fachliche Kompetenz, insbesondere die immunologischen Fragestellungen betreffend, haben dieses Projekt maßgeblich geprägt. Zudem möchte ich mich für die Peptidsynthese und die Hilfestellung bei den ELISPOT-Analysen bedanken.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn **Dr. Rolf Warta**, der mich wirklich jederzeit überaus geduldig bei der Versuchsplanung, -durchführung und vor allem der Datenauswertung unterstützt hat. Seine Erfahrung und außerordentliche Methodenkompetenz sowie seine vielen konstruktiven Ideen haben diese Arbeit unheimlich bereichert.

Ein außerordentlicher Dank geht auch an meine wunderbare Mitdotorandin **Carmen Rapp**, die ich als Wissenschaftlerin und Mensch ungemein schätze, und die während meiner Zeit im Labor zu einer meiner wertvollsten und besten Freundinnen geworden ist. Ich danke ihr von ganzem Herzen für jedwede wissenschaftliche sowie persönliche Unterstützung und Hilfe.

Herrn **Dr. Gerhard Dyckhoff** danke ich für die ausgezeichnete Zusammenarbeit und die reibungslose Organisation der Blutabnahmen. Sein Engagement und seine bewundernswerte und vorbildliche Mitmenschlichkeit ließen mich nie vergessen, dass hinter den Tumorproben Menschen stehen.

Herrn **Prof. Dr. Viktor Umansky** danke ich für das Interesse an meiner Fragestellung sowie die hilfreichen Diskussionsbeiträge während der TAC-Meetings.

Meinem Mitdotoranden **Steffen Dettling** danke ich für die außerordentlich gute wissenschaftliche und freundschaftliche Zusammenarbeit.

Dr. Slava Stamova, Dr. Anchana Rathimasamy, Simone Jünger, Mariana Bucur und Ludmila Umansky danke ich herzlich für die kompetente und tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der immunologischen Assays.

Mein Dank geht auch an **Dr. Martina Schnölzer, Dr. Felix Bestvater, Dr. Melanie Beyer-Hudler** und ihre Forschungsteams für die intensive Beratung und fachliche Unterstützung bei der Planung, Protokollausarbeitung, Probenzusammenstellung für die Massenspektrometrie, die *Laser Capture Microdissection* sowie die Microarrays.

Frau **Dr. med. Carolin Mogler** danke ich herzlich dafür, dass sie sich stets Zeit für mich genommen hat, um mit mir ihr großes histopathologisches Wissen zu teilen.

Auch möchte ich mich bei **Christoph Geisenberger** für die Unterstützung bei der bioinformatischen Auswertung der Arraydaten und die bereichernden wissenschaftlichen Gespräche bedanken.

Allen derzeitigen und allen ehemaligen Labormitgliedern für den Spaß und die lustige und schöne Zeit im Labor, die anregenden Gespräche und hilfreichen Tipps. Euch verdanke ich, dass ich immer sehr gerne im Labor gearbeitet habe.

Ein großes Dankeschön geht auch an unsere technischen Assistenten **Melanie Greibich, Hildegard Göltzer, Farzaneh Kashfi, Ilka Hearn** und Azubis **Axel Schöffel, Cinja Sackmann**, die mir stets beratend und helfend zur Seite standen und den Laboralltag bereicherten.

Mandy Barthel danke ich herzlich für die reibungslose Organisation der administrativen Seite des Laboralltags sowie insbesondere der Blutabnahmen und natürlich für die lustigen Mittagspausen.

Ein herzliches Dankeschön geht auch an Frau **Dr. phil. Anna Weiland** für die linguistische Korrektur sowie an **Annika Tisken** und **Anke Deckers** für die Unterstützung bei der graphischen Umsetzung der Zellbilder.

Mein Dank gilt auch allen **HNO-Tumorpatienten und ihren Angehörigen** dafür, dass ich die Gewebe im Rahmen meiner Forschung nutzen durfte und für die Bereitschaft nach Heidelberg zu kommen, um wiederkehrend Blut zu spenden, sowie allen „gesunden Individuen“ für ihre Blutspenden.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinem geliebten **Papilie**, der mir mein Studium ermöglicht hat, mich immer unterstützt, hinter mir steht und mich bedingungslos liebt.

Ein Riesendank gebührt auch **meiner geliebten Schwester Gianna und meinen besten Freunden**. Die kompletten vier Jahre lang habt ihr mich motiviert, gestärkt, aufgebaut, abgelenkt, geerdet, mir zugehört und dafür gesorgt, dass ich den Fokus für die wirklich wichtigen Dinge im Leben nicht verliere! Ihr seid die Allerbesten!

Mein besonderer und größter Dank geht an meinen besten Freund und Schatz **Dominik** für seine unendliche Geduld und sein Verständnis und dafür, dass er mir immer zur Seite steht, mich bestärkt und an mich glaubt. Ohne seine Unterstützung und Liebe wäre ich heute nicht, wo und wer ich bin.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- Adelstein, D.J., Ridge, J.A., Gillison, M.L., Chaturvedi, A.K., D'Souza, G., Gravitt, P.E., Westra, W., Psyrri, A., Martin Kast, W., Koutsky, L.A., Giuliano, A., Krosnick, S., Trotti, A., Schuller, D.E., Forastiere, A., & Danksy Ullmann, C. (2009) Head and neck squamous cell cancer and the human papillomavirus: Summary of a National Cancer Institute State of the Science Meeting, November 9-10, 2008, Washington, D.C. *Head Neck*, **31**, 1393–1422.
- Agrawal, N., Frederick, M.J., Pickering, C.R., Bettegowda, C., Chang, K., Li, R.J., Fakhry, C., Xie, T.X., Zhang, J., Wang, J., Zhang, N., El-Naggar, A.K., Jasser, S.A., Weinstein, J.N., Trevino, L., Drummond, J.A., Muzny, D.M., Wu, Y., Wood, L.D., Hruban, R.H., Westra, W.H., Koch, W.M., Califano, J.A., Gibbs, R.A., Sidransky, D., Vogelstein, B., Velculescu, V.E., Papadopoulos, N., Wheeler, D.A., Kinzler, K.W., & Myers, J.N. (2011) Exome Sequencing of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Reveals Inactivating Mutations in NOTCH1. *Science*, **333**, 1154–1157.
- Alegre, M.-L., Frauwirth, K.A., & Thompson, C.B. (2001) T-CELL REGULATION BY CD28 AND CTLA-4. *Nat Rev Immunol*, **1**, 220–228.
- Ang, K.K., Harris, J., Wheeler, R., Weber, R., Rosenthal, D.I., Nguyen-Tân, P.F., Westra, W.H., Chung, C.H., Jordan, R.C., Lu, C., Kim, H., Axelrod, R., Silverman, C.C., Redmond, K.P., & Gillison, M.L. (2010) Human Papillomavirus and Survival of Patients with Oropharyngeal Cancer. *New England Journal of Medicine*, **363**, 24–35.
- Antony, P.A., Piccirillo, C.A., Akpınarli, A., Finkelstein, S.E., Speiss, P.J., Surman, D.R., Palmer, D.C., Chan, C.-C., Klebanoff, C.A., Overwijk, W.W., Rosenberg, S.A., & Restifo, N.P. (2005) CD8+ T cell immunity against a tumor/self-antigen is augmented by CD4+ T helper cells and hindered by naturally occurring T regulatory cells. *The Journal of Immunology*, **174**, 2591–2601.
- Arstila, T.P. (1999) A Direct Estimate of the Human T Cell Receptor Diversity. *Science*, **286**, 958–961.
- Azatov, M., Goicoechea, S.M., Otey, C.A., & Upadhyaya, A. (2016) The actin crosslinking protein palladin modulates force generation and mechanosensitivity of tumor associated fibroblasts. *Sci Rep*, **6**, 28805.
- Azimi, F., Scolyer, R.A., Rumcheva, P., Moncrieff, M., Murali, R., McCarthy, S.W., Saw, R.P., & Thompson, J.F. (2012) Tumor-Infiltrating Lymphocyte Grade Is an Independent Predictor of Sentinel Lymph Node Status and Survival in Patients With Cutaneous Melanoma. *Journal of Clinical Oncology*, **30**, 2678–2683.
- Bates, G.J., Fox, S.B., Han, C., Leek, R.D., Garcia, J.F., Harris, A.L., & Banham, A.H. (2006) Quantification of Regulatory T Cells Enables the Identification of High-Risk Breast Cancer Patients and Those at Risk of Late Relapse. *Journal of Clinical Oncology*, **24**, 5373–5380.
- Bechtel, W., McGoohan, S., Zeisberg, E.M., Müller, G.A., Kalbacher, H., Salant, D.J., Müller, C.A., Kalluri, R., & Zeisberg, M. (2010) Methylation determines fibroblast activation and fibrogenesis in the kidney. *Nature Medicine*, **16**, 544–550.
- Beckhove, P., Warta, R., Lemke, B., Stoycheva, D., Momburg, F., Schnölzer, M., Warnken, U., Schmitz-Winnenthal, H., Ahmadi, R., Dyckhoff, G., Bucur, M., Jünger, S., Schueler, T., Lennerz, V., Woelfel, T., Unterberg, A., & Herold-Mende, C. (2010) Rapid T cell–based identification of human tumor tissue antigens by automated two-dimensional protein fractionation. *Journal of Clinical Investigation*, **120**, 2230–2242.
- Bi, S. & Baum, L.G. (2009) Sialic acids in T cell development and function. *Biochim. Biophys. Acta*, **1790**, 1599–1610.
- Biaglow, J.E. & Miller, R.A. (2014) The thioredoxin reductase/thioredoxin system: Novel redox targets for cancer therapy. *Cancer Biology & Therapy*, **4**, 13–20.
- Bian, Y., Knobloch, T.J., Sadim, M., Kaklamani, V., Raji, A., Yang, G.Y., Weghorst, C.M., & Pasche, B. (2007) Somatic acquisition of TGFBR1*6A by epithelial and stromal cells during head and neck and colon cancer development. *Human Molecular Genetics*, **16**, 3128–3135.
- Binder, J.X., Pletscher-Frankild, S., Tsafou, K., Stolte, C., O'Donoghue, S.I., Schneider, R., & Jensen, L.J. (2014) COMPARTMENTS: unification and visualization of protein subcellular localization evidence. *Database (Oxford)*, **2014**, bau012–bau012.
- Bornstein, P. (1995) Diversity of function is inherent in matricellular proteins: an appraisal of thrombospondin 1. *The Journal of Cell Biology*, **130**, 503–506.
- Bornstein, P. (2001) Thrombospondins as matricellular modulators of cell function. *Journal of Clinical Investigation*, **107**, 929–934.
- Braakhuis, B.J.M., Tabor, M.P., Kummer, J.A., Leemans, C.R., & Brakenhoff, R.H. (2003) A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications. *Cancer Research*, **63**, 1727–1730.
- Braumüller, H., Wieder, T., Brenner, E., Aßmann, S., Hahn, M., Alkhaled, M., Schilbach, K., Essmann, F., Kneil-

- ling, M., Griessinger, C., Ranta, F., Ullrich, S., Mocikat, R., Braungart, K., Mehra, T., Fehrenbacher, B., Berdel, J., Niessner, H., Meier, F., van den Broek, M., Häring, H.-U., Handgretinger, R., Quintanilla-Martinez, L., Fend, F., Pesic, M., Bauer, J., Zender, L., Schaller, M., Schulze-Osthoff, K., & Röcken, M. (2013) T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence. *Nature*, **494**, 361–365.
- Bremnes, R.M., Dønnem, T., Al-Saad, S., Al-Shibli, K., Andersen, S., Sirera, R., Camps, C., Martinez, I., & Busund, L.-T. (2011) The role of tumor stroma in cancer progression and prognosis: emphasis on carcinoma-associated fibroblasts and non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*, **6**, 209–217.
- Calon, A., Lonardo, E., Berenguer-Llgero, A., Espinet, E., Hernando-Momblona, X., Iglesias, M., Sevillano, M., Palomo-Ponce, S., Tauriello, D.V.F., Byrom, D., Cortina, C., Morral, C., Barceló, C., Tosi, S., Riera, A., Attolini, C.S.-O., Rossell, D., Sancho, E., & Batlle, E. (2015) Stromal gene expression defines poor-prognosis subtypes in colorectal cancer. *Nature Publishing Group*, **47**, 320–329.
- Cancer Genome Atlas Network (2015) Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature*, **517**, 576–582.
- Cappelli, L.C., Gutierrez, A.K., Baer, A.N., Albayda, J., Manno, R.L., Haque, U., Lipson, E.J., Bleich, K.B., Shah, A.A., Naidoo, J., Brahmer, J.R., Le, D., & Bingham, C.O. (2016) Inflammatory arthritis and sicca syndrome induced by nivolumab and ipilimumab. *Ann. Rheum. Dis*, annrheumdis–2016–209595.
- Carreras, J., Lopez-Guillermo, A., Fox, B.C., Colomo, L., Martinez, A., Roncador, G., Montserrat, E., Campo, E., & Banham, A.H. (2006) High numbers of tumor-infiltrating FOXP3-positive regulatory T cells are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. *Blood*, **108**, 2957–2964.
- Chang, H.Y., Chi, J.-T., Dudoit, S., Bondre, C., van de Rijn, M., Botstein, D., & Brown, P.O. (2002) Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *PNAS*, **99**, 12877–12882.
- Cheever, M.A., Allison, J.P., Ferris, A.S., Finn, O.J., Hastings, B.M., Hecht, T.T., Mellman, I., Prindiville, S.A., Viner, J.L., Weiner, L.M., & Matrisian, L.M. (2009) The prioritization of cancer antigens: a national cancer institute pilot project for the acceleration of translational research. *Clinical Cancer Research*, **15**, 5323–5337.
- Chen, M., Xiang, R., Wen, Y., Xu, G., Wang, C., Luo, S., Yin, T., Wei, X., Shao, B., Liu, N., Guo, F., Li, M., Zhang, S., Li, M., Ren, K., Wang, Y., & Wei, Y. (2015) A whole-cell tumor vaccine modified to express fibroblast activation protein induces antitumor immunity against both tumor cells and cancer-associated fibroblasts. *Sci Rep*, **5**, 14421.
- Cheng, J.-T., Deng, Y.-N., Yi, H.-M., Wang, G.-Y., Fu, B.-S., Chen, W.-J., Liu, W., Tai, Y., Peng, Y.-W., & Zhang, Q. (2016) Hepatic carcinoma-associated fibroblasts induce IDO-producing regulatory dendritic cells through IL-6-mediated STAT3 activation. *Oncogenesis*, **5**, e198.
- Chi, V. & Chandy, K.G. (2007) Immunohistochemistry: Paraffin Sections Using the Vectastain ABC Kit from Vector Labs. *Journal of Visualized Experiments*, e308–e308.
- Chu, P., Wu, E., & Weiss, L.M. (2000) Cytokeratin 7 and Cytokeratin 20 Expression in Epithelial Neoplasms: A Survey of 435 Cases. *Modern Pathology*, **13**, 962–972.
- Colevas, A.D. (2006) Chemotherapy Options for Patients With Metastatic or Recurrent Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Journal of Clinical Oncology*, **24**, 2644–2652.
- Collet, J.-F. & Messens, J. (2010) Structure, Function, and Mechanism of Thioredoxin Proteins. *Antioxidants & Redox Signaling*, **13**, 1205–1216.
- Condon, M.S. (2005) The role of the stromal microenvironment in prostate cancer. *Seminars in Cancer Biology*, **15**, 132–137.
- Contardi, E., Palmisano, G.L., Tazzari, P.L., Martelli, A.M., Falà, F., Fabbi, M., Kato, T., Lucarelli, E., Donati, D., Polito, L., Bolognesi, A., Ricci, F., Salvi, S., Gargaglione, V., Mantero, S., Alberghini, M., Ferrara, G.B., & Pistillo, M.P. (2005) CTLA-4 is constitutively expressed on tumor cells and can trigger apoptosis upon ligand interaction. *Int. J. Cancer*, **117**, 538–550.
- Cooper, D., Schermer, A., & Sun, T.T. (1985) Classification of human epithelia and their neoplasms using monoclonal antibodies to keratins: strategies, applications, and limitations. *Lab. Invest*, **52**, 243–256.
- Côté, A.L., Byrne, K.T., Steinberg, S.M., Zhang, P., & Turk, M.J. (2011) Protective CD8 memory T cell responses to mouse melanoma are generated in the absence of CD4 T cell help. *PLoS ONE*, **6**, e26491.
- Curiel, T.J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Evdemon-Hogan, M., Conejo-Garcia, J.R., Zhang, L., Burow, M., Zhu, Y., Wei, S., Kryczek, I., Daniel, B., Gordon, A., Myers, L., Lackner, A., Disis, M.L., Knutson, K.L., Chen, L., & Zou, W. (2004) Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med*, **10**, 942–949.
- Curran, T.-A., Jalili, R.B., Farrokhi, A., & Ghahary, A. (2014) IDO expressing fibroblasts promote the expansion of antigen specific regulatory T cells. *Immunobiology*, **219**, 17–24.
- Curry, J.M., Sprandio, J., Cognetti, D., Luginbuhl, A., Bar-ad, V., Pribitkin, E., & Tuluc, M. (2014) Tumor microenvironment in head and neck squamous cell carcinoma. *Semin. Oncol*, **41**, 217–234.
- Darby, I., Skalli, O., & Gabbiani, G. (1990) Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts

- during experimental wound healing. *Lab. Invest*, **63**, 21–29.
- Darby, I.A. & Hewitson, T.D. (2007) Fibroblast differentiation in wound healing and fibrosis. *Int. Rev. Cytol*, **257**, 143–179.
- Darby, I.A., Laverdet, B., Bonté, F., & Desmoulière, A. (2014) Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clin Cosmet Investig Dermatol*, **7**, 301–311.
- Davis, M.M. & Bjorkman, P.J. (1988) T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature*, **334**, 395–402.
- De Vlieghere, E., Verset, L., Demetter, P., Bracke, M., & De Wever, O. (2015) Cancer-associated fibroblasts as target and tool in cancer therapeutics and diagnostics. *Virchows Arch*, **467**, 367–382.
- Desmoulière, A., Redard, M., Darby, I., & Gabbiani, G. (1995) Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *The American Journal of Pathology*, **146**, 56–66.
- Dimitroff, C.J., Pera, P., Dall'Olio, F., Matta, K.L., Chandrasekaran, E.V., Lau, J.T., & Bernacki, R.J. (1999) Cell surface n-acetylneuraminic acid alpha2,3-galactoside-dependent intercellular adhesion of human colon cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, **256**, 631–636.
- Direkze, N.C. & Alison, M.R. (2006) Bone marrow and tumour stroma: an intimate relationship. *Hematol Oncol*, **24**, 189–195.
- Direkze, N.C., Hodivala-Dilke, K., Jeffery, R., Hunt, T., Poulson, R., Oukrif, D., Alison, M.R., & Wright, N.A. (2004) Bone marrow contribution to tumor-associated myofibroblasts and fibroblasts. *Cancer Research*, **64**, 8492–8495.
- Dolznic, H., Schweifer, N., Puri, C., Kraut, N., Rettig, W.J., Kerjaschki, D., & Garin-Chesa, P. (2005) Characterization of cancer stroma markers: in silico analysis of an mRNA expression database for fibroblast activation protein and endosialin. *Cancer Immun*, **5**, 10.
- Dong, C., Juedes, A.E., Temann, U.A., Shresta, S., Allison, J.P., Ruddle, N.H., & Flavell, R.A. (2001) ICOS co-stimulatory receptor is essential for T-cell activation and function. *Nature*, **409**, 97–101.
- Dunn, G.P., Old, L.J., & Schreiber, R.D. (2004) The three Es of cancer immunoeediting. *Annu. Rev. Immunol*, **22**, 329–360.
- Dvorak, H.F. (1986) Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N. Engl. J. Med*, **315**, 1650–1659.
- Dvorak, H.F. (2015) Tumors: wounds that do not heal-redux. *Cancer Immunol Res*, **3**, 1–11.
- Eden, E., Navon, R., Steinfeld, I., Lipson, D., & Yakhini, Z. (2009) GOrilla: a tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists. *BMC Bioinformatics*, **10**, 48–7.
- Edlund, K., Lindskog, C., Saito, A., Berglund, A., Pontén, F., Göransson-Kultima, H., Isaksson, A., Jirström, K., Planck, M., Johansson, L., Lambe, M., Holmberg, L., Nyberg, F., Ekman, S., Bergqvist, M., Landelius, P., Lamberg, K., Botling, J., Östman, A., & Micke, P. (2012) CD99 is a novel prognostic stromal marker in non-small cell lung cancer. *Int. J. Cancer*, **131**, 2264–2273.
- Erez, N., Truitt, M., Olson, P., Arron, S.T., & Hanahan, D. (2010) Cancer-Associated Fibroblasts Are Activated in Incipient Neoplasia to Orchestrate Tumor-Promoting Inflammation in an NF-kappaB-Dependent Manner. *Cancer Cell*, **17**, 135–147.
- Ericson, M.L., Hörling, J., Wendel-Hansen, V., Holmgren, A., & Rosén, A. (1992) Secretion of thioredoxin after in vitro activation of human B cells. *Lymphokine Cytokine Res*, **11**, 201–207.
- Espina, V., Wulfkuhle, J.D., Calvert, V.S., VanMeter, A., Zhou, W., Coukos, G., Geho, D.H., Petricoin, E.F., & Liotta, L.A. (2006) Laser-capture microdissection. *Nat Protoc*, **1**, 586–603.
- Facciabene, A., Motz, G.T., & Coukos, G. (2012) T-Regulatory Cells: Key Players in Tumor Immune Escape and Angiogenesis. *Cancer Research*, **72**, 2162–2171.
- Fakhry, C., Westra, W.H., Li, S., Cmelak, A., Ridge, J.A., Pinto, H., Forastiere, A., & Gillison, M.L. (2008) Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J. Natl. Cancer Inst*, **100**, 261–269.
- Fallarino, F., Grohmann, U., Hwang, K.W., Orabona, C., Vacca, C., Bianchi, R., Belladonna, M.L., Fioretti, M.C., Alegre, M.-L., & Puccetti, P. (2003) Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol*, **4**, 1206–1212.
- Fassnacht, M. (2005) Induction of CD4+ and CD8+ T-Cell Responses to the Human Stromal Antigen, Fibroblast Activation Protein: Implication for Cancer Immunotherapy. *Clinical Cancer Research*, **11**, 5566–5571.
- Fidler, I.J. (2003) Timeline: The pathogenesis of cancer metastasis: the “seed and soil” hypothesis revisited. *Nat. Rev. Cancer*, **3**, 453–458.
- Finak, G., Bertos, N., Pepin, F., Sadekova, S., Souleimanova, M., Zhao, H., Chen, H., Omeroglu, G., Meterissian, S., Omeroglu, A., Hallett, M., & Park, M. (2008) Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer. *Nat Med*, **14**, 518–527.
- Forastiere, A., Koch, W., Trotti, A., & Sidransky, D. (2001) Head and neck cancer. *N. Engl. J. Med*, **345**, 1890–1900.

- Forastiere, A., Weber, R., & Ang, K. (2008) Treatment of head and neck cancer. *N. Engl. J. Med*, **358**, 1076–authorreply1077–8.
- Gajewski, T.F. & Fitch, F.W. (1988) Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. I. IFN-gamma inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones. *The Journal of Immunology*, **140**, 4245–4252.
- Galluzzi, L., Vacchelli, E., Pedro, J.-M.B.-S., Buqué, A., Senovilla, L., Baracco, E.E., Bloy, N., Castoldi, F., Abastado, J.-P., Agostinis, P., Apte, R.N., Aranda, F., Ayyoub, M., Beckhove, P., Blay, J.-Y., Bracci, L., Caignard, A., Castelli, C., Cavallo, F., Celis, E., Cerundolo, V., Clayton, A., Colombo, M.P., Coussens, L., Dhodapkar, M.V., Eggermont, A.M., Fearon, D.T., Fridman, W.H., Fučíková, J., Gabrilovich, D.I., Galon, J., Garg, A., Ghiringhelli, F., Giaccone, G., Gilboa, E., Gnjatic, S., Hoos, A., Hosmalin, A., Jäger, D., Kalinski, P., Kärre, K., Kepp, O., Kiessling, R., Kirkwood, J.M., Klein, E., Knuth, A., Lewis, C.E., Liblau, R., Lotze, M.T., Lugli, E., Mach, J.-P., Mattei, F., Mavilio, D., Melero, I., Melief, C.J., Middendorf, E.A., Moretta, L., Odunsi, A., Okada, H., Palucka, A.K., Peter, M.E., Pienta, K.J., Porgador, A., Prendergast, G.C., Rabinovich, G.A., Restifo, N.P., Rizvi, N., Sautès-Fridman, C., Schreiber, H., Seliger, B., Shiku, H., Silva-Santos, B., Smyth, M.J., Speiser, D.E., Spisek, R., Srivastava, P.K., Talmadge, J.E., Tartour, E., van der Burg, S.H., Van Den Eynde, B.J., Vile, R., Wagner, H., Weber, J.S., Whiteside, T.L., Wolchok, J.D., Zitvogel, L., Zou, W., & Kroemer, G. (2015) Classification of current anticancer immunotherapies. *Oncotarget*, **5**, 12472–12508.
- Galon, J., Costes, A., Sanchez-Cabo, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Lagorce-Pagès, C., Tosolini, M., Camus, M., Berger, A., Wind, P., Zinzindohoué, F., Bruneval, P., Cugnenc, P.-H., Trajanoski, Z., Fridman, W.-H., & Pagès, F. (2006) Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*, **313**, 1960–1964.
- Galon, J.R.M., s, F.P., Marincola, F.M., Angell, H.K., Thurin, M., Lugli, A., Zlobec, I., Berger, A., Bifulco, C., Botti, G., Tatangelo, F., Britten, C.M., Kreiter, S., Chouchane, L., Delrio, P., Arndt, H., Asslaber, M., Maio, M., Masucci, G.V., Mihm, M., Vidal-Vanaclocha, F., Allison, J.P., Gnjatic, S., Hakansson, L., Huber, C., Singh-Jasuja, H., Ottensmeier, C., Zwierzina, H., Laghi, L., Grizzi, F., Ohashi, P.S., Shaw, P.A., Clarke, B.A., Wouters, B.G., Kawakami, Y., Hazama, S., Okuno, K., Wang, E., O'Donnell-Tormey, J., Lagorce, C., Pawelec, G., Nishimura, M.I., Hawkins, R., Lapointe, R.J., Lundqvist, A., Khleif, S.N., Ogino, S., Gibbs, P., Waring, P., Sato, N., Torigoe, T., Itoh, K., Patel, P.S., Shukla, S.N., Palmqvist, R., Nagtegaal, I.D., Wang, Y., D'Arrigo, C., Kopetz, S., Sinicrope, F.A., Trinchieri, G., Gajewski, T.F., Ascierto, P.A., & Fox, B.A. (2012) Cancer classification using the Immunoscore: a worldwide task force. *Journal of Translational Medicine*, **10**, 1–1.
- Ganly, I., Soutar, D.S., Brown, R., & Kaye, S.B. (2000) p53 alterations in recurrent squamous cell cancer of the head and neck refractory to radiotherapy. *Br. J. Cancer*, **82**, 392–398.
- Garbin, S., Pittet, B., Montandon, D., Gabbiani, G., & Desmouliere, A. (1996) Covering by a flap induces apoptosis of granulation tissue myofibroblasts and vascular cells. *Wound Repair Regen*, **4**, 244–251.
- Garin-Chesa, P., Old, L.J., & Rettig, W.J. (1990) Cell surface glycoprotein of reactive stromal fibroblasts as a potential antibody target in human epithelial cancers. *PNAS*, **87**, 7235–7239.
- Geary, L.A., Nash, K.A., Adisetiyo, H., Liang, M., Liao, C.-P., Jeong, J.H., Zandi, E., & Roy-Burman, P. (2014) CAF-secreted annexin A1 induces prostate cancer cells to gain stem cell-like features. *Mol. Cancer Res*, **12**, 607–621.
- Ghebeh, H., Mohammed, S., Al-Omair, A., Qattan, A., Lehe, C., Al-Qudaihi, G., Elkum, N., Alshabanah, M., Bin Amer, S., Tulbah, A., Ajarim, D., Al-Tweigeri, T., & Dermime, S. (2006) The B7-H1 (PD-L1) T lymphocyte-inhibitory molecule is expressed in breast cancer patients with infiltrating ductal carcinoma: correlation with important high-risk prognostic factors. *Neoplasia*, **8**, 190–198.
- Gillet, J.-P. & Gottesman, M.M. (2010) Mechanisms of multidrug resistance in cancer. *Methods Mol. Biol*, **596**, 47–76.
- Gillison, M.L., D'Souza, G., Westra, W., Sugar, E., Xiao, W., Begum, S., & Viscidi, R. (2008) Distinct Risk Factor Profiles for Human Papillomavirus Type 16-Positive and Human Papillomavirus Type 16-Negative Head and Neck Cancers. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, **100**, 407–420.
- Gires, O. & Bauerle, P.A. (2010) EpCAM As a Target in Cancer Therapy. *Journal of Clinical Oncology*, **28**, e239–e240.
- Go, S., Sato, C., Yin, J., Kannagi, R., & Kitajima, K. (2007) Hypoxia-enhanced expression of free deaminoneuraminic acid in human cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, **357**, 537–542.
- Goh, P.P., Sze, D.M., & Roufogalis, B.D. (2007) Molecular and cellular regulators of cancer angiogenesis. *Curr Cancer Drug Targets*, **7**, 743–758.
- Gonda, T.A., Varro, A., Wang, T.C., & Tycko, B. (2010) Molecular biology of cancer-associated fibroblasts: can these cells be targeted in anti-cancer therapy? *Semin. Cell Dev. Biol*, **21**, 2–10.
- Gonzalez-Galarza, F.F., Takeshita, L.Y.C., Santos, E.J.M., Kempson, F., Maia, M.H.T., Silva, A.L.S.D., Silva, A.L.T.E., Ghattaoraya, G.S., Alfirevic, A., Jones, A.R., & Middleton, D. (2015) Allele frequency net 2015 update: new

- features for HLA epitopes, KIR and disease and HLA adverse drug reaction associations. *Nucleic Acids Research*, **43**, D784–D788.
- Gottesman, M.M. (2002) Mechanisms of cancer drug resistance. *Annu. Rev. Med*, **53**, 615–627.
- Granata, R., Miceli, R., Orlandi, E., Perrone, F., Cortelazzi, B., Franceschini, M., Locati, L.D., Bossi, P., Bergamini, C., Mirabile, A., Mariani, L., Olmi, P., Scaramellini, G., Potepan, P., Quattrone, P., Ang, K.K., & Licitra, L. (2012) Tumor stage, human papillomavirus and smoking status affect the survival of patients with oropharyngeal cancer: an Italian validation study. *Annals of Oncology*, **23**, 1832–1837.
- Green, D.R., Droin, N., & Pinkoski, M. (2003) Activation-induced cell death in T cells. *Immunol. Rev*, **193**, 70–81.
- Guo, C., Manjili, M.H., Subjeck, J.R., Sarkar, D., Fisher, P.B., & Wang, X.-Y. (2013) Therapeutic cancer vaccines: past, present, and future. *Adv. Cancer Res*, **119**, 421–475.
- Haddad, R.I. & Shin, D.M. (2008) Recent advances in head and neck cancer. *N. Engl. J. Med*, **359**, 1143–1154.
- Haggerty, T.J., Dunn, I.S., Rose, L.B., Newton, E.E., & Kurnick, J.T. (2012) A screening assay to identify agents that enhance T-cell recognition of human melanomas. *Assay Drug Dev Technol*, **10**, 187–201.
- Haggerty, T.J., Dunn, I.S., Rose, L.B., Newton, E.E., Pandolfi, F., & Kurnick, J.T. (2014) Heat Shock Protein-90 Inhibitors Enhance Antigen Expression on Melanomas and Increase T Cell Recognition of Tumor Cells. *PLoS ONE*, **9**, e114506.
- Halliday, G.M., Patel, A., Hunt, M.J., Tefany, F.J., & Barnetson, R.S. (1995) Spontaneous regression of human melanoma/nonmelanoma skin cancer: association with infiltrating CD4+ T cells. *World J Surg*, **19**, 352–358.
- Hamid, O., Robert, C., Daud, A., Hodi, F.S., Hwu, W.-J., Kefford, R., Wolchok, J.D., Hersey, P., Joseph, R.W., Weber, J.S., Dronca, R., Gangadhar, T.C., Patnaik, A., Zarour, H., Joshua, A.M., Gergich, K., Ellassaiss-Schaap, J., Algazi, A., Mateus, C., Boasberg, P., Tumei, P.C., Chmielowski, B., Ebbinghaus, S.W., Li, X.N., Kang, S.P., & Ribas, A. (2013) Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma. *N. Engl. J. Med*, **369**, 134–144.
- Hammarstedt, L., Lindquist, D., Dahlstrand, H., Romanitan, M., Dahlgren, L.O., Joneberg, J., Creson, N., Lindholm, J., Ye, W., Dalianis, T., & Munck-Wikland, E. (2006) Human papillomavirus as a risk factor for the increase in incidence of tonsillar cancer. *Int. J. Cancer*, **119**, 2620–2623.
- Hanahan, D. & Coussens, L.M. (2012) Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell*, **21**, 309–322.
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*, **100**, 57–70.
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, **144**, 646–674.
- Hansen, N.U.B., Willumsen, N., Sand, J.M.B., Larsen, L., Karsdal, M.A., & Leeming, D.J. (2016) Type VIII collagen is elevated in diseases associated with angiogenesis and vascular remodeling. *Clinical Biochemistry*.
- Harper, J. & Sainson, R.C.A. (2014) Regulation of the anti-tumour immune response by cancer-associated fibroblasts. *Seminars in Cancer Biology*, **25**, 69–77.
- Harrington, L.E., Hatton, R.D., Mangan, P.R., Turner, H., Murphy, T.L., Murphy, K.M., & Weaver, C.T. (2005) Interleukin 17–producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol*, **6**, 1123–1132.
- Hasina, R., Whipple, M.E., Martin, L.E., Kuo, W.P., Ohno-Machado, L., & Lingen, M.W. (2008) Angiogenic heterogeneity in head and neck squamous cell carcinoma: biological and therapeutic implications. *Lab. Invest*, **88**, 342–353.
- Hawiger, D., Inaba, K., Dorsett, Y., Guo, M., Mahnke, K., Rivera, M., Ravetch, J.V., Steinman, R.M., & Nussenzweig, M.C. (2001) Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *Journal of Experimental Medicine*, **194**, 769–779.
- Henzen-Logmans, S.C., Mullink, H., Ramaekers, F.C., Tadema, T., & Meijer, C.J. (1987) Expression of cytokeratins and vimentin in epithelial cells of normal and pathologic thyroid tissue. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, **410**, 347–354.
- Herbst, R.S., Kim, E.S., & Harari, P.M. (2001) IMC-C225, an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody, for treatment of head and neck cancer. *Expert Opin Biol Ther*, **1**, 719–732.
- Herndon, J.M., Stuart, P.M., & Ferguson, T.A. (2005) Peripheral Deletion of Antigen-Specific T Cells Leads to Long-Term Tolerance Mediated by CD8+ Cytotoxic Cells. *The Journal of Immunology*, **174**, 4098–4104.
- Hinz, B., Celetta, G., Tomasek, J.J., Gabbiani, G., & Chaponnier, C. (2001) Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. *Mol. Biol. Cell*, **12**, 2730–2741.
- Ho, S., Marçal, H., & Foster, L.J.R. (2014) Towards scarless wound healing: a comparison of protein expression between human, adult and foetal fibroblasts. *Biomed Res Int*, **2014**, 676493–10.
- Hofheinz, R.D., al-Batran, S.E., Hartmann, F., Hartung, G., Jager, D., Renner, C., Tanswell, P., Kunz, U., Amelsberg, A., Kuthan, H., & Stehle, G. (2003) Stromal Antigen Targeting by a Humanised Monoclonal Antibody: An Early Phase II Trial of Sibrotuzumab in Patients with Metastatic Colorectal Cancer. *Oncology Research and Treatment*, **26**, 44–48.

- Huang, D.W., Sherman, B.T., & Lempicki, R.A. (2009) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc*, **4**, 44–57.
- Humblet, Y. (2004) Cetuximab: an IgG(1) monoclonal antibody for the treatment of epidermal growth factor receptor-expressing tumours. *Expert Opin. Pharmacother*, **5**, 1621–1633.
- Inoue, T., Yoneda, K., Manabe, M., & Demitsu, T. (2000) Spontaneous regression of Merkel cell carcinoma: a comparative study of TUNEL index and tumor-infiltrating lymphocytes between spontaneous regression and non-regression group. *Journal of Dermatological Science*, **24**, 203–211.
- Jeong, W. (2003) Roles of TRP14, a Thioredoxin-related Protein in Tumor Necrosis Factor- Signaling Pathways. *Journal of Biological Chemistry*, **279**, 3151–3159.
- Jeong, W., Yoon, H.W., Lee, S.-R., & Rhee, S.G. (2004) Identification and characterization of TRP14, a thioredoxin-related protein of 14 kDa. New insights into the specificity of thioredoxin function. *J. Biol. Chem*, **279**, 3142–3150.
- Ji, X., Ji, J., Shan, F., Zhang, Y., Chen, Y., & Lu, X. (2015) Cancer-associated fibroblasts from NSCLC promote the radioresistance in lung cancer cell lines. *Int J Clin Exp Med*, **8**, 7002–7008.
- Jotzu, C., Alt, E., Welte, G., Li, J., Hennessy, B.T., Devarajan, E., Krishnappa, S., Pinilla, S., Droll, L., & Song, Y.-H. (2010) Adipose tissue-derived stem cells differentiate into carcinoma-associated fibroblast-like cells under the influence of tumor-derived factors. *Anal Cell Pathol (Amst)*, **33**, 61–79.
- Joyce, J.A. & Pollard, J.W. (2009) Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat. Rev. Cancer*, **9**, 239–252.
- Kakarla, S., Chow, K.K.H., Mata, M., Shaffer, D.R., Song, X.-T., Wu, M.-F., Liu, H., Wang, L.L., Rowley, D.R., Pfizenmaier, K., & Gottschalk, S. (2013) Antitumor effects of chimeric receptor engineered human T cells directed to tumor stroma. *Mol. Ther*, **21**, 1611–1620.
- Kakarla, S., Song, X.-T., & Gottschalk, S. (2012) Cancer-associated fibroblasts as targets for immunotherapy. *Immunotherapy*, **4**, 1129–1138.
- Kalluri, R. (2009) EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *J. Clin. Invest*, **119**, 1417–1419.
- Kalluri, R. (2016) The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nat. Rev. Cancer*, **16**, 582–598.
- Kalluri, R. & Weinberg, R.A. (2009) The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest*, **119**, 1420–1428.
- Kalluri, R. & Zeisberg, M. (2006) Fibroblasts in cancer. *Nat. Rev. Cancer*, **6**, 392–401.
- Kamangar, F. (2006) Patterns of Cancer Incidence, Mortality, and Prevalence Across Five Continents: Defining Priorities to Reduce Cancer Disparities in Different Geographic Regions of the World. *Journal of Clinical Oncology*, **24**, 2137–2150.
- Kayamori, K., Katsube, K.-I., Sakamoto, K., Ohyama, Y., Hirai, H., Yukimori, A., Ohata, Y., Akashi, T., Saitoh, M., Harada, K., Harada, H., & Yamaguchi, A. (2016) NOTCH3 Is Induced in Cancer-Associated Fibroblasts and Promotes Angiogenesis in Oral Squamous Cell Carcinoma. *PLoS ONE*, **11**, e0154112.
- Keck, M.K., Zuo, Z., Khattri, A., Stricker, T.P., Brown, C.D., Imanguli, M., Rieke, D., Endhardt, K., Fang, P., Brägelmann, J., DeBoer, R., El-Dinali, M., Aktolga, S., Lei, Z., Tan, P., Rozen, S.G., Salgia, R., Weichselbaum, R.R., Lingen, M.W., Story, M.D., Ang, K.K., Cohen, E.E.W., White, K.P., Vokes, E.E., & Seiwert, T.Y. (2015) Integrative analysis of head and neck cancer identifies two biologically distinct HPV and three non-HPV subtypes. *Clinical Cancer Research*, **21**, 870–881.
- Kerr, K.M., Johnson, S.K., King, G., Kennedy, M.M., Weir, J., & Jeffrey, R. (1998) Partial regression in primary carcinoma of the lung: does it occur? *Histopathology*, **33**, 55–63.
- Kikuchi, N., Horiuchi, A., Osada, R., Imai, T., Wang, C., Chen, X., & Konishi, I. (2006) Nuclear expression of S100A4 is associated with aggressive behavior of epithelial ovarian carcinoma: an important autocrine/paracrine factor in tumor progression. *Cancer Sci*, **97**, 1061–1069.
- Komarova, N.L. & Boland, C.R. (2013) Cancer: calculated treatment. *Nature*, **499**, 291–292.
- Kreiter, S., Vormehr, M., van de Roemer, N., Diken, M., Löwer, M., Diekmann, J., Boegel, S., Schrörs, B., Vascotto, F., Castle, J.C., Tadmor, A.D., Schoenberger, S.P., Huber, C., Türeci, Ö., & Sahin, U. (2015) Mutant MHC class II epitopes drive therapeutic immune responses to cancer. *Nature*, **520**, 692–696.
- Kuperwasser, C., Chavarria, T., Wu, M., Magrane, G., Gray, J.W., Carey, L., Richardson, A., & Weinberg, R.A. (2004) Reconstruction of functionally normal and malignant human breast tissues in mice. *PNAS*, **101**, 4966–4971.
- Kutler, D.I. (2002) A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR). *Blood*, **101**, 1249–1256.
- Kyriakides, T.R., Zhu, Y.H., Smith, L.T., Bain, S.D., Yang, Z., Lin, M.T., Danielson, K.G., Iozzo, R.V., LaMarca, M., McKinney, C.E., Ginns, E.I., & Bornstein, P. (1998) Mice that lack thrombospondin 2 display connective tissue abnormalities that are associated with disordered collagen fibrillogenesis, an increased vascular density, and a bleeding diathesis. *The Journal of Cell Biology*, **140**, 419–430.

- Langley, R.R. & Fidler, I.J. (2011) The seed and soil hypothesis revisited--the role of tumor-stroma interactions in metastasis to different organs. *Int. J. Cancer*, **128**, 2527–2535.
- Laouar, Y., Sutterwala, F.S., Gorelik, L., & Flavell, R.A. (2005) Transforming growth factor-beta controls T helper type 1 cell development through regulation of natural killer cell interferon-gamma. *Nat Immunol*, **6**, 600–607.
- Lawrence, S.M., Huddleston, K.A., Pitts, L.R., Nguyen, N., Lee, Y.C., Vann, W.F., Coleman, T.A., & Betenbaugh, M.J. (2000) Cloning and expression of the human N-acetylneuraminic acid phosphate synthase gene with 2-keto-3-deoxy-D-glycero- D-galacto-nononic acid biosynthetic ability. *J. Biol. Chem*, **275**, 17869–17877.
- LeBleu, V.S., Taduri, G., O'Connell, J., Teng, Y., Cooke, V.G., Woda, C., Sugimoto, H., & Kalluri, R. (2013) Origin and function of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Nat Med*, **19**, 1047–1053.
- Lee, A.S. (2001) The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications. *Trends Biochem. Sci*, **26**, 504–510.
- Lee, J., Fassnacht, M., Nair, S., Boczkowski, D., & Gilboa, E. (2005) Tumor immunotherapy targeting fibroblast activation protein, a product expressed in tumor-associated fibroblasts. *Cancer Research*, **65**, 11156–11163.
- Leemans, C.R., Braakhuis, B.J.M., & Brakenhoff, R.H. (2010) The molecular biology of head and neck cancer. *Nature Publishing Group*, **11**, 9–22.
- Li, C., Shintani, S., Terakado, N., Nakashiro, K.-I., & Hamakawa, H. (2002) Infiltration of tumor-associated macrophages in human oral squamous cell carcinoma. *Oncol. Rep*, **9**, 1219–1223.
- Li, M., Li, M., Yin, T., Shi, H., Wen, Y., Zhang, B., Chen, M., Xu, G., Ren, K., & Wei, Y. (2016) Targeting of cancer-associated fibroblasts enhances the efficacy of cancer chemotherapy by regulating the tumor microenvironment. *Mol Med Report*, **13**, 2476–2484.
- Li, P., Shan, J.-X., Chen, X.-H., Zhang, D., Su, L.-P., Huang, X.-Y., Yu, B.-Q., Zhi, Q.-M., Li, C.-L., Wang, Y.-Q., Tomei, S., Cai, Q., Ji, J., Li, J.-F., Chouchane, L., Yu, Y.-Y., Sun, F.-Z., Xu, Z.-H., Liu, B.-Y., & Zhu, Z.-G. (2015) Epigenetic silencing of microRNA-149 in cancer-associated fibroblasts mediates prostaglandin E2/interleukin-6 signaling in the tumor microenvironment. *Cell Res*, **25**, 588–603.
- Li, X., Wang, Y., Zhao, Y., Yang, H., Tong, A., Zhao, C., Shi, H., Li, Y., Wang, Z., & Wei, Y. (2013) Immunotherapy of tumor with vaccine based on basic fibroblast growth factor-activated fibroblasts. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, **140**, 271–280.
- Liao, D., Luo, Y., Markowitz, D., Xiang, R., & Reisfeld, R.A. (2009) Cancer associated fibroblasts promote tumor growth and metastasis by modulating the tumor immune microenvironment in a 4T1 murine breast cancer model. *PLoS ONE*, **4**, e7965.
- Liu, M., Guo, S., & Stiles, J.K. (2011) The emerging role of CXCL10 in cancer (Review). *Oncol Lett*, **2**, 583–589.
- Lohr, J., Ratliff, T., Huppertz, A., Ge, Y., Dictus, C., Ahmadi, R., Grau, S., Hiraoka, N., Eckstein, V., Ecker, R.C., Korff, T., Deimling, von, A., Unterberg, A., Beckhove, P., & Herold-Mende, C. (2011) Effector T-cell infiltration positively impacts survival of glioblastoma patients and is impaired by tumor-derived TGF- β . *Clinical Cancer Research*, **17**, 4296–4308.
- Luo, H., Tu, G., Liu, Z., & Liu, M. (2015) Cancer-associated fibroblasts: A multifaceted driver of breast cancer progression. *Cancer Letters*, **361**, 155–163.
- Luster, A.D. & Ravetch, J.V. (1987) Biochemical characterization of a gamma interferon-inducible cytokine (IP-10). *Journal of Experimental Medicine*, **166**, 1084–1097.
- Lynch, D.H., Ramsdell, F., & Alderson, M.R. (1995) Fas and FasL in the homeostatic regulation of immune responses. *Immunol. Today*, **16**, 569–574.
- Ma, W., Lehner, P.J., Cresswell, P., Pober, J.S., & Johnson, D.R. (1997) Interferon-gamma rapidly increases peptide transporter (TAP) subunit expression and peptide transport capacity in endothelial cells. *J. Biol. Chem*, **272**, 16585–16590.
- Mahadevan, D. & Hoff, Von, D.D. (2007) Tumor-stroma interactions in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Molecular Cancer Therapeutics*, **6**, 1186–1197.
- Mahmoud, S.M.A., Lee, A.H.S., Paish, E.C., Macmillan, R.D., Ellis, I.O., & Green, A.R. (2012) Tumour-infiltrating macrophages and clinical outcome in breast cancer. *Journal of Clinical Pathology*, **65**, 159–163.
- Mahmoud, S.M.A., Paish, E.C., Powe, D.G., Macmillan, R.D., Grainge, M.J., Lee, A.H.S., Ellis, I.O., & Green, A.R. (2011) Tumor-Infiltrating CD8+ Lymphocytes Predict Clinical Outcome in Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, **29**, 1949–1955.
- Mantovani, A., Bottazzi, B., Colotta, F., Sozzani, S., & Ruco, L. (1992) The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunol. Today*, **13**, 265–270.
- Marur, S. & Forastiere, A.A. (2008) Head and neck cancer: changing epidemiology, diagnosis, and treatment. *Mayo Clin. Proc*, **83**, 489–501.
- Marur, S., D'Souza, G., Westra, W.H., & Forastiere, A.A. (2010) HPV-associated head and neck cancer: a virus-

- related cancer epidemic. *Lancet Oncol*, **11**, 781–789.
- Masson, D., Zamai, M., & Tschopp, J. (2002) Identification of granzyme A isolated from cytotoxic T-lymphocyte-granules as one of the proteases encoded by CTL-specific genes. *FEBS Letters*, **208**, 84–88.
- Maus, M.V., Fraietta, J.A., Levine, B.L., Kalos, M., Zhao, Y., & June, C.H. (2014) Adoptive immunotherapy for cancer or viruses. *Annu. Rev. Immunol*, **32**, 189–225.
- McNally, A., Hill, G.R., Sparwasser, T., Thomas, R., & Steptoe, R.J. (2011) CD4+CD25+ regulatory T cells control CD8+ T-cell effector differentiation by modulating IL-2 homeostasis. *PNAS*, **108**, 7529–7534.
- Mehanna, H., Beech, T., Nicholson, T., El-Hariry, I., McConkey, C., Paleri, V., & Roberts, S. (2013) Prevalence of human papillomavirus in oropharyngeal and nonoropharyngeal head and neck cancer--systematic review and meta-analysis of trends by time and region. *Head Neck*, **35**, 747–755.
- Melero, I., Berman, D.M., Aznar, M.A., Korman, A.J., Gracia, J.L.P., & Haanen, J. (2015) Evolving synergistic combinations of targeted immunotherapies to combat cancer. *Nat. Rev. Cancer*, **15**, 457–472.
- Melero, I., Gaudernack, G., Gerritsen, W., Huber, C., Parmiani, G., Scholl, S., Thatcher, N., Wagstaff, J., Zielinski, C., Faulkner, I., & Mellstedt, H. (2014) Therapeutic vaccines for cancer: an overview of clinical trials. *Nat Rev Clin Oncol*, **11**, 509–524.
- Melief, C.J.M. & van der Burg, S.H. (2008) Immunotherapy of established (pre)malignant disease by synthetic long peptide vaccines. *Nat. Rev. Cancer*, **8**, 351–360.
- Mellman, I., Coukos, G., & Dranoff, G. (2011) Cancer immunotherapy comes of age. *Nature*, **480**, 480–489.
- Miller, K.D., Siegel, R.L., Lin, C.C., Mariotto, A.B., Kramer, J.L., Rowland, J.H., Stein, K.D., Alteri, R., & Jemal, A. (2016) Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **66**, 271–289.
- Mills, C.D., Kincaid, K., Alt, J.M., Heilman, M.J., & Hill, A.M. (2000) M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. *The Journal of Immunology*, **164**, 6166–6173.
- Mishra, P.J., Mishra, P.J., Humeniuk, R., Medina, D.J., Alexe, G., Mesirov, J.P., Ganesan, S., Glod, J.W., & Banerjee, D. (2008) Carcinoma-associated fibroblast-like differentiation of human mesenchymal stem cells. *Cancer Research*, **68**, 4331–4339.
- Mlecnik, B., Tosolini, M., Kirilovsky, A., Berger, A., Bindea, G., Meatchi, T., Bruneval, P., Trajanoski, Z., Fridman, W.-H., Pagès, F., & Galon, J. (2011) Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction. *J. Clin. Oncol*, **29**, 610–618.
- Moll, R., Franke, W.W., Schiller, D.L., Geiger, B., & Krepler, R. (1982) The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*, **31**, 11–24.
- Morrison, S.J. & Spradling, A.C. (2008) Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell*, **132**, 598–611.
- Mrazek, A.A., Carmical, J.R., Wood, T.G., Hellmich, M.R., Eltorkey, M., Bohanon, F.J., & Chao, C. (2014) Colorectal Cancer-Associated Fibroblasts are Genotypically Distinct. *Curr Cancer Ther Rev*, **10**, 97–218.
- Murphy, K.M. (2011) *Janeway's Immunobiology*. Taylor & Francis Group.
- Murphy, K.M., Mahlke, K., Seidler, L., Travers, P., Haußer-Siller, I., & Walport, M. (2009) *Janeway Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag.
- Neckers, L. & Workman, P. (2012) Hsp90 molecular chaperone inhibitors: are we there yet? *Clinical Cancer Research*, **18**, 64–76.
- Nielsen, M., Lundegaard, C., & Lund, O. (2007) Prediction of MHC class II binding affinity using SMM-align, a novel stabilization matrix alignment method. *BMC Bioinformatics*, **8**, 238.
- Nikolich-Zugich, J. (2008) Ageing and life-long maintenance of T-cell subsets in the face of latent persistent infections. *Nat Rev Immunol*, **8**, 512–522.
- Ogino, T., Shigyo, H., Ishii, H., Katayama, A., Miyokawa, N., Harabuchi, Y., & Ferrone, S. (2006) HLA class I antigen down-regulation in primary laryngeal squamous cell carcinoma lesions as a poor prognostic marker. *Cancer Research*, **66**, 9281–9289.
- Oh, E.-Y., Christensen, S.M., Ghanta, S., Jeong, J.C., Bucur, O., Glass, B., Montaser-Kouhsari, L., Knoblauch, N.W., Bertos, N., Saleh, S.M., Haibe-Kains, B., Park, M., & Beck, A.H. (2015) Extensive rewiring of epithelial-stromal co-expression networks in breast cancer. *Genome Biol*, **16**, 128.
- Ohshio, Y., Teramoto, K., Hanaoka, J., Tezuka, N., Itoh, Y., Asai, T., Daigo, Y., & Ogasawara, K. (2015) Cancer-associated fibroblast-targeted strategy enhances antitumor immune responses in dendritic cell-based vaccine. *Cancer Sci*, **106**, 134–142.
- Onizuka, S., Tawara, I., Shimizu, J., Sakaguchi, S., Fujita, T., & Nakayama, E. (1999) Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. *Cancer Research*, **59**, 3128–3133.
- Öhlund, D., Elyada, E., & Tuveson, D. (2014) Fibroblast heterogeneity in the cancer wound. *J. Exp. Med*, **211**, 1503–1523.
- Österreicher, C.H., Penz-Österreicher, M., Grivnennikov, S.I., Guma, M., Koltsova, E.K., Datz, C., Sasik, R., Hardi-

- man, G., Karin, M., & Brenner, D.A. (2011) Fibroblast-specific protein 1 identifies an inflammatory subpopulation of macrophages in the liver. *PNAS*, **108**, 308–313.
- Paget, S. (1889) THE DISTRIBUTION OF SECONDARY GROWTHS IN CANCER OF THE BREAST. *The Lancet*, **133**, 571–573.
- Pagès, F., Berger, A., Camus, M., Sanchez-Cabo, F., Costes, A., Molitor, R., Mlecnik, B., Kirilovsky, A., Nilsson, M., Damotte, D., Meatchi, T., Bruneval, P., Cugnenc, P.-H., Trajanoski, Z., Fridman, W.-H., & Galon, J. (2005) Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.*, **353**, 2654–2666.
- Pardoll, D.M. (2012) The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer*, **12**, 252–264.
- Paterson, R.F., Ulbright, T.M., MacLennan, G.T., Zhang, S., Pan, C.-X., Sweeney, C.J., Moore, C.R., Foster, R.S., Koch, M.O., Eble, J.N., & Cheng, L. (2003) Molecular genetic alterations in the laser-capture-microdissected stroma adjacent to bladder carcinoma. *Cancer*, **98**, 1830–1836.
- Patocs, A., Zhang, L., Xu, Y., Weber, F., Caldes, T., Mutter, G.L., Platzer, P., & Eng, C. (2007) Breast-Cancer Stromal Cells with TP53 Mutations and Nodal Metastases. *New England Journal of Medicine*, **357**, 2543–2551.
- Peng, C.-H., Liao, C.-T., Peng, S.-C., Chen, Y.-J., Cheng, A.-J., Juang, J.-L., Tsai, C.-Y., Chen, T.-C., Chuang, Y.-J., Tang, C.-Y., Hsieh, W.-P., & Yen, T.-C. (2011) A novel molecular signature identified by systems genetics approach predicts prognosis in oral squamous cell carcinoma. *PLoS ONE*, **6**, e23452.
- Perrone, F., Bossi, P., Cortelazzi, B., Locati, L., Quattrone, P., Pierotti, M.A., Pilotti, S., & Licitra, L. (2010) TP53 Mutations and Pathologic Complete Response to Neoadjuvant Cisplatin and Fluorouracil Chemotherapy in Resected Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*, **28**, 761–766.
- Peters, B., Bulik, S., Tampe, R., van Endert, P.M., & Holzhutter, H.G. (2003) Identifying MHC Class I Epitopes by Predicting the TAP Transport Efficiency of Epitope Precursors. *The Journal of Immunology*, **171**, 1741–1749.
- Pezzutto, A., Ulrichs, T., & Burmester, G.R. (2007) *Taschenatlas Der Immunologie: Grundlagen, Labor, Klinik*. Thieme.
- Pietras, K. & Östman, A. (2010) Hallmarks of cancer: Interactions with the tumor stroma. *Exp. Cell Res*, **316**, 1324–1331.
- Pipkorn, R., Braun, K., Wiessler, M., Waldeck, W., Schrenk, H.-H., Koch, M., Semmler, W., & Komljenovic, D. (2014) A peptide & peptide nucleic acid synthesis technology for transporter molecules and theranostics—the SPPS. *Int J Med Sci*, **11**, 697–706.
- Platten, M. & Offringa, R. (2015) Cancer immunotherapy: exploiting neoepitopes. *Cell Res*, **25**, 887–888.
- Poeta, M.L., Manola, J., Goldwasser, M.A., Forastiere, A., Benoit, N., Califano, J.A., Ridge, J.A., Goodwin, J., Kennedy, D., Saunders, J., Westra, W., Sidransky, D., & Koch, W.M. (2007) TP53 mutations and survival in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N. Engl. J. Med.*, **357**, 2552–2561.
- Potentia, S., Zeisberg, E., & Kalluri, R. (2008) The role of endothelial-to-mesenchymal transition in cancer progression. *Br. J. Cancer*, **99**, 1375–1379.
- Powis, G., Mustacich, D., & Coon, A. (2000) The role of the redox protein thioredoxin in cell growth and cancer. *Free Radic. Biol. Med*, **29**, 312–322.
- Preiß, J., Dornoff, W., Schmieder, A., Honecker, F., & Claßen, J. (2014) *Taschenbuch Onkologie: Interdisziplinäre Empfehlungen Zur Therapie 2014/2015*. Zuckschwerdt Verlag.
- Prendergast, G.C., Metz, R., & Muller, A.J. (2009) IDO recruits Tregs in melanoma. *Cell Cycle*, **8**, 1818–1819.
- Prendergast, G.C., Smith, C., Thomas, S., Mandik-Nayak, L., Laury-Kleintop, L., Metz, R., & Muller, A.J. (2014) Indoleamine 2,3-dioxygenase pathways of pathogenic inflammation and immune escape in cancer. *Cancer Immunol Immunother*, **63**, 721–735.
- Procko, E., Ferrin-O'Connell, I., Ng, S.-L., & Gaudet, R. (2006) Distinct Structural and Functional Properties of the ATPase Sites in an Asymmetric ABC Transporter. *Molecular Cell*, **24**, 51–62.
- Qiu, W., Hu, M., Sridhar, A., Opeskin, K., Fox, S., Shipitsin, M., Trivett, M., Thompson, E.R., Ramakrishna, M., Goringe, K.L., Polyak, K., Haviv, I., & Campbell, I.G. (2008) No evidence of clonal somatic genetic alterations in cancer-associated fibroblasts from human breast and ovarian carcinomas. *Nat. Genet.*, **40**, 650–655.
- Read, S., Malmström, V., & Powrie, F. (2000) Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *Journal of Experimental Medicine*, **192**, 295–302.
- Resch, K., Martin, M.U., & Kaefer, V. (2010) *Immunopharmakologie*. UTB GmbH.
- Robbins, P.F., Lu, Y.-C., El-Gamil, M., Li, Y.F., Gross, C., Gartner, J., Lin, J.C., Teer, J.K., Clifton, P., Tycksen, E., Samuels, Y., & Rosenberg, S.A. (2013) Mining exomic sequencing data to identify mutated antigens recognized by adoptively transferred tumor-reactive T cells. *Nature Medicine*, **19**, 747–752.
- Robert, C., Ribas, A., Wolchok, J.D., Hodi, F.S., Hamid, O., Kefford, R., Weber, J.S., Joshua, A.M., Hwu, W.-J.,

- Gangadhar, T.C., Patnaik, A., Dronca, R., Zarour, H., Joseph, R.W., Boasberg, P., Chmielowski, B., Mateus, C., Postow, M.A., Gergich, K., Ellassaiss-Schaap, J., Li, X.N., Iannone, R., Ebbinghaus, S.W., Kang, S.P., & Daud, A. (2014) Anti-programmed-death-receptor-1 treatment with pembrolizumab in ipilimumab-refractory advanced melanoma: a randomised dose-comparison cohort of a phase 1 trial. *Lancet*, **384**, 1109–1117.
- Rosa, F.M. & Fellous, M. (1988) Regulation of HLA-DR gene by IFN-gamma. Transcriptional and post-transcriptional control. *The Journal of Immunology*, **140**, 1660–1664.
- Rubartelli, A., Bajetto, A., Allavena, G., Wollman, E., & Sitia, R. (1992) Secretion of thioredoxin by normal and neoplastic cells through a leaderless secretory pathway. *J. Biol. Chem*, **267**, 24161–24164.
- Rubartelli, A., Bonifaci, N., & Sitia, R. (1995) High rates of thioredoxin secretion correlate with growth arrest in hepatoma cells. *Cancer Research*, **55**, 675–680.
- Rudd, C.E. & Schneider, H. (2003) Unifying concepts in CD28, ICOS and CTLA4 co-receptor signalling. *Nat Rev Immunol*, **3**, 544–556.
- Rusakiewicz, S., Semeraro, M., Sarabi, M., Desbois, M., Locher, C., Mendez, R., Vimond, N., Concha, A., Garrido, F., Isambert, N., Chaigneau, L., Le Brun-Ly, V., Dubreuil, P., Cremer, I., Caignard, A., Poirier-Colame, V., Chaba, K., Flament, C., Halama, N., Jager, D., Eggermont, A., Bonvalot, S., Commo, F., Terrier, P., Opolon, P., Emile, J.F., Coindre, J.M., Kroemer, G., Chaput, N., Le Cesne, A., Blay, J.Y., & Zitvogel, L. (2013) Immune Infiltrates Are Prognostic Factors in Localized Gastrointestinal Stromal Tumors. *Cancer Research*, **73**, 3499–3510.
- Rüger, B., Dunbar, P.R., Hasan, Q., Sawada, H., Kittelberger, R., Greenhill, N., & Neale, T.J. (1994) Human mast cells produce type VIII collagen in vivo. *Int J Exp Pathol*, **75**, 397–404.
- Rønnev-Jessen, L., Petersen, O.W., & Bissell, M.J. (1996) Cellular changes involved in conversion of normal to malignant breast: importance of the stromal reaction. *Physiol. Rev*, **76**, 69–125.
- Sabbatini, P., Tsuji, T., Ferran, L., Ritter, E., Sedrak, C., Tuballes, K., Jungbluth, A.A., Ritter, G., Aghajanian, C., Bell-McGuinn, K., Hensley, M.L., Konner, J., Tew, W., Spriggs, D.R., Hoffman, E.W., Venhaus, R., Pan, L., Salazar, A.M., Diefenbach, C.M., Old, L.J., & Gnajatic, S. (2012) Phase I trial of overlapping long peptides from a tumor self-antigen and poly-ICLC shows rapid induction of integrated immune response in ovarian cancer patients. *Clinical Cancer Research*, **18**, 6497–6508.
- Salo, T., Vered, M., Bello, I.O., Nyberg, P., Bitu, C.C., Zlotogorski Hurvitz, A., & Dayan, D. (2014) Insights into the role of components of the tumor microenvironment in oral carcinoma call for new therapeutic approaches. *Exp. Cell Res*, **325**, 58–64.
- Santos, A.M., Jung, J., Aziz, N., Kissil, J.L., & Puré, E. (2009) Targeting fibroblast activation protein inhibits tumor stromagenesis and growth in mice. *J. Clin. Invest*, **119**, 3613–3625.
- Sappino, A.P., Skalli, O., Jackson, B., Schürch, W., & Gabbiani, G. (1988) Smooth-muscle differentiation in stromal cells of malignant and non-malignant breast tissues. *Int. J. Cancer*, **41**, 707–712.
- Sasada, T., Kimura, M., Yoshida, Y., Kanai, M., & Takabayashi, A. (2003) CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with gastrointestinal malignancies. *Cancer*, **98**, 1089–1099.
- Sato, E., Olson, S.H., Ahn, J., Bundy, B., Nishikawa, H., Qian, F., Jungbluth, A.A., Frosina, D., Gnajatic, S., Ambrosone, C., Kepner, J., Odunsi, T., Ritter, G., Lele, S., Chen, Y.-T., Ohtani, H., Old, L.J., & Odunsi, K. (2005) Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *PNAS*, **102**, 18538–18543.
- Schmoll, H.J., Höffken, K., & Possinger, K. (2005) *Kompendium Internistische Onkologie: Standards in Diagnostik Und Therapie*. Springer Berlin Heidelberg.
- Schreiber, R.D., Old, L.J., & Smyth, M.J. (2011) Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science*, **331**, 1565–1570.
- Seiwert, T.Y., Zuo, Z., Keck, M.K., Khattri, A., Pdamallu, C.S., Stricker, T., Brown, C., Pugh, T.J., Stojanov, P., Cho, J., Lawrence, M.S., Getz, G., Brägelmann, J., DeBoer, R., Weichselbaum, R.R., Langerman, A., Portugal, L., Blair, E., Stenson, K., Lingen, M.W., Cohen, E.E.W., Vokes, E.E., White, K.P., & Hammerman, P.S. (2015) Integrative and comparative genomic analysis of HPV-positive and HPV-negative head and neck squamous cell carcinomas. *Clinical Cancer Research*, **21**, 632–641.
- Serini, G. & Gabbiani, G. (1999) Mechanisms of myofibroblast activity and phenotypic modulation. *Exp. Cell Res*, **250**, 273–283.
- Sharabi, A.B., Lim, M., DeWeese, T.L., & Drake, C.G. (2015) Radiation and checkpoint blockade immunotherapy: radiosensitisation and potential mechanisms of synergy. *Lancet Oncol*, **16**, e498–e509.
- Shen, Y. & Hendershot, L.M. (2005) ERdj3, a stress-inducible endoplasmic reticulum DnaJ homologue, serves as a cofactor for BiP's interactions with unfolded substrates. *Mol. Biol. Cell*, **16**, 40–50.
- Shimizu, J., Yamazaki, S., & Sakaguchi, S. (1999) Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *The Journal of Immunology*, **163**, 5211–5218.

- Sica, A., Schioppa, T., Mantovani, A., & Allavena, P. (2006) Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: Potential targets of anti-cancer therapy. *European Journal of Cancer*, **42**, 717–727.
- Siegel, R., Naishadham, D., & Jemal, A. (2013) Cancer statistics, 2013. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **63**, 11–30.
- Silva, M., Silva, Z., Marques, G., Ferro, T., Gonçalves, M., Monteiro, M., van Vliet, S.J., Mohr, E., Lino, A.C., Fernandes, A.R., Lima, F.A., van Kooyk, Y., Matos, T., Tadokoro, C.E., & Videira, P.A. (2015) Sialic acid removal from dendritic cells improves antigen cross-presentation and boosts anti-tumor immune responses. *Oncotarget*, **5**.
- Skinner, H.D., Sandulache, V.C., Ow, T.J., Meyn, R.E., Yordy, J.S., Beadle, B.M., Fitzgerald, A.L., Giri, U., Ang, K.K., & Myers, J.N. (2012) TP53 Disruptive Mutations Lead to Head and Neck Cancer Treatment Failure through Inhibition of Radiation-Induced Senescence. *Clinical Cancer Research*, **18**, 290–300.
- Speiser, D.E., Liénard, D., Rufer, N., Rubio-Godoy, V., Rimoldi, D., Lejeune, F., Krieg, A.M., Cerottini, J.-C., & Romero, P. (2005) Rapid and strong human CD8+ T cell responses to vaccination with peptide, IFA, and CpG oligodeoxynucleotide 7909. *Journal of Clinical Investigation*, **115**, 739–746.
- Straussman, R., Morikawa, T., Shee, K., Barzily-Rokni, M., Qian, Z.R., Du, J., Davis, A., Mongare, M.M., Gould, J., Frederick, D.T., Cooper, Z.A., Chapman, P.B., Solit, D.B., Ribas, A., Lo, R.S., Flaherty, K.T., Ogino, S., Wargo, J.A., & Golub, T.R. (2012) Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion. *Nature*, **487**, 500–504.
- Strebhardt, K. & Ullrich, A. (2008) *Paul Ehrlich's Magic Bullet Concept: 100 Years of Progress.*, Nature reviews. Cancer. Nature Publishing Group.
- Streit, M., Riccardi, L., Velasco, P., Brown, L.F., Hawighorst, T., Bornstein, P., & Detmar, M. (1999) Thrombospondin-2: a potent endogenous inhibitor of tumor growth and angiogenesis. *PNAS*, **96**, 14888–14893.
- Streit, M., Stephen, A.E., Hawighorst, T., Matsuda, K., Lange-Asschenfeldt, B., Brown, L.F., Vacanti, J.P., & Detmar, M. (2002) Systemic inhibition of tumor growth and angiogenesis by thrombospondin-2 using cell-based antiangiogenic gene therapy. *Cancer Research*, **62**, 2004–2012.
- Strutz, F., Okada, H., Lo, C.W., Danoff, T., Carone, R.L., Tomaszewski, J.E., & Neilson, E.G. (1995) Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1. *The Journal of Cell Biology*, **130**, 393–405.
- Sugihara, H., Ishimoto, T., Yasuda, T., Izumi, D., Eto, K., Sawayama, H., Miyake, K., Kurashige, J., Imamura, Y., Hiyoshi, Y., Iwatsuki, M., Iwagami, S., Baba, Y., Sakamoto, Y., Miyamoto, Y., Yoshida, N., Watanabe, M., Takamori, H., & Baba, H. (2015) Cancer-associated fibroblast-derived CXCL12 causes tumor progression in adenocarcinoma of the esophagogastric junction. *Med. Oncol*, **32**, 618–7.
- Sugimoto, H., Mundel, T.M., Kieran, M.W., & Kalluri, R. (2014) Identification of fibroblast heterogeneity in the tumor microenvironment. *Cancer Biology & Therapy*, **5**, 1640–1646.
- Sun, Y., Song, M., Jäger, E., Schwer, C., Stevanovic, S., Flindt, S., Karbach, J., Nguyen, X.D., Schadendorf, D., & Cichutek, K. (2008) Human CD4+ T lymphocytes recognize a vascular endothelial growth factor receptor-2-derived epitope in association with HLA-DR. *Clinical Cancer Research*, **14**, 4306–4315.
- Sund, M. & Kalluri, R. (2009) Tumor stroma derived biomarkers in cancer. *Cancer Metastasis Rev*, **28**, 177–183.
- Takahashi, H., Sakakura, K., Kawabata-Iwakawa, R., Rokudai, S., Toyoda, M., Nishiyama, M., & Chikamatsu, K. (2015) Immunosuppressive activity of cancer-associated fibroblasts in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother*, **64**, 1407–1417.
- Tampe, B. & Zeisberg, M. (2014) Contribution of genetics and epigenetics to progression of kidney fibrosis. *Nephrol. Dial. Transplant*, **29 Suppl 4**, iv72–iv79.
- Tenzer, S., Peters, B., Bulik, S., Schoor, O., Lemmel, C., Schatz, M.M., Kloetzel, P.-M., Rammensee, H.-G., Schild, H., & Holzthutter, H.G. (2005) Modeling the MHC class I pathway by combining predictions of proteasomal cleavage, TAP transport and MHC class I binding. *Cell. Mol. Life Sci*, **62**, 1025–1037.
- Tomasek, J.J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C., & Brown, R.A. (2002) Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*, **3**, 349–363.
- Torre, L.A., Bray, F., Siegel, R.L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., & Jemal, A. (2015) Global cancer statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **65**, 87–108.
- Tran, E., Chinnasamy, D., Yu, Z., Morgan, R.A., Lee, C.-C.R., Restifo, N.P., & Rosenberg, S.A. (2013) Immune targeting of fibroblast activation protein triggers recognition of multipotent bone marrow stromal cells and cachexia. *J. Exp. Med*, **210**, 1125–1135.
- Tsutsumi, S., Namba, T., Tanaka, K.-I., Arai, Y., Ishihara, T., Aburaya, M., Mima, S., Hoshino, T., & Mizushima, T. (2006) Celecoxib upregulates endoplasmic reticulum chaperones that inhibit celecoxib-induced apoptosis in human gastric cells. *Oncogene*, **25**, 1018–1029.
- Tuhkanen, H., Anttila, M., Kosma, V.-M., Heinonen, S., Juhola, M., Helisalmi, S., Kataja, V., & Mannermaa, A. (2006) Frequent gene dosage alterations in stromal cells of epithelial ovarian carcinomas. *Int. J. Cancer*,

- 119**, 1345–1353.
- Uhlen, M., Fagerberg, L., Hallstrom, B.M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., Sivertsson, A., Kampf, C., Sjostedt, E., Asplund, A., Olsson, I., Edlund, K., Lundberg, E., Navani, S., Szgyarto, C.A.K., Odeberg, J., Djurainovic, D., Takanen, J.O., Hober, S., Alm, T., Edqvist, P.H., Berling, H., Tegel, H., Mulder, J., Rockberg, J., Nilsson, P., Schwenk, J.M., Hamsten, M., Feilitzten, von, K., Forsberg, M., Persson, L., Johansson, F., Zwahlen, M., Heijne, von, G., Nielsen, J., & Ponten, F. (2015) Tissue-based map of the human proteome. *Science*, **347**, 1260419–1260419.
- van der Gun, B.T.F., Melchers, L.J., Ruiters, M.H.J., de Leij, L.F.M.H., McLaughlin, P.M.J., & Rots, M.G. (2010) EpCAM in carcinogenesis: the good, the bad or the ugly. *Carcinogenesis*, **31**, 1913–1921.
- van Karnebeek, C.D.M., Bonafé, L., Wen, X.-Y., Tarailo-Graovac, M., Balzano, S., Royer-Bertrand, B., Ashikov, A., Garavelli, L., Mammi, I., Turolla, L., Breen, C., Donnai, D., Cormier, V., Heron, D., Nishimura, G., Uchikawa, S., Campos-Xavier, B., Rossi, A., Hennes, T., Brand-Arzamendi, K., Rozmus, J., Harshman, K., Stevenson, B.J., Girardi, E., Superti-Furga, G., Dewan, T., Collingridge, A., Halparin, J., Ross, C.J., Van Allen, M.I., Rossi, A., Engelke, U.F., Kluijtmans, L.A.J., van der Heeft, E., Renkema, H., de Brouwer, A., Huijben, K., Zijlstra, F., Heisse, T., Boltje, T., Wasserman, W.W., Rivolta, C., Unger, S., Lefeber, D.J., Wevers, R.A., & Superti-Furga, A. (2016) NANS-mediated synthesis of sialic acid is required for brain and skeletal development. *Nature Publishing Group*.
- Vermorken, J.B., Herbst, R.S., Leon, X., Amellal, N., & Baselga, J. (2008) Overview of the efficacy of cetuximab in recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck in patients who previously failed platinum-based therapies. *Cancer*, **112**, 2710–2719.
- Videira, P.A., Amado, I.F., Crespo, H.J., Alguero, M.C., Dall'Olio, F., Cabral, M.G., & Trindade, H. (2007) Surface α 2-3- and α 2-6-sialylation of human monocytes and derived dendritic cells and its influence on endocytosis. *Glycoconjugate Journal*, **25**, 259–268.
- Vignali, D.A.A., Collison, L.W., & Workman, C.J. (2008) How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol*, **8**, 523–532.
- Villadangos, J.A., Heath, W.R., & Carbone, F.R. (2007) Outside looking in: the inner workings of the cross-presentation pathway within dendritic cells. *Trends in Immunology*, **28**, 45–47.
- Vogel, A., Horneffer, V., Lorenz, K., Linz, N., Hüttmann, G., & Gebert, A. (2007) Principles of Laser Microdissection and Catapulting of Histologic Specimens and Live Cells. In *Laser Manipulation of Cells and Tissues, Methods in Cell Biology*. Elsevier, pp. 153–205.
- Vogel, C. & Marcotte, E.M. (2012) Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat. Rev. Genet*, **13**, 227–232.
- Voskens, C.J., Goldinger, S.M., Loquai, C., Robert, C., Kaehler, K.C., Berking, C., Bergmann, T., Bockmeyer, C.L., Eigentler, T., Fluck, M., Garbe, C., Gutzmer, R., Grabbe, S., Hauschild, A., Hein, R., Hundorfean, G., Justich, A., Keller, U., Klein, C., Mateus, C., Mohr, P., Paetzold, S., Satzger, I., Schadendorf, D., Schlaeppli, M., Schuler, G., Schuler-Thurner, B., Trefzer, U., Ulrich, J., Vaubel, J., Moos, von, R., Weder, P., Wilhelm, T., Göppner, D., Dummer, R., & Heinzerling, L.M. (2013) The price of tumor control: an analysis of rare side effects of anti-CTLA-4 therapy in metastatic melanoma from the ipilimumab network. *PLoS ONE*, **8**, e53745.
- Wang, L.-C.S., Lo, A., Scholler, J., Sun, J., Majumdar, R.S., Kapoor, V., Antzis, M., Cotner, C.E., Johnson, L.A., Durham, A.C., Solomides, C.C., June, C.H., Puré, E., & Albelda, S.M. (2014) Targeting fibroblast activation protein in tumor stroma with chimeric antigen receptor T cells can inhibit tumor growth and augment host immunity without severe toxicity. *Cancer Immunol Res*, **2**, 154–166.
- Weber, F., Xu, Y., Zhang, L., Patocs, A., Shen, L., Platzer, P., & Eng, C. (2007) Microenvironmental Genomic Alterations and Clinicopathological Behavior in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *JAMA*, **297**, 187–195.
- Wen, K.W. & Damania, B. (2010) Hsp90 and Hsp40/Erdj3 are required for the expression and anti-apoptotic function of KSHV K1. *Oncogene*, **29**, 3532–3544.
- Wen, Y., Wang, C.-T., Ma, T.-T., Li, Z.-Y., Zhou, L.-N., Mu, B., Leng, F., Shi, H.-S., Li, Y.-O., & Wei, Y.-Q. (2010) Immunotherapy targeting fibroblast activation protein inhibits tumor growth and increases survival in a murine colon cancer model. *Cancer Science*, **101**, 2325–2332.
- Wichmann, G., Rosolowski, M., Krohn, K., Kreuz, M., Boehm, A., Reiche, A., Scharrer, U., Halama, D., Bertolini, J., Bauer, U., Holzinger, D., Pawlita, M., Hess, J., Engel, C., Hasenclever, D., Scholz, M., Ahnert, P., Kirsten, H., Hemprich, A., Wittekind, C., Herbarth, O., Horn, F., Dietz, A., Loeffler, M., Leipzig Head and Neck Group (LHNG) (2015) The role of HPV RNA transcription, immune response-related gene expression and disruptive TP53 mutations in diagnostic and prognostic profiling of head and neck cancer. *Int. J. Cancer*, **137**, 2846–2857.
- Willett, C.G., Boucher, Y., di Tomaso, E., Duda, D.G., Munn, L.L., Tong, R.T., Chung, D.C., Sahani, D.V., Kalva, S.P.,

- Kozin, S.V., Mino, M., Cohen, K.S., Scadden, D.T., Hartford, A.C., Fischman, A.J., Clark, J.W., Ryan, D.P., Zhu, A.X., Blaszkowsky, L.S., Chen, H.X., Shellito, P.C., Lauwers, G.Y., & Jain, R.K. (2004) Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivascular effects in human rectal cancer. *Nat Med*, **10**, 145–147.
- Winslow, S. (2015) Prognostic stromal gene signatures in breast cancer 1–13.
- Wittekind, C. (2014) *TNM Atlas*. John Wiley & Sons.
- Yamada, M., Tomida, A., Yoshikawa, H., Taketani, Y., & Tsuruo, T. (1996) Increased expression of thioredoxin/adult T-cell leukemia-derived factor in cisplatin-resistant human cancer cell lines. *Clinical Cancer Research*, **2**, 427–432.
- Yamashita, M., Ogawa, T., Zhang, X., Hanamura, N., Kashikura, Y., Takamura, M., Yoneda, M., & Shiraishi, T. (2012) Role of stromal myofibroblasts in invasive breast cancer: stromal expression of alpha-smooth muscle actin correlates with worse clinical outcome. *Breast Cancer*, **19**, 170–176.
- Yang, Z., Kyriakides, T.R., & Bornstein, P. (2000) Matricellular proteins as modulators of cell-matrix interactions: adhesive defect in thrombospondin 2-null fibroblasts is a consequence of increased levels of matrix metalloproteinase-2. *Mol. Biol. Cell*, **11**, 3353–3364.
- Yang, Z., Strickland, D.K., & Bornstein, P. (2001) Extracellular matrix metalloproteinase 2 levels are regulated by the low density lipoprotein-related scavenger receptor and thrombospondin 2. *J. Biol. Chem*, **276**, 8403–8408.
- Yu, M., Haslam, R.H., & Haslam, D.B. (2000) HEDJ, an Hsp40 co-chaperone localized to the endoplasmic reticulum of human cells. *J. Biol. Chem*, **275**, 24984–24992.
- Yu, P. (2005) Intratumor depletion of CD4+ cells unmasks tumor immunogenicity leading to the rejection of late-stage tumors. *Journal of Experimental Medicine*, **201**, 779–791.
- Zeisberg, E.M. & Zeisberg, M. (2013) The role of promoter hypermethylation in fibroblast activation and fibrogenesis. *J. Pathol*, **229**, 264–273.
- Zeisberg, E.M., Potenta, S., Xie, L., Zeisberg, M., & Kalluri, R. (2007) Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts. *Cancer Research*, **67**, 10123–10128.
- Zeisberg, M., Strutz, F., & Müller, G.A. (2000) Role of fibroblast activation in inducing interstitial fibrosis. *J. Nephrol*, **13 Suppl 3**, S111–S120.
- Zhang, B. (2008) Targeting the Stroma by T Cells to Limit Tumor Growth. *Cancer Research*, **68**, 9570–9573.
- Zhang, L., Conejo-Garcia, J.R., Katsaros, D., Gimotty, P.A., Massobrio, M., Regnani, G., Makrigiannakis, A., Gray, H., Schlienger, K., Liebman, M.N., Rubin, S.C., & Coukos, G. (2003) Intratumoral T Cells, Recurrence, and Survival in Epithelial Ovarian Cancer. *New England Journal of Medicine*, **348**, 203–213.
- Zhang, S.-F., Wang, X.-Y., Fu, Z.-Q., Peng, Q.-H., Zhang, J.-Y., Ye, F., Fu, Y.-F., Zhou, C.-Y., Lu, W.-G., Cheng, X.-D., & Xie, X. (2015) TXNDC17 promotes paclitaxel resistance via inducing autophagy in ovarian cancer. *Autophagy*, **11**, 225–238.
- Zhang, Y. & Ertl, H.C.J. (2016) Depletion of FAP+ cells reduces immunosuppressive cells and improves metabolism and functions CD8+T cells within tumors. *Oncotarget*.
- Zhang, Z., Wang, A., Li, H., Zhi, H., & Lu, F. (2016) STAT3-dependent TXNDC17 expression mediates Taxol resistance through inducing autophagy in human colorectal cancer cells. *Gene*, **584**, 75–82.
- Zhou, F. (2009) Molecular mechanisms of IFN-gamma to up-regulate MHC class I antigen processing and presentation. *Int. Rev. Immunol*, **28**, 239–260.
- Zi, F., He, J., He, D., Li, Y., Yang, L., & Cai, Z. (2015a) Fibroblast activation protein α in tumor microenvironment: Recent progression and implications (Review). *Mol Med Report*, 1–9.
- Zi, F., He, J., He, D., Li, Y., Yang, L., & Cai, Z. (2015b) Fibroblast activation protein α in tumor microenvironment: Recent progression and implications (Review). *Mol Med Report*, 1–9.
- Zom, G.G., Khan, S., Britten, C.M., Sommandas, V., Camps, M.G.M., Loof, N.M., Budden, C.F., Meeuwenoord, N.J., Filippov, D.V., van der Marel, G.A., Overkleeft, H.S., Melief, C.J.M., & Ossendorp, F. (2014) Efficient induction of antitumor immunity by synthetic toll-like receptor ligand-peptide conjugates. *Cancer Immunol Res*, **2**, 756–764.

9 ANHANG

9.1 Abbildungen

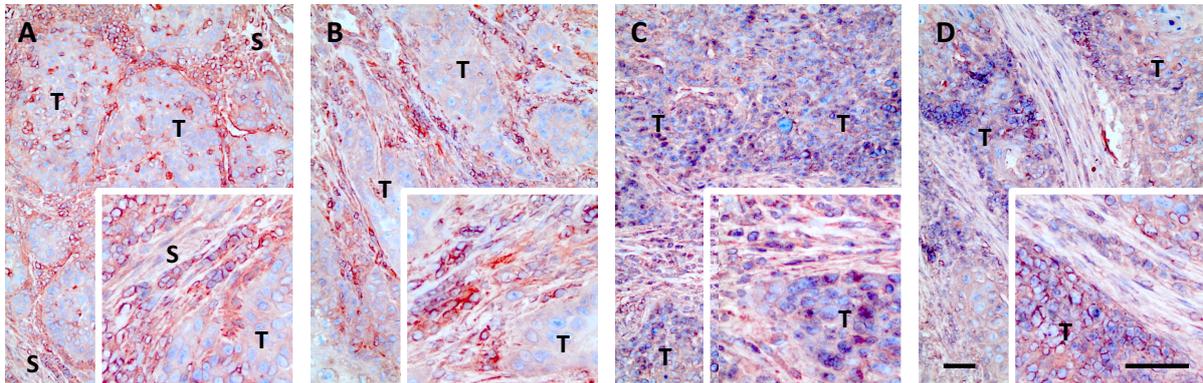


Abbildung 30: Immunhistochemische Färbungen gegen HLA-ABC auf Gewebedünnschnitten.

A| HNO432, B| HNO467, C| HNO722 und D| HNO741 gefärbt mit dem pan-MHC-I-Antikörper HLA-ABC (W36/32). Messbalken = 50 µm.

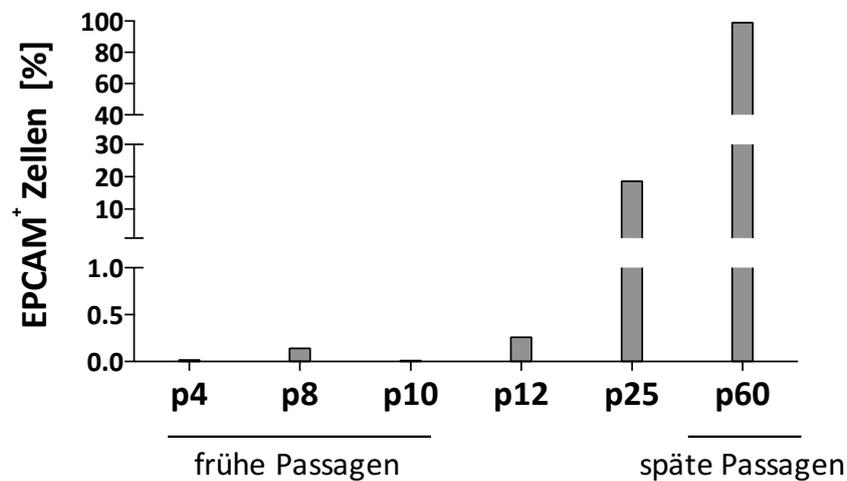


Abbildung 31: Zunahme des Anteils EPCAM-positiver Zellen von frühen über mittlere bis zu den späten Passagen.

Repräsentative FACS-Analysen verschiedener Passagen (p4, p8, p10, p12, p25, p60) der HNSCC-Primärzellkultur HNO467. Die frühen Passagen (p4, p8, p10) enthalten 0,001 & bis 0,140 % EPCAM-positiv Zellen. Über die Kultivierung steigt die Anzahl der EPCAM⁺ Zellen an bis die späten Passagen schließlich aus 100 % EPCAM⁺ Zellen bestehen.

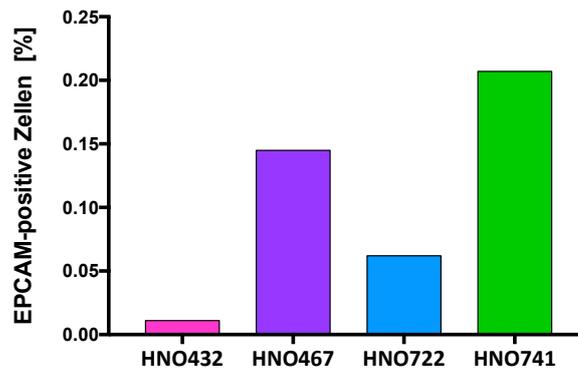


Abbildung 32: Reinheit der frühen Passagen nach dem EPCAM-*BeadSort*

Balken repräsentieren den prozentualen Anteil der EPCAM-positiven Zellen in den frühen Passagen (CAFs) der HNSCC-Tumorpatienten HNO4332, HNO467, HNO722, HNO741.

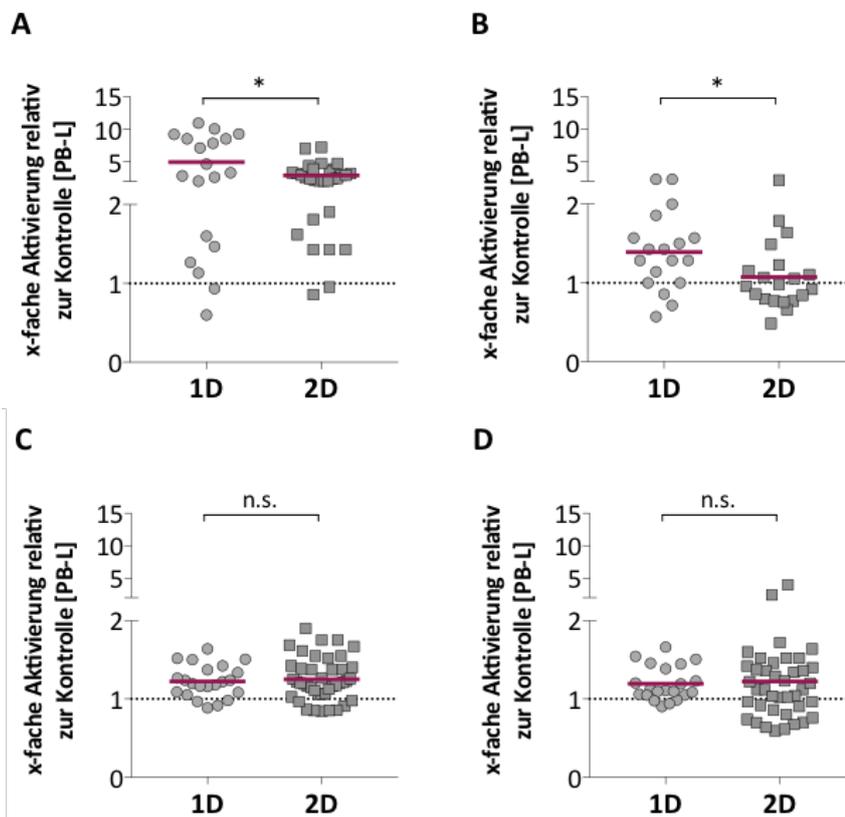


Abbildung 33: Kumulative Daten der IFN- γ -ELISPOT-Assays der 1. und 2. Dimensionsfraktionen aufgetrennt nach Patienten.

Kumulative Darstellung der T-Zellantworten gegen die erste Dimension (1D) und zweite Dimension (2D) der PF2D-Fractionen von **A** | HNO432, **B** | HNO467, **C** | HNO722, **D** | HNO741. Die Fractionen wurden mit den DCs inkubiert, autologe T-Zellen (TCs) zugegeben und anschließend die Anzahl reaktiver TCs (IFN- γ -Spots/ 1×10^4 TCs) in Triplikaten detektiert. Punkte/Quadrate repräsentieren Quotienten aus dem Mittelwert (Triplikate) der Anzahl reaktiver TCs (IFN- γ -Spots/ 1×10^4 TCs) gegen die PF2D-Fractionen und dem PBMC-Lysat (PB-L). * = $p < 0,05$, n.s. = nicht signifikant.

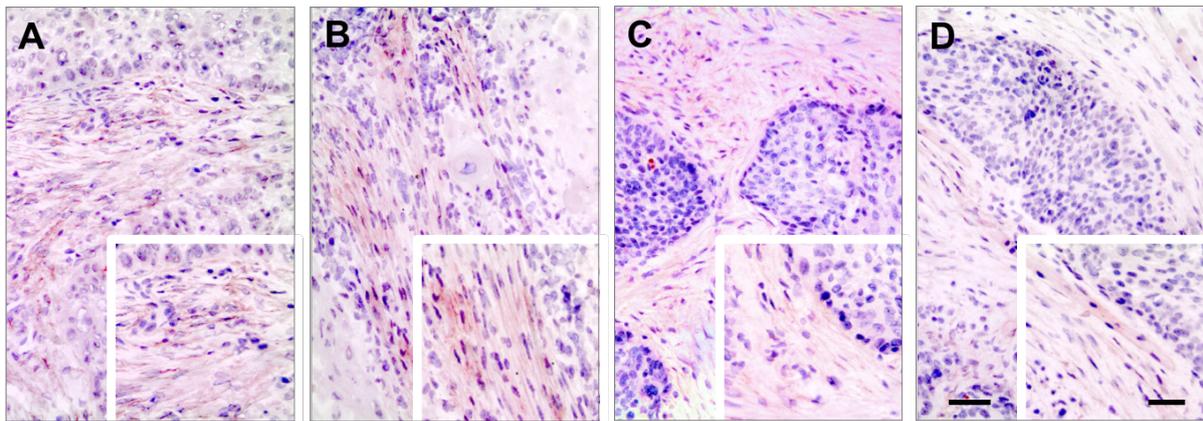


Abbildung 34: Immunhistochemische Färbungen, der für die LCM verwendeten Gewebe gegen FAP.
 Für die *Laser Capture Microdissection* verwendete HNSCC-Tumore **A** | HNO269b, **B** | HNO281b, **C** | HNO485y und **D** | HNO543 wurden immunhistochemisch den gegen das *Fibroblast Activation Protein* (FAP) gefärbt. Messbalken = 50 µm.

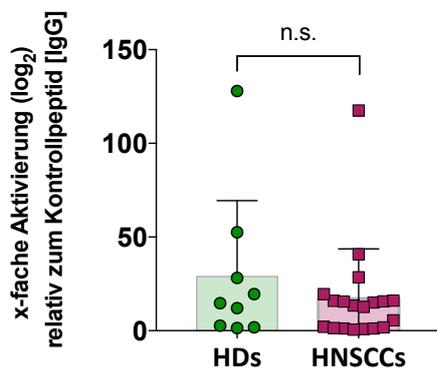


Abbildung 35: Vergleich der T-Zellantworten gegen die Positivkontrolle CMV/AdV in gesunden Spendern (HDs) und HNSCC-Tumorpatienten (HNSCC) im IFN-γ-ELISPOT-Assay.
 n.s. = nicht signifikant.

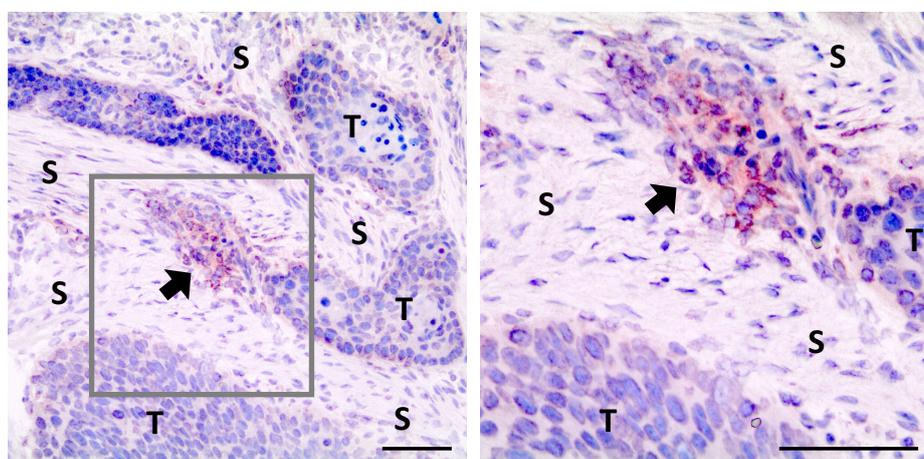


Abbildung 36: Repräsentative immunhistochemische Färbung gegen das Kandidatenantigen NANS.
 Acetonfixierte Gewebedünnschnitte des HNSCC-Tumors HNO280 wurden immunhistochemisch gegen N-Acetylneuraminsäure (NANS) gefärbt. Pfeil weist auf die Akkumulation von Lymphozyten hin. S = Tumorstromaareale, T = Tumoreareale. Messbalken = 50 µm.

9.2 Tabellen

Tabelle 28: Statistische Werte zu den Microarray-basierenden Intersektionsstudien

Gensymbol	Gruppe I		Gruppe II		Gruppe III	
	Vergleichbare Expression in CAFs und dissektiertem Tumorstroma		Höhere Expression im Tumorstroma vergl. mit Normalstroma		Höhere Expression in CAFs vergl. mit normalen Fibroblasten	
	p-Wert	log ₂ FC	p-Wert	log ₂ FC	p-Wert	log ₂ FC
C22orf28	0,2054	-0,3470	0,6933	-0,0401	< 0.0001	0,6520
CAP1	0,6523	-0,1440	0,0650	0,5685	0,0865	0,2058
CFL1	0,1313	-0,5939	0,5561	0,0594	< 0.0001	0,7114
CMPK1	0,4501	0,1441	0,0378	0,5628	0,4178	0,1672
COL5A2	0,0993	1,3771	0,0950	1,7306	0,1627	0,2228
COX5A	0,3775	-0,1013	0,0040	0,6795	0,1231	0,1437
DNAJB11	0,1370	0,3116	0,0338	0,8055	0,0036	0,2983
FABP5	0,0906	0,9265	0,5372	-0,4107	0,0001	0,5592
FAP	0,1248	-1,2272	0,0812	1,4634	< 0.0001	1,0302
GGH	0,1635	-0,5338	0,0063	1,0245	0,6332	0,5478
GLRX	0,0524	-0,5872	0,0409	1,3433	0,2654	-0,2884
GLT25D1	0,3020	0,2940	0,8499	0,0252	0,0012	0,6999
GSTO1	0,0052	-0,7253	0,0214	0,8239	0,0019	0,6096
H2AFZ	0,2761	-0,4133	0,0643	0,5545	0,0181	0,2804
HIST2H2AC	0,2993	-0,7002	0,7966	-0,2453	0,0404	0,5016
HPRT1	0,0321	-0,9922	0,0852	0,5525	0,0002	0,5271
HSP90AA1	0,2750	-0,1241	0,0168	0,5576	0,4987	-0,0534
HSP90B1	0,3435	0,4279	0,0354	0,9097	0,0031	0,3674
KHSRP	0,6764	0,3155	0,9673	0,1328	0,0010	0,5608
MTPN	0,0527	-0,4250	0,0498	0,5907	0,0146	-0,1618
NANS	0,1260	-0,4970	0,9656	0,1038	< 0.0001	0,6299
NPTN	0,7167	0,0120	0,0062	0,5555	0,0124	-0,2071
PAFAH1B3	0,3909	-0,1007	0,9385	-0,1733	0,0063	0,5905
PALLD	0,4820	0,4641	0,0306	1,2437	0,2030	-0,1402
PFN1	0,1588	-0,4590	0,0360	0,6557	0,0199	0,4234
PRDX4	0,3949	-0,2026	0,0511	1,1244	0,0012	0,3514
RCN3	0,1098	-0,7025	0,8193	0,0678	0,0026	0,7971
SET	0,6774	-0,0460	0,0540	0,6515	0,1349	-0,2147
SH3BGR1	0,6035	0,0916	0,0655	0,6403	0,0001	-0,2466
SLC4A7	0,1587	0,2166	0,0180	0,6860	0,1785	-0,2982
SLK	0,1989	0,3196	0,0715	0,6661	0,9584	0,0834
TACSTD2	0,1459	1,0574	0,6085	-2,0643	0,0022	1,2708
THBS2	0,3407	0,4187	0,0276	1,4088	0,0150	-0,5406
TPM4	0,4290	-0,6351	0,0412	1,2331	0,0001	-1,0115
TXNDC17	0,2783	-0,3731	0,0711	0,5512	0,0021	0,4336
UBAP2L	0,0956	0,3709	0,0380	0,9048	< 0.0001	-0,5387