

DISSERTATION

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

vorgelegt von

Diplom-Biologe Christoph Sandro Schlude

Geboren in Balingen, Deutschland

Tag der mündlichen Prüfung: _____

Die Bedeutung patientenindividueller
Antigene bei der T-Zell-Antwort
gegen kolorektale Tumore

Gutachter: Prof. Dr. Philipp Beckhove

Prof. Dr. Viktor Umansky

Danksagung

Mein herzlichster Dank geht an Prof. Dr. Philipp Beckhove für die Bereitstellung des Themas, die fortlaufende wissenschaftliche Betreuung und die Möglichkeit meine Doktorarbeit in seinem Labor anfertigen zu können, sowie die Erstellung des Erstgutachtens. Vielen Dank auch für die Unterstützung und das Verständnis für meine „wissenschaftsnahen“ Aktivitäten im Welcome-Team, Party-Team, Pizza & Talk Team, beim PhD-Student-Council und den Helmholtz-Juniors.

Vielen Dank an Prof. Dr. Stephan Frings für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes. Herzlichen Dank auch an Prof. Dr. Viktor Umansky für die Bereitschaft das Zweitgutachten zu erstellen und seine Unterstützung als Mitglied meines „Advisory Committee“. Ebenso Dank an PD Dr. Mathias Witzens-Harig, der mich als externes Mitglied im TAC unterstützte.

Herzlichen Dank an alle Kooperationspartner, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Im Speziellen an Prof. Dr. Christel Herold-Mende und Dr. Rolf Warta sowie der ganzen Arbeitsgruppe der Neurochirurgie. Besonderen Dank auch an die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Jürgen Weitz in der Chirurgischen Klinik für die jahrelange, hervorragende Kooperation, sowie an alle Mitglieder der KFO.

Den besten Dank an alle momentanen und ehemaligen Mitglieder des Beckhove-Labors, die immer für eine gute Atmosphäre gesorgt und meine Zeit als Doktorand unvergesslich gemacht haben. Für die Anfangszeit herzlichen Dank der „alten Riege“, die mir einen guten Start ermöglichte und mich ins Welcome-Team integrierte: Dr. Andreas „Aggro“ Bonertz, dem unaufgeregten Dr. Tobias Seibel und Dr. Kim Pietsch, der mir auch die Grundzüge der Praktikantenauswahl näher brachte. Besonderer Dank gilt hier Dr. Andreas Bonertz, der mich hervorragend wissenschaftlich betreute.

Herzlichen Dank auch an die Doktoranden, die ich davon überzeugte, dass das Beckhove-Labor das Beste ist und die anschließend mit mir eine „neue Ära“ einläuteten. Besten Dank an Felix Klug für die Diskussionen rund um Wissenschaft, Wirtschaft und Fußball. Für die tolle Zeit im und außerhalb des Labors: ohne Dich hätte die Doktorarbeit nur halb so viel Spaß gemacht! Vielen Dank an Felix Klug und an Hans-Henning Schmidt für alle gemeinsamen Aktivitäten von Videoabenden im Labor bis zum legendären ImmunoCup!

Danke auch an meine Sitznachbarin Anna-Lena Krause, an Nisit Khandelwal, Maria Xydia, Jasmin Quandt, Yingzi Ge, Mario Grimm und Christina Pfirschke für die tolle Zeit. Auch vielen Dank an meine Praktikantinnen Julia und Franzy. Es hat viel Spaß gemacht mit euch allen!

Vielen Dank auch an Mariana Bucur und Simone Jünger, die trotz uns Chaoten und ihrer eigenen Projekte das Labor immer gut organisiert haben. Ebenso gilt mein Dank Irmi Williams und Bianca Dornseiff für ihre Unterstützung.

Der größte Dank gilt jedoch meiner Familie. Insbesondere meinen Eltern Alfred und Margit Grathwohl. Ohne ihre Unterstützung und den bedingungslosen Rückhalt wäre weder mein Studium noch diese Doktorarbeit möglich gewesen.

Ein besonderer und allergrößter Dank an meine wunderschöne Frau Elisabeth – für alles was war, ist und sein wird! Ohne Dich, das ist sicher, wäre ich nie dahin gekommen, wo ich jetzt bin. Und mit Dir bin ich mir sicher, alles erreichen zu können.

Zusammenfassung

T-Zellantworten in Tumorpatienten korrelieren mit einer verbesserten Prognose. Hierfür sind unter anderem zytotoxische T-Zellen verantwortlich, die Tumorantigene auf Tumorzellen erkennen. Die therapeutische Einleitung oder Verstärkung solcher tumorantigenspezifischer T-Zellantworten ist daher ein wesentliches Ziel der Tumormimmuntherapie. Bisher sind die Ziel-Antigene prognostisch relevanter, spontaner T-Zellantworten jedoch nicht bekannt.

Im Zuge dieser Arbeit wurde daher eine systematische Untersuchung durchgeführt, um die Antigene zu identifizieren, welche spontane T-Zell-Antworten bei Patienten mit kolorektalem Karzinom auslösen. T-Zellantworten gegen diese neu identifizierten Antigene wurden in einer größeren Patientenkohorte mit T-Zellantworten verglichen, die gegen bereits etablierte „kanonische“ Tumorantigene gerichtet sind, welche häufig therapeutisch für Tumormimmuntherapien eingesetzt werden.

Die Etablierung einer gesamtproteombasierten Technologie PF2D (Proteinfractionierung in zwei Dimensionen) in unserer Arbeitsgruppe erlaubte es, aus Lysaten von Primärtumoren und Lebermetastasen Protein-Fractionen zu identifizieren, die eine starke T-Zell-Antwort in ELISpot-Analysen auslösen konnten. Über massenspektrometrische Analysen und weitere ELISpots konnten aus diesen Fraktionen 21 bisher unbekannte tumorassoziierte Antigene identifiziert werden. Dabei zeigte sich, dass die T-Zell-Antwort bei Primärtumoren und Lebermetastasen gegen verschiedene Antigene gerichtet ist. Einige der identifizierten TAA zeigen außerdem auf Tumorstammzellen eine erhöhte Expression. Weitere Analysen zeigten im Blut der Patienten zudem eine höhere Frequenz von T-Zellen, die spezifisch gegen die neu identifizierten TAA reagierten, verglichen mit bereits bekannten, kanonischen TAA.

In einem zweiten Teil der Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass Patienten mit kolorektalem Karzinom spontane T-Zell-Antworten gegen mutierte Formen tumorassoziiierter Antigene induzieren können. Diese Patienten weisen im Blut höhere Frequenzen spezifischer T-Zellen gegen die mutierten Formen auf als gegen die korrespondierenden Wildtyp-Antigene und zeigen außerdem eine verstärkte Immunantwort.

Diese Arbeit zeigt, dass klassische tumorassoziierte Antigene für die Immunantwort gegen Tumore nur eine Nebenrolle spielen. Patientenindividuelle Antigene, die durch die einzigartige Entwicklung des Tumors entstehen, besitzen eine hohe Immunogenität und bieten daher ein besseres Ziel für das Immun-Monitoring oder gerichtete T-Zell-Therapien.

Abstract

T cell responses in cancer patients correlate with improved prognosis. This effect can partially be attributed to cytotoxic T cells that recognize tumor antigens on cancer cells. Hence, the induction or improvement of such therapeutic tumor antigen-specific T cell responses is a major goal of tumor immunotherapy. So far the target-antigens of relevant prognostic T cell responses are unknown.

In this thesis a systematic analysis was performed to identify those antigens that are able to elicit spontaneous T cell responses in patients with colorectal carcinoma. Those responses against the newly identified antigens were then compared, in a larger patient cohort, to T cell responses against established “canonical” tumor antigens that are commonly used for immunotherapy.

The establishment of the proteome-based technology PF2D (Protein fractionation in two dimensions) in our group allowed the identification of protein fractions out of lysates from primary and metastatic tumor tissue that were capable to elicit strong T cell responses in ELISpot assays. With mass spectrometry and further ELISpot tests we could identify 21 so far unknown tumor-associated antigens. We could show that the T cell response was directed against different antigens in primary tumors or liver metastasis. Some of the identified antigens were selectively overexpressed on tumor stem cells. Additionally in the blood of these patients there was a higher frequency of T cells specific for the newly identified TAA in comparison with canonical TAA, that have been described in the past.

In part two of this thesis we could show that patients suffering from colorectal cancer are able to induce spontaneous T cell responses against mutated forms of tumor-associated antigens. These patients harbor higher frequencies of T cells in the blood that are specific for the mutated forms compared to the corresponding wildtyp antigens and they show an increased immune response.

This work shows that classical tumor-associated antigens play a minor role in the immune response against tumors. Patient-individual antigens, a result of the unique tumor development in every patient, are highly immunogenic and serve as better targets for immune monitoring and directed T cell therapies.

Non exiguum temporis habemus, sed multum perdidimus.

Lucius Annaeus Seneca - De Brevitate Vitae

Inhalt

Danksagung	I
Zusammenfassung.....	III
Abstract	V
Inhalt	VII
1 Einleitung	1
1.1 Das kolorektale Karzinom	1
1.1.1 Die Entstehung des kolorektalen Karzinoms.....	1
1.1.2 Krebsstammzellen	3
1.2 Die T-Zell-Immunität bei Tumorerkrankungen.....	5
1.2.1 T-Zell-Entwicklung	5
1.2.2 Tumorassoziierte Antigene und die Aktivierung von T-Zellen	5
1.2.3 T-Zell-Effektorfunktionen	6
1.2.4 Immuno-Surveillance	8
1.2.5 Immuno-Editing.....	9
1.3 Konventionelle Therapien beim kolorektalen Karzinom	10
1.4 Immuntherapien beim kolorektalen Karzinom	11
1.4.1 Monoklonale Antikörper	12
1.4.2 Beseitigung der inhibitorischen Mechanismen.....	13
1.4.3 Adoptiver T-Zell Transfer.....	14
1.4.4 Tumorassoziierte Antigene	15
2 Zielsetzung	17

3 Material und Methoden	18
3.1 Materialien	18
3.1.1 Geräte.....	18
3.1.2 Chemikalien & Reagenzien.....	19
3.1.3 Gebrauchsfertige Reagenzien	19
3.1.4 Gebrauchsfertige Kits	20
3.1.5 Wildtyppeptide.....	20
3.1.6 Peptide mit Aminosäurenaustausch	21
3.1.7 Peptide nach PF2D-Analyse.....	21
3.1.8 Antikörper und Konjugate	31
3.1.9 Verbrauchsmaterialien.....	32
3.1.10 Puffer & Lösungen.....	33
3.1.11 Humane Proben	35
3.1.12 Software	35
3.2 Methoden	36
3.2.1 Zellbiologische Methoden.....	36
3.2.2 Proteinbiochemische Methoden.....	39
3.2.3 Immunbiologische Methoden	41
3.2.4 Molekularbiologische Methoden	49
4 Ergebnisse	51
4.1 Der Zusammenhang von T-Zell-Antworten gegen Tumor-Lysat und Antworten gegen tumorassoziierte Antigene - Eine Phase-I-Studie	51
4.2 Die systematische Analyse der Zielstrukturen spontaner T-Zell-Antworten bei Patienten mit kolorektalem Karzinom	52
4.2.1 Antigen-Analyse von Patient 2241.....	54
4.2.2 Antigen-Analyse von Patient 2295	58

4.2.3	Differentielle T-Zell-Reaktivität gegen Primärtumor und Metastase	62
4.2.4	Charakterisierung der neu identifizierten tumorassoziierten Antigene	70
4.1.4	Differentielle Genexpression der neuen TAA in Krebsstammzellen	74
4.1.5	Bedeutung der neuen TAA bei weiteren Patienten mit kolorektalem Karzinom ...	76
4.2	Auswirkung von Mutationen auf die T-Zell-Reaktivität.....	79
4.2.1	T-Zell-Antworten gegen mutierte Antigene	79
4.2.2	Mutationsanalyse von Patienten mit kolorektalem Karzinom	83
4.2.3	Korrelation der Sequenzanalyse mit den ELISpot Ergebnissen.....	84
5	Diskussion	87
5.1	Analyse der Zielstrukturen spontaner T-Zell-Antworten von Patienten mit kolorektalem Karzinom	88
5.1.1	Die differentielle Erkennung von tumorassoziierten Antigenen	90
5.1.2	Die physiologische Bedeutung der neuen tumorassoziierten Antigene.....	91
5.2	Auswirkung von Mutationen auf die T-Zell-Reaktivität.....	94
5.3	Ausblick.....	98
6	Anhang.....	99
6.1	Möglichkeiten zur Verstärkung der anti-Tumor-Immunreaktion mit Viren – Immunmonitoring einer Phase-I-Studie	99
6.1.1	Auswirkung der Impfung auf die Aktivität des Immunsystems	100
6.1.2	Zusammenhang der T-Zell-Reaktivität gegenüber autologem Tumorlysat und gegenüber synthetischen Peptiden	102
6.2	Eine detaillierte Betrachtung der 21 neu identifizierten TAA	105
6.3	Übersicht über die ELISpot-Reaktivität und die Ergebnisse der Sequenzanalyse.....	113
7	Abkürzungsverzeichnis	118
8	Referenzen	121

1 Einleitung

1.1 Das kolorektale Karzinom

Krebserkrankungen gehören zu den häufigsten Todesursachen weltweit. In Deutschland sind sie, laut Zahlen der Weltgesundheitsorganisation WHO, nach den Kreislauferkrankungen die zweithäufigste Todesursache, aber auch in den Entwicklungsländern steigt die Inzidenz vieler Krebsarten seit Jahren stark an und wird durch die Ausbreitung eines „westlichen Lebensstils“ weiter zunehmen (Jemal et al. 2010). In Europa entwickelt statistisch gesehen jede dritte Person im Laufe ihres Lebens Krebs. Knapp 400.000 Menschen erkranken in Deutschland jedes Jahr, ungefähr gleich verteilt auf Frauen und Männer. Knapp Dreiviertel der Neuerkrankungen tritt bei über 60-jährigen auf. Durch die demografische Entwicklung und die höhere Lebenserwartung in Deutschland könnte längerfristig auch das relative Inzidenzrisiko steigen.

Das kolorektale Karzinom, das 95 % aller bösartigen Darmtumore ausmacht, ist in Deutschland die zweithäufigste Krebsneuerkrankung bei Männern wie bei Frauen. Auch bei den Krebstodesursachen rangieren Darmtumore auf Platz 2 bei Männern und auf Platz 3 bei Frauen. Damit beträgt, nach Daten des Statistischen Bundesamts, das Risiko einer oder eines Deutschen, im Laufe seines Lebens an Darmkrebs zu erkranken etwa 6 %, und daran zu versterben etwa 2,5 - 3,0 %.

1.1.1 Die Entstehung des kolorektalen Karzinoms

Die Entwicklung des kolorektalen Karzinoms verläuft über viele Jahre und kann in verschiedene Phasen eingeteilt werden. Die Entstehung eines Darmtumors beginnt mit der Veränderung des normalen Darmepithels durch Mutationen. Diese erlauben den Epithelzellen über das physiologische Maß hinaus zu proliferieren. Dadurch bilden sich Darmpolypen, auch Adenome genannt. Bei einer seltenen vererblichen Erkrankung, der familiären adenomatösen Polyposis, kommt es zur massenhaften Bildung von Polypen, was unbehandelt ein immenses Darmkrebsrisiko darstellt. Diese pilzförmigen Neubildungen sind zunächst gutartig und erhöhen bei geringer Größe das Risiko an Darmkrebs zu erkranken nur

unwesentlich. Durch weitere Mutationen kommt es jedoch zu einem Fortschreiten der Erkrankung bis hin zu einem invasiven Verhalten der Zellen, bei dem sie in nebenliegendes Gewebe eindringen. Diese Entdeckung, dass sich aus harmlosen Polypen durch weitere Mutationen aggressive Adenokarzinome entwickeln, wurde bereits in den achtziger Jahren als Adenom-Karzinom-Sequenz beschrieben (Deyhle 1980; Vogelstein et al. 1988), und führte 2002 zur Einführung der Vorsorge-Koloskopie in Deutschland.

Die verschiedenen Stadien der Tumorentwicklung werden durch eine internationale Organisation, die UICC, definiert. Definitionsgemäß liegt in Stadium I eine Invasion der unter der Darmschleimhaut liegenden Submukosa bis maximal in die Tunica Muscularis vor. Die Infiltration der Subserosa, des Bauchfells oder anderen Nachbarorganen charakterisiert das Stadium II. Im dritten Stadium sind bereits lokale Metastasen in den Lymphknoten nachweisbar. Das letzte Stadium IV beinhaltet die Invasion in weiter entfernte Organe und die Bildung von Fernmetastasen, beim kolorektalen Karzinom meist in Leber oder Lunge.

Analog zur Adenom-Karzinom-Sequenz, bei der durch Mutationen aus einem gutartigen Polypen ein bösartiges Karzinom entsteht, spielen auch bei der Wandlung eines nicht-invasiven Karzinoms zu einer Metastase vor allem durch Mutationen ausgelöste zelluläre Veränderungen eine wichtige Rolle (Fidler und Kripke 1977). Dieser Prozess wurde als „metastatische Kaskade“ beschrieben (Viadana et al. 1978). In dieser Kaskade erwerben die Zellen des Primärtumors grundlegende neue Eigenschaften um sich von einer Zelle des Darmepithels zu einer metastasierenden Zelle zu wandeln.

Zu Beginn der Tumorentwicklung erlangen die epithelialen Zellen die Fähigkeit zu Zellwachstum und Zellteilung über das physiologische Maß hinaus und erlangen eine Resistenz gegenüber der Apoptose. Durch diese Eigenschaften wächst der Tumor und bald benötigt er eine erhöhte Angiogenese um den Sauerstoffbedarf zu decken. Neben der Bildung neuer Blutgefäße führt ein Mangel an Sauerstoff auch dazu, dass die Zellen selektivem Druck ausgesetzt werden, der sie dazu treibt, aus den hypoxischen Zonen zu wandern (Plasswilm et al. 2000). Der Schritt zu einem invasiven Karzinom geht mit einer grundlegenden Änderung der Zellmorphologie einher, der sogenannten epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) (Greenburg und Hay 1982). Die Zellen wandeln sich dabei von einem epithelialen zu einem vorläuferähnlichen mesenchymalen Phänotyp, der es den Zellen erlaubt, zu migrieren. In diesem Zustand sind die Zellen in der Lage, die extrazelluläre

Matrix zu durchbrechen und naheliegende Organe zu infiltrieren (Kramer und Nicolson 1979; Franz et al. 2006). Erste Metastasen bilden sich häufig in den lokalen Lymphknoten (Grimes und Bell 1952), sind aber wohl nicht ausschlaggebend für die spätere Bildung von Fernmetastasen (Campos et al. 2011). Die Entstehung von Fernmetastasen beim kolorektalen Karzinom beginnt mit dem Eindringen von Tumorzellen in die Blutbahn. Die Bedeutung dieser zirkulierenden Tumorzellen (CTC) wurde bereits in den sechziger Jahren untersucht (Roberts et al. 1967). Tatsächlich überleben die meisten CTC nur kurze Zeit im Blut, da sie durch mechanische Scherkräfte (Weiss 1992), oder das Immunsystem getötet werden (Wexler et al. 1976). Beim kolorektalen Karzinom gelangen die zirkulierenden Zellen aus dem gastrointestinalen System über die Pfortader in die Leber. Dort bleiben sie häufig in den kleinen Kapillaren stecken, und verlassen das Blutsystem durch Extravasation (Eder und Weiss 1991). Durch eine umgekehrte Wandlung, der mesenchymalen-epithelialen Transition (MET), erreichen die Zellen einen Zustand, der die Bildung von ersten Mikrometastasen zulässt. Der gesamte Prozess der Metastasierung ist äußerst ineffizient und über 99 % aller Zellen, die den Tumor verlassen, überleben nicht (Mehlen und Puisieux 2006). Dennoch sind metastasierte Tumore für 90 % der Krebstoten verantwortlich (Mehlen und Puisieux 2006).

1.1.2 Krebsstammzellen

Bereits 1855 vermutete der deutsche Pathologe Rudolph Virchow, dass Tumore durch die Aktivierung ruhender embryonen-ähnlicher Zellen entstehen (Virchow 1855). In den 1960er und 1970er Jahren diskutierten Forscher dann intensiv die Ähnlichkeiten von Tumorzellen und Stammzellen (Potter 1978). So verfügen Tumorzellen über viele Eigenschaften, die sonst nur Stammzellen aufweisen: Tumorzellen und Stammzellen sind wenig differenziert, haben die Fähigkeit zur Migration, besiedeln bestimmte Gewebenischen bevorzugt und vor allem besitzen beide Zelltypen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und beide bringen Zellen hervor, die in verschiedene Typen ausdifferenzieren können (Wang und Dick 2005). Dabei wurde früh die Frage aufgeworfen, ob aus Stammzellen Tumorzellen entstehen können (Hamburger und Salmon 1977). Zwei wichtige Erkenntnisse führten dazu, dass diese Theorie der Krebsstammzellen (CSC) heute als gut belegt gilt. Erstens wurden in fast allen menschlichen Organen adulte Stammzellen gefunden, welche als Ursprung für Tumore in Frage kommen, und der Gruppe um Michael Clarke gelang es als Erste Krebsstammzellen auch in soliden Tumoren nachweisen (Al-Hajj et al. 2003). Zum Zweiten wurde entdeckt, dass nicht alle

Tumorzellen die gleichen Eigenschaften haben, und nur wenige Zellen in der Lage sind, neue Tumore zu bilden, wenn sie entnommen und neu transplantiert werden. So gelang es der Gruppe um John Dick zu zeigen, dass nur bestimmte Zellen einer akuten myeloischen Leukämie in der Lage sind, nach einer Transplantation erneut eine Leukämie zu initiieren (Lapidot et al. 1994). Ganz ähnlich wie bei pluripotenten Stammzellen sind in diesen Experimenten nur einige wenige Leukämiezellen in der Lage, neue Tumoren zu bilden, wohingegen die Mehrzahl der Tumorzellen zwar stark proliferieren, jedoch nur ein geringes Potential zur Selbsterneuerung und somit zum Tumorwachstum aufweisen. Seit diesen grundlegenden Entdeckungen wurde bei vielen soliden Tumoren, darunter auch bei kolorektalen Karzinomen, nachgewiesen, dass auch hier nur eine kleine Subfraktion von Zellen neue Tumore in Mäusen bilden können. Der Forschungsgruppe um Hanno Glimm am NCT Heidelberg gelang es, solche Krebsstammzellen zu isolieren und in Kultur zu halten. Dabei zeigte sich, dass es unter den Krebsstammzellen verschiedene tumorinitiierende Zellen (TIC) gibt, die sich beispielsweise in ihrem Potential unterscheiden, Metastasen bilden zu können (Dieter et al. 2011).

Neben der Fähigkeit, sich selbst zu erneuern und Metastasen zu bilden, besitzen Krebsstammzellen jedoch noch weitere Stammzelleigenschaften, die für Krebstherapien von Bedeutung sind. So verfügen (Krebs-)Stammzellen über eine natürliche Resistenz gegenüber Chemotherapeutika, da sie einen ATP-Transporter besitzen, der selektiv die zytotoxischen Substanzen aus dem Zellinnern befördert. (Dean et al. 2005). Daneben verharren sie häufig im Ruhezustand ohne sich zu teilen und schützen damit die Zelle vor medikamenteninduzierter Apoptose (Kucia und Ratajczak 2006). Deshalb kommt es bei vielen Therapien durch das Absterben von Krebszellen zu einer starken Reduktion der Tumormasse, die Krebsstammzellen aber überleben häufig und können langfristig zu Rezidiven und Metastasen führen. Hier könnten geeignete Immuntherapien großes Potential besitzen. Eine Erkennung der Zellen vorausgesetzt, könnte eine T-Zell-Therapie nicht nur verbliebene CSC an der Primärtumorstelle, sondern auch zirkulierende Tumorzellen (CTC) und Mikrometastasen effektiv bekämpfen.

1.2 Die T-Zell-Immunität bei Tumorerkrankungen

1.2.1 T-Zell-Entwicklung

Obwohl die generellen Mechanismen der T-Zell-Biologie schon bekannt waren, war noch vor zwanzig Jahren nicht klar, ob T-Zellen in der Lage sind Tumorzellen effizient zu erkennen und abzutöten. T-Zellen erkennen Antigene, kurze Peptide, die auf MHC-Molekülen (*Major Histocompatibility Complex*, Hauptgewebeverträglichkeitskomplex) auf der Oberfläche von Zellen präsentiert werden. Die Erkennung der Peptide erfolgt über die T-Zell-Rezeptoren, die während der Entwicklung der T-Zellen im Thymus entstehen. Die T-Zell-Rezeptoren entstehen durch somatische Rekombination verschiedener Gensegmente und erhalten so und durch eine ungenaue Verknüpfung der Genabschnitte eine hohe Diversität. Um die Funktion der Rezeptoren zu gewährleisten und eine Reaktion gegen körpereigenes Gewebe auszuschließen, sind eine positive sowie eine negative Selektion notwendig. Diese Selektionsschritte werden durch die Bindung des T-Zell-Rezeptors an MHC-Moleküle mit körpereigenen Peptiden vermittelt (Derbinski et al. 2001). T-Zellen, die mit ihren Rezeptoren nur schwach oder gar nicht an MHC-Peptid-Komplexe binden, werden negativ selektioniert. Dasselbe geschieht mit T-Zellen, die zu stark an den Komplex binden, da sie Autoimmunerkrankungen auslösen könnten. Nur T-Zellen, die mit mittlerer Affinität an MHC-Moleküle mit körpereigenem Peptid binden, werden positiv selektioniert. Diese Schritte in der Entwicklung der T-Zell-Rezeptoren sind deshalb so bedeutend, da es sich bei Krebszellen um körpereigenes Gewebe handelt, das somit auch keine Fremdproteine enthält wie Virus-infizierte Zellen oder Bakterien. Für das Immunsystem ist es deshalb deutlich schwieriger, eine Tumorzelle zu erkennen als eine Zelle, die mit Viren infiziert ist. Trotzdem unterscheiden sich Krebszellen von gesunden Körperzellen und bilden damit die Grundlage für eine Erkennung durch T-Zell-Rezeptoren und ihre Vernichtung durch die T-Zellen.

1.2.2 Tumorassoziierte Antigene und die Aktivierung von T-Zellen

Antigene, die zur Erkennung der Tumorzellen durch T-Zellen führen können, sind beispielsweise körpereigene Proteine, die stark überexprimiert sind. Durch diese Überexpression steigt die Anzahl der MHC-Moleküle mit dem gleichen Peptid und damit auch die Avidität der T-Zell-Rezeptor-Bindung, wodurch eine Reaktion der T-Zelle möglich wird. Eine andere Klasse von Antigenen sind Peptide, die durch Mutationen entstehen.

Durch die veränderte Gensequenz entstehen Peptide mit anderen Aminosäuren oder durch die veränderte Antigen-Prozessierung sogar komplett neue Peptidsequenzen, die präsentiert werden. Des Weiteren exprimieren Tumore häufig Antigene, die mit bestimmten Differenzierungsstadien assoziiert sind oder ausschließlich in der embryonalen Entwicklung vorkommen. Auch Proteine mit veränderter Glykosylierung können Ziele für T-Zellen sein. Eine letzte und spezielle Gruppe sind onkovirale Antigene. Sie spielen vor allem eine Rolle bei Tumoren, die durch Viren ausgelöst werden, z.B. durch Hepatitis B oder das Papilloma-Virus.

Antigene führen in einem geeigneten Kontext – beispielweise einer Entzündung – zur Aktivierung der T-Zell-Antwort. Dabei müssen naive T-Zellen aus dem Thymus zuerst durch professionelle Antigen-präsentierende Zellen (APC), beispielsweise Dendritische Zellen (DC), aktiviert werden, bevor sie Tumorzellen abtöten können. Dendritische Zellen sind in der Lage, Proteine aus ihrer Umgebung, z.B. von nekrotischen Tumorzellen, aufzunehmen, zu prozessieren und auf ihren MHC-Molekülen zu präsentieren. Durch sogenannte „Danger-Signale“ wird die Aufnahme von Antigenen gestoppt und die Reifung der Dendritischen Zellen eingeleitet. Diese wandern aus dem Gewebe in lokale Lymphknoten ein. Dort sind sie in der Lage, Tumor-spezifische, naive T-Zellen durch die präsentierten Antigene und co-stimulatorische Moleküle zu aktivieren. Die so aktivierten T-Zellen vermehren sich, strömen aus und wandern gezielt in entzündetes Gewebe ein. Wenn sie dort auf Tumorzellen treffen, die das spezifische Antigen der T-Zelle auf ihrer Oberfläche präsentieren, ist die T-Zelle in der Lage, Tumorzellen gezielt und nacheinander in die Apoptose zu treiben. Dabei bedient sie sich verschiedener Effektorfunktionen.

1.2.3 T-Zell-Effektorfunktionen

In zytotoxischen T-Zellen befinden sich Granula mit bereits synthetisierten Effektormolekülen. Diese werden bei einer Reaktion gegen Tumorzellen gezielt ausgeschüttet und setzen beispielsweise Perforine frei, welche Poren in der Zellmembran der Tumorzelle bilden. Durch diese Poren gelangen dann die ebenfalls freigesetzten Granzyme in die Zelle (Masson et al. 1986). Im Zellinnern wird durch die Granzyme eine Kaskade von Caspasen in Gang gesetzt, die letztlich zur Fragmentierung der DNA und der Auflösung der Zelle in kleine Vesikel führt (Simon et al. 1987). Die Caspasen-Kaskade kann

auch unabhängig vom Perforin/Granzym-System eingeleitet werden. Aktivierte T-Zellen tragen auf ihrer Oberfläche den Liganden für einen sogenannten Todesrezeptor, den Fas-Rezeptor, der auf Tumorzellen vorkommt. Durch die Interaktion der beiden Moleküle kommt es ebenfalls zur Aktivierung der Caspasen und zur Apoptose der Tumorzelle (Trauth et al. 1989).

Ein weiteres wichtiges Molekül, das bei Reaktion einer zytotoxischen T-Zelle ausgeschüttet wird, ist Interferon- γ (IFN- γ), das vielfältige Funktionen besitzt. Zuerst einmal führt Interferon- γ dazu, dass vermehrt MHC-Moleküle mit Peptiden beladen und auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Unter anderem wird das Immuno-Proteasom induziert (Belich et al. 1994; Dick et al. 1996), die TAP-Transporter aktiviert sowie die Expression der MHC-Klasse-I und Klasse-II-Proteine gesteigert (Boehm et al. 1997). Dies alles erhöht die Antigen-Präsentation und verbessert so die anti-Tumor-Wirkung von T-Zellen enorm. Daneben hat Interferon- γ direkte Effekte auf die Proliferation und den Zelltod. Das Tumorwachstum wird durch einen Stopp des Zellzyklus unterdrückt (Balkwill und Taylor-Papadimitriou 1978; Roos et al. 1984). Dies wird vor allem über die Induktion von Inhibitoren der Cyclin-abhängigen Kinasen erreicht (Harvat et al. 1997). Außerdem ist Interferon- γ in der Lage, das Onkogen c-myc, das eine wichtige Rolle in vielen Tumoren spielt, über verschiedene Signalwege herunter zu regulieren (Ramana et al. 2000). Darüber hinaus kann Interferon- γ auch direkt Apoptose in Zielzellen auslösen, indem es mittelbar ebenfalls die Caspasen-Kaskade aktiviert (Chin et al. 1997). Neben diesen Effekten, die direkt auf die Zielzelle wirken, hat Interferon- γ auch systemische Wirkung und eine Funktion in der Immunmodulation. So ist es eines der Schlüsselzytokine, welches dafür sorgt, dass eine Immunreaktion eher in Richtung der zellulären T_H1 -Antwort geführt wird und die tendentiell humoralen T_H2 -Zellen unterdrückt werden (Gajewski und Fitch 1988; Boehm et al. 1997). Des Weiteren induziert Interferon- γ die Sekretion von Chemokinen, die dafür sorgen, dass weitere T-Zellen in den Tumor einwandern (Taub et al. 1993). Insgesamt induziert Interferon- γ mehr als 100 Gene und vermittelt somit eine umfassende anti-Tumor-Antwort.

Der menschliche Körper verfügt mit den T-Zellen über eine Waffe gegen entartete Zellen. Wie eingangs erwähnt, war trotzdem lange Zeit nicht klar, ob T-Zellen tatsächlich in der Lage sind Tumorzellen effizient zu erkennen und abzutöten.

1.2.4 Immuno-Surveillance

Bereits im Jahr 1909 äußerte der Immunologe Paul Ehrlich die Vermutung, dass Tumore durch das Immunsystem bekämpft und zerstört werden könnten (Ehrlich 1909). Zu seiner Zeit gab es aber keine Möglichkeiten diese Vermutung auch experimentell zu belegen. Es dauerte daher weitere 50 Jahre bis die ersten Hinweise auf eine Beteiligung des Immunsystems an der Tumorbekämpfung entdeckt wurden: die tumorassoziierten Antigene (TAA) (Old und Boyse 1964). Zum ersten Mal war belegt worden, dass es T-Zellen gibt, die Tumorzellen erkennen und somit die Fähigkeit besitzen sollten, diese auch abzutöten. Auch durch diese Entdeckung wurde das Konzept der *Immuno-Surveillance* (Immun-Überwachung) bei Krebs populärer (Burnet 1957; Burnet 1957). Weitere Beobachtungen stützten diese Theorie, die Keast auf vier Punkte zusammengefasst hat (Keast 1970). Erstens tritt Krebs normalerweise zu den Zeitpunkten im Leben auf, an denen das Immunsystem geschwächt ist, wie bei Älteren oder Menschen mit Fehlfunktionen im Thymus. Zweitens steigt die Krebsinzidenz nach der Behandlung mit Immunsuppressiva an. Drittens lässt sich der gleiche Effekt auch experimentell durch eine Entnahme des Thymus bei Mäusen nachweisen. Viertens und letztens zeigen auch seltene Erkrankungen, die durch einen Mangel in der zellulären Immunität gekennzeichnet sind, eine hohe Inzidenz von Tumoren, wenn die Patienten lange genug überleben, um deren Entwicklung zu erlauben.

Diese Beobachtungen und das Konzept der Immun-Überwachung wurden jedoch durch neue Experimente in Frage gestellt. So wurde gezeigt, dass es keinen Unterschied gibt in der Tumorentwicklung von spontanen sowie von induzierten Karzinomen bei Mäusen mit vollem Immunsystem und solchen, die nur ein rudimentäres Immunsystem besitzen (Stutman 1974; Stutman 1975). In den Folgejahren wurde viel darüber diskutiert, warum das Immunsystem Tumorzellen nicht erkennen kann. So dauerte es erneut einige Zeit, bis Anfang der 1990er die Möglichkeiten zum gezielten Abschalten von Genen in Mäusen neue Erkenntnisse brachte. So wurde gezeigt, dass in Mäusen mehr spontane oder über Karzinogene induzierte Tumore auftraten, wenn das Gen für Interferon- γ nicht funktional war (Kaplan et al. 1998). Ähnliche Ergebnisse waren auch zu beobachten wenn Mäuse komplett ohne T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen auskommen mussten (Shankaran et al. 2001). Heute ist allgemein akzeptiert, dass das Immunsystem auf verschiedene Weise vor Tumoren schützen kann. So beschreibt Schreiber drei Hauptfunktionen der Immunzellen gegen Krebs. Zum einen bietet es einen Schutz vor Viren, die Tumore auslösen können. Zweitens werden durch die zügige

Eliminierung von Pathogenen chronische Entzündungen vermieden, die auf vielfältige Weise zur Tumorbildung beitragen könnten. Zuletzt ist das Immunsystem auch in der Lage, über tumorassoziierte Antigene direkt Tumorzellen zu abzutöten (Schreiber et al. 2011).

1.2.5 Immuno-Editing

Wie steht es also um das Konzept der Immun-Überwachung aus der sechziger Jahren und wie erklärt man sich die Entwicklung eines Tumors trotz der vielfältigen Fähigkeiten des Immunsystems? Heute ist bekannt, dass nicht nur die Anzahl der Tumorzellen durch das Immunsystem beeinflusst wird, sondern auch deren Qualität. Das neue Konzept, bei dem postuliert wird, dass die Aktionen der Immunzellen die Krebszellen verändern, nennt man *Immuno-Editing* (Immun-Abwandlung) (Dunn et al. 2002). Auslöser für diese Hypothese waren Experimente mit Mäusen, die gezeigt haben, dass Tumore unter dem Druck eines funktionierenden Immunsystems ihre Immunogenität vermindern; im Unterschied zu Tumoren, die in Mäusen ohne Immunfunktionen wuchsen (Shankaran et al. 2001).

Das Konzept umfasst drei verschiedene Phasen, die sich während der Entwicklung des Tumors abspielen: Elimination, Equilibrium und *Escape* (Flucht) (Dunn et al. 2004; Schreiber et al. 2011). Die erste Phase der Elimination entspricht am ehesten der ursprünglichen Vorstellung der Immun-Überwachung: Sowohl das angeborene wie auch das adaptive Immunsystem erkennen die beginnende Entwicklung eines Tumors und töten entartete Zellen gezielt ab. Somit wird eine Krebserkrankung von Anfang an unterbunden. Nur wenn einzelne Tumorzellvarianten diese Phase der Elimination überleben tritt die nächste Phase ein: Equilibrium. In diesem Zustand verhindert das Immunsystem, vor allem durch T-Zellen und Interferon- γ , die Ausbreitung des Tumors durch Wachstumsstopp und das Abtöten einzelner Zellen. Dieser Zustand kann lange bestehen bleiben, auch bis zum Lebensende des Patienten. Jedoch übt diese Kontrolle durch das Immunsystem auch einen Selektionsdruck auf den Tumor aus. So können in den genetisch instabilen Tumoren Zellvarianten entstehen, die der Erkennung durch das Immunsystem entkommen. Dies kann durch eine Reduktion der MHC-Moleküle oder einen kompletten Verlust immunogener Antigene passieren. Ebenso können Zellvarianten insensitiv gegenüber Effektorfunktionen werden oder der Tumor induziert eine immunsuppressive Mikroumgebung. In all diesen Fällen schaffen es Zellvarianten, für das Immunsystem „unsichtbar“ zu werden. Man spricht von der *Escape-*

Phase (Flucht-Phase). Die Zellvarianten wachsen damit ohne Kontrolle, bis die Tumorerkrankung klinisch detektierbar wird.

1.3 Konventionelle Therapien beim kolorektalen Karzinom

Die Auswahl an möglichen Therapien bei Patienten mit kolorektalem Karzinom hängt stark vom Stadium der Krebserkrankung ab. In frühen Stadien bestehen noch hervorragende Heilungschancen, wodurch die Krebsvorsorge einen wichtigen Platz bei der Prävention einnimmt. Wird bei einer Untersuchung ein frühes Stadium des Tumors entdeckt, kann durch eine Operation die Ausbreitung verhindert werden. Bei Adenomen reicht häufig schon eine endoskopische Polypektomie, um eine vollständige Heilung herbeizuführen. Bei fortgeschrittenen Krankheitsstadien richtet sich die Therapie in der Regel nach bestimmten Richtlinien (Schmiegel et al. 2004; Schmiegel et al. 2010). Wenn bereits ein Karzinom vorliegt, wird nur dann lediglich der lokale Tumor entfernt, wenn das Risiko einer vollständigen Operation größer ist, als die Wahrscheinlichkeit des Lymphknotenbefalls. Liegt kein erhöhtes Risiko für eine Operation vor oder sind nachweislich Lymphknoten betroffen, wird der komplette Bereich einschließlich des Lymphabflussgebiets entfernt. Dies entspricht im Kolon je nach befallenem Abschnitt einer Hemikolektomie rechts oder links, einer Kolon-Transversum- oder einer Sigma-Resektion. Wenn der Primärtumor bereits Nachbarorgane infiltriert hat, ist es auch möglich und nützlich diese mit zu entfernen. Die chirurgische Resektion stößt unter Umständen bei Fernmetastasen an ihre Grenzen. Leber- oder Lungenmetastasen sind nur dann operabel wenn nur ein Organ betroffen ist, und auch nur weniger als fünf einzelne Metastasen detektierbar sind. In einem solchen Fall können auch Metastasen chirurgisch entfernt werden. 40-50% der Patienten entwickeln dennoch in der Folge ein lokales Rezidiv (Chiappa et al. 1999). Der Grund hierfür sind offenbar ruhende Tumorzellen oder Mikrometastasen, die nach einer Teilresektion hochwachsen können (Scheele et al. 1995).

Neben der rein chirurgischen Entfernung ist die Chemotherapie die wichtigste adjuvante Therapieform beim kolorektalen Karzinom. Durch den Einsatz von Zytostatika werden eventuell im Körper verbliebene Tumorzellen durch eine Störung des Zellzyklus oder wichtigen Stoffwechselprozessen gehemmt. So kann das Auftreten von Rezidiven verzögert

und die Überlebenszeit verlängert werden. Am häufigsten werden 5-Fluorouracil (oder die Vorstufe Capecitabin), Oxaliplatin und Irinotecan verwendet, zur Entgiftung häufig in Kombination mit Folsäure (Leukovorin). In der Radio-Chemotherapie findet noch Mitomycin C Anwendung. Die Chemotherapie als Unterstützung zur chirurgischen Resektion wird meistens eingesetzt sobald Lymphknoten-Metastasen vorlagen. Auch nach der Entfernung von Leber- oder Lungenmetastasen wird eine adjuvante Chemotherapie empfohlen. Bei inoperablen Metastasen wurde eine Chemotherapie lange nur palliativ eingesetzt. Neuere Forschungen zeigen aber, dass durch den Einsatz der Zytostatika ein Rückgang der Leberlesionen zu beobachten ist, der potentiell eine sekundäre Resektion möglich macht (Aschele et al. 2009; Segal und Saltz 2009).

Die Behandlung mit Strahlen spielt nur beim Rektumkarzinom eine Rolle. Aufgrund der Lage im Körper können hier ausreichend hohe Strahlendosen angewendet werden. Die Bestrahlung wird häufig als neoadjuvante Behandlung eingesetzt um eine Verkleinerung (*Downsizing*) oder sogar eine Stadienreduktion (*Downgrading*) zu erreichen und so die Operation zu erleichtern. Auch als adjuvante Therapie verbessert die Bestrahlung das Überleben von Rektumkarzinom-Patienten und vermindert das Auftreten von lokalen Rezidiven. In höheren Stadien wird sie in Kombination als Radio-Chemotherapie eingesetzt.

1.4 Immuntherapien beim kolorektalen Karzinom

Immuntherapien gegen Krebserkrankungen haben eine lange Tradition. So behandelte bereits 1891 Dr. William Coley Krebskranke mit Hilfe einer Mixtur toter Bakterien, die das Immunsystem gegen den Tumor stimulieren sollten (Coley 1891). Viele Jahre später wurde weiterhin auf eine unspezifische Stimulation des Immunsystems gesetzt. So wurde beispielsweise Interferon- α und Interleukin-2 eingesetzt (Huber und Wolfel 2004).

Bis heute haben sich hauptsächlich vier verschiedene Gebiete für die spezifische Immuntherapie entwickelt:

- monoklonale Antikörper
- die Beseitigung der Inhibition
- adoptiver Transfer von Zellen
- Vakzinierungen mit tumorassoziierten Antigenen

1.4.1 Monoklonale Antikörper

In den letzten Jahren entwickelten sich vor allem monoklonale Antikörper zu einer wirkungsvollen Ergänzung, da sie sowohl als Bestandteil einer adjuvanten Therapie oder eigenständig eingesetzt werden können.

Im Moment sind drei monoklonale Antikörper für die Behandlung des kolorektalen Karzinoms zugelassen. Die erste Zulassung erhielt Bevacizumab, besser bekannt unter dem Handelsnamen Avastin®. Dabei handelt es sich um einen humanisierten Antikörper der gegen die Angiogenese, genauer gesagt gegen VEGF (vaskulärer-endothelialer Wachstumsfaktor), gerichtet ist. Durch das Neutralisieren der Faktoren, die für das Wachstum der Blutgefäße verantwortlich sind, soll der Tumor von der Sauerstoffversorgung abgeschnitten und ausgehungert werden (Ferrara und Kerbel 2005). Einige Jahre später folgte die Zulassung von Cetuximab (Erbix®) (Jonker et al. 2007). Der chimäre Antikörper bindet an den Wachstumsrezeptor EGFR (Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor) und blockiert damit die Signalweiterleitung, was zu einer Hemmung des Tumorwachstums führen soll (Mendelsohn und Baselga 2003). Ebenfalls gegen EGFR gerichtet ist der komplett humane Antikörper Panitumumab (Vectibix®), der eine vergleichbare Wirkung wie Cetuximab besitzt. Beide anti-EGFR Antikörper setzen jedoch den Wildtypstatus von Kras voraus (Amado et al. 2008).

In der Entwicklung befinden sich noch einige weitere Antikörper, von denen die meisten ebenfalls gegen Wachstumsfaktoren oder aber die entsprechenden Rezeptoren gerichtet sind. So richtet sich Rilotumumab gegen den Hepatozyten-Wachstumsfaktor (HGF) (Rosen et al. 2010). Ganitumab soll den Insulin-Wachstumsfaktor-1-Rezeptor (IGF-1R) blockieren (Tolcher et al. 2009). Ein monoklonaler Antikörper gegen den Plazenta-Wachstumsfaktor (PGF) befindet sich in klinischen Studien der Phase I (Lassen et al. 2012). Mit Nimotuzumab ist auch ein weiterer Antikörper gegen EGFR in Entwicklung (Berger et al. 2011). Ein weiterer VEGF-Rezeptor ist Neuropilin-1 (Soker et al. 1998). Die Blockade von Neuropilin-1 bewirkt einen additiven Effekt zusammen mit Avastin® (Pan et al. 2007). Am weitesten fortgeschritten in dieser Entwicklung ist Ramucirumab. Der Antikörper blockiert den VEGF-Rezeptor 2 und befindet sich bereits in klinischen Studien der Phase III (Spratlin 2011).

Ein anderes Ziel hat Conatumumab. Viele Tumorzellen exprimieren Apoptose-induzierende Rezeptoren, wie TRAIL-Rezeptor (TNF-verwandter Apoptose-induzierender Ligand-Rezeptor)

(Nagata 1997; Thorburn 2004). Conatumumab aktiviert den TRAIL-Rezeptor DR5 und soll so direkt zur Vernichtung der Krebszelle führen (Camidge et al. 2010). Ebenfalls ein neuer Angriffspunkt sind die Adhäsionsmoleküle des Endothels. Eglf7 führt zur Verminderung der Expression von ICAM-1 und VCAM-1 und verhindert somit den Eintritt von Immunzellen in das Tumorgewebe (Delfortrie et al. 2011). Ein anti-Eglf7 Antikörper soll die Extravasation der Immunzellen erleichtern und somit die anti-Tumorantwort verbessern (Li et al. 2012).

1.4.2 Beseitigung der inhibitorischen Mechanismen

Nach heutigem Verständnis sind regulatorische T-Zellen (Treg) ein wichtiger Faktor bei der Verhinderung einer effektiven Immunantwort gegen Krebszellen, indem sie tumorreaktive Effektor-T-Zellen supprimieren (Sakaguchi et al. 2001). Auch beim kolorektalen Karzinom verhindern regulatorische T-Zellen eine Immunantwort von tumorspezifischen, zytotoxischen T-Zellen (Bonertz et al. 2009). Aus diesem Grund bietet die Inhibition dieser Treg einen sehr guten Angriffspunkt, um die Immunität gegen den Tumor zu verstärken (Clarke et al. 2006).

Eine Möglichkeit ist es, die Anzahl regulatorischer T-Zellen zu vermindern. Das Zytostatikum Cyclophosphamid scheint neueren Forschungsergebnissen zufolge, gezielt zum Absterben von regulatorischen T-Zellen zu führen (van der Most et al. 2009). Auch Paclitaxel führt zu einer stärkeren Reduktion von regulatorischen T-Zellen als von zytotoxischen Effektorzellen (Zhang et al. 2008). Beide Medikamente werden jedoch beim kolorektalen Karzinom standardmäßig nicht eingesetzt. Eine weitere Möglichkeit regulatorische T-Zellen aus dem System zu entfernen, bietet die starke Expression von CD25 auf diesen Zellen. Antikörper gegen CD25 führen Zerstörung der Zellen, vermutlich über antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC). Daclizumab (Zenapex®) und Basiliximab (Simulect®) sind solche anti-CD25-Antikörper, die auch für die Behandlung einiger Krebserkrankungen zugelassen sind, und beispielsweise bei Brustkrebs die Immunantwort signifikant verstärkt (Rech und Vonderheide 2009).

Neben der Reduktion der Anzahl regulatorischer T-Zellen ist auch das Blockieren der suppressiven Funktion ein geeigneter Angriffspunkt. Hier spielt vor allem CTLA-4 (Zytotoxisches T-Lymphozyten Antigen 4) eine wichtige Rolle. CTLA-4 ist ein inhibitorischer Rezeptor für die CD80/CD86 Liganden auf T-Zellen und damit in der Lage, die

Effektorfunktionen von zytotoxischen T-Zellen zu unterdrücken (Read et al. 2000). Zugelassen ist bereits der Antikörper Ipilimumab (Yervoy®) für die Behandlung von Melanomen in späten Stadien. Für das kolorektale Karzinom befindet sich der anti-CD25-Antikörper Tremelimumab in klinischen Studien der Phase II (Chung et al. 2010).

Interessanterweise hat eine kürzlich veröffentlichte Arbeit in einem Mausmodell gezeigt, dass auch die Vakzinierung mit Dendritischen Zellen zu einer Inhibition von suppressiven Zellen führt (Kim et al. 2010).

1.4.3 Adoptiver T-Zell Transfer

Als adoptiver T-Zell Transfer versteht man die Gabe von meist autologen Zellen als anti-Krebstherapie. Normalerweise werden diese Zellen vor Verabreichung behandelt, um entweder bestimmte Zelltypen anzureichern oder die Aktivität der Zellen zu erhöhen. Für den Transfer können autologe PBMC, autologe TIL oder allogene Zellen verwendet werden.

Schon 1979 wurde bei einer allogenen Knochenmarkstransplantation ein Anti-Leukämie-Effekt festgestellt (Weiden et al. 1979). Eine genauere Untersuchung dieses Effekts zeigte, dass er auf die Aktivität von Spender-T-Zellen zurückzuführen ist (Ferrara und Deeg 1991). Allerdings ist der Einsatz von allogenen T-Zellen für die Bekämpfung von soliden Tumoren, wie dem kolorektalen Karzinom, nur wenig erfolgreich (Lundqvist und Childs 2005).

Bei Versuchen mit autologen Zellen, ruhte die Hoffnung lange Zeit auf Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TIL). Frühe Untersuchungen zeigten, dass Patienten, die über solche eingewanderte Lymphozyten im Tumor verfügen, eine bessere Prognose aufweisen (Pastrnak und Jansa 1989). Erste Versuche in Mäusen zeigten, dass TIL zusammen mit Interleukin-2 und Cyclophosphamid zu einer Elimination von größeren, metastasierten Tumoren führen können (Rosenberg et al. 1986). In der Folge wurden TIL auch bei Patienten eingesetzt und unter anderem durch Markierung mit Indium-111 gezeigt, dass diese auch in kolorektale Tumore einwandern (Dillman et al. 1997). Untersuchungen zeigten auch, dass TIL in Geweben von kolorektalen Primärtumoren und Lebermetastasen vorkommen und diese antigenspezifisch aktiviert sind. Außerdem nahm die Zahl der TIL mit höherem Tumor-Stadium deutlich ab (Koch et al. 2006; Wagner et al. 2008). Viele Versuche konnten aber keine Vorteile für das progressionsfreie Überleben oder das Gesamtüberleben feststellen

(Gardini et al. 2004). Ein Problem stellte die recht schwierige Gewinnung einer ausreichend großen Anzahl von TIL aus dem Tumorgewebe dar, was den Nachweise über eine klinische Effizienz bisher nicht eindeutig ermöglichte (Dillman 2011).

Ein genauerer Blick darauf, welche Lymphozyten einen positiven Beitrag zur Immunität gegen den Tumor beitragen, lenkte den Blick auf Effektor-Memory-Zellen (Pages et al. 2005). Weitere Forschungen belegten, dass vor allem $CD8^+$ T-Zellen in der Lage sind, Tumorzellen zu zerstören und dabei von $CD4^+$ T-Zellen unterstützt werden. Regulatorische T-Zellen verhindern hingegen eine ausreichende Immunantwort (Antony et al. 2005). In der Folge wurde dadurch der adoptive Transfer mit PBMC forciert. 2008 wurde eine beachtliche Remissionsrate in Melanom-Patienten gezeigt, die mit autologen $CD4^+$ T-Zellen behandelt wurden, die vorab antigenspezifisch aktiviert wurden (Hunder et al. 2008).

Ein Durchbruch auf dem Weg zu einem therapeutischen Einsatz des adoptiven Transfers war die erste Zulassung, abgesehen von der hämatopoetischen Stammzell-Transplantation, einer zellbasierten Therapie in 2010. Sipuleucel T[®] wurde für die Behandlung des gegen die Hormon-Therapie resistenten Prostatakarzinoms zugelassen. Bei Sipuleucel T[®] werden PBMC mehrere Tage mit einem Fusionsprotein aus GM-CSF und der prostataspezifischen sauren Phosphatase (PAP) inkubiert. Dabei soll GM-CSF für die Differenzierung von Monozyten und Makrophagen zu Dendritischen Zellen sorgen, welche dann PAP als Peptid für die T-Zellen präsentieren können. Dadurch soll es zu einer Aktivierung der T-Zellen kommen. Das finale Produkt enthält jedoch eine Mischung all dieser Zellen und anderer PBMC sowie dem Fusionsprotein. Der genaue Wirkmechanismus ist daher unklar. Sipuleucel T[®] führte zu einer messbaren Immunantwort in allen Patienten und ein Patient erfuhr eine komplette Remission (Kantoff et al. 2010). Auch wenn dieses Medikament bisher auf das Prostatakarzinom beschränkt ist, zeigt es dennoch das Potential des adoptiven Transfers für die allgemeine Krebstherapie.

1.4.4 Tumorassoziierte Antigene

Die Entdeckung tumorassoziiierter Antigene (TAA) war der Startpunkt für die spezifische Immuntherapie. Ab 1988 entdeckten mehrere Gruppen, dass sich Tumore von gesunden Zellen unterscheiden und dass diese Unterschiede über Antigene von T-Zellen erkannt werden können (De Plaen et al. 1988; Degiovanni et al. 1988; Knuth et al. 1989). Diese

tumorassoziierten Antigene sind heute von besonderer Bedeutung für die anti-Krebstherapie. So gibt es beispielsweise eine große Überlappung von potentiellen TAA mit Zielen monoklonaler Antikörper. Auch bei der neuesten Therapieform über adoptiven T-Zell-Transfer, Sipuleucel T[®], ist die Stimulation mit einem Antigen, in diesem Fall PAP, die Grundlage der therapeutischen Wirkung.

Viele weitere Forschungsansätze nutzen tumorassoziierte Antigene für die Induktion tumorspezifischer T-Zell-Antworten. Einige Studien belegen scheinbar nur eine schwache induzierte Immunantwort nach einer Vakzinierung ausschließlich mit Peptiden (Nagorsen und Thiel 2006). Andere jedoch sind in der Lage, beachtliche Reaktivitäten des Immunsystems zu belegen. So entwickelten beispielsweise neun von zehn Patienten mit kolorektalem Karzinom eine, teilweise monatelang anhaltende, Immunreaktion nach einer Vakzinierung mit verschiedenen, langen Peptiden von p53 (Speetjens et al. 2009). In dieser Studie, wie auch in vielen anderen, werden lange Peptide verwendet, die zuerst noch prozessiert werden müssen. Dies garantiert eine effizientere Präsentation und eine bessere Aktivierung der T-Zellen, da nur professionelle antigenpräsentierende Zellen das lange Peptid verarbeiten und als TAA über MHC-Klasse-I und -II präsentieren können (Bijker et al. 2008; Faure et al. 2009). Außerdem wird so auch eine bessere Aktivierung der CD4⁺ T-Zellen gewährleistet als bei der Nutzung von kurzen Peptiden (Melief und van der Burg 2008).

Neben der Vakzinierung mit Peptiden sind auch Impfungen mit Dendritischen Zellen (DC) in der Lage, eine Stimulation der T-Zellen zu erreichen (Banchereau und Palucka 2005). So wurde gezeigt, dass Dendritische Zellen mit autologem Tumorlysat inkubiert und zur Impfung eingesetzt, das Überleben der Patienten mit kolorektalem Karzinom verlängern (Liang et al. 2003). Burgdorf et al. untersuchten in einer Phase-I-Studie für kolorektale Patienten die Wirkung von DC, die mit dem Lysat einer Melanom-Zelllinie gepulst wurden (Burgdorf et al. 2006). Andere Forscher benutzen Dendritische Zellen in Verbindung mit bekannten TAA, wie CEA, Mage-A3 und Her2/neu (Kavanagh et al. 2007). Bemerkenswert sind auch Studien, die sich nicht auf ein spezielles Antigen stützen, sondern mit Hilfe des Newcastle-Disease-Virus und multispezifischen Antikörpern eine grundlegende Aktivierung der T-Zellen gegen ein größeres Repertoire patienteneigener TAA induzieren (Aigner et al. 2008).

2 Zielsetzung

Die Entwicklung von effektiven Immuntherapien gegen Krebserkrankungen ist ein Ziel der translationalen Krebsforschung. Sowohl für die Grundlagenforschung als auch für die therapeutischen Ansätze in der Klinik ist dafür ein genaues Verständnis der Erkennungsmechanismen des Immunsystems von großer Bedeutung.

T-Zellen erkennen maligne Tumorzellen über kurze Peptide, sogenannte tumorassoziierte Antigene (TAA). Diese TAA charakterisierten transformierte Zellen und unterscheiden sie von gesunden Zellen. Viele Studien deuten darauf hin, dass Antigene ein inneres, immunogenes Potential besitzen müssen, um für eine erfolgreiche Immuntherapie geeignet zu sein. Außerdem sollten sie nur schwach in normalem Gewebe aber in ausreichenden Mengen im Tumorgewebe exprimiert sein, um sowohl eine Antwort von CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen als auch von CD4⁺ T-Helferzellen zu ermöglichen. Sogar innerhalb der gleichen Tumorart unterscheiden sich die TAA häufig von Patient zu Patient, beispielsweise aufgrund von Mutationen. Die geeigneten tumorassoziierten Antigene für eine Therapie zu finden und zu definieren ist daher eine der bedeutendsten Aufgaben der translationalen Immunologie.

Diese Dissertation hatte zum Ziel, herauszufinden welches tatsächlich die physiologisch relevanten Antigene bei Patienten mit kolorektalem Karzinom sind. Mit Hilfe einer neu etablierten Technik sollte zuerst untersucht werden welches die patientenindividuellen Ziel-Antigene spontaner T-Zell-Antworten sind. Ein Vergleich sollte zeigen, ob sich die Antigene im Primärtumor von denen in Fernmetastasen eines Patienten unterscheiden und ob die neu entdeckten TAA auf bestimmten Zellen, wie Tumorstammzellen, gehäuft vorkommen. Im letzten Teil der Arbeit sollte die Auswirkung von Mutationen auf die T-Zell-Reaktivität untersucht werden.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Geräte

CO ₂ -Inkubator	<i>MCO-20 AIC</i> , Sanyo, Japan
Dispergiergerät	<i>Ultra-Turrax® T25</i> , IKA-Werke, Deutschland
Durchflusszytometer	<i>FACS Canto™ II</i> , Becton Dickinson, Deutschland
ELISpot-Analysegerät	<i>ImmunoSpot® S5</i> , CTL, USA
Einfrierbecher	<i>True North® Chilling Jar</i> , Heathrow Scientific, USA
Feinwaage	<i>AE 163</i> , Mettler-Toledo, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	<i>IX81</i> , Olympus, Deutschland
Gefrierschrank (-20°C)	<i>Comfort</i> , Liebherr, Deutschland
Gefrierschrank (-80°C)	<i>VIP Series® MDF-U73 VC</i> , Sanyo, Japan
Glasgeräte	Schott, Deutschland
Kühlbare Zentrifuge	<i>Multifuge X3FR</i> , Heraeus Instruments, Deutschland
Kühlschrank	<i>Medline</i> , Liebherr, Deutschland
Magnetsystem	<i>MPC-L</i> , Dynal, Deutschland
Magnetsystem	<i>OctoMACS & MidiMACS</i> , Miltenyi Biotec, Deutschland
Magnetheizrührer	<i>RCT basic</i> , IKA Labortechnik, Deutschland
Mikropipetten (2-1000µl)	<i>Pipetman</i> , Gilson, Deutschland
Multikanalpipetten (200µl)	<i>Pipet lite</i> , Rainin, Niederlande
Phasenkontrastmikroskop	<i>Axiovert 25</i> , Zeiss, Deutschland
pH-Meter	<i>PB-11</i> , Sartorius, Deutschland
Pipettierhilfe	<i>Accu-jet® pro</i> , Brand, Australien
Rollmixer	<i>RM5</i> , CAT GmbH, Deutschland
Schüttler	<i>Multitron</i> , Infors HT, Schweiz
Spektralphotometer	<i>NanoDrop 2000c</i> , Thermo Scientific, USA
Sterile Arbeitsbank	<i>Cellgard 480 ES</i> , Nuaire, USA
Tischzentrifuge	<i>Biofuge fresco</i> , Heraeus Instruments, Deutschland
Vortexer	<i>REAX 2000</i> , Heidolph, Deutschland

Waage	<i>PB 3002-S</i> , Mettler-Toledo, Deutschland
Wasserreinigungssystem	<i>xCAD</i> , TKA Genepure, Deutschland
Wasserbad	<i>1003</i> , GFL mbH, Deutschland
Zählkammer	<i>Neubauerkammer</i> , Brand, Australien

3.1.2 Chemikalien & Reagenzien

CaCl ₂	Sigma-Aldrich, USA
Collagenase D	Roche, Deutschland
DNase I	Roche, Deutschland
Granulozyten-Monozyten Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF)	Bayer, Deutschland
Humanes Immunglobulin (Sandoglobulin®)	CSL Behring, Deutschland
Hyaluronidase	Sigma-Aldrich, USA
Interleukin-2 (IL-2)	Novartis, Schweiz
Interleukin-4 (IL-4)	Promocell, Deutschland
Iso-Propanol	Sigma-Aldrich, USA
MgCl ₂	Ambion, USA
NaOH	Sigma-Aldrich, USA
Natronlauge	Mallinckrodt Baker, USA
PBS dulbecco	Biochrom, Deutschland

3.1.3 Gebrauchsfertige Reagenzien

Biocoll	Biochrom, Deutschland
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, USA
EDTA (Versen)	Sigma-Aldrich, USA
Fötale Kälberserum (FCS)	Biochrom, Deutschland
Glutamin	Sigma-Aldrich, USA
HEPES-Puffer	PAA, Österreich
Humanes AB-Serum	PAN Biotech, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	PAA, Österreich

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Sigma-Aldrich, USA
RPMI-1640-Medium	Sigma-Aldrich, USA
Trypanblau 0,4%	Sigma-Aldrich, USA
Tween®20	Sigma-Aldrich, USA
X-VIVO 20 Medium	Lonza, Schweiz

3.1.4 Gebrauchsfertige Kits

AP-Konjugat-Substrat-Kit	BioRad, USA
CELLlection™-Pan-Mouse-IgG-Kit	Life Technologies, USA
Dynabeads®-Pan-Mouse-IgG-Kit	Life Technologies, USA
Dynabeads® Untouched™ Human T Cells-Kit	Life Technologies, USA
MACS® CD4+ CD25+ Regulatory T Cell-Kit	Miltenyi Biotec, Deutschland
MACS® CD4+ Microbeads	Miltenyi Biotec, Deutschland
MACS® CD8+ Microbeads	Miltenyi Biotec, Deutschland
MACS®-Dead-cell-removal-Kit	Miltenyi Biotec, Deutschland

3.1.5 Wildtyppeptide

CEA	YVCGIQNSVSANRSDPVTLDVLYGPDTPHISPPDSSYLSGANLNLSCHSA
EGFR	KLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRN
Her-2/neu	REVRVTSANIGEFAGCKKIFGSLAFLPESFDGD
Heparanase 1	MLLRSKPALPPPMLLLLLGPLGPLSPGALPRPAQAQDVVDLDFFTQEPLH
Heparanase 2	STYSRSSVDVLYTFANCSGLDLIFGLNALLRTADLQWNSSNAQLLLDYCS
MAGE-A3	FLWGPALVETSIVKVLHMHMVKISGGPHISYPPLHEWVLRGEE
Mucin-1	(GVTSAPDTRPAPGSTAPPAH)x5
p53	TAKSVTCTYSPALNKMFCQLAKTQVQLWVDSTPPPGTRVRAMAIYKQSQ
Survivin	FEELTLGEFLKLDREERAKNKIAKETNNKKKEFEETAKKVRRAIEQLAAMD
Telomerase	LTFNRGFKAGRNMRRKLFGLVRLKCHSLFLDLQVNSLQTVCTNIYKILL

3.1.6 Peptide mit Aminosäurenaustausch

Protein p53

p53 R175H	MAIYKQSQHMTEVVRHCPHHERCSDSDGLAP
p53 R248Q	TTIHYNMYCNSSCMGGMNQRPILTIITLEDSSGNL
p53 R248W	TTIHYNMYCNSSCMGGMNWRPILTIITLEDSSGNL
p53 R273H	EDSSGNLLGRNSFEVHVCACPGRDRRTEENLRKK
p53 R282W	EDSSGNLLGRNSFEVRVCACPGRDWRTEENLRKK
p53 G245S	TTIHYNMYCNSSCMGSMNRRPILTIITLEDSSGNL
p53 R273C	EDSSGNLLGRNSFEVCVCACPGRDRRTEENLRKK

GTPase Kras

Kras G12D	TEYKLVVVGADGVGKSALTIQLIQNHFV
Kras G12V	TEYKLVVVGAVGVGKSALTIQLIQNHFV
Kras G13D	TEYKLVVVGAGDVGKSALTIQLIQNHFV
Kras G12C	TEYKLVVVGACGVGKSALTIQLIQNHFV
Kras G12S	TEYKLVVVGASGVGKSALTIQLIQNHFV

Serin/Threonin-Proteinkinase B-raf

B-raf V600E	LHEDLTVKIGDFGLATEKSRWVSGSHQFEQLS
-------------	----------------------------------

3.1.7 Peptide nach PF2D-Analyse

26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 6

26S A	IRDFKQAAELFLDTVSTFTSYELMDYKTFV
26S B	RPDSKNWQYQETIKKGDLLLNRVQKLSRVI

28S ribosomal protein S23, mitochondrial

28S	EKLFVETGKALLAEGVILRRVGEARTQHG
-----	-------------------------------

40S ribosomal protein S2

40S A	SLPIKESEIIDFFLGASLKDEVKIMPVQK
40S B	ATAIRGAILAKLSIVPVRRGY

60kDa Heat Shock Protein

HSP60 A	KVGEVIVTKDDAMLLKKGDKAQIEKRIQE
HSP60 B	KAQIEKRIQEIIIEQLDVTTSEYEKEKLNER
HSP60 C	EYEKEKLNERLAKLSDGVAVLKVGGTSDVE

Aldehyde dehydrogenase X

Aldehyde DeX A	RLLNLLADLVERDRVYLASLETLDNGKP
Aldehyde DeX B	GKPFQESYALDLDEVIKVYRYFAGWADKW

alpha-Fibrinogen

Fibrinogen A	CRMKGLIDEVNQDFTNRINKLKNLSFEYQK
Fibrinogen B	ALAREVDLKDYEDQQKQLEQVIKDLLPSRDRQHL

Aminoacylase-1

Aminoacylase A	QKVEVAPGYVVTWLTWPGTNPTLSSILLNS
Aminoacylase B	FSRVCKDMNLTLEPEIMPAATDNRYIRAVG

Annexin A2

Annexin A	LASALKSALS GHLETVILGLLKTPAQY
Annexin B	MKGLGTDEDSLIEIICSRTNQEIQEINRVY
Annexin C	AEDGSVIDYELIDQDARDLYDAGVKR
Annexin D	RDLYDAGVKRKGTDV PKWISIMTERS

Anterior gradient protein 2 homolog

AntGrProt2	MEKIPVSAFLLLVALSYTLARDTTVKPGAK
------------	--------------------------------

Apolipoprotein D

ApoD A	MLLLLLSALAGLFGAAEGQAFHLGKCPN
ApoD B	KIKVLNQELRADGTVNQIEGEATPVNL

ATP synthase subunit alpha, mitochondrial

ATP synthase A RLTDADAMKYTIVVSATASDAAPLQYLAPY
ATP synthase B AGDVSAYIPTNVISITDGQIFLETELFYKG

beta-2 microglobulin

beta2m KVEHSDLSFSKDWSFYLLYYTEFTPTEKDE

BUB3 isoform a

BUB3 A DRLIVGTAGRRVLVWDLRNMGYVQQRRESS
BUB3 B GYVQQRRESSLKYQTRCIRAFPNKQGYVLS

C19orf21 (nicht-charakterisiertes Protein)

C19orf21 VNRIPPDAYQPYLSPGTPQLEFSAFGAFGKPS

Caspase-14

Caspase14 A TDALHVYSTVEGYIAYRHDQKGSCFIQTLV
Caspase14 B KGSCFIQTLVDVFTKRKGHILELLETVTRR
Caspase14 C LELLTEVTRRMAEAEELVQEGKARKTNPEIQ
Caspase14 D KARKTNPEIQSTLRKRLYLQ

Cathepsin B

Cathepsin B FLGGPKPPQRVMFTEDLKLPAFDAREQWP

Creatine kinase-B

Creatine A KLAVEALSSLDGDLAGRYYALKSMTEAEQQ
Creatine B HLGYILTCPSNLGTGLRAGVHIKLPNLGKH

Desmoplakin

Desmoplakin A MYYSRRGVITDQNSDGYCQTGTMSRHQNQN
Desmoplakin B LIIPPNPLAVDLSCKIEQYYEAILALWNQ
Desmoplakin C YEAILALWNQLYINMKSLVSWHYCMIDIEK

Dsc1a

Dsc1a A QLLFSLVLTLLCDACQKVYLRVPSHLQAE
Dsc1a B AFRILEDGSIYTTHTDLILSSERKSFSIFLS
Dsc1a C PNVILGRWAILAMVLGSVLLLILFTCFV

Eukaryotic initiation factor 4A-II

eIF4a A NEIVDNFDDMNLKESLLRGIYAYGF EKPSAI
eIF4a B VIAQAQSGTGKTATFAISILQLEIEFKET
eIF4a C TQALVLAPTRELAQQIQKVILALGDYMG
eIF4a D VVGTPGRVFDMLNRRYLSPKWIKMFVLDE

Elongation factor 1-alpha 1

EF1alpha A GTTLEALDCILPPTRPTDKPLRLPLQDVY
EF1alpha B PLRLPLQDVYKIGGIGTVPVGRVETGVLKP
EF1alpha C GRVETGVLKPGMVVTFAPVNVVTE

Elongation factor 1-gamma

EF1gamma A NLITGMFQRDLKLRKNAFASVILFGTNNSS
EF1gamma B VILFGTNNSSSISGVWVFRGQELAFPLSPD
EF1gamma C QELAFPLSPDWQVDYESY

Elongation factor Tu

EF Tu A KPFLLPVEAVYSVPGRGTVVTGTLERGIK
EF Tu B NLGALVRGLKREDLRRGLVMVKPGSIKPHQ

ERp44

ERp44 A VFSLPDLRCSLLLLVTWVFTPVTTEITSL
ERp44 B SLDTENIDEILNNADVAVNFYADWCRFSQ

ERp57

ERp57 RLRRALFPGVALLLAAARLAAASDVLELTD

Fatty acid-binding protein

Fatty acid bp WDGKESTITRKLKDGKLVVECVMMNNVTCTR

Fibronectin

Fibronectin A MLRGP GPGLLLLAVQCLGTAVPSTGASKSK

Fibronectin B VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVR

Fibronectin C TIEGLQPTVEYVVSVYAQNPSGESQPLVQT

Filaggrin-2

Filaggrin-2 A MTDLLRSVVTVIDVFYKYTKQDGECGTLK

Filaggrin-2 B RDHDRRLDFTEFLMIFKLTMACNKVLSKE

Filaggrin-2 C DTPGHKSGYRHSSWSEGEHGYSSGHSRGT

Glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase

GAPDH A HLQGGAKRVIISAPSADAPMFVMGVNHEKY

GAPDH B ALNDHFVKLISWYDNEFGYSNRVVDLMAHM

GrpE-like protein cochaperone

GrpE A KADPPATEKTLLEEKVKLEEQLKETVEKYK

GrpE B QLKETVEKYKRALADTENLRQRSQKLVEEA

GTP-specific succinyl-CoA synthetase beta subunit

SCS-betaG A FKLLTADPKVEAILVNIFGGIVNCAIANGITKA

SCS-betaG B EVNPFGETPEGQVVCFDAKINFDDNAEFRQK

Heat shock cognate 71 kDa protein isoform 1

HSC71 A PSYVAFTDTERLIGDAAKNQVAMNPTNTVFDA

HSC71 B AAIAYGLDKKVGAEARNVLIFDLGGGTFDVS

Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1

hnRNP A1 A GFGFVTYATVEEVDAAMNARPHKVDGRVVE

hnRNP A1 B VKKIFVGGIKEDTEEHHLRDYFEQYGKIEV

Histone H2A.2

Histone H2 A RISVGAPVYMAAVIEYLAAEILELAGNAAR
Histone H2 B ARDNKKARIAPRHILLAVANDEELNQLLKG

Homeobox prox 1

Prox1 A LKQQL EDMQKQLRQLQEKFYQIYDSTDSEN
Prox1 B KQELNTAMSQVVDTVVVKVFSAPSRQVPQV

Hemoglobin subunit alpha

Hemoglobin LPAEFTP AVHASL DKFLASVSTVLT SKY

Ig gamma-4 chain C region

Ig gamma-4 A CPSCAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
Ig gamma-4 B QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

Keratinocyte proline-rich protein

KPRP A CAPVCYTETCYVECPVQNYVPCPAPQPVQM
KPRP B EPCLYPEPLPALRPTPRPVPLPRPGQCEIP

Leucine-rich repeat-containing protein 15

hLib15 A QVLP IGLFQGLDSLESLLLSSNQLLQIQP
hLib15 B QLHG NHLEYIPDGAFDHLVGLTKLNLGKN

LIM-protein FHL3

FHL3 VPCYDNTFANTCAECQQLIGHDSRELFYED

Lipoma-preferred partner isoform a

LPP A SLDAEIDSLTSILADLECSSPYKPRPPQSST
LPP B TVRIVALDRDFHVHCYRCEDCGLLSEGDN

M4 protein

M4 A FPPERPQQQLPHGLGGIGMGLGPGGQPIDAN
M4 B FNECGHVLYADIKMENGKSKGCGVVKFESPEVAER

Major vault protein

MVP A WLIRGPLEYVPSAKVEVVEERQAIPLDENE
MVP B RQAIPLDENEGIYVQDVKTGKVRVIGSTY

NADP-dependent isocitrate dehydrogenase

IDH A TRIIWELIKEKLIFPYVELDLHSYDLGIEN
IDH B SLGMMTSVLVCPDGKTVEAEAAHGTVTRHY

Nuclear corepressor KAP-1

KAP-1 A RERLRPERPRLLPCLHSACSACLGAAPA
KAP-1 B SRDGERTVYCNVHKHEPLVLFCECDTLTC

Plakoglobin

Plakoglobin A ELLAIFKSGGIPALVRMLSSPVESVLFYA
Plakoglobin B SPVESVLFYAITTLHNLLLYQEGAKMAVRL
Plakoglobin C QEGAKMAVRLADGLQKMVPLLKNKNNPKFLA
Plakoglobin D LNKNNPKFLAITTDCLQLLAYG

Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17 isoform 1

DDX17 A GIAQTGSGKTLAYLLPAIVHINHQPYLERG
DDX17 B WPKEVRQLAEDFLRDYTQINVGNLELSANH

Prolactin-inducible protein

PIP A RLLQLLFRASPATLLLVLCLQLGANKAQDN
PIP B ELKECMVVKTYLISSIPLQGAFNYKYTAQL

Proteasome subunit beta type-5

Proteasome beta5 RISGATFSVSGSVYAYGVMDRGSYDLEVE

Protein S100-A7 (Psoriasin)

Psoriasin NEDKKIDFSEFLSLLGDIATDYHKQ

Protein S100-A8

S100-A8 A FKELDINTDGAVNFQEFLILVIKMGVAAHKK

S100-A8 B SLIKGNFHAVYRDDLKKLLETECPQY

Protein S100-A9

S100-A9 A HPDTLNQGEFKELVRKDLQNFLKKENKNE

S100-A9 B NADKQLSFEEFIMLMARLTWASHEKMHEG

Protein S100-A11

S100-A11 A GYNYTLSKTEFLSFMNTELAaftknqkdpG

S100-A11 B AFTKNQKDPGVLD RMMKKLDTNSDGQLDFS

S100-A11 C TNSDGQLDFSEFLNLIGGLAMA

Protein ETHE1

ETHE1 A DAQLIKELGLRLLYAVNTHCHADHITGSSL

ETHE1 B TPGCVTFVLNDHSMaFTGDALLIRGCGRTD

Protein SCO2 homolog

SCO2 RTRLLITGLFGAGLGGAWLALRAEKERLQQ

Pyruvate kinase M2

PK M2 A RPVAVALDTKGPEIRTGLIKGSGTAEVELK

PK M2 B LIAREAEAAIYHLQLFEELRRLAPITSDPT

RNA helicase A

RNA helicase A EALLKYIETLNVPgAVLVFLPGWNLIYTMQK

Selenium-binding protein 1

Selenium bp1 A NGKGGFVLLDGETFEVKGTWERPGGAAPLGY
Selenium bp1 B STEWAAPNVLRDGFNPADVEAGLYGSHLYV

Serum Albumin

Albumin GMFLYEYARRHPDYSVLLLLRLAKTYETTLEKC

Sorcin

Sorcin RQHFISFDTRSGTVDPQELQKALTTMGFRL

Stathmin isoform a

Stathmin RASGQAFELILSPRSKESVPEFPLSPPKKK

Stomatin-like 2

Stomatin A VVERMGRFHRILEPGLNILIPVLDRIYVQ
Stomatin B AVLAKAKAKAEAIRILAAALTQHNGDAAAS

Superoxid Dismutase (CuZnSod)

CuZnSod DGVADVSIEDSVISLSGDHCIIGRTLHVHE

Suprabasin isoform 1

Suprabasin LARLVGSCSLLLLLGALSGWAASDDPIEKV

Thioredoxin peroxidase PMP20

PMP20 AFGKETDLLLDDSLVSIFGNRRRLKRFSMVV

Transferrin

Transferrin A NPDPWAKNLNEKDYELLCLDGTRKPVEEYA
Transferrin B LLCLDGTRKPVEEYANCHLARAPNHAVVTR

Transgelin

Transgelin A GVILSKLVNSLYPDGSKPVKVPENPPSMVF
Transgelin B AVQRTLALGSLAVTKNDGHYRGDPNWFMK

Transgelin 2

Transgelin 2 A NWLKDGTVLCELINALYPEGQAPVKKIQAS
Transgelin 2 B QRTLMLNLGGLAVARDDGLFSGDPNWFPKKS

tRNA methyltransferase 112 homolog

tRNA 112 IPKVEWSAFLEAADNLRLIQVPKGPVEGYE

Tubulin alpha-1A chain

Tubulin A GKHVPRAVFVDLEPTVIDEVRTGTYRQLFH
Tubulin B SLLMERLSVDYGGKSKLEFSIYPAPQVSTA

Ubiquitin

Ubiquitin A MQIFVKLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKI
Ubiquitin B NVKAKIQDKEGIPPDQQRLLIFAGKQLEDGR

WD40 repeat-containing protein SMU1

SMU1 A SSDVIRLIMQYLKENSLHRALATLQEETTV
SMU1 B LATLQEETTVSLNTVDSIESFVADINSGHW
SMU1 C FVADINSGHWDTVLQAIQSLKLPDKTLIDLY

Zink-alpha-2-Glykoprotein

Zn-alpha2GP MVRMVPVLLSLLLLLGPVAPQENQDGRYSL

3.1.8 Antikörper und Konjugate

Reaktivität	Wirt	Isotyp	Klon	Konjugat	Firma	Land
IFN- γ	Maus	IgG1	1-D1K	unkonjugiert	Mabtech	Schweden
IFN- γ	Maus	IgG1	7-B61	Biotin	Mabtech	Schweden
CD45	Maus	IgG1	HI30	Pacific blue	BioLegend	USA
CD31	Maus	IgG1	WM59	APC	BioLegend	USA
EPCAM	Maus	IgG1	HEA125	FITC	Dr. Moldenhauer	Deutschland
FSP-1	Maus	IgG2a	D7-FIB	PE	AbD Serotec	Deutschland
CD3	Maus	IgG2a	OKT3	unkonjugiert	Dr. Moldenhauer	Deutschland
CD19	Maus	IgG1	HD37	unkonjugiert	Dr. Moldenhauer	Deutschland
CD56	Maus	IgG1	C218	unkonjugiert	Beckman-Coulter	USA
BUB3	Kaninchen	IgG	poly	unkonjugiert	Abcam	England
ATP Synthase	Kaninchen	IgG	poly	unkonjugiert	Abcam	England
Hnr A1	Kaninchen	IgG	poly	unkonjugiert	Abcam	England
Cathepsin B	Kaninchen	IgG	poly	unkonjugiert	MBL	USA
Fibronectin	Kaninchen	IgG	poly	unkonjugiert	MBL	USA
Selenium bp1	Kaninchen	IgG	poly	unkonjugiert	Atlas Antibodies	Schweden
KAP-1	Kaninchen	IgG	poly	unkonjugiert	Abcam	England
eEF1 alpha1	Kaninchen	IgG	poly	unkonjugiert	ProteinTech	USA
eEF gamma	Kaninchen	IgG	poly	unkonjugiert	Abcam	England
Caspase 14	Kaninchen	IgG	poly	unkonjugiert	Acris	Deutschland

Psoriasin	Kaninchen	IgG	poly	unkonjugiert	Abcam	England
S100A9	Kaninchen	IgG	poly	unkonjugiert	Abcam	England
Annexin A2	Kaninchen	IgG	poly	unkonjugiert	Abcam	England
Sorcini	Kaninchen	IgG	poly	unkonjugiert	Abcam	England
Transgelin	Kaninchen	IgG	poly	unkonjugiert	Atlas Antibodies	Schweden
Erp44	Kaninchen	IgG	poly	unkonjugiert	Abcam	England
AntGradProt2	Kaninchen	IgG	poly	unkonjugiert	Atlas Antibodies	Schweden
Prox1	Kaninchen	IgG	poly	unkonjugiert	Abcam	England
Plakoglobin	Kaninchen	IgG	poly	unkonjugiert	Acris	Deutschland
LPP isoform a	Kaninchen	IgG	poly	unkonjugiert	Atlas Antibodies	Schweden
Zn-alpha2-GP	Kaninchen	IgG	poly	unkonjugiert	Atlas Antibodies	Schweden
Kaninchen IgG	Hühnchen	IgG	poly	Alexa 488	Life Technologies	USA

Streptavidin alkalische Phosphatase

7-Aminoactinomycin D (7-AAD)

Propidiumiodid (PI)

Pacific Orange

Mabtech, Schweden

BD Bioscience, USA

Miltenyi Biotec, Deutschland

Life Technologies, USA

3.1.9 Verbrauchsmaterialien

ELISpot-Platten (*MultiScreen HA*)

Expressfilter 0,22µm (*Millex GP*)

Röhrchen 50ml (*Leuco-Sep®*)

Mikrotiterplatten, unbeschichtet

Petrischalen (*Optimix™*)

Petrischalen, beschichtet

Reagenzreservoir

Millipore, Deutschland

Millipore, Deutschland

Greiner Bio-One, Österreich

BD Falcon, USA

BD Falcon, USA

TPP, Schweiz

Fisher Scientific, USA

Zellkulturflaschen	TPP, Schweiz
Zentrifugenröhrchen (15ml & 50ml)	TPP, Schweiz
Serumpipetten	Greiner Bio-One, Österreich
Zellschaber	TPP, Schweiz
Zellfilter (40µm & 100µm)	BD Falcon, USA
Kryoröhrchen (<i>Cryo.S™</i>)	BD Falcon, USA
Einmalspritzen (50ml)	Terumo, Japan
Einmalspritzen (10ml)	BD Falcon, USA
Einmalskalpelle (<i>No.20</i>)	Feather, Japan
Pipettenspitzen (10µl, 200µl, 1000µl)	StarLab, Deutschland
Multipettenspitzen (20µl, 200µl)	Rainin, Niederlande
MACS Säulen (<i>MS, LS, LD</i>)	Miltenyi Biotec, Deutschland
Reaktionsgefäße (<i>Safe-lock</i> , 1,5ml & 2ml)	Eppendorf, Deutschland
Reaktionsgefäße (<i>LoBind</i> , 1,5ml)	Eppendorf, Deutschland
Serologische Pipetten (5ml, 10ml, 25ml)	BD Falcon, USA
Zentrifugenfilter (<i>Amicon® Ultra</i>)	Millipore, Deutschland
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, USA

3.1.10 Puffer & Lösungen

FACS-Puffer

1 x PBS

2 % FCS

ELISpot-Waschpuffer

1 x PBS

0,2 % Tween®20

MACS-Puffer

1 x PBS

0,5 % AB Serum

0,05 % EDTA

DC-Medium

1 x X-VIVO

50 U/ml IL-4

560 U/ml GM-CSF

TC-Medium

1 x RPMI 1640

10 % FCS

1 x Penicillin/Streptomycin

100 mM HEPES

3 U/ml IL-4

100 U/ml IL-2

Einfriermedium

1 x AB Serum

10 % DMSO

Dead Cell removal Binding-Puffer

1x ddH₂O

5 % Binding Puffer (20x)

CELLection-Puffer 1 (pH 7,4)

1 x PBS

0,1 % BSA

CELLection-Puffer 3 (pH 7,0 - 7,4)

1 x RPMI 1640

1 % FCS

1 mM CaCl₂

4 mM MgCl₂

Membranlysepuffer

10 % Glyzerol

5 M urea

2 M thiourea

50 mM Tris-HCl (pH 8,0)

2,0 % (w/v) n-octylglucoside

2,5 % (w/v) SB3-10

1,0 mM Protease Inhibitor

Natriumcitratpuffer

2,94 g Trinatriumcitrat

1000 ml destilliertes Wasser

pH auf 6,0 eingestellt mit 1N HCl

0,5 ml Tween 20

3.1.11 Humane Proben

Peripheres Blut, Knochenmark-Blut,
Tumorgewebe und gesundes Kontroll-
gewebe

Universitätsklinikum Heidelberg,
Chirurgische Klinik
Prof. Dr. med. Jürgen Weitz

3.1.12 Software

CellQuest Pro

Beckton Dickinson, USA

FlowJo 6.2

Tree Star, USA

FACS Diva

Beckton Dickinson, USA

GraphPad Prism 5

GraphPad Software Inc, USA

Office 2007

Microsoft, USA

Windows XP

Microsoft, USA

Xcellence

Olympus, Deutschland

ImmunoSpot

CTL, USA

ImageJ

National Institute of Health, USA

3.2 Methoden

3.2.1 Zellbiologische Methoden

Organisches Material von Patienten mit kolorektalem Karzinom

Patienten mit kolorektalem Karzinom wurden in der Chirurgischen Klinik der Universität Heidelberg vor dem Unterzeichnen der Einverständniserklärung über den Sinn und die Bedeutung der Forschung mündlich und schriftlich aufgeklärt. Peripheres Blut der Patienten wurde vor der Operation und gegebenenfalls später ambulant abgenommen und heparinisiert. Knochenmarkblut wurde unter systemischer Anästhesie aus dem Beckenkamm entnommen und ebenfalls heparinisiert. Tumorgewebe und gesundes Kontrollgewebe wurde bei der Operation entnommen und in PBS auf Eis aufbewahrt bis es verarbeitet wurde. Das Protokoll wurde von der Ethikkommission der Universität Heidelberg genehmigt.

Isolation von mononukleären Zellen aus peripherem Blut und Knochenmark

Mononukleäre Zellen aus peripherem Blut und aus Knochenmark wurden über eine Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation gewonnen. Dazu wurde 15 ml Ficolllösung in ein Röhrchen mit Filter überführt und für 1 min bei 2000 U/min zentrifugiert um die Lösung unter dem Filter zu sammeln. Danach wurde 10 ml RPMI-1640 über den Filter geschichtet und das Blut vorsichtig zugegeben. Für den Aufbau des Gradienten und die Dichteseparation wurde das Röhrchen für 20 Minuten bei 2000 U/min zentrifugiert. Dabei setzen sich dichte Bestandteile, wie Erythrozyten und polymorphkernige Granulozyten, unten am Boden ab; das zellfreie Plasma bildet die oberste Phase. Mononukleäre Zellen reichern sich aufgrund ihrer spezifischen Dichte an der Phasengrenze an. Dadurch können sie nach der Zentrifugation mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgesaugt werden. Die Zellen wurden in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen gesammelt und mit PBS gewaschen: Auffüllen und Zentrifugieren bei 1400 U/min für 8 min. Die mononukleären Zellen aus dem Blut (PBMC) oder aus dem Knochenmark (BMMC) wurden dann entweder für die spätere Verwendung eingefroren oder in Kultur genommen.

Kultivierung von T-Zellen und Generierung von Dendritischen Zellen

PBMC oder BMDC wurden in X-VIVO 20 aufgenommen und in beschichtete Zellkulturpetrischalen überführt. Nach 45-90 Minuten adhären die Monozyten und ähnliche Vorläuferzellen am Boden der Petrischale, die Lymphozyten bleiben im Überstand. Durch vorsichtiges Abspülen der Platten wurde der Überstand mit den enthaltenen Lymphozyten entnommen und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Zu den adhären Zellen wurde zügig 15 ml DC-Medium gegeben, wodurch diese sich, durch die enthaltenen Zytokine im Medium, innerhalb von 4-7 Tagen zu Dendritischen Zellen entwickeln. Die Lymphozyten im Zentrifugenröhrchen wurden für 8 min bei 1400 U/min zentrifugiert, in 15 ml TC-Medium aufgenommen und in einer unbeschichteten Petrischale in Kultur genommen.

Zellkulturbedingungen

Alle Zellen wurden in sterilen, z.T. beschichteten Zellkulturpetrischalen in einem Begasungsbrutschrank bei 37 °C in einer H₂O-gesättigten Atmosphäre mit 5 % CO₂ kultiviert. T-Zellen und Dendritische Zellen sind Suspensionszellen. Dreimal pro Woche wurden die Zellen mit frischem TC-Medium bzw. DC-Medium versorgt. Dazu wurde zwei Drittel des Mediums abgenommen und durch frisches Medium ersetzt. Das abgenommene Medium wurde zentrifugiert (1400 U/min, 8 min), um die darin enthaltenen Zellen nicht zu verlieren. Nach der Zentrifugation wurden die Zellen resuspendiert und wieder in die Kultur zurückgegeben. Alle Kulturmedien wurden vor Gebrauch in einem Wasserbad auf 37°C erwärmt. Alle Arbeiten mit diesen Zellen wurden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt. Wenn nicht anders angegeben, wurden bei Bedarf Zellen in 15 ml Zentrifugenröhrchen immer bei 1400 U/min für 8 Minuten und Zellen in 50 ml Zentrifugenröhrchen für 10 Minuten zentrifugiert.

Einfrieren und Auftauen von Zellen

Das Tieffrieren erlaubt es, Zellen für längere Zeit aufzubewahren. Dazu wurden die Zellen abzentrifugiert und in 1 ml eiskaltem Einfriermedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde sofort in Kryoröhrchen überführt und in einem Einfrierblock, der mit Isopropanol gefüllt war, bei -80 °C eingefroren. Das umgebende Isopropanol garantiert eine gleichmäßige Abkühlung von circa 1 °C/min und verhindert so die Ausbildung von zellschädigenden Eiskristallen.

Um kryokonservierte Zellen aufzutauen, wurden die Zellen mit erwärmtem Medium schrittweise gelöst und unverzüglich in 10 ml warmes Medium überführt. Um das im Einfriermedium enthaltene DMSO abzutrennen, wurde bei 530 g für 3 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die pelletierten Zellen wurden in warmem, frischem Medium resuspendiert und in Kultur genommen. Dieses Vorgehen beim Auftauen garantiert einen schnellen Übergang in die flüssige Phase und eine rasche Verdünnung in frischem Medium um die zytotoxischen Effekte des enthaltenen DMSO zu minimieren. DNA, die durch tote Zellen freigesetzt wird, führt häufig zum Verklumpen von Zellen. Dies kann dazu führen, dass bei sich anschließenden Versuchen Zellen verloren gehen. Deshalb wurde teilweise 100 U DNase I zum Medium gegeben um die freie DNA abzubauen und das Verklumpen von Zellen zu verhindern.

Isolation von Einzelzellen aus humanem Gewebe

Humanes Gewebe besteht aus einer Vielzahl verschiedener Zelltypen. Viele Tumore bestehen zu einem Großteil aus Stromazellen (z.B. Fibroblasten, Endothelzellen, Leukozyten) und nur zu geringeren Teilen aus Tumorzellen. Um mit diesen einzelnen Zelltypen zu arbeiten, müssen Einzelzellen aus dem Gewebe gewonnen werden.

Nachdem das Abtropfgewicht bestimmt war, wurde das Gewebe zuerst in einer Petrischale in PBS mit Skalpell mechanisch zerkleinert. Anschließend wurden die Gewebestücke inklusive PBS in ein Zentrifugenröhrchen überführt und Verdauungsenzyme zugegeben (für 10 g Gewebe: 20 mg Hyaluronidase). Anschließend wurde das Röhrchen bei 37 °C schüttelnd für 30 min inkubiert. Nach der Zugabe von 1 ml EDTA, um die Enzymaktivität zu stoppen, wurde die Suspension zuerst über einen gröberen Zellfilter (100 µm) und anschließend über einen engmaschigeren Filter (40 µm) in ein neues Röhrchen überführt. Um das Verklumpen der Zellen in den folgenden Experimenten zu verhindern, wurden 100 U DNase I zugegeben und das Röhrchen erneut für 30 min bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (1400 U/min, 8 min), der Überstand verworfen, die Zellen in Medium aufgenommen und gezählt.

Bestimmung der Lebendzellzahl

Trypanblau erlaubt die Unterscheidung zwischen lebenden und sterbenden, bzw. toten Zellen. Lebende Zellen mit intakter Zellmembran erlauben kein Eindringen des Farbstoffs. Jedoch kann er in Zellen mit beschädigter Membran eindringen und sie damit anfärben.

Die genaue Lebendzellzahl wurde bestimmt, indem Zellen mit Trypanblau (Verdünnung 1:10) angefärbt und in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop ausgezählt wurden. Es wurden jeweils 4 Großquadrate ausgezählt. Das Volumen der Zählkammer beträgt 0,1 µl je Großquadrat. Deshalb muss die bestimmte Zellzahl je Quadrat mit dem Faktor 10^4 verrechnet werden um die Lebendzellzahl nach folgender Formel zu erhalten:

$$\text{Zellen}/_{\text{ml}} = \text{Zellen (Großquadrat)} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

3.2.2 Proteinbiochemische Methoden

Herstellung von Gewebelysaten

Solides Tumorgewebe von kolorektalen Primärtumoren oder Lebermetastasen sowie gesundes Kontrollgewebe wurde in der Chirurgischen Universitätsklinik Heidelberg entnommen. Zur Herstellung von Gewebelysaten wurde zunächst vorhandenes Fettgewebe mit Hilfe eines Skalpells entfernt. Das Gewebe wurde zerkleinert und ein Gewebestück von jeweils circa 0,5 cm³ in ein 5 ml Röhrchen überführt und 500 µl Membranlysepuffer zugegeben. Die Homogenisierung erfolgte anschließend für maximal 1 min mit einem Dispergiergerät. Um eine Kontamination verschiedener Proben auszuschließen, wurde das Dispergiergerät nach jeder Probe dreimal mit 0,3 M NaOH und anschließend dreimal mit ddH₂O gewaschen. Das Gewebelysat wurde bis 2 ml mit Membranlysepuffer aufgefüllt und für eine Stunde bei 13.000 U/min und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand mit den enthaltenen Proteinen wurde anschließend vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Vorbereitung der PF2D-Analyse

Gewebelysate, die in Membranlysepuffer gelöst vorlagen, wurden in 3,5 ml Startpuffer umgepuffert. Dazu wurde eine *PD10 Sephadex G-25*-Säule verwendet, die vorher mit 15 ml Startpuffer äquilibriert wurde. Anschließend wurde die Proteinkonzentration bestimmt.

Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration von Gewebelysaten, die für die PF2D-Analyse vorgesehen waren, wurde mit dem *Micro BCA Protein Assay Kit* bestimmt. Diese Methode basiert auf der Eigenschaft von Bicinchoninsäure (BCA) mit einwertigen Kupferionen (Cu^{1+}) zu einer Komplexverbindung mit violetter Farbe zu reagieren. Cu^{1+} Ionen werden gebildet, wenn Cu^{2+} Ionen in einer alkalinen Umgebung von Proteinen reduziert wird. Die entstehende Komplexverbindung ist wasserlöslich und besitzt eine starke Absorption bei 562 nm die linear mit der Proteinkonzentration ansteigt (Smith 1984).

Von jeder Probe wurde jeweils eine 1:100 und 1:1000 Verdünnung in Startpuffer angesetzt und jeweils mit 100 μl BCA-Lösung versetzt. Nach einer Inkubation von einer Stunde wurde die Absorption mit einem 570 nm Filter gemessen und die Proteinkonzentration anhand einer Eichgeraden mathematisch bestimmt.

Die Konzentration bei allen Gelegenheiten außer der PF2D-Analyse wurde mit dem NanoDrop 2000c Spectrometer bei 280 nm gemessen.

Proteinfractionierung in zwei Dimensionen (PF2D)

Die Vorbereitung der Proben sowie die gesamte Proteinfractionierung wurden von Dr. Rolf Warta in der Neurochirurgischen Klinik Heidelberg durchgeführt.

Die ProteomeLab™ PF2D-Analyse basiert auf einer zweidimensionalen Auftrennung von Proteinlysaten nach pH-Wert und Hydrophobizität der Proteine (Lubman et al. 2002). Das PF2D-Gerät besteht aus zwei Modulen, die jeweils eine Dimension der Auftrennung übernehmen. In der ersten Dimension wird eine Chromatofokussierung über HPLC-Säulen durchgeführt. Dabei werden die Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt separiert. Der lineare pH-Gradient kommt durch das Mischen zweier Puffer mit unterschiedlichem pH-Wert (Startpuffer pH 8,5 und Eluierungspuffer pH 4,0) zustande. In der zweiten Dimension werden die Proteine über Umkehrphasechromatographie nach der Stärke ihrer Hydrophobie aufgetrennt. Dabei führt die Interaktion der Proteine mit C18-Alkylresten in der Säule zusammen mit einem linearen Gradienten von 0,1 % TFA und 0,08 % TFA in Acetonitril zu einer Retention und damit einer Auftrennung abhängig ihrer Hydrophobizität.

Für die PF2D-Analyse in der ersten Dimension wurden Proteinlysate in 2 ml Startpuffer mit bis zu 5 mg Protein auf die Säule gegeben nachdem diese mit HPLC- H_2O vorbereitet wurde und das System betriebsbereit war. Die Auftrennung erfolgte in 1,5 ml Fraktionen beginnend

mit pH 8,5 in abnehmenden Schritten von pH 0,3 bis ein pH-Wert von 4,0 erreicht war. Die Flussrate lag bei 0,2 ml/min. Der Proteingehalt in den Fraktionen wurde durch die Absorption bei 280 nm gemessen. Ein Teil der Fraktionen wurde dann für ELISpot-Analysen verwendet, der andere Teil für die spätere Analyse der zweiten Dimension bei -20 °C eingefroren.

Für die zweite Dimension wurden nur Fraktionen verwendet, die relevante Antworten in der ELISpot-Analyse aufwiesen. Jeweils 200 µl der ersten Dimension wurde eingesetzt und ein Gradient von 5 % bis 100 % Acetonitril angelegt. Die Flussrate lag bei 0,75 ml/min. Die eluierten Proteine wurden bei -20 °C aufbewahrt bis sie für die ELISpot-Analyse und die folgende massenspektrometrische Analyse verwendet wurden.

Auswahl der Peptide

Die Peptide für die ELISpot-Analyse wurden mit Hilfe der Epitopvorhersagedatenbank SYFPEITHI ausgewählt (Rammensee et al. 1999). Die komplette Aminosäuresequenz der durch die Massenspektrometrie identifizierten Proteine wurde in die Datenbank geladen und für jedes Protein jeweils bis zu 20 der wahrscheinlichsten Epitope (höchster Score) der HLA-Allele A*0201, A*03, A*01, B*0702, DRB1*1501, DRB1*0701 und DRB1*0301 notiert. Für jedes Protein wurden dann ein bis vier Peptide mit einer Länge von etwa 30 Aminosäuren ausgewählt, die für jedes HLA-Allel möglichst viele Epitope mit hohem SYFPEITHI-Score beinhalteten.

3.2.3 Immunbiologische Methoden

GST-ELISA für den Nachweis von spezifischen Antikörpern in Patientenserum

Die serologische Untersuchung von Patientenseren für den Nachweis von Antikörper-Antworten gegen die Proteine p53, Mage A3 und Survivin wurde über einen GST-ELISA erreicht (Sehr et al. 2001), der von Alexander Migdoll am NCT Heidelberg durchgeführt wurde.

Die Proteine p53, Mage A3 und Survivin wurden rekombinant als Fusionsprotein mit GST (Glutathion-S-Transferase) in *E. coli* exprimiert. Zusätzlich enthielten diese Fusionsproteine eine C-terminale Markierung (*Tag*), bestehend aus den 11 terminalen Aminosäuren des *SV40 large T-Antigen*.

Spezielle 96-Well-Mikrotiterplatten wurden über Nacht mit Glutathioncasein beschichtet, einem Bindepartner für GST-Fusionsproteine. Die Konzentration der drei bakteriellen Antigenlysate wurde auf 0,25 mg/ml eingestellt und in den Platten gekoppelt. Bakterielle GST-Lysate ohne Antigen wurden vorab mit den Seren inkubiert um unspezifische Antikörper zu eliminieren. Die Seren wurden schließlich in einer Verdünnung von 1:500 in die Platten mit den immobilisierten Antigenen gegeben. Gebundene Antikörper wurden mit einer Meerrettichperoxidase, gekoppelt an einen Antikörper gegen humanes F_c, detektiert. Als Substrat diente *o*-Phenylendiamin Dihydrochlorid und H₂O₂. Die Absorption wurde bei 490 nm gemessen, als Referenz diente eine Wellenlänge von 650 nm.

Isolierung von Zellen mit magnetischen Kügelchen

Dynabeads® sind superparamagnetische Kügelchen aus Polystyrol von exakt gleicher Größe, die bereits in den 1970er Jahren entwickelt wurden (Ugelstad 1976). Sie besitzen eine gleichmäßige magnetische Verteilung und ihre Oberfläche kann mit verschiedenen Molekülen bedeckt sein. Die in dieser Arbeit verwendeten Dynabeads waren entweder mit Antikörpern bedeckt, die direkt gegen Zelloberflächenantigene gerichtet waren oder sie trugen Antikörper gegen den konstanten Teil von Maus Immunglobulin. So konnten diese mit der gewünschten Spezifität selbst gekoppelt werden. Durch die magnetischen Eigenschaften der Kügelchen lassen sich, mit Hilfe eines starken Magnetfelds, die an den Kügelchen gebundenen Zellen von nicht gebundenen Zellen trennen. Dies erlaubt die Isolation oder Depletion von bestimmten Zellpopulationen. Eine Besonderheit weisen CELlection™-Dynabeads® auf. Sie tragen ein DNA-Verbindungsstück zwischen dem Kügelchen und dem Antikörper. Diese Konstruktion erlaubt das nachträgliche Entfernen der magnetischen Kügelchen von gebundenen Zellen durch DNase.

Auf dem gleichen Prinzip beruhen auch MACS-Microbeads™ von Miltenyi. Diese ebenfalls superparamagnetischen Kügelchen mit einem Durchmesser von etwa 50 nm bestehen aus einer biologisch abbaubaren Matrix und beeinflussen dadurch die Funktion der Zellen nicht, auch wenn sie noch an den Zellen haften. Die magnetische Separation der MACS-markierten Zellen funktioniert über eine Säule an der ein starkes Magnetfeld angelegt wird. Somit können auch hier gewünschte Zellpopulationen isoliert oder depletiert werden.

Anreicherung von T-Zellen mit Dynabeads

Für die Analyse der Funktionalität von T-Zellen im ELISpot können verschiedene Subpopulationen verwendet werden. In einem ersten Schritt wurden daher die T-Zellen von sonstigen Lymphozyten, z.B. NK-Zellen und B-Zellen, abgetrennt und somit angereichert. Um die Funktionalität nicht zu beeinflussen wurde dazu eine sogenannte Negativselektion verwendet. Dazu liegt den Dynabeads ein Antikörpercocktail bei, der Antikörper gegen CD14, CD16a, CD16b, CD19, CD36, CD56, CDw123 und CD235a enthält. Durch diese Mischung werden alle anderen Zellen von Dynabeads gebunden und entfernt und die T-Zellen bleiben als einzige Population zurück.

Für den Versuch wurden T-Zellen durch mehrmaliges Abspülen von den Zellkulturpetrischalen in Zentrifugenröhrchen überführt und abzentrifugiert (1400 U/min, 8 min). Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und 100 µl MACS-Puffer je 10^7 Zellen zugegeben. Dazu wurden dann analog jeweils 20 µl des Antikörpercocktails pipettiert. Anschließendes Rotieren des Röhrchens für 20 Minuten bei 4 °C stellte die Bindung der Antikörper an die Zielzellen sicher. Nach der Inkubation wurden 2 ml MACS-Puffer zugegeben und die Zellen erneut abzentrifugiert. Der Überstand mit ungebundenen Antikörpern wurde verworfen und die Zellen in 900 µl MACS-Puffer je 10^7 Zellen aufgenommen. Jeweils 100 µl Dynabeads wurden zugegeben und für die Kopplung bei Raumtemperatur 15 Minuten rotiert. Anschließend wurde mit MACS-Puffer auf 5 ml aufgefüllt und gemischt. Die Röhrchen wurden in die Magnethalterung gesteckt und für 3 Minuten inkubiert. In dieser Zeit werden alle von Dynabeads gebundenen Zellen an die Röhrchenwand zum Magneten gezogen. Mit einer Pasteurpipette wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und in ein neues Tube überführt. Nach einer weiteren Zentrifugation stehen die angereicherten T-Zellen für weitere Experimente zur Verfügung.

Isolation von T-Zell-Subpopulationen über MACS-Microbeads

Für die genauere Bestimmung der T-Zell-Antworten ist eine Auftrennung der Zellen in Subpopulationen notwendig. Über die Markierung von Oberflächenmarkern mit magnetischen Kügelchen lassen sich z.B. $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen trennen.

Dazu wurden angereicherte T-Zellen in 80 µl MACS-Puffer je 10^7 Zellen aufgenommen, 20 µl anti-CD8-Microbeads zugegeben, gut gemischt und für 15 Minuten bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden 2 ml MACS-Puffer zugegeben und die Zellen abzentrifugiert. Der

Überstand wurde abgenommen und die microbeadgebundenen Zellen in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert. Eine MACS-MS-Säule wurde am Magnethalter befestigt und einmal mit 500 µl Puffer gewaschen. Dann wurde die Zellsuspension auf die Säule gegeben. Die microbeadgebundenen CD8⁺ T-Zellen werden vom Magneten zurückgehalten und der Durchfluss, der die ungebundenen CD4⁺ Zellen enthält in einem Röhrchen gesammelt. Die Säule wurde noch dreimal mit jeweils 500 µl Puffer gespült und anschließend vom Magnethalter entfernt und auf ein neues Röhrchen gesetzt. Durch die Zugabe von 1 ml Puffer und dem Einsatz eines mitgelieferten Stempels können nun die CD8⁺ T-Zellen aus der Säule entfernt werden.

Isolation von Dendritischen Zellen über Dynabeads

Auch für die Aufreinigung von Dendritischen Zellen wurde das Prinzip der magnetischen Separation angewendet. Durch den Schritt der Adhäsionsreinigung am Beginn der Zellkultur befinden sich jedoch weniger unerwünschte Zelltypen in der Kultur als bei der T-Zell-Kultur. Am Tag des ELISpots wurden die Dynabeads vorbereitet. Dazu wurden pro Patient jeweils 100 µl Pan-Mouse-IgG-Dynabeads mit anti-CD56-, anti-CD19- und anti-CD3-Antikörpern gemischt und für das Koppeln für 20 Minuten bei 4°C rotiert. Anschließend wurden die Dynabeads zusammengeführt und zweimal mit RPMI-1640 gewaschen. Dazu wurde das Röhrchen in den Magnethalter gesteckt, der Überstand abgenommen und neues Medium zugegeben. In der Zwischenzeit wurden die Dendritischen Zellen durch mehrmaliges starkes Abspülen von den Platten entfernt und in Zentrifugenröhrchen überführt. Dabei wurden gegebenenfalls die Dendritischen Zellen aus dem Blut und aus dem Knochenmark eines Patienten zusammengeführt und abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 1 ml RPMI-1640 aufgenommen und mit den antikörpergekoppelten Dynabeads versetzt, gefolgt von einer Inkubation von 20 Minuten auf dem Rollmixer bei 4 °C. Anschließend wurde mit Medium auf 5 ml aufgefüllt und gemischt und die Röhrchen im Magnethalter platziert. Nach 3 Minuten wurden die angereicherten Dendritischen Zellen im Überstand vorsichtig abgenommen und in ein neues Röhrchen überführt.

ELISpot-Analyse (Enzyme-linked ImmunoSpot Assay)

Die ELISpot-Analyse wurde bereits 1983 entwickelt um antigenspezifische B-Zellen quantitativ nachzuweisen (Czerkinsky et al. 1983). Etwas modifiziert eignet er sich auch

hervorragend für den Nachweis von antigenspezifischen T-Zellen. Antigenpräsentierende Zellen, wie beispielsweise Dendritische Zellen, werden dazu ausgesät und mit verschiedenen Testpeptiden sowie Kontrollpeptiden inkubiert. Diese Peptide werden von den Dendritischen Zellen aufgenommen, prozessiert und als Antigene auf MHC-Molekülen auf der Zelloberfläche präsentiert. Werden nun die T-Zellen eines Patienten hinzugegeben, reagieren nur solche T-Zellen, die spezifisch ein präsentiertes Antigen erkennen. Eine darauf folgenden Reaktionen der Zellen ist die Sekretion von Effektormolekülen, wie Interferon- γ oder Perforin. Diese Moleküle werden durch stationär an die Membran gebundene Antikörper abgefangen. Durch einen sekundären Antikörper, der an in einem weiteren Schritt an eine alkalische Phosphatase gekoppelt wird, lassen sich diese Effektormoleküle nachweisen. Durch die Zugabe eines Substrats kommt es durch die Phosphatase zur Entstehung eines unlöslichen Farbstoffs, der die Membran an der Stelle der gebundenen Moleküle anfärbt. So entstehen auf der Membran farbige Stellen (*Spots*), die jeweils für eine reaktive T-Zelle stehen. So lässt sich quantitativ und sehr sensitiv die Anzahl der antigenspezifischen Zellen in einer Probe bestimmen.

Vor dem eigentlichen Experiment wurde die ELISpot-Platte vorbereitet. Dazu wurde der Interferon- γ (IFN- γ)-Fänger-Antikörper 1:100 in PBS verdünnt und gut gemischt. Dann wurden jeweils 100 μ l pro Well in die Platte gegeben und der Antikörper für 3 Stunden bei 37°C an die Membran gekoppelt. Alternativ wurde die Kopplung auch bei 4°C über Nacht durchgeführt. Anschließend wurde die Antikörperlösung abgekippt und zweimal mit Waschpuffer und zweimal mit PBS gewaschen. Dann wurde zum Blockieren der noch freien Bindestellen je 200 μ l X-VIVO 20 Medium mit 10 % AB-Serum zugegeben und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde erneut je zweimal mit Waschpuffer und PBS gewaschen. Für das ELISpot-Experiment wurden standardmäßig dann 10.000 Dendritische Zellen in jedes Well verteilt und jeweils 20 μ g Testpeptid, oder Endoglobulin als Kontrolle, zugegeben und für mindestens 4 Stunden inkubiert. Anschließend wurden je Well 50.000 T-Zellen zugegeben und die Kokultur für 40 Stunden inkubiert. Danach wurde der ELISpot abgestoppt. Dazu wurde die Platte je zweimal mit Waschpuffer und PBS gewaschen und anschließend für 1 Minute mit H₂O inkubiert. Dadurch werden alle Zellen lysiert. Anschließend wurde erneut je zweimal mit Waschpuffer und PBS gewaschen und dann je 100 μ l biotinylierter anti-IFN- γ -Antikörper (1:1000 in PBS verdünnt) zugegeben und bei 37 °C inkubiert. Nach 90 Minuten wurde wie zuvor gewaschen und je 100 μ l einer alkalischen Phosphatase (1:1000 in PBS)

zugegeben, die an Streptavidin gekoppelt war. Nach 90 Minuten bei 37 °C und den Waschschrritten wurde je 100 µl des Substrats für die alkalische Phosphatase (nach Herstellerangaben vorbereitet) zugegeben und die Platte im Dunkeln inkubiert. Durch regelmäßige Sichtkontrollen wurde der Fortgang der Farbreaktion beobachtet und diese nach zwei bis 20 Minuten abgestoppt. Dazu wurde die Substratlösung abgekippt und zweimal mit H₂O gewaschen. Der Plastikboden der Platte wurde abgezogen und die Platte auf Tüchern trockengetupft und mindestens einen Tag getrocknet bevor sie ausgezählt wurde. Für die Analyse wurde das Immunospot® S5-System von CTL verwendet.

Depletion apoptotischer und toter Zellen

Für einige Experimente ist das Vorhandensein von apoptotischen oder toten Zellen negativ, da diese in ihrer Struktur instabil sind und z.B. Antikörper aller Art unspezifisch binden können. Speziell für die Separation von Tumor- und Stromazellen mit dem Ziel anschließend Gewebelysate herzustellen sind tote Zellen als Verunreinigung ein Problem. Für die Entfernung dieser Zellen kann ebenfalls auf magnetische Kügelchen zurückgegriffen werden. Die *MACS Dead Cell Removal Beads* erkennen ein Antigen in der Plasmamembran von frühen und späten apoptotischen sowie von toten Zellen.

Für die Anwendung wurden 100 µl der Microbeads zu jeweils 10⁷ Zellen gegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Eine MACS-LS-Säule wurde im Magnethalter befestigt und mit 1000 µl *Binding*-Puffer äquilibriert. Die Zellen wurden mit 1000 µl *Binding*-Puffer gemischt und auf die Säule gegeben. Die Säule wurde dreimal mit 1000 µl *Binding*-Puffer gespült. Der Durchfluss mit den lebenden Zellen wurde in einem Zentrifugenröhrchen aufgefangen.

Separation von Tumor- und Stromazellen über MACS-Microbeads

Um Tumor- und Stromazellen voneinander zu trennen wurden zuerst die oben beschriebenen Schritte zur Gewinnung von Einzelzellen und der Depletion von toten Zellen durchgeführt. Im Anschluss wurden Tumor- und Stromazellen über den tumorassoziierten Marker EpCAM separiert. Dabei wurden CELlection™-Dynabeads verwendet, um die Magnetkügelchen nach der Separation wieder entfernen zu können.

Dazu wurden die Zellen mit MACS-Puffer auf eine Konzentration von 10⁷ Zellen / ml eingestellt. 10 µg anti-EpCAM-Antikörper wurde je Milliliter zugegeben, gut gemischt und für

15 Minuten bei 4 °C auf dem Rollmixer inkubiert. Anschließend wurden 2 ml Puffer 1 zugegeben und die Zellen abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 1 ml Puffer 1 je 10^7 Zellen resuspendiert. Danach wurden 25 µl CELlection-Dynabeads je 10^7 Zellen hinzugegeben und für 20 Minuten bei 4 °C rotiert. Die Zellsuspension wurde danach nochmals gemischt und für 2 Minuten im Magnethalter inkubiert. Der Überstand, der die Stromazellen beinhalten sollte, wurde vorsichtig mit einer Serumpipette abgenommen und in ein neues Tube überführt. Dieser Vorgang wurde noch einmal mit 1 ml Puffer 1 wiederholt. Danach wurden pro 10^7 microbeadgebundenen Zellen 200 µl Puffer 3, der zuvor auf 37 °C vorgewärmt wurde, und 4 µl der mitgelieferten DNase zugegeben. Nach einer Inkubation von 15 Minuten auf dem Rollmixer bei Raumtemperatur wurde die Suspension zehnmal mit einer 1 ml Pipette stark auf- und abpipettiert um die restlichen Microbeads von den Zellen zu lösen. Die Zellsuspension wurde für 2 Minuten im Magnethalter inkubiert und der Überstand mit den Tumorzellen vorsichtig in ein neues Röhrchen überführt. Auch dieser Schritt wurde einmal mit Puffer 3 wiederholt. Abschließend wurden die separierten Tumor- und Stromazellen gezählt.

Vakzinierungen mit autologen NDV-infizierten Tumorzellen

Im Zuge einer klinischen Studie der Phase I wurden in der Chirurgischen Universitätsklinik Heidelberg Patienten mit einem experimentellen Vakzin behandelt. Die hier in Kürze zusammengefassten Versuche wurden komplett von der Arbeitsgruppe unter Leitung von Prof. Dr. Jürgen Weitz durchgeführt.

Operabel entfernte autologe Lebermetastasen wurden mechanisch zerkleinert und mit Sputolysin® für 15 min nach Herstellerangaben behandelt. Anschließend wurde durch die Behandlung der Gewebestücke mit DNase I und Dispase und das Passieren durch einen Filter einzelne Zellen gewonnen. Nach einer Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation wurden die isolierten Tumorzellen gezählt. Je 1×10^7 Zellen wurden dann mit 64 Hämagglutinationseinheiten / ml des Newcastle-Disease-Virus Stamm Ulster für eine Stunde leicht schüttelnd inkubiert. Nach der Infektion der Zellen wurden diese zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen für eine ausreichende Virusreplikation für 12 Stunden kultiviert. Parallel dazu wurden auch nicht-infizierte Tumorzellen kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen abgelöst und auf Sterilität getestet. Danach wurden die Tumorzellen mit 200 Gy bestrahlt und in einzelnen Chargen

eingefroren. Am Tag jeder Impfung wurde eine Charge mit NDV-infizierten Zellen, und gegebenenfalls eine Charge mit nicht-infizierten Zellen, aufgetaut und in sterilem, physiologischem NaCl resuspendiert und gezählt. Die NDV-infizierten Zellen wurden mit 35 µg eines bispezifischen Antikörpers versetzt, der gegen das Hämagglutinin von NDV sowie gegen CD28 gerichtet ist, und zusammen mit Interleukin-2 dem Patienten verabreicht. Jeder Patient erhielt vier Impfungen mit jeweils 5×10^6 Tumorzellen im Abstand von je zwei Wochen und eine fünfte Impfung nach weiteren vier Wochen. Bei der ersten und letzten Impfung erhielt er zusätzlich eine Impfung mit nicht-infizierten Tumorzellen ohne bispezifischen Antikörper. Jeweils vor und drei Tage nach einer Impfung wurde peripheres Blut entnommen und die Immunreaktion verfolgt.

Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie ist eine der bedeutendsten Methoden der Immunologie. Die Analyse beruht auf der Messung von optischen Signalen, die von Zellen emittiert werden, wenn diese einen Laserstrahl passieren. Durch eine sehr präzise Küvette aus Glas oder Quarz wird garantiert, dass immer nur einzelne Zellen nacheinander durch den Messbereich eines Laserstrahls geführt werden. Ein Detektor fängt das dabei entstehende Streulicht oder Fluoreszenzsignal auf. Normale Zellen emittieren nur sehr wenig fluoreszierendes Licht. Markiert man die Zellen jedoch mit Antikörpern, die spezielle fluoreszierende Farbstoffe tragen, können diese Zellen anhand des Fluoreszenzsignals unterschieden werden. Die Stärke des Fluoreszenzsignals korreliert dabei mit der Stärke der Expression des Moleküls gegen das der Antikörper gerichtet ist. Durch den Einsatz von verschiedenfarbigen Lasern und Filtern kann eine einzelne Zelle auf verschiedene Merkmale hin gleichzeitig untersucht werden. Durch eine sehr hohe Durchflussrate (bis zu 1000 Zellen/s) können sehr detaillierte Aussagen über Subpopulationen einer Probe gemacht werden.

Etwa 5×10^5 Zellen je Probe wurden gewaschen (200 µl FACS-Puffer zugeben, 3 min bei 1600 U/min zentrifugieren) und anschließend in FACS-Puffer resuspendiert. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Zellen wurden für 10 min mit Endobulin (2,5 µg/µl) inkubiert um Fc-Rezeptoren zu blockieren. Anschließend wurden die fluoreszenzstofftragenden Antikörper für die Färbung von Oberflächenmolekülen zugegeben und für 20 Minuten im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden anschließend zweimal gewaschen um sie von ungebundenen Antikörpern zu befreien. Farbstoffe für die lebend/tot-Färbung wurden

nach Herstellerangaben zugegeben und die Zellen in 100 µl FACS-Puffer aufgenommen. Die Analyse wurde mit einem FACS Canto II (Beckton Dickinson, USA) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit FlowJo (Tree Star, USA).

Immunhistologie

Für den Nachweis von Proteinexpression im Tumorgewebe wurden aus Paraffinblöcken mit formalinfixierten Tumorproben dünne Schnitte hergestellt und auf Objektträgern platziert. Deparaffinisiert wurde über eine Xylol-Ethanol-Behandlung: 2x 3 min 100 % Xylol; 3 min 50 % Xylol / 50 % Ethanol; 3 min 100 % Ethanol; 2 min 95 % Ethanol; 2 min 70 % Ethanol; 2 min 50 % Ethanol; Inkubation in H₂O. Anschließend wurden die Objektträger in Natriumcitrat-Puffer in einem Dampfkochtopf für drei Minuten erhitzt um Antigene wieder zugänglich für Antikörper zu machen. Danach wurden die Schnitte zweimal für 5 min mit TBS-T (TBS mit 0,025 % Tween-20) gewaschen und für zwei Stunden mit Kaninchenserum blockiert. Anschließend wurde das Serum abgetropft und die jeweiligen primären Antikörper zugegeben. Es folgte eine Inkubation bei 4 °C über Nacht. Am nächsten Tag wurden die Schnitte zweimal gewaschen und der sekundäre Antikörper aufgebracht und für eine Stunde im Dunkeln inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit anschließender vorsichtiger Trocknung der Probenränder wurden die Schnitte mit Gelatine eingedeckelt. Die Analyse erfolgte auf einem IX81-System unter Xcellence Software (beides Olympus, Deutschland). Die Auswertung wurde mit ImageJ (National Institute of Health, USA) durchgeführt.

3.2.4 Molekularbiologische Methoden

Massenspektrometrische Analyse der PF2D-Fractionen

Um herauszufinden, welche Proteine in den verschiedenen ELISpot-reaktiven Fraktionen enthalten sind, wurde eine massenspektrometrische Analyse durchgeführt. Die Probenvorbereitung, die Massenspektrometrie sowie die erste bioinformatische Auswertungen wurden von Frau Dr. Martina Schnölzer und ihrem Team in der Proteomics-Core-Facility am DKFZ durchgeführt.

Die PF2D-Fractionen wurden gegebenenfalls mit Hilfe einer SpeedVac auf ein geeignetes Volumen eingengt und anschließend mit Trypsin verdaut. Die so vorbereiteten Proben wurden auf einem LTQ-Orbitrap-XL Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific, Dreieich)

analysiert. Die Auswertung der massenspektrometrischen Daten erfolgte mit Mascot 2.2.2 (Matrix Science, England).

DNA-Sequenzanalyse

Die Sequenzanalyse für die Bestimmung von Mutationen in p53, Kras und B-raf Genen wurde von Herrn Prof. Dr. Wilko Weichert und Herrn Dr. Roland Penzel am Pathologischen Institut der Universität Heidelberg durchgeführt.

Aus formalinfixiertem und paraffineingebettetem Tumorgewebe wurde eine Serie von Schnitten angefertigt. Die ersten Schnitte wurden mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt und pathologisch sichergestellt, dass es sich um Tumorgewebe handelt. Die darauf folgenden 7,5 µm Schnitte wurden für die DNA-Extraktion verwendet. Ein erfahrener Pathologe markierte auf dem HE-gefärbten Schnitt, wo sich der Tumor befindet und schätzte den Anteil an Tumorzellen. Die restlichen Schnitte wurden durch Xylol-Ethanol-Behandlung deparaffinisiert. Danach wurde durch einen Abgleich mit den HE-gefärbten Schnitten an tumorreichen Stellen Gewebe mit Hilfe einer Glaskapillare abgekratzt. Die DNA wurde unter Benutzung eines *Qiasymphony® DNA Mini Kits* isoliert und im Gerät platziert. Die Sequenzierung wurde vollautomatisch mit *QIASymphony® SP/AS* durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Der Zusammenhang von T-Zell-Antworten gegen Tumor-Lysat und Antworten gegen tumorassoziierte Antigene - Eine Phase-I-Studie

Beim Versuch das patienteneigene Immunsystem zu verstärken und vor allem gezielt gegen die Tumorzellen zu richten, stellt sich, unabhängig vom letztlich verwendeten System grundlegend die Frage, welche Zielstrukturen auf den Tumorzellen dafür geeignet sind.

In einer Phase-I-Studie, welche am Universitätsklinikum Heidelberg in Kooperation mit dem DKFZ durchgeführt wurde, sollte untersucht werden, ob autologe Tumorzellen als Antigen-Quelle effektiv eingesetzt werden können. Zur weiteren Stimulation des Immunsystems wurden bei dieser Impfung die Tumorzellen mit speziellen Viren infiziert und mit bi-spezifischen Antikörpern behandelt. Die genaue Beschreibung sowie die Erläuterung der Ergebnisse dieser Studie finden sich im Anhang. Das parallel zu der Impfung verlaufende Immun-Monitoring hatte das Ziel, die Veränderung der T-Zell-Reaktivitäten der einzelnen Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten zu bestimmen. Dafür wurde Blut entnommen und mittels ELISpot Analysen die T-Zell-Antworten gegenüber autologem Tumor-Lysat und ausgewählten Peptiden tumorassoziierter Antigene überprüft.

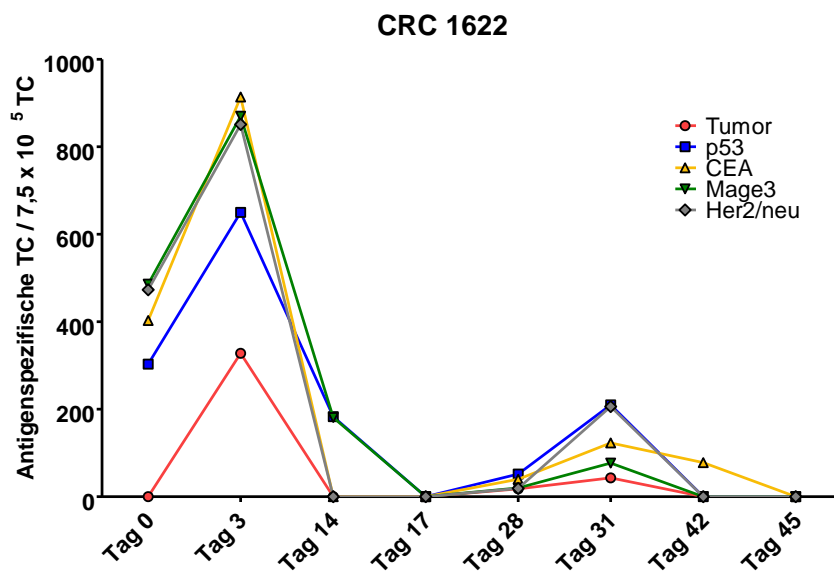


Abbildung 1

Der individuelle Verlauf der Frequenzen antigenspezifischer T-Zellen im peripheren Blut von Patient 1622. Jeder Punkt in der Grafik entspricht der Anzahl spezifischer T-Zellen gegen autologes Tumorlysate (rot) oder synthetische Antigene (farbig) je $7,5 \times 10^4$ T-Zellen.

Ein zentrales Ergebnis dieser Studie war, dass sich durch diese Impfstrategie bei allen getesteten Patienten eine T-Zell-Reaktivität gegen Tumor-Lysat induzieren lässt, welche vor Beginn der Impfung nicht nachzuweisen war (siehe Anhang; Abb. 26). Autologe Tumorzellen eignen sich somit sehr gut als Antigen-Quelle für die Stimulation von T-Zellen gegen den Tumor. Bei der Betrachtung der patientenindividuellen Verläufe der T-Zell-Antworten (beispielhaft ist in Abbildung 1 der Verlauf bei Patient 1622 gezeigt), zeigt sich, dass die T-Zell-Antworten gegenüber Tumor-Lysat (rot) und TAA-Peptiden (bunt) weitestgehend synchron verlaufen: ein Anstieg der Reaktivität gegenüber den Peptiden tumorassoziierter Antigene führt auch zu einem Anstieg der Reaktivität gegenüber des autologen Tumor-Lysats (Abb. 1). Diese Beobachtung ließ sich nicht nur bei Patient 1622 machen: über alle Patienten hinweg zeigt sich eine hochsignifikante Korrelation der T-Zell-Antworten zwischen Tumor-Lysat und TAA-Peptiden (siehe Anhang, Abb. 27).

Diese Tatsache zeigt, dass tumorassozierte Antigene eine hohe Relevanz bei der T-Zell-Reaktion gegen Tumore besitzen, da die Anzahl reaktiver, spezifischer T-Zellen gegen TAA-Peptide durchweg höher ist als gegen Tumor-Lysat (Abb. 1; auch Anhang, Abb. 26). Dennoch stellt sich bei dieser Studie noch immer die Frage, welches die besten Zielantigene für eine optimale T-Zell-Reaktion sind und welche Proteinanteile im Tumor-Lysat denn nun die Reaktivität der T-Zellen ausgelöst haben.

4.2 Die systematische Analyse der Zielstrukturen spontaner T-Zell-Antworten bei Patienten mit kolorektalem Karzinom

Um systematisch und unbefangen zu untersuchen, welche Antigene bei einem Patienten mit kolorektalem Karzinom wirklich bei der Erkennung des Tumors eine Rolle spielen, entwickelten wir eine Proteom-basierte Methode (PF2D-Methodik; vgl. Schema Abb. 2). Bei dieser Methode wird Tumorgewebe des Patienten lysiert und die Proteine im Lysat zuerst in einer ersten Dimension nach ihrem pH-Wert in verschiedene Fraktionen aufgetrennt. Später können dieselben Fraktionen über eine HPLC-Säule nach ihrer Größe in weitere Sub-Fraktionen unterteilt werden. T-Zellen, die aus dem Blut der Patienten isoliert wurden, wurden dann jeweils auf ihre Reaktivität gegenüber den einzelnen Fraktionen in ELISpot-

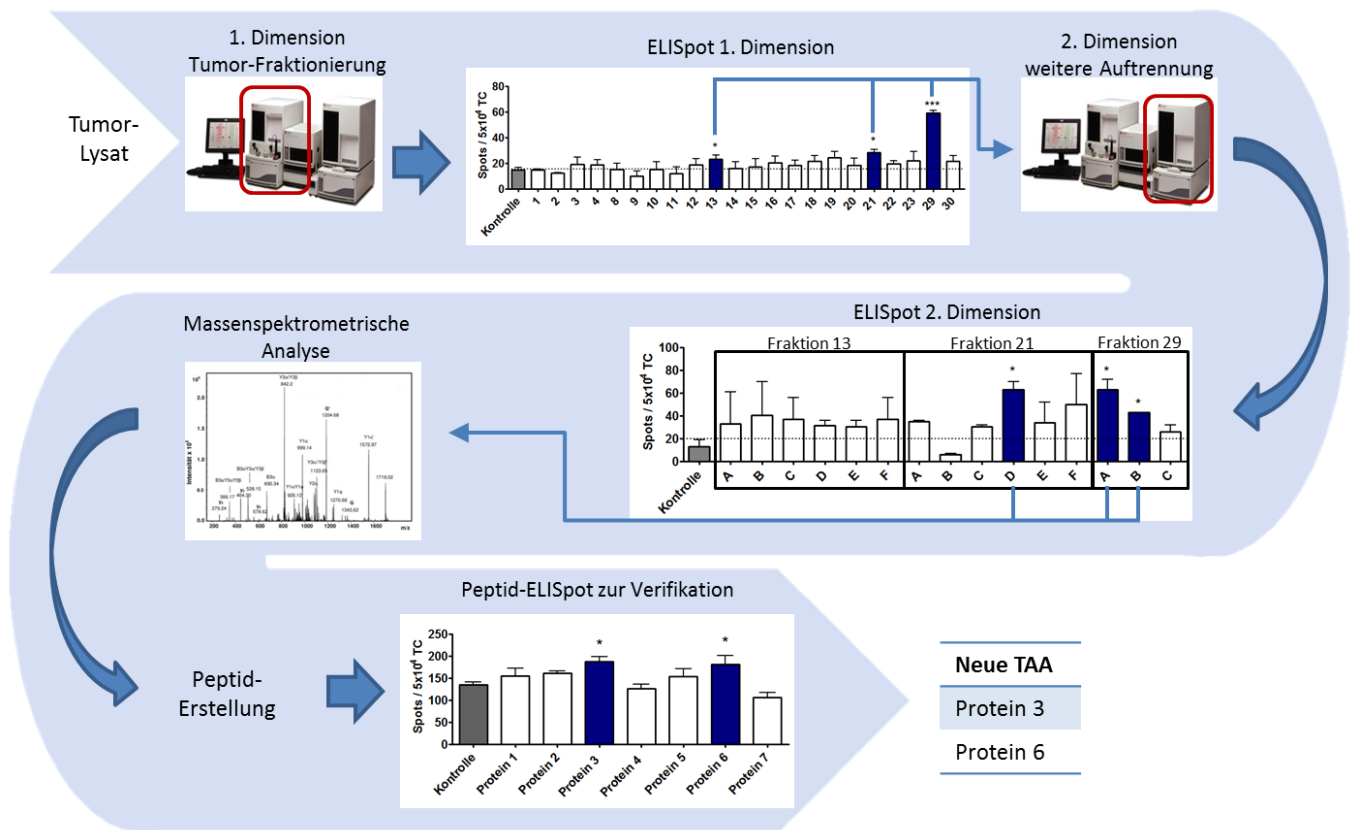


Abbildung 2

Schematische Darstellung der PF2D-Methodik für die Identifizierung neuer tumor-assoziierten Antigene. Das Tumor-Lysat von CRC-Patienten wurde in einem ersten Schritt über den pH-Wert in mehrere Proteinfractionen aufgetrennt. Autologe T-Zellen wurden anschließend in einer ELISpot-Analyse verwendet, um die Reaktivität gegenüber diesen Fractionen zu testen. Fractionen, die zu einer signifikanten T-Zell-Reaktion führten, wurden anschließend in einer 2. Dimension über HPLC-Säulen in weitere Sub-Fractionen unterteilt. Nach einem erneuten ELISpot-Test wurden die positiven Sub-Fractionen massenspektrometrisch auf die darin enthaltenen Proteine analysiert. Für diese Proteine wurden dann mit Hilfe der Epitop-Vorhersage der Datenbank Syfpeithi geeignete Peptide designt und durch eine weitere Überprüfung mit autologen T-Zellen des Patienten im ELISpot als neue tumorassoziierte Antigene verifiziert.

Analysen getestet. Nur Fractionen der ersten Dimension, die eine signifikante T-Zell-Antwort im ELISpot ausgelöst hatten, wurden für die Auftrennung in der zweiten Dimension verwendet. Lieferten die resultierenden Sub-Fractionen in der folgenden ELISpot Analyse signifikante Ergebnisse, wurden sie massenspektrometrisch auf die enthaltenen Proteine hin untersucht. Um zu zeigen, welche der gefundenen Proteine für die eigentliche T-Zell-

Antwort verantwortlich war, wurden geeignete Peptide hergestellt und in einem finalen ELISpot-Test als T-Zell-Antigene verifiziert (Abb.2).

4.2.1 Antigen-Analyse von Patient 2241

Tumorgewebe des primären kolorektalen Karzinoms von Patient 2241 wurde anhand der PF2D-Methodik (Abb.2) aufgetrennt. Die ELISpot-Ergebnisse der ersten Fraktion zeigen, dass zwei Fraktionen, 10 und 14, eine signifikante T-Zell-Antwort auslösen konnten (Abb. 3A).

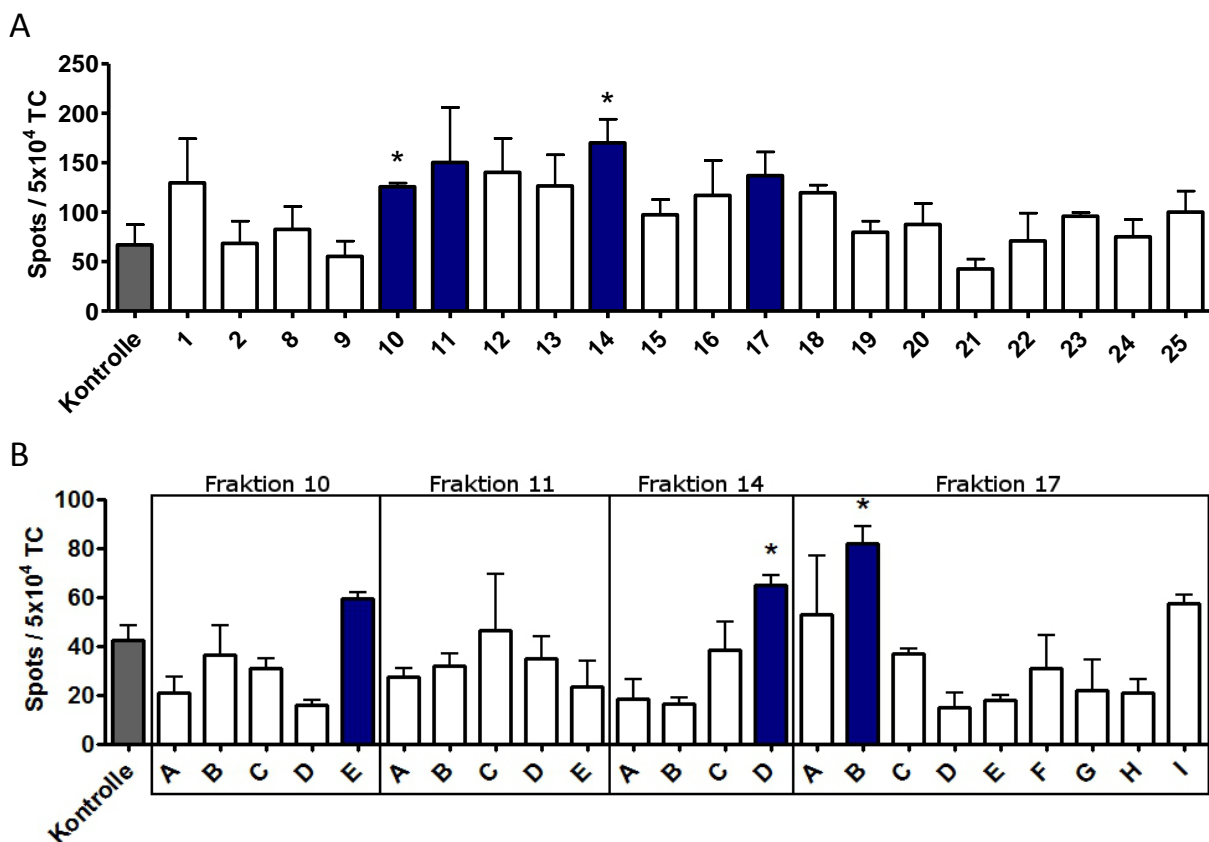


Abbildung 3

T-Zell-Antworten gegen Tumorlysat-Fraktionen der 1. Dimension (A) und der 2. Dimension (B) von Patient 2241. Nach der jeweiligen Auftrennung der Proteine (nach pH-Wert in der 1. Dimension; nach Größe in der 2. Dimension) bei der PF2D-Analyse wurden autologe Dendritische Zellen mit den resultierenden Fraktionen versetzt und mit patienteneigenen T-Zellen kultiviert. Die Anzahl reaktiver T-Zellen (Spots) pro 5×10^4 T-Zellen wurde durch ELISpot Analysen gemessen. (Sub-)Fraktionen mit blau markierten Säulen wurden jeweils für den nachfolgenden Schritt weiterverwendet.

* $P < 0,05$ (zweiseitiger Student-t Test)

Da dies die erste Probe war, die wir untersuchten, verwendeten wir auch die Fraktionen 11 und 17 weiter, da diese ebenfalls deutlich erhöhte T-Zell-Antworten induzierten (Abb. 3A). Die weitere Auftrennung der vier Fraktionen 10, 11, 14 und 17 nach Proteingröße und der anschließende ELISpot-Test mit den gewonnenen Sub-Fraktionen ergibt ein interessantes Bild (Abb. 3B). Es finden sich zwei signifikant erhöhte Sub-Fraktionen: 14D und 17B. In der ersten Dimension war jedoch nur Fraktion 14 in der Lage gewesen, eine signifikante T-Zell-Reaktion auszulösen. Fraktion 17 war zwar erhöht, jedoch nicht signifikant. Scheinbar hat die weitere Auftrennung der Proteine nach Größe zu einer Erhöhung der Konzentration einzelner Proteine in den Sub-Fraktionen geführt. So konnte eine vorher maskierte T-Zell-Reaktivität nun zu einer signifikanten Antwort führen.

Ein gegensätzliches Bild zeigen die Sub-Fraktionen von Fraktion 10, welche in der 1. Dimension eine signifikante Antwort ausgelöst hatte. Die Sub-Fraktionen sind jedoch nicht in der Lage, signifikante T-Zell-Reaktionen auszulösen.

Um nun herauszufinden, welche Proteine für die T-Zell-Reaktivitäten bei Patient 2241 verantwortlich waren und damit als Zielstrukturen der spontanen T-Zell-Antwort in Frage kommen, wurden die blau markierten Sub-Fraktionen 14D, 17B und 10E massenspektrometrisch analysiert. Dazu wurden die Fraktionen über eine Vakuumzentrifuge konzentriert und getrocknet und anschließend mit Trypsin verdaut, um Protein-Bruchstücke zu gewinnen. Mit Hilfe eines Massenspektrometers lassen sich nun die Aminosäure-Sequenzen der Peptide bestimmen. Über einen Abgleich mit Datenbanken erhält man somit die Identität des Proteins.

Die Anzahl der „Treffer“ weist darauf hin, wie häufig ein Peptid des Proteins detektiert wurde. Die Punkte sagen aus, wie hoch die Übereinstimmung mit dem genannten Protein ist. Bei zwei oder mehr Treffern und einem Punktwert über 60 gilt das Protein als sicher nachgewiesen.

Insgesamt konnten 14 Proteine aus den drei Subfraktionen massenspektrometrisch nachgewiesen werden (Tabelle 1). Sechs Proteine wurden aus der Probe von Subfraktion 17B und acht Proteine aus der Subfraktion 10E identifiziert. Aus Subfraktion 14D erreichte kein Protein die definierten Werte, um als sicher nachgewiesen zu gelten. Dies kann auf die unterschiedliche Qualität der Proben zurückgeführt werden. Subfraktion 17B hatte augenscheinlich eine sehr gute Qualität, da fast alle Proteine dieser Subfraktion sehr hohe

Punktwerte erreichen (Tabelle 1). Interessanterweise lassen sich auf den ersten Blick keine bekannten, klassischen T-Zell-Antigene erkennen.

Massenspektrometrisch detektierte Proteine	Fraktion	Punkte	Masse (Da)	Treffer
Caspase 14	17B	439	27947	10
Protein S100-A7 (Psoriasis)	17B	376	11564	7
Leucine-rich repeat-containing protein 15	17B	334	65893	9
Zink-alpha-2-Glykoprotein	17B	218	34942	5
Protein S100-A9	17B	169	13291	2
60 kDa heat shock protein, mitochondrial	10E	150	61157	5
Protein S100-A11	10E	141	11847	2
Annexin A2	10E	127	38808	2
Plakoglobin	10E	112	38808	3
Eukaryotic initiation factor 4A-II	10E	104	46593	2
Elongation factor 1-alpha 1	10E	99	50437	4
Protein S100-A8	17B	92	10988	2
WD40 repeat-containing protein SMU1	10E	73	58118	2
Elongation factor 1-gamma	10E	68	41589	3

Tabelle 1

Massenspektrometrisch nachgewiesenen Proteine von Patient 2241. Die Proteine sind nach absteigendem Punktwert geordnet. Es sind nur sicher nachgewiesene Proteine dargestellt. Als sicher nachgewiesen gilt ein Protein, wenn mindestens 2 Peptide detektiert wurden (Treffer) und die Übereinstimmung mit dem Protein hoch ist (Gesamtzahl der Punkte > 60).

Um sicher nachzuweisen, dass eines dieser Proteine ein echtes T-Zell-Ziel ist, wurden für jedes Protein, das in der Massenspektrometrie nachgewiesen wurde, Peptide erstellt. Diese Peptide wurden so gewählt, dass sie verschiedene Epitope beinhalteten, die auf den am häufigsten vorkommenden Typen von MHC-Klasse-I und MHC-Klasse-II präsentiert werden können. In ELISpot-Analysen wurden diese Peptide zusammen mit Dendritischen Zellen und T-Zellen des Patienten eingesetzt, aus dessen Gewebe das nachgewiesene Protein isoliert

wurde. So ist sichergestellt, dass dieses Protein eine tatsächliches Ziel in der Immunantwort gegen den Tumor dieses Patienten ist: ein neues tumorassoziertes Antigen.

Für Patient 2241 konnten sechs Peptidmixturen identifiziert werden, die in der Lage sind eine signifikante T-Zell-Antwort auszulösen. Jeweils drei stammen aus den zwei verbliebenen Fraktionen 10E und 17B.

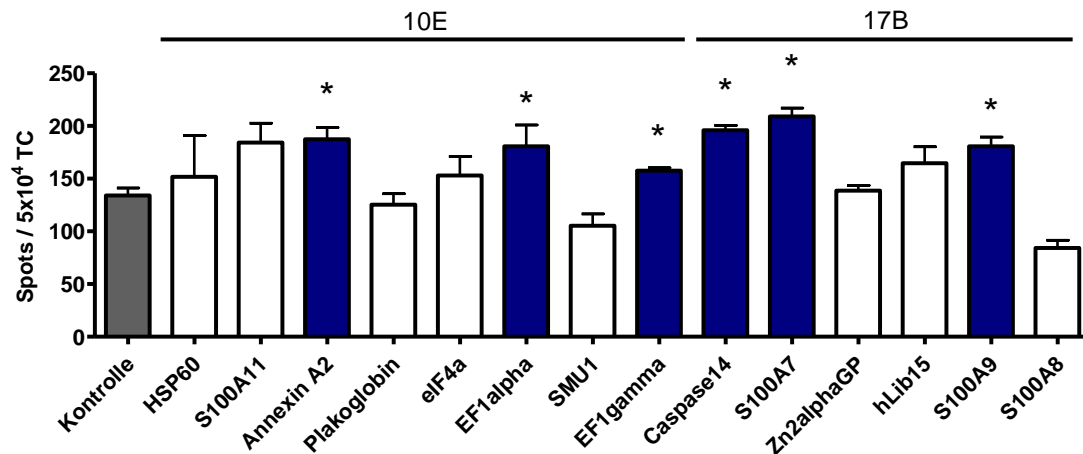


Abbildung 4

T-Zell-Antworten gegen Peptide der massenspektrometrisch nachgewiesenen Proteine von Patient 2241. Synthetische Peptide der nachgewiesenen Proteine wurden in ELISpot-Analysen mit Zellen von Patient 2241 eingesetzt. Die Anzahl reaktiver T-Zellen (*Spots*) pro 5x10⁴ T-Zellen wurde gemessen. Blaue Säulen markieren neu identifizierte Tumorassozierte Antigene.

* P < 0,05 (zweiseitiger Student-t Test)

Neue tumorassozierte Antigene
Annexin A2
Elongationsfaktor 1 alpha
Elongationsfaktor 1 gamma
Caspase 14
Protein S100-A7 (Psoriasis)
Protein S100-A9

Tabelle 2

Neu identifizierte tumorassozierte Antigene (TAA) von Patient 2241.

Diese verifizierten Proteine definieren wir somit als neue tumorassoziierte Antigene (TAA) (Tabelle 2). Bei diesem Patienten scheinen diese Proteine das Hauptziel der T-Zell-Antwort gegen den Tumor zu sein.

4.2.2 Antigen-Analyse von Patient 2295

Bei Patient 2295 wurde, ebenso wie bei Patient 2241, Tumorgewebe des primären kolorektalen Karzinoms für die Analyse verwendet.

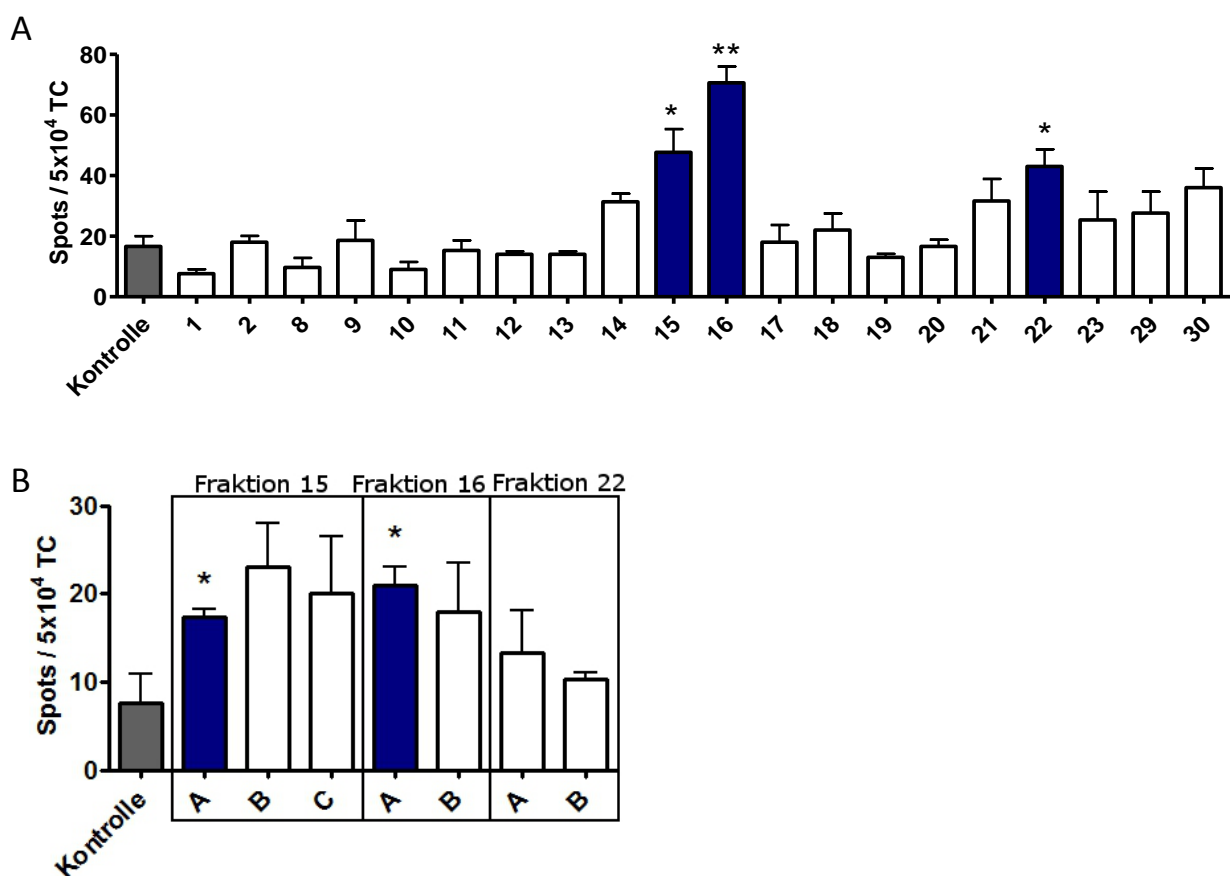


Abbildung 5

T-Zell-Antworten gegen Tumorlysat-Fractionen der 1. Dimension (A) und der 2. Dimension (B) von Patient 2295. Nach der jeweiligen Auftrennung der Proteine (nach pH-Wert in der 1. Dimension; nach Größe in der 2. Dimension) bei der PF2D-Analyse wurden autologe Dendritische Zellen mit den resultierenden (Sub-)Fraktionen versetzt und mit patienteneigenen T-Zellen kultiviert. Die Anzahl reaktiver T-Zellen (*Spots*) pro 5x10⁴ T-Zellen wurde durch ELISpot Analysen gemessen. (Sub-)Fraktionen mit blau markierten Säulen wurden jeweils für den nachfolgenden Schritt weiterverwendet.

** P < 0,005; * P < 0,05 (zweiseitiger Student-t Test)

Nach der Auftrennung in der 1. Dimension (vgl. Schema Abb. 1) zeigten drei Fraktionen eine deutliche Fähigkeit zur Stimulation autologer T-Zellen im ELISpot: Fraktion 15, 16 und 22 (Abb. 5A).

Auch wenn sich die Auftrennung der Proteine nach ihrem pH-Wert zwischen einzelnen Patienten nicht direkt vergleichen lässt, lässt sich dennoch bereits hier darauf schließen, dass die T-Zell-Antworten beider Patienten von unterschiedlichen Proteinen stammen müssen (vgl. Abb. 3A und Abb. 5A). Fraktion 10 bei Patient 2241 wurde mit einer Unsicherheit von etwa pH 0,2 um den pH-Bereich 7,9 eluiert (Abb. 3A). Fraktion 22 bei Patient 2295 im Bereich von pH 4,3 (Abb. 5A). In den vergleichbaren pH-Bereichen des jeweils anderen Patienten gab es jedoch keine erkennbare T-Zell-Stimulation, was den Schluss zulässt, dass bei den beiden Patienten verschiedene Proteine für die T-Zell-Antwort gegen den Tumor von Bedeutung sind.

Nach der weiteren Auftrennung der drei Fraktionen, zeigen zwei Sub-Fraktionen, 15A und 16A das Potential sehr deutliche T-Zell-Antworten auslösen zu können. Bedingt durch einen technischen Mangel wurden die Fraktionen nicht stark aufgetrennt, was die Aussagekraft des Experiments jedoch in keiner Weise beeinflusst.

Massenspektrometrisch detektierte Proteine	Fraktion	Punkte	Masse (Da)	Treffer
Superoxid Dismutase (CuZnSod)	16A	488	16122	22
ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	15A	244	59828	4
alpha-Fibrinogen	15A	220	70223	4
LIM-protein FHL3	15A	198	33208	5
Tubulin alpha-1A chain	15A	190	50810	3
Selenium-binding protein 1	15A	186	52907	4
Glycerinaldehyd-3-phosphat dehydrogenase	15A	185	36202	6
Elongation factor Tu	15A	175	37775	4
Hämoglobin alpha	15A	163	19204	3
Creatine kinase-B	15A	157	42745	4
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	15A	156	34245	4
28S ribosomal protein S23, mitochondrial	15A	155	21814	3
C19orf21 (nicht-charakterisiertes Protein)	15A	152	75482	3

BUB3 isoform a	15A	140	37587	3
Keratinocyte prolin-rich protein	16A	136	67172	6
Proteasome subunit beta type-5	15A	134	23053	3
Filagrin-2	16A	98	249296	2
Nuclear corepressor KAP-1	15A	94	90247	2
Cathepsin B	15A	91	23633	2
Protein SCO2 homolog	15A	90	29903	2
Ig gamma-4 chain C region	15A	88	36431	2
Fibronectin	15A	88	260064	2
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 6	15A	85	45787	2
Stathmin isoform a	15A	75	17292	2
Fatty acid-binding protein	16A	73	15497	2
Aminoacylase-1	15A	72	46084	2
beta-2 microglobulin	15A	66	12905	3
RNA helicase A	15A	60	143405	2

Tabelle 3

Massenspektrometrisch nachgewiesenen Proteine von Patient 2295. Die Proteine sind nach absteigendem Punktwert geordnet. Es sind nur sicher nachgewiesene Proteine dargestellt. Als sicher nachgewiesen gilt ein Protein, wenn mindestens 2 Peptide detektiert wurden (Treffer) und die Übereinstimmung mit dem Protein hoch ist (Gesamtzahl der Punkte > 60).

Bei der massenspektrometrischen Analyse der beiden Sub-Fractionen, konnten insgesamt 28 Proteine nachgewiesen werden, wobei 24 Proteine aus Fraktion 15A stammen (Tabelle 3). Erneut konnten keine klassischen tumorassoziierten Antigene, wie p53, MUC oder EGFR massenspektrometrisch nachgewiesen werden.

Nach dem Design geeigneter Peptide für alle 28 Proteine wurde erneut eine ELISpot-Analyse zur Verifikation durchgeführt. Sieben Peptid-Mixturen konnten signifikante T-Zell-Reaktionen induzieren (Abb. 6). Dabei stammten alle sieben von Subfraktion 15A. Die vier Peptidmixturen der nachgewiesenen Proteine aus Subfraktion 16A führten dagegen nicht zu einer signifikant erhöhten T-Zell-Antwort.

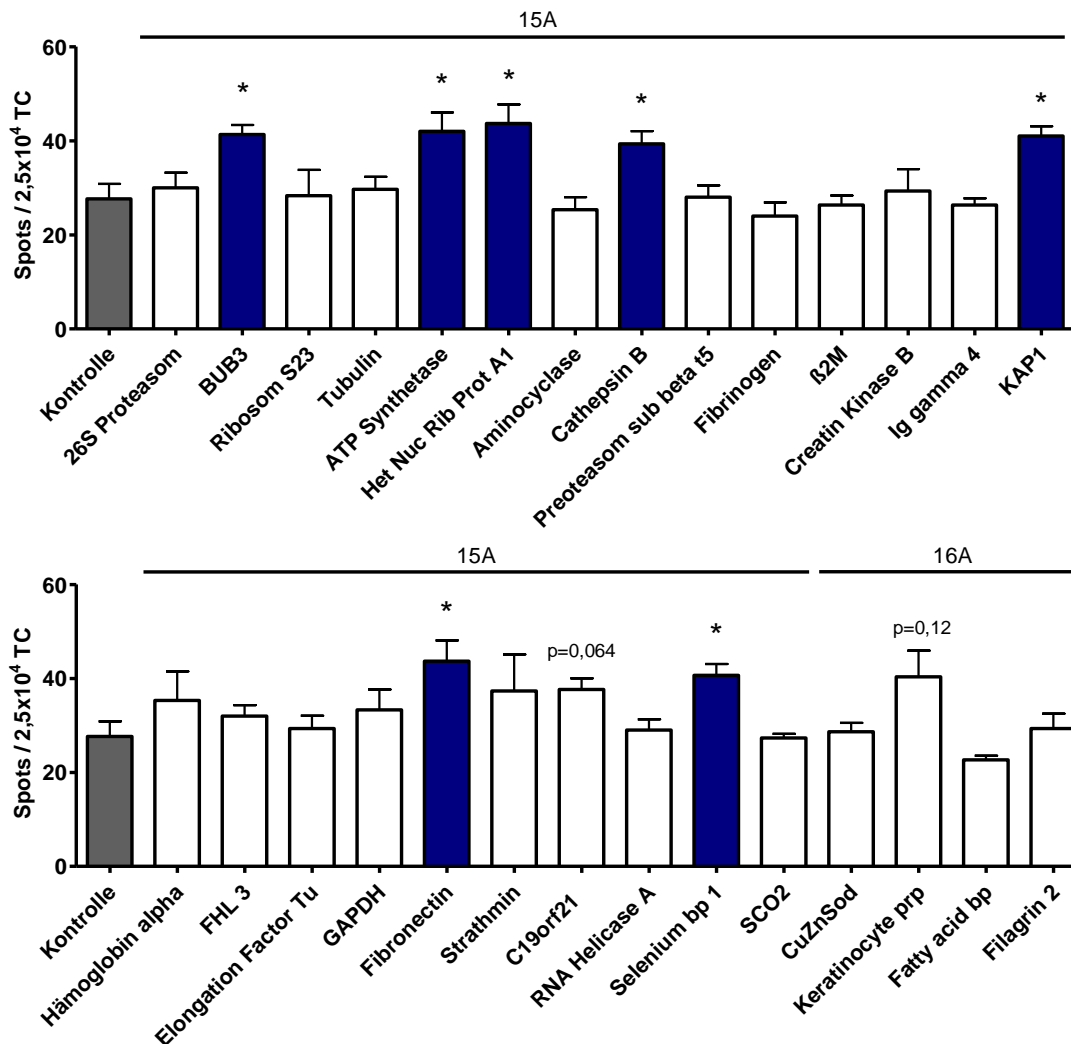


Abbildung 6

T-Zell-Antworten gegen Peptide der massenspektrometrisch nachgewiesenen Proteine von Patient 2295. Synthetische Peptide der nachgewiesenen Proteine wurden in ELISpot-Analysen mit Zellen von Patient 2295 eingesetzt. Die Anzahl reaktiver T-Zellen (*Spots*) pro 5×10^4 T-Zellen wurde gemessen. Blaue Säulen markieren neu identifizierte Tumorassoziierte Antigene.

* $P < 0,05$ (zweiseitiger Student-t Test)

Die neu definierten tumorassoziierten Antigene (TAA) von Patient 2295 sind in Tabelle 4 dargestellt. Eine genauere Betrachtung aller neuen TAA erfolgt in Abschnitt 3.2.4.

Neue tumorassoziierte Antigene
BUB 3
ATP Synthase
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1
Cathepsin B
Nuclear corepressor KAP1
Fibronectin
Selenium binding protein 1

Tabelle 4

Neu identifizierte tumorassoziierte Antigene (TAA) von Patient 2295.

4.2.3 Differentielle T-Zell-Reaktivität gegen Primärtumor und Metastase

Eine der spannendsten Fragen der T-Zell-Immunologie bei Krebserkrankungen ist, ob es bei der Erkennung der Tumorzellen durch T-Zellen Unterschiede zwischen Zellen des Primärtumors und der Metastase gibt. Kolorektale Tumore bilden in späten Stadien häufig Lebermetastasen (Swinton et al. 1968). Diese Zellen der Metastase unterscheiden sich von den Zellen des Primärtumors teilweise deutlich in ihrer Proteinexpression (Gallick et al. 1985; Hernandez et al. 2000). Das liegt unter anderem an der dafür nötigen transienten Umwandlung der Zellen in einen mesenchymalen Phänotyp, der die Metastasierung überhaupt erst ermöglicht (Koten und Den Otter 1991). Eine mögliche T-Zell-Therapie gegen Tumore, könnte den Vorteil haben, dass auch kleinste Mikrometastasen aufgespürt und zerstört werden. Dazu ist es aber von äußerster Wichtigkeit zu wissen, ob die Erkennung der Metastasen über die gleichen Antigene möglich ist, wie beim Primärtumor.

Für diese Analyse haben wir Gewebe des kolorektalen Primärtumors und der Leber-Metastase von einem einzelnen Patienten (Patient 2215) erneut mit Hilfe der PF2D-Methode in mehrere Protein-Fractionen unterteilt und die Analysen analog zu den vorherigen beiden Patienten durchgeführt. Ein besonderes Augenmerk galt dabei jeweils der Unterschiedlichkeit von Primärtumor (PTu) und Lebermetastase (Met).

Die ELISpot-Analyse nach der Auftrennung nach pH-Wert in der 1. Dimension (Abb. 7) zeigt, dass eine Fraktion aus der Lebermetastase (Abb. 7A) und zwei Fraktionen aus dem

Primärtumor (Abb. 7B) signifikante Antworten auslösen. Da im pH-Bereich von Fraktion 8 nur bei der Fraktion des Primärtumors eine Reaktivität zu beobachten ist, deutet alles darauf hin, dass ein Antigen aus diesem Bereich nur beim Primärtumor und nicht bei der Metastase eine Rolle spielt.

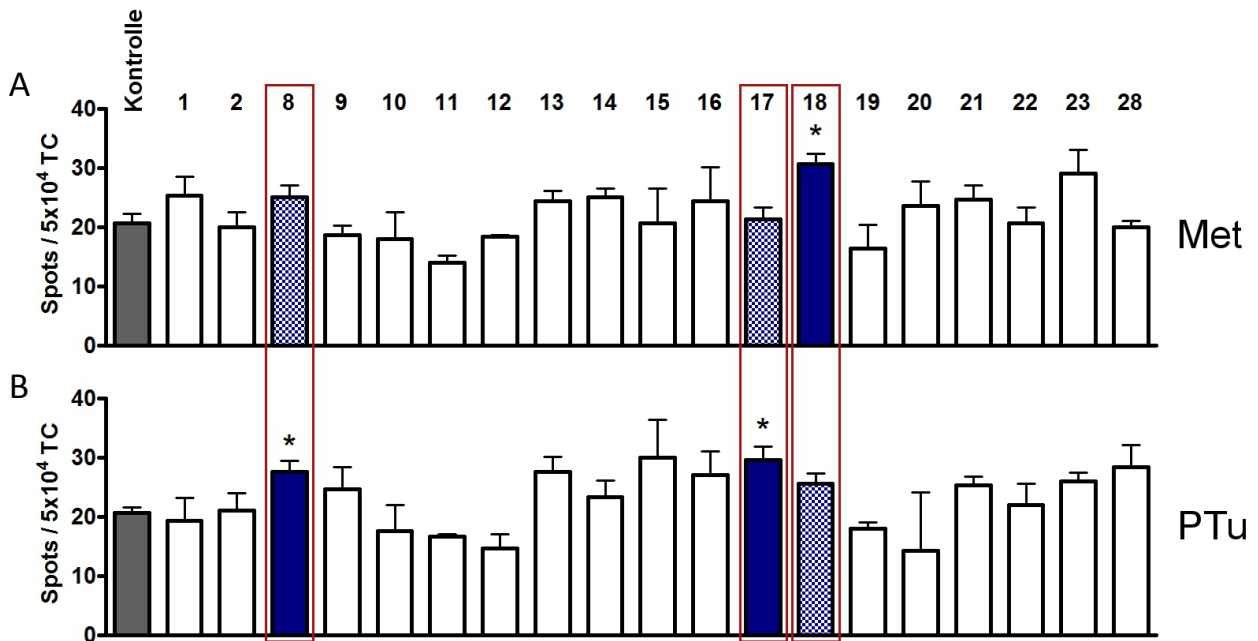


Abbildung 7

T-Zell-Antworten gegen Fraktionen der 1. Dimension aus Lebermetastasen-Lysat (Met) (A) oder Primärtumor-Lysat (PTu) (B) von Patient 2215. Die Proteine der Lysate wurden nach ihrem pH-Wert aufgetrennt und mit autologen Dendritischen Zellen inkubiert. Nach der Co-Kultur mit T-Zellen für 48 Stunden wurde die Anzahl reaktiver T-Zellen (*Spots*) pro 5×10^4 T-Zellen durch ELISpot gemessen. Fraktionen mit blau markierten Säulen wurden für die 2. Dimension weiterverwendet. Karierte Säulen kennzeichnen die korrespondierenden Fraktionen der jeweils anderen Entität, die ebenfalls für die 2. Dimension weiterverwendet wurden.

* $P < 0,05$ (zweiseitiger Student-t Test)

Für die weitere Analyse wurden außer den drei positiven Fraktionen auch die jeweils korrespondierenden Fraktionen verwendet. In diesen Fraktionen (z.B. Fraktion 8 der Metastase) sollten sich, durch die Auftrennung nach pH-Wert, teilweise die gleichen Proteine befinden wie in der korrespondierenden reaktiven Fraktion (z.B. Fraktion 8 des Primärtumors). Da diese aber im einen Fall nicht zu einer signifikanten T-Zell-Antwort geführt haben, können sie als negative Vergleichsgruppe dienen, um die relevanten TAA zu

finden. Nur Proteine, die in einer reaktiven Fraktion vorkommen, nicht aber in der nicht-reaktiven, werden als potentielle Kandidaten weiterverfolgt.

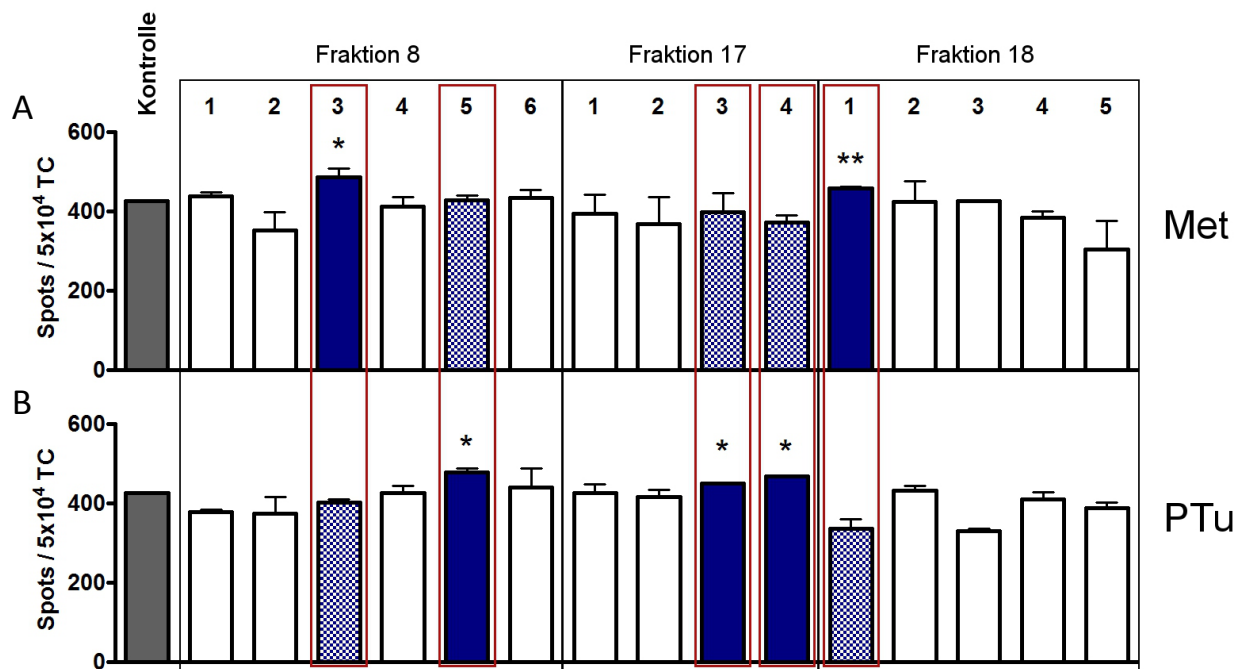


Abbildung 8

T-Zell-Antworten gegen Sub-Fractionen der 2. Dimension der Metastase (A) oder des Primärtumors (B) von Patient 2215. Ausgewählte Fraktionen der 1. Dimension wurden anhand ihrer Größe über HPLC-Säulen in der 2. Dimension aufgetrennt. ELISpot-Analysen wurden erneut mit autologen Dendritischen Zellen und T-Zellen durchgeführt. Die Anzahl reaktiver T-Zellen (*Spots*) pro 5×10^4 T-Zellen wurde gemessen. Blau markierte Säulen markieren die Sub-Fractionen, die für die massenspektrometrische Analyse weiterverwendet wurden. Karierte Säulen kennzeichnen die korrespondierenden Fraktionen der jeweils anderen Entität. Auch diese wurden massenspektrometrisch analysiert.

** $P < 0,005$; * $P < 0,05$ (zweiseitiger Student-t Test)

Nach der weiteren Auftrennung der Fraktionen über HPLC-Säulen wurden mit den resultierenden Sub-Fractionen erneut ELISpot-Tests durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die zuvor reaktiven Fraktionen (Abbildung 7) auch nach der weiteren Auftrennung reaktiver Sub-Fractionen beinhalten (Abbildung 8). Fraktion 18, die einzige reaktive Fraktion des Lebermetastasen-Lysats in der 1. Dimension, zeigt auch nach der 2. Dimension eine reaktive Sub-Fraktion: 18-1 (Abb. 8A). Auch beim Primärtumor sind die reaktiven Fraktionen der 1. Dimension, die Fraktionen 8 und 17 (Abb. 7B) durch reaktive Sub-Fractionen der 2.

Dimension repräsentiert (Abb. 8B). Die Auftrennung führte bei Fraktion 17 zur Bildung von zwei reaktiven Sub-Fractionen: 17-3 und 17-4. Bei Fraktion 8 stimuliert Sub-Fraction 8-5 die autologen T-Zellen signifikant. Die Sub-Fraction 8-3 aus der Lebermetastase führte ebenfalls zu einer signifikanten T-Zell-Reaktion (Abb. 8A), obgleich Fraktion 8 der Lebermetastase nach der 1. Dimension nicht zu einer signifikanten Antwort geführt hatte (Abb. 7A).

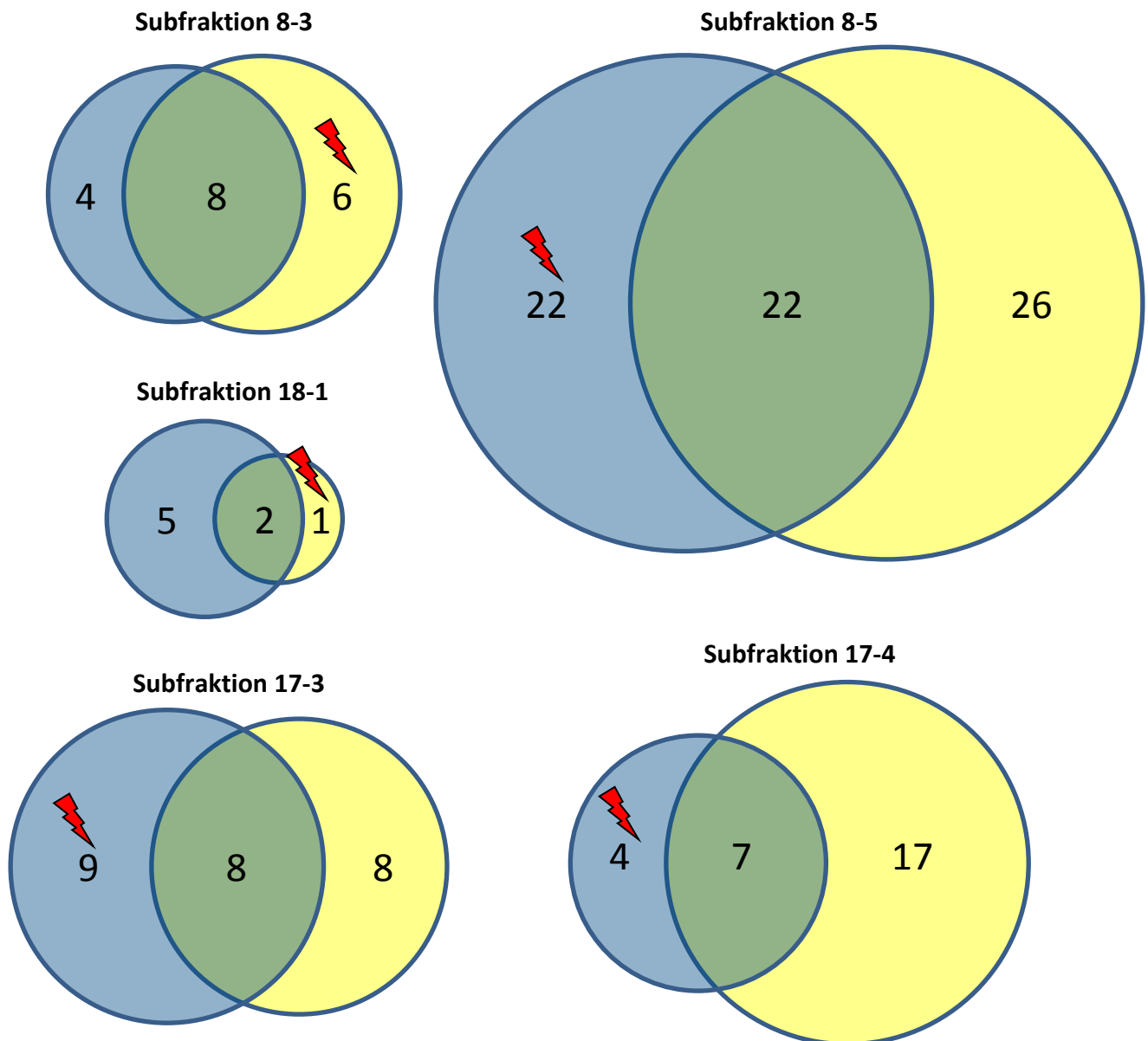


Abbildung 9

Vergleich der einzelnen Subfraktionen von Patient 2215. Anzahl massenspektrometrisch identifizierter Proteine aus Tumor (blaue Kreise) und Metastase (gelbe Kreise). Die Größe der Kreise korreliert mit der Anzahl der Proteine. Die Überlappung (grüne Überschneidung) zeigt an, wie viele Proteine in beiden Lysaten gefunden werden konnten. Der rote Blitz gibt an, welche Subfraktion im ELISpot signifikant reaktiv war.

Die Beobachtung, dass reaktive Subfraktionen aus zuvor nicht reaktiven Fraktionen hervorgehen, konnte auch schon bei Patient 2241 gemacht werden (Abb. 3A und B). Wie dort beschrieben, lässt sich dies durch eine höhere Konzentration einzelner Proteine im Zuge der Auftrennung erklären.

Auch nach der 2. Dimension ist keine direkte Überlappung der reaktiven Fraktionen zu sehen, was weiterhin für die differentielle Erkennung von Primärtumor und Metastase spricht.

Wie bereits nach der 1. Dimension wurden auch die korrespondierenden Sub-Fraktionen in den nachfolgenden Analyseschritt übernommen, um einen Negativ-Abgleich vornehmen zu können. Somit wurden insgesamt 10 Sub-Fraktionen – 8-3, 8-5, 17-3, 17-4 und 18-1 jeweils von Primärtumor und Lebermetastase – für die massenspektrometrische Analyse verwendet. Insgesamt konnten deutlich über 100 Proteine aus den verschiedenen Fraktionen sicher nachgewiesen werden. Da diese Anzahl an Kandidaten-Proteinen jedoch die Möglichkeiten des ELISpot-Tests mit Zellen eines einzelnen Patienten weit übersteigt, wurde der zuvor angesprochene Negativ-Abgleich durchgeführt: nur Proteine, die in der reaktiven Sub-Fraktion nachgewiesen wurden, nicht jedoch in der korrespondierenden nicht-reaktiven Sub-Fraktion vorkamen, wurden als TAA-Kandidaten behandelt.

Ein Vergleich der einzelnen Subfraktionen ist in Abbildung 9 zu sehen. Dabei sind die Subfraktionen als Kreise dargestellt, wobei die Größe der Kreise mit der Anzahl der massenspektrometrisch identifizierten Proteine korreliert. Blaue Kreise stehen für Proteine, die aus dem Primärtumor isoliert wurden und gelbe Kreise für Proteine aus der Lebermetastase. Die Überlappung der Kreise deutet an, wie viele der Proteine der jeweiligen Sub-Fraktion in beiden Lysaten gefunden wurden. Dabei zeigt sich über alle Sub-Fraktionen insgesamt etwa ein Verhältnis von jeweils einem Drittel. So wurden beispielsweise bei Sub-Fraktion 17-3 insgesamt 25 Proteine identifiziert (Abb. 9). Neun dieser 25 kamen ausschließlich im Tumorlysat vor, und weitere acht nur im Lysat der Lebermetastase. Acht Proteine konnten in beiden Lysaten nachgewiesen werden (Abb. 9). Die roten Blitze zeigen, welches die Subfraktionen waren, die signifikante Ergebnisse im ELISpot zeigten. Diese 42 Proteine wurden als potentielle neue tumorassoziierte Antigene weiterverwendet und sind in Tabelle 5 dargestellt.

Massenspektrometrisch detektierte Proteine	Fraktion	Punkte	Masse (Da)	Treffer
Apolipoprotein D	18-1	2095	59720	58
Transgelin	8-5	595	22653	16
Transgelin-2	8-5	481	22548	11
Heat shock cognate 71 kDa protein isoform 1	8-5	406	71082	10
Plakoglobin	17-4	405	82381	8
Protein S100-A9	8-3	357	13291	9
ERp57	17-3	348	54541	6
Sorcin isoform a	8-5	335	21947	8
Stomatin-like 2	8-5	330	38839	5
Transferrin	17-4	327	79310	6
Pyruvate kinase M2	8-5	264	58411	4
M4 protein	8-5	256	77897	5
Annexin A2	8-5	228	38808	5
Desmoplakin	8-5	220	157801	5
Fibronectin	17-3	192	260064	3
Serum Albumin	8-3	188	71246	6
tRNA methyltransferase 112 homolog	8-3	187	14304	2
Prolactin-inducible protein	17-3	186	16847	4
Thioredoxin peroxidase PMP20	8-5	176	22262	4
Keratinocyte proline-rich protein	17-4	168	67172	5
Zn-alpha2-glycoprotein	8-3	165	34942	3
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	17-3	150	36202	4
Histone H2A.2	8-3	142	13898	4
NADP-dependent isocitrate dehydrogenase	8-5	140	46944	2
Filaggrin-2	8-5	139	249296	2
ERp44	17-3	128	52282	3
Hemoglobin subunit alpha	17-3	115	13631	2
Major Vault Protein	8-5	113	100135	3
Ubiquitin	8-3	112	8446	2
Protein S100-A11	8-5	107	11847	2
Lipoma-preferred partner isoform a	17-3	105	67129	3
Aldehyde dehydrogenase X	8-5	100	56858	3

Caspase-14	17-3	99	27947	2
Homeobox prox 1	8-5	93	28165	3
Dsc1a	17-3	92	93668	3
Suprabasin isoform 1	8-5	91	60562	3
40S ribosomal protein S2	8-5	88	31590	2
GrpE-like protein cochaperone	17-4	79	24361	3
Protein ETHE1	8-5	76	28368	3
Anterior gradient protein 2 homolog	8-5	74	20024	2
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17 isof. 1	8-5	62	80906	2
GTP-specific succinyl-CoA synthetase beta subunit	8-5	60	44065	2

Tabelle 5

Ergebnis der massenspektrometrischen Analyse der Sub-Fraktionen von Patient 2215. Es sind nur Proteine dargestellt, die in reaktiven Sub-Fraktionen, jedoch nicht in den korrespondierenden nicht-reaktiven Sub-Fraktionen sicher nachgewiesen werden konnten. Als sicher nachgewiesen gilt ein Protein, wenn mindestens 2 Peptide detektiert wurden (Treffer) und die Übereinstimmung mit dem Protein hoch ist (Gesamtzahl der Punkte > 60).

Um von den Kandidaten zu verifizierten tumorassoziierten Antigenen zu gelangen, wurden erneut synthetische Peptide für jedes einzelne Kandidatenprotein erstellt. Durch die große Anzahl der Peptide und die begrenzte Menge an verfügbaren Zellen des Patienten wurden die ELISpot-Analysen nur mit der Hälfte der sonst üblichen Zellzahl durchgeführt, was jedoch keinen starken Einfluss auf die Ergebnisse haben sollte.

Insgesamt haben acht Peptidmixturen eine signifikante T-Zell-Antwort ausgelöst (Abb. 10). Sieben davon stammen aus Sub-Fraktionen des Primärtumors 8-5, 17-3 und 17-4. Aus den beiden Sub-Fraktionen der Lebermetastase, 18-1 und 8-3 löste nur ein Peptidmix eine signifikante T-Zell-Reaktion aus: Zn-alpha2 GP. Dabei ist zu beachten, dass nur sieben Proteine exklusiv in reaktiven Fraktionen der Lebermetastase nachgewiesen und damit getestet werden konnten. Ein direkter, finaler Vergleich zwischen Antigenen des Primärtumors und der Metastase ist dadurch nur schwer möglich. Dennoch zeigen diese Ergebnisse, dass eine differentielle Erkennung von Primärtumor und Lebermetastase durch T-Zellen existiert. Durch die Analyse konnten acht solcher differentieller tumorassoziiertes Antigene neu identifiziert werden (Tabelle 6).

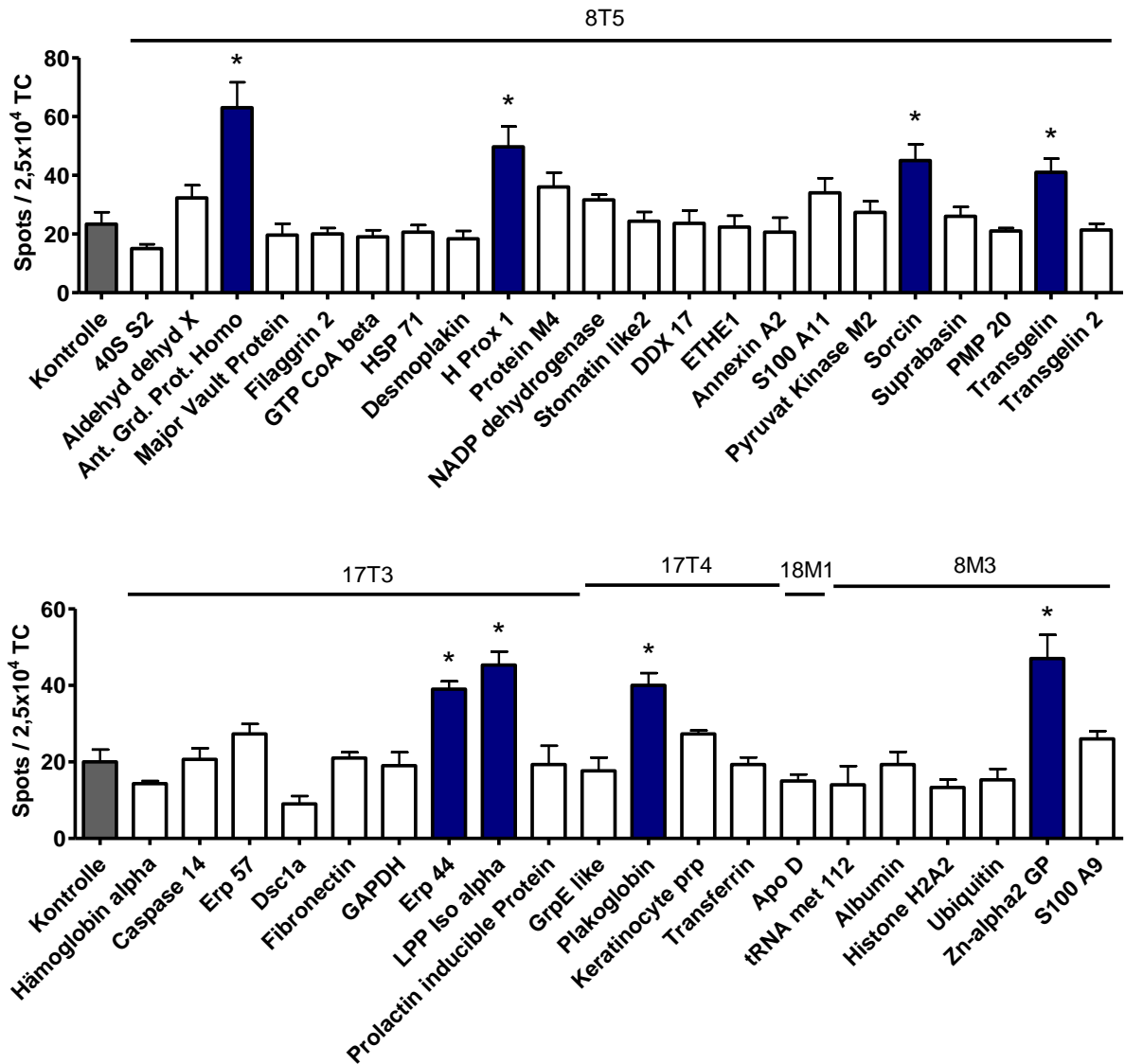


Abbildung 10

T-Zell-Antworten gegen Peptide der massenspektrometrisch nachgewiesenen Proteine von Patient 2215. Synthetische Peptide ausgewählter nachgewiesener Proteine wurden in ELISpot-Analysen mit Zellen von Patient 2215 eingesetzt. Die Anzahl reaktiver T-Zellen (*Spots*) pro $2,5 \times 10^4$ T-Zellen wurde gemessen. Blaue Säulen markieren neu identifizierte tumorassoziierte Antigene.

* $P < 0,05$ (zweiseitiger Student-t Test)

Neue tumorassoziierte Antigene
Anterior gradient 2 homolog
Homeobox Prox 1
Sorcin
Transgelin
Endoplasmic Reticulum protein 44
Lipoma-preferred-partner Isoform alpha
Plakoglobin
Zn-alpha2 Glykoprotein

Tabelle 6

Neu identifizierte tumorassoziierte Antigene (TAA) von Patient 2215.

4.2.4 Charakterisierung der neu identifizierten tumorassoziierten Antigene

Insgesamt konnten 21 Proteine als neue tumorassoziierte Antigene (TAA) durch die massenspektrometrische Analyse und den anschließenden Peptid-ELISpot verifiziert werden. Unter diesen neuen TAA befinden sich keine bekannten, klassischen TAA wie beispielsweise p53. Eine erste Analyse dieser 21 Proteine zeigt, dass sie auf den ersten Blick wenig gemein haben. Sie unterscheiden sich beispielsweise in ihrer subzellulären Lokalisation. Eine Übersicht darüber bietet Abbildung 11. Einige sind vorwiegend innerhalb des Nukleus lokalisiert, wie KAP1 und Homeobox Prox 1. Andere befinden sich im Zytoplasma oder sind mit der Plasmamembran verknüpft, wie Plakoglobin oder Annexin A2. Die 21 neuen TAA beinhalten auch Proteine, die sekretiert werden und vorrangig extrazellulär vorkommen, wie Fibronectin und Zn-alpha2-GP oder in der Membran von zellulären Organellen integriert sind, wie die ATP-Synthase. Eine immunhistologische Färbung von vier der 21 neuen TAA (Abb. 12) zeigt diese Unterschiedlichkeit sehr deutlich. Die Färbung von Homeobox Prox 1 (Abb. 12A) zeigt deutlich eine Expression in Nuklei der Tumorzellen, erkennbar durch grüne Punktierung in den blau gefärbten Zellkernen. In manchen Zellen ist das Protein in den Zellkernen darüber hinaus stark überexprimiert (rote Pfeile). Plakoglobin (Abb. 12B) ist scheinbar ausschließlich in den Tumorzellen und nicht im Stroma exprimiert. Die subzelluläre Lokalisation scheint sich besonders an der Plasmamembran der Zellgrenzen zu konzentrieren (roter Pfeil). Elongation Factor 1 γ (Abb. 12C) zeigt eine sehr starke Expression in den

Tumorzellen und eine abgeschwächte im Stroma-Anteil. S100-A9 wiederum scheint vor allem im Bereich der Stromazellen exprimiert zu werden (Abb. 12D).

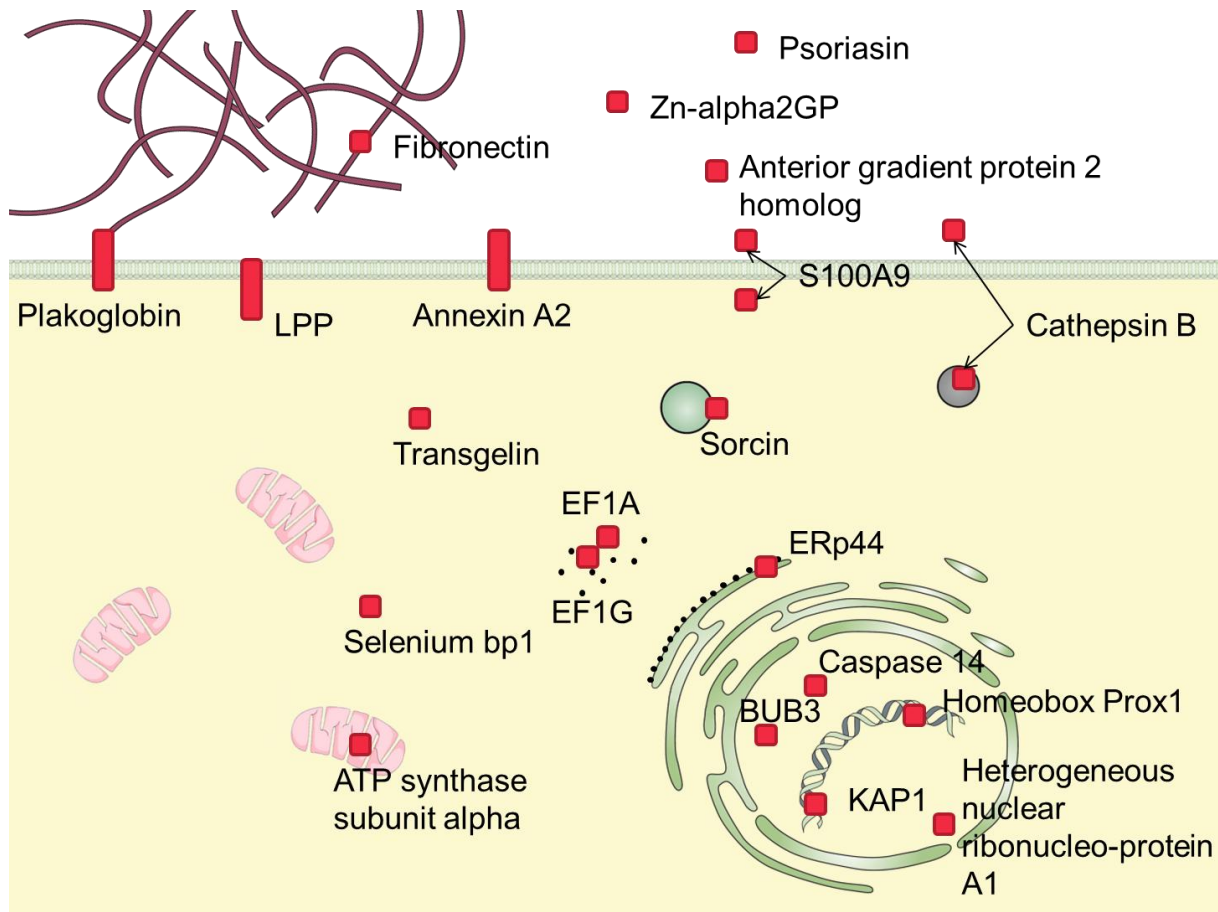


Abbildung 11

Subzelluläre Expression der neu identifizierten tumorassoziierten Antigene. Die 21 neuen TAA weisen keine Gemeinsamkeit in ihrer subzellulären Expression auf. Einige sind im Nukleus anzutreffen, andere in der Membran von Organellen, in der Zellmembran verankert oder als sekretierte Proteine in der extrazellulären Matrix.

Die subzelluläre Expression wurde anhand der Datenbanken UniprotKB (www.uniprot.org) und GenAtlas (www.genatlas.org) bestimmt.

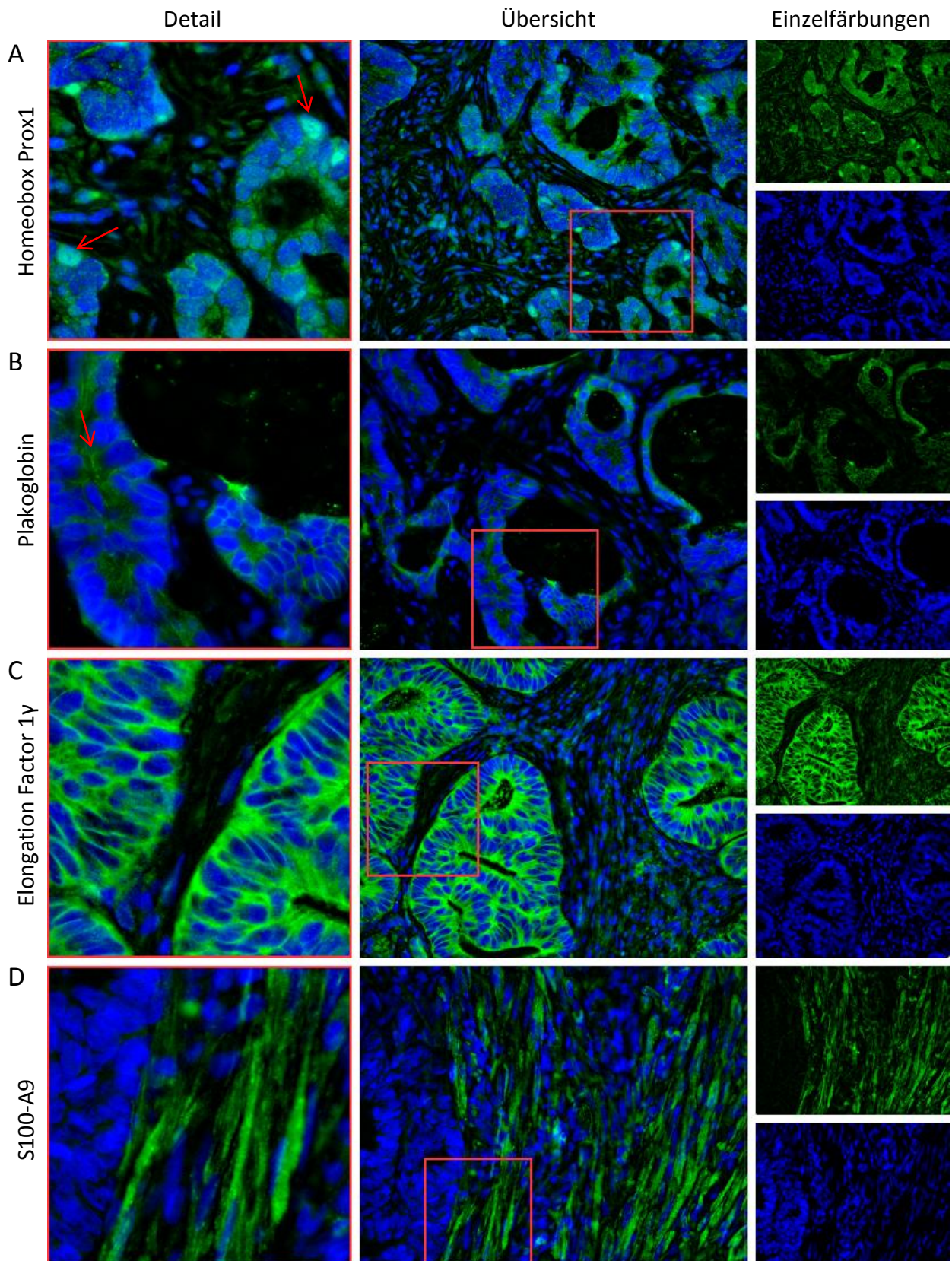


Abbildung 12

Immunhistologische Färbung von vier der 21 neuen TAA. Mittig ist eine Übersichtsaufnahme zu sehen. Das rote Quadrat markiert den Ausschnitt der Detailaufnahme (links). Rechts sind die einzelnen Färbungen zu sehen. Grün gefärbt sind die jeweiligen TAA, blau gefärbt sind die Zellkerne (DAPI-Färbung).

Eine Analyse aller 21 neuen TAA zeigt, dass der Großteil ubiquitär im Menschen vorkommt (Abb. 13A). Über 75 % der Proteine kommen in jeder oder in sehr vielen Zelltypen und Geweben vor. Nur vier der neuen TAA sind in ihrer Expression stärker limitiert. Caspase 14 (epitheliale Zellen), Psoriasin (Atmungs- und Verdauungstrakt) und Anterior gradient protein 2 homolog (u.a. Dickdarm) sind auch in gesunden Zellen des kolorektalen Systems

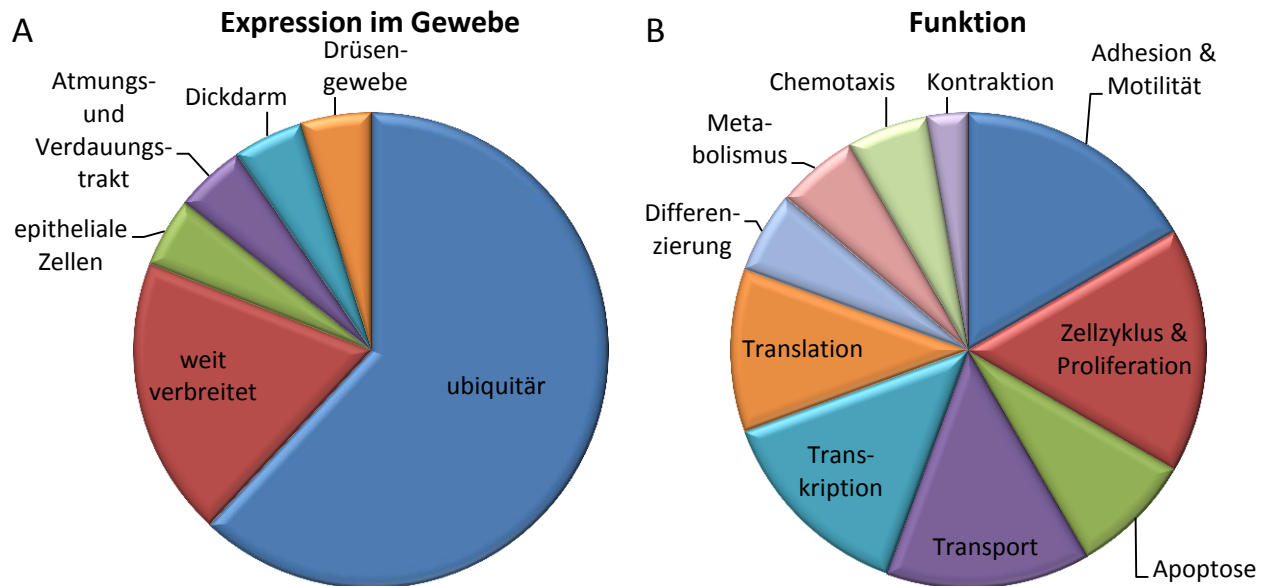


Abbildung 13

Übersicht über die Expression im Gewebe (A) und die generelle Funktion (B) der 21 neu identifizierten TAA. Mehr als 75 % der TAA sind in fast allen Körperzellen exprimiert. In der Funktion unterscheiden sich die TAA aber weitestgehend. Die Grafiken wurden durch Daten der Datenbanken UniprotKB (www.uniprot.org) und GenAtlas (www.genatlas.org) erstellt.

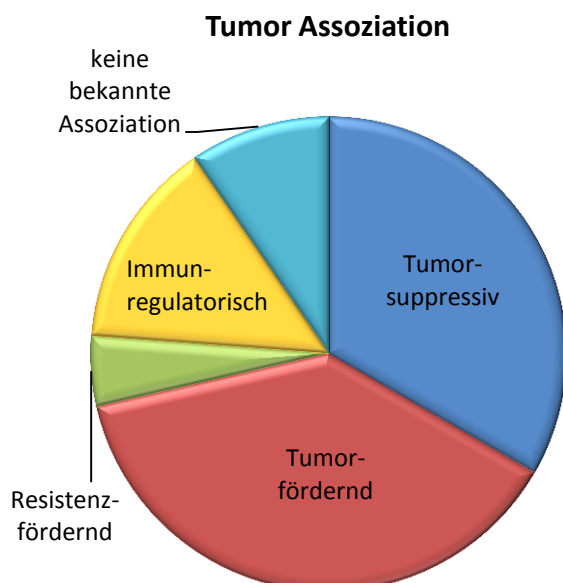


Abbildung 14

Übersicht über die Tumor-Assoziation der 21 neu identifizierten TAA. Knapp ein Drittel der TAA haben Funktionen, die tumorsuppressiv wirken. Etwa ebenso viele Proteine haben tendenziell tumorfördernde Eigenschaften. Ein Sechstel der neuen TAA hat Funktionen, die das Immunsystem betreffen. Die Grafik wurde durch Daten der Datenbanken UniprotKB (www.uniprot.org) und GenAtlas (www.genatlas.org) erstellt.

vorhanden. Zn-alpha2-GP wird vor allem von Drüsengeweben sekretiert und ist in verschiedenen Körperflüssigkeiten vorhanden.

Werden die 21 Proteine nach ihrer Funktion kategorisiert (Abb. 13B), zeigt sich ein sehr vielfältiges Spektrum. Wie schon nach der subzellulären Lokalisation (Abb. 11) zu vermuten war, unterscheiden sich die 21 neuen TAA auch in ihrer Funktion. Die größten Gruppen sind Adhäsion und Motilität sowie Zellzyklus und Proliferation.

Ein letzter, aber sehr interessanter Aspekt in dieser Betrachtung ist die Tumor-Assoziation der Proteine (Abb. 14). Sie könnte einen Hinweis darauf geben, welche Rolle die neu identifizierten TAA im Tumor spielen und Grundlage einer veränderten Expression sein, die zur Erkennung der Tumorzelle durch T-Zellen führt. Eine Analyse der beschriebenen Funktionen zeigt, dass ein Drittel der Proteine Tumor-suppressiv wirken können. Dem gegenüber stehen mehr als ein Drittel der TAA, die durch ihre Funktion das Tumor-Wachstum tendenziell fördern. Drei der 21 Proteine beeinflussen das Immunsystem und ein Protein, Sorcin, wird mit der Resistenz gegen mehrere anti-Krebsmedikamente in Verbindung gebracht (Maddalena et al. 2011). Von den restlichen Proteinen ist bisher keine direkte Assoziation zu Tumoren bekannt.

4.1.4 Differentielle Genexpression der neuen TAA in Krebsstammzellen

Die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Hanno Glimm am NCT forscht an Krebsstammzellen und hat verschiedene Subtypen dieser tumorinitiierenden Zellen (TIC) entdeckt, darunter metastasierende und nicht-metastasierende TIC. Analysen zeigten, dass es Unterschiede in der Genexpression zwischen diesen TIC und Zellen von Primärtumoren oder Metastasen gibt. Ein Abgleich der Daten aus den Expressionsanalysen mit den neu identifizierten TAA zeigt, dass diese auch eine starke Relevanz bei Krebsstammzellen besitzen.

Tumorassoziertes Antigen	Expression in tumorinitiierenden Zellen (TIC)
Annexin A2	Höher in TIC als in Primärtumoren
Elongationsfaktor 1 alpha	Höher in TIC als in Primärtumoren, höher in stark metastasierenden TIC
Elongationsfaktor 1 gamma	Höher in metastasierenden als in nicht-metastasierenden TIC

Caspase 14	
Protein S100-A7 (Psoriasin)	
Protein S100-A9	
BUB 3	Höher in TIC als in Primärtumoren
ATP Synthase	
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	
Cathepsin B	Höher in Primärtumoren als in TIC
Nuclear corepressor KAP1	
Fibronectin	
Selenium binding protein 1	Höher in nicht-metastasierenden TIC als in metastasierenden TIC
Anterior gradient 2 homolog	Höher in nicht-metastasierenden TIC als in metastasierenden TIC
Homeobox Prox 1	
Sorcin	
Transgelin	
Endoplasmic Reticulum protein 44	
Lipoma-preferred-partner Isoform alpha	Höher in nicht-metastasierenden TIC als in metastasierenden TIC
Plakoglobin	Höher in nicht-metastasierenden TIC als in metastasierenden TIC
Zn-alpha2 Glykoprotein	Höher in nicht-metastasierenden TIC als in metastasierenden TIC

Tabelle 7

Übersicht über die relative Expression aller neu identifizierten tumorassoziierten Antigene in tumorinitiierenden Zellen (TIC). Nur bei signifikanten Unterschieden ist die Expression angegeben. Die Genexpressionsanalyse wurde freundlicherweise von unseren Kooperationspartnern, der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Hanno Glimm, zur Verfügung gestellt.

Knapp die Hälfte der neuen TAA wird differentiell exprimiert (Tab. 7). Dabei zeigt sich, dass drei der neuen Antigene, BUB3, Annexin A2 und der Elongationsfaktor 1 alpha, in tumorinitiierenden Zellen eine erhöhte Expression im Vergleich zu Primärtumoren aufweisen (Tab. 7). Der Elongationsfaktor 1 alpha ist darüber hinaus auch noch in stark

metastasierenden TIC höher exprimiert. Der Elongationsfaktor 1 gamma zeigt eine stärkere Expression in metastasierenden tumorinitiierenden Zellen im Vergleich mit nicht-metastasierenden TIC (Tab. 7). Tabelle 7 zeigt ebenfalls, dass sechs weitere neue TAA hingegen in nicht-metastasierenden tumorinitiierenden Zellen oder dem Primärtumor höher exprimiert sind.

4.1.5 Bedeutung der neuen TAA bei weiteren Patienten mit kolorektalem Karzinom

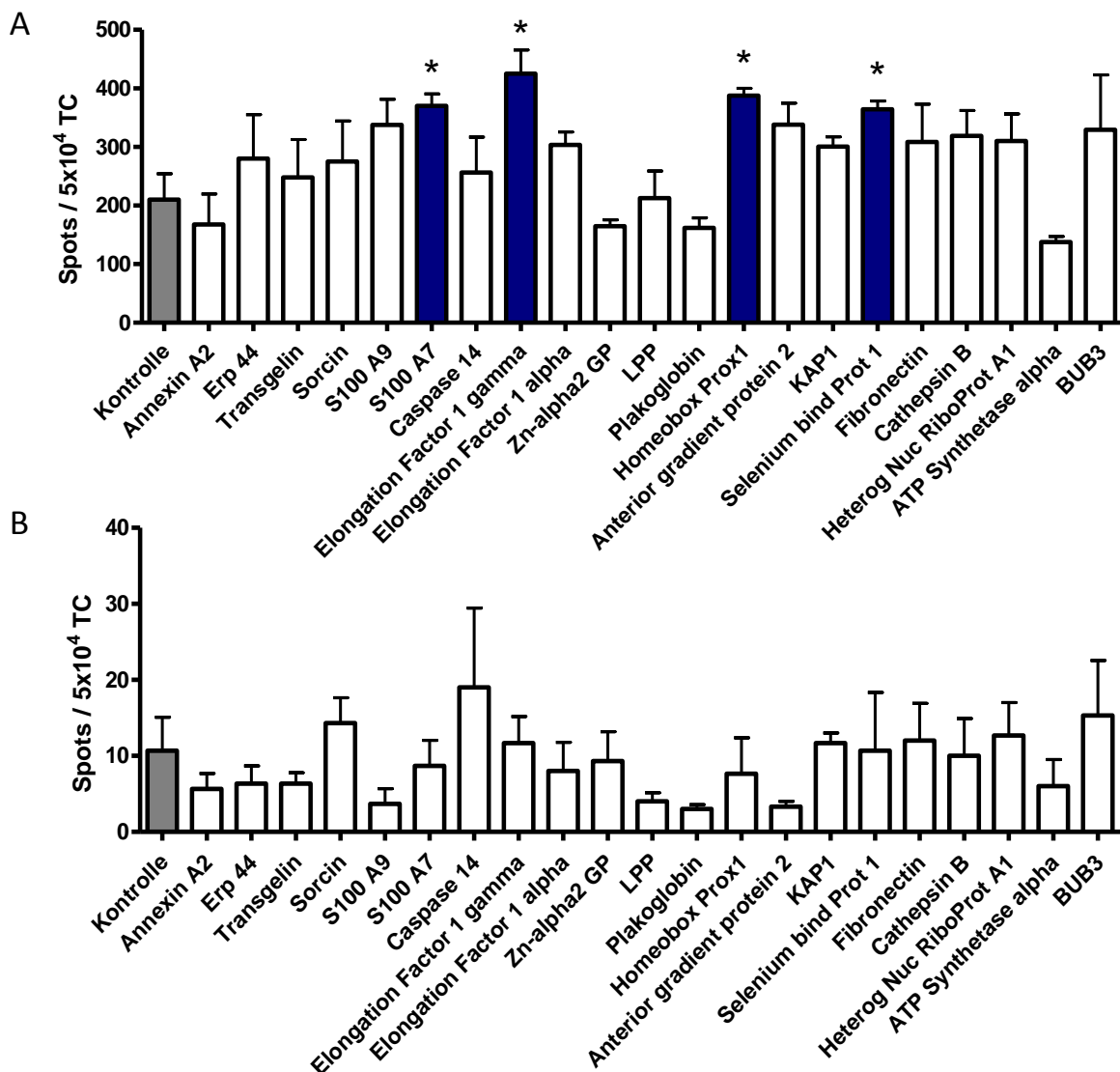


Abbildung 15

T-Zell-Antworten gegen Peptide der neuen TAA bei Patient 2430 (A) und dem gesunden Spender 010 (B). Die Analyse wurde mit synthetischen Peptiden der neuen TAA durchgeführt. Die Anzahl reaktiver T-Zellen (*Spots*) pro 5x10⁴ T-Zellen wurde gemessen. Blaue Säulen markieren signifikant erhöhte T-Zell-Reaktivität.

* P < 0,05 (zweiseitiger Student-t Test)

Für eine potentielle Nutzung der neuen TAA ist es grundlegend wichtig zu wissen, ob diese eine Bedeutung nur in den Patienten haben, aus denen sie ursprünglich isoliert und identifiziert wurden, oder aber auch in anderen Patienten mit kolorektalem Karzinom zu einer Reaktion des Immunsystems führen können. Ersteres würde für eine personalisierte Therapie sprechen und eine Analyse der relevanten Antigene individuell für jeden Patienten nötig machen. Sollten die neuen TAA jedoch auch in anderen Patienten zu signifikanten T-Zell-Antworten führen, könnte das ein Hinweis darauf sein, dass diese Antigene eine generelle Rolle beim kolorektalen Karzinom spielen und dadurch auch für Therapien in Frage kommen, die auf breitere Patientengruppen ausgelegt sind.

Der erste Versuch mit einem Patienten (Abb. 15A) zeigt bereits, dass es bei einigen TAA ebenfalls zu einer signifikanten Reaktion der T-Zellen kommt. Diese Beobachtung steht im Kontrast zum Versuch mit T-Zellen eines gesunden Spenders (Abb. 15B), bei dem keines der getesteten Peptide zu signifikanten T-Zell-Antworten führte.

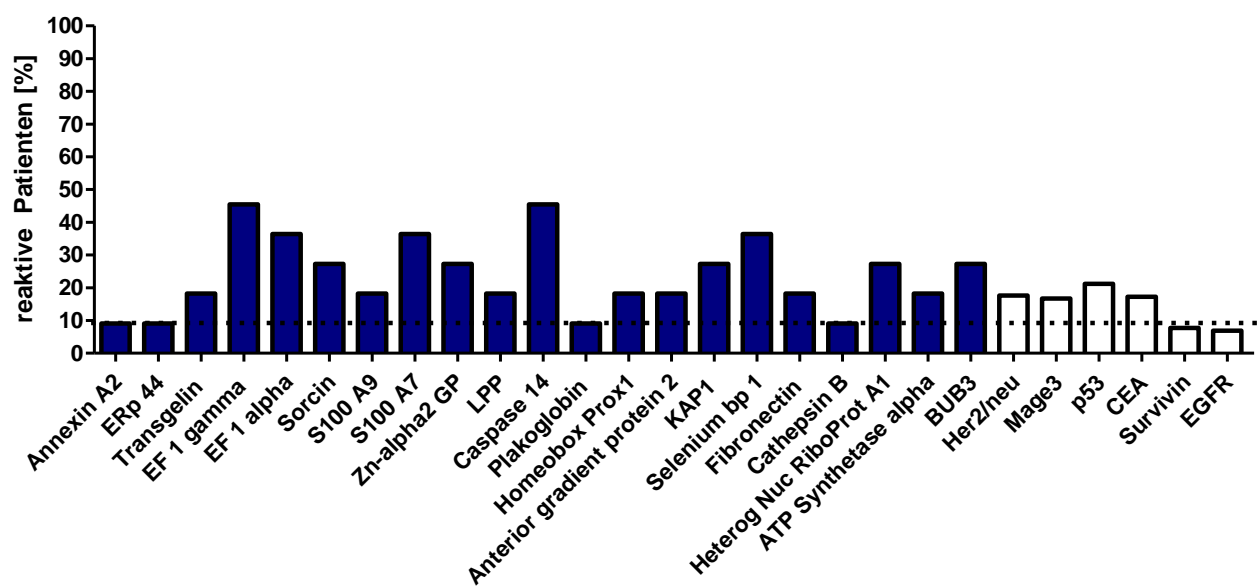


Abbildung 16

Übersicht über die signifikante T-Zell-Reaktivität der neuen TAA bei CRC Patienten (n=11) im Vergleich mit klassischen TAA (n=34). Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Patienten, welche signifikante T-Zell-Antworten beim betreffenden TAA aufwiesen. Die gestrichelte Linie markiert die Grenze von 9 % (entspricht einem reaktiven Patient bei den neuen TAA).

Insgesamt wurde jedes neue tumorassoziierte Antigen bei 11 Patienten mit CRC getestet. Die kumulierte Reaktivität der einzelnen TAA ist in Abbildung 16 im Vergleich mit klassischen TAA zu sehen. Elongation Factor 1γ (EF 1 gamma) und Caspase 14 führen bei mehr als 45 %

der Patienten zu signifikanten Ergebnissen. Elongation Factor 1 α (EF 1 alpha), S100A7 und Selenium bp1 werden noch von über 36 % der Patienten erkannt. Im Vergleich dazu führen die klassischen TAA tendenziell seltener zu signifikanten T-Zell-Reaktionen. Beispielsweise kommt p53 auf eine Reaktivität von 21,6 % (Abb. 16).

In Summe haben 17 der 21 TAA bei mehreren Patienten zu einer T-Zell-Reaktion geführt. Lediglich bei Annexin A2, ERp 44, Plakoglobin und Cathepsin B konnte außer der verifizierten Antwort des ursprünglichen Patienten keine erneute Reaktion bei anderen Patienten gemessen werden. Bei der Analyse von 10 gesunden Spendern wurde nur ein einziges Mal eine signifikante Reaktion gegen eines der neuen TAA, BUB3, festgestellt (Daten nicht dargestellt).

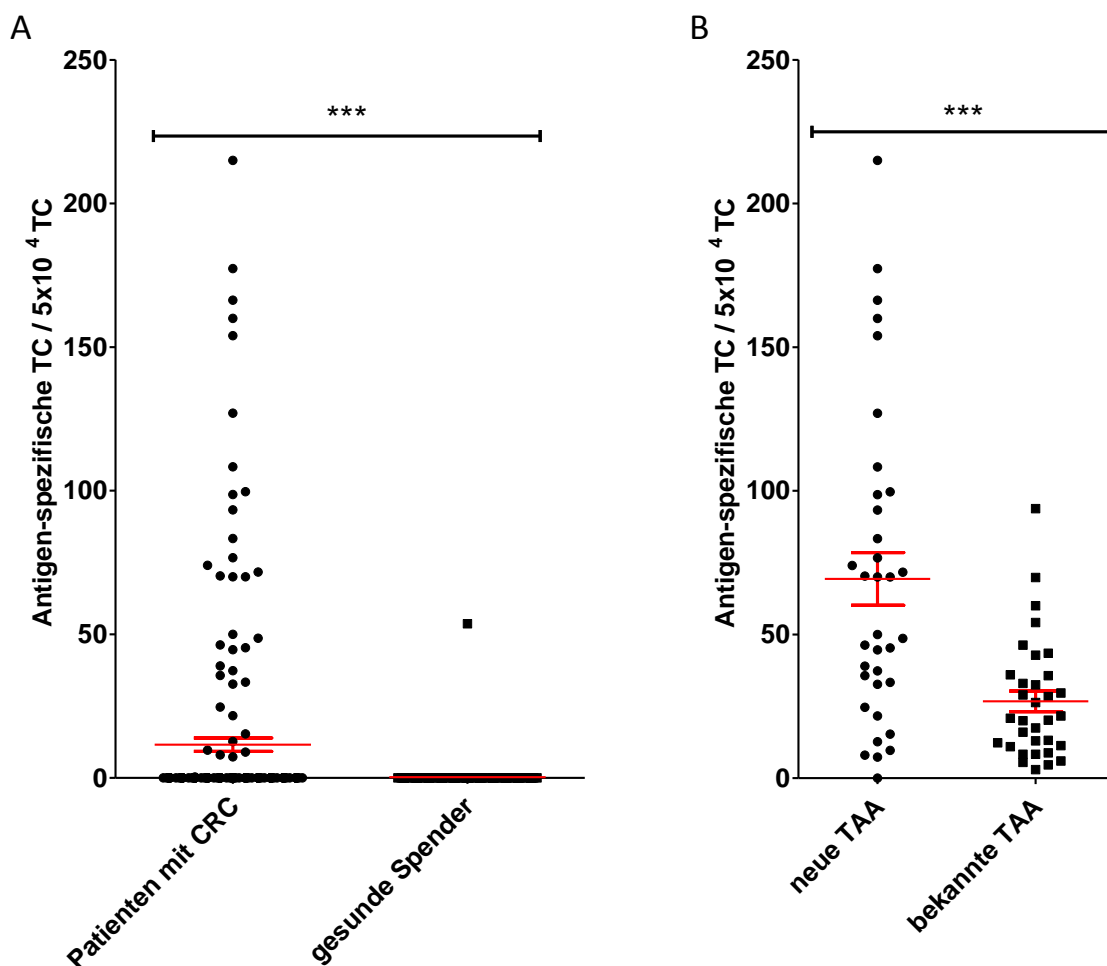


Abbildung 17

Die Frequenz antigenspezifischer T-Zellen bei Patienten und gesunden Spendern (**A**) und bei CRC Patienten im Vergleich mit Frequenzen gegen bekannte Antigene (**B**). Jeder Punkt in der Grafik entspricht der Anzahl spezifischer T-Zellen je 5×10^4 T-Zellen.

*** P < 0,0005 (zweiseitiger Student-t Test)

Betrachtet man die Frequenz der Antigen-spezifischen T-Zellen in Patienten mit CRC und in gesunden Spendern (Abb. 17A), ist zu erkennen, dass die Anzahl der spezifischen T-Zellen bei Patienten stark schwankt. Ein genauerer Blick darauf und der Vergleich mit Analysen unseres Labors mit bereits seit längerem bekannten tumorassoziierten Antigenen wie p53, Mage-3 und Survivin zeigt, dass es signifikant mehr spezifische T-Zellen gibt, die gegen die neu identifizierten Antigene reagieren (Abb. 17B). Diese neuen Antigene scheinen somit nicht nur in einer Vielzahl von CRC-Patienten eine Rolle zu spielen, sondern sie sind auch in der Lage, stärkere Immunantworten auszulösen.

4.2 Auswirkung von Mutationen auf die T-Zell-Reaktivität

Die Erkennung von Krebszellen durch T-Zellen im Körper basiert auf der Unterscheidung von Peptiden, die auf MHC-Molekülen präsentiert werden. Um Autoimmunkrankheiten zu verhindern, werden die T-Zellen in ihrer Entwicklung im Thymus gegen körpereigene Peptide negativ-selektioniert (Wilson et al. 1976). Dies führt dazu, dass sie körpereigene Wildtyp-Peptide bestenfalls mit geringer Affinität binden können, und somit Krebszellen nur dann erkennen wenn Wildtyp-Peptide überexprimiert werden und somit die Avidität steigt. Anders verhält es sich bei Sequenzen, die während der Entwicklung der T-Zellen nicht vorhanden waren, wie Peptide von Viren oder aber mutierte körpereigene Proteine. Solche Proteine mit veränderter Sequenz entstehen über die Dauer der Entwicklung von Tumoren. Über die Jahre sammeln sich über einhundert Mutationen an (Bozic et al. 2010), was letztlich dazu führen kann, dass T-Zellen die Tumorzelle als Ziel erkennen.

4.2.1 T-Zell-Antworten gegen mutierte Antigene

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle von bekannten Mutationen des kolorektalen Karzinoms bei der T-Zell-Reaktivität zu untersuchen. Dazu wurden Peptide aus sogenannten *Hot-Spot-Regionen* von p53, Kras und B-raf verwendet. In diesen Regionen kommen Mutationen mit größerer Häufigkeit vor. Es wurden Peptide aus je einem Exon von Kras und B-raf, sowie aus drei Exons von p53 verwendet, welche die am häufigsten vorkommenden, bekannten Mutationen trugen (Brosh und Rotter 2009). Zur Kontrolle wurden die korrespondierenden Wildtyp-Sequenzen eingesetzt. In ELISpot-Analysen mit Zellen von 26 Patienten mit

kolorektalem Karzinom wurde mit Hilfe dieser Peptide die Interferon- γ Antwort von T-Zellen gemessen.

In Abbildung 18A ist ein exemplarisches Ergebnis mit T-Zellen aus dem peripheren Blut von Patient 1622 zu sehen. Zwei Peptide mit mutierten Sequenzen von p53 (R175H, R248Q) führten zu einer signifikant stärkeren T-Zell-Reaktion als die zugehörigen Wildtyp-Peptide.

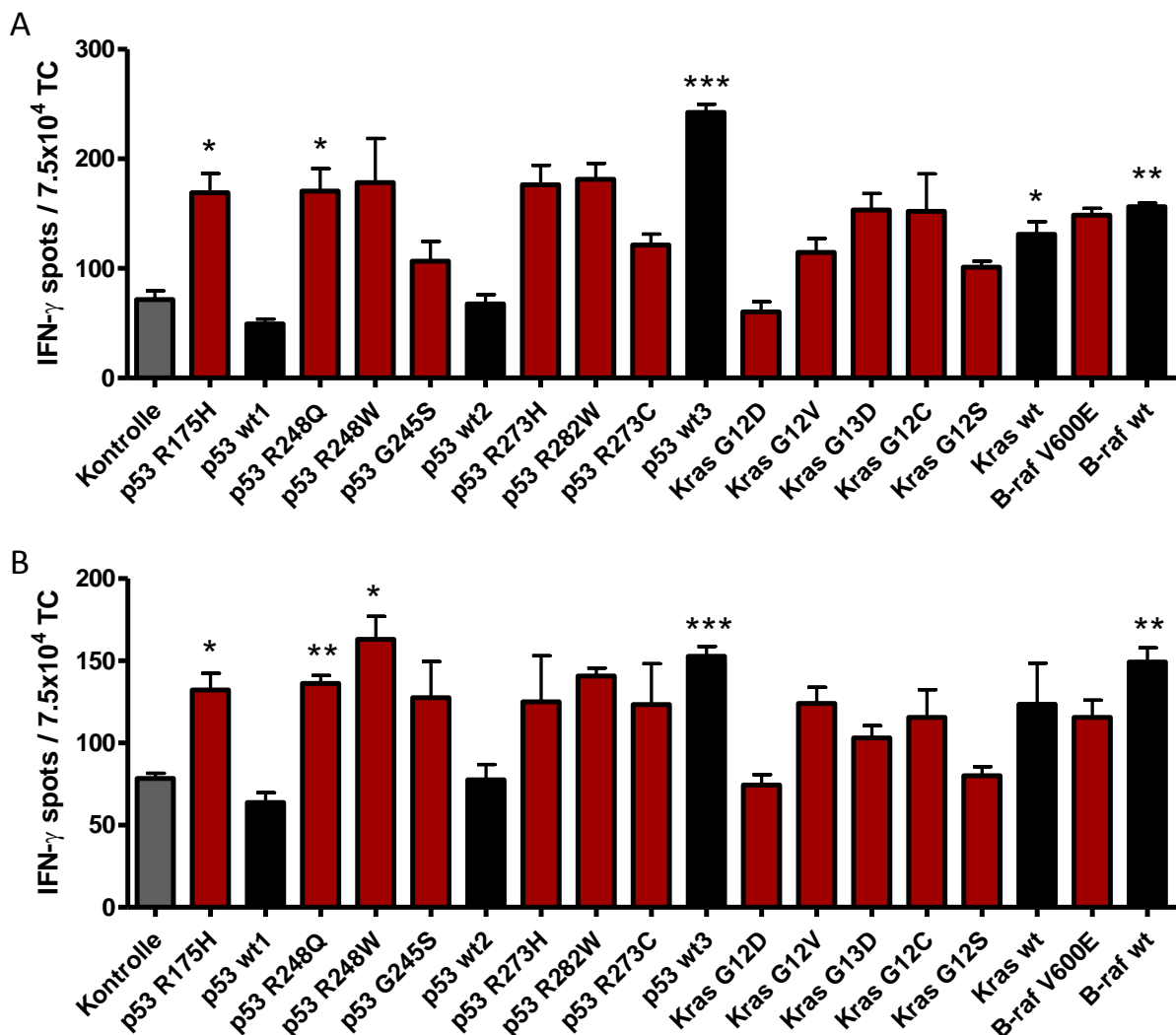


Abbildung 18

Interferon- γ -Antworten von T-Zellen, die aus peripheren Blut (A) oder Knochenmark (B) von Patient 1622 isoliert wurden. Die Anzahl reaktiver T-Zellen (*Spots*) pro $7,5 \times 10^4$ T-Zellen wurde gemessen. Rote Säulen markieren Peptide mit mutierten Sequenzen, schwarze Säulen rechts daneben markieren die korrespondierenden Wildtyp-Peptide.

*** $P < 0,0005$; ** $P < 0,005$; * $P < 0,05$ (zweiseitiger Student-t Test)

Auch die Peptide mit den Mutationen in der Region um die Aminosäure-Positionen 270-280 sind gegenüber der Kontrolle stark erhöht, jedoch ist die Antwort beim korrespondierenden

Wildtyp-Peptid noch höher. Somit ist nicht sicher, ob es sich um eine Antwort gegen die Mutation oder die Wildtyp-Anteile im Peptid handelt. Ähnlich verhält es sich bei den B-raf-Peptiden. Auch hier ist das Peptid mit der mutierten Sequenz gegenüber der Kontrolle erhöht, jedoch nicht signifikant höher als das Wildtyp-Peptid. Außerdem ist auch das Kras-Wildtyp-Peptid signifikant positiv.

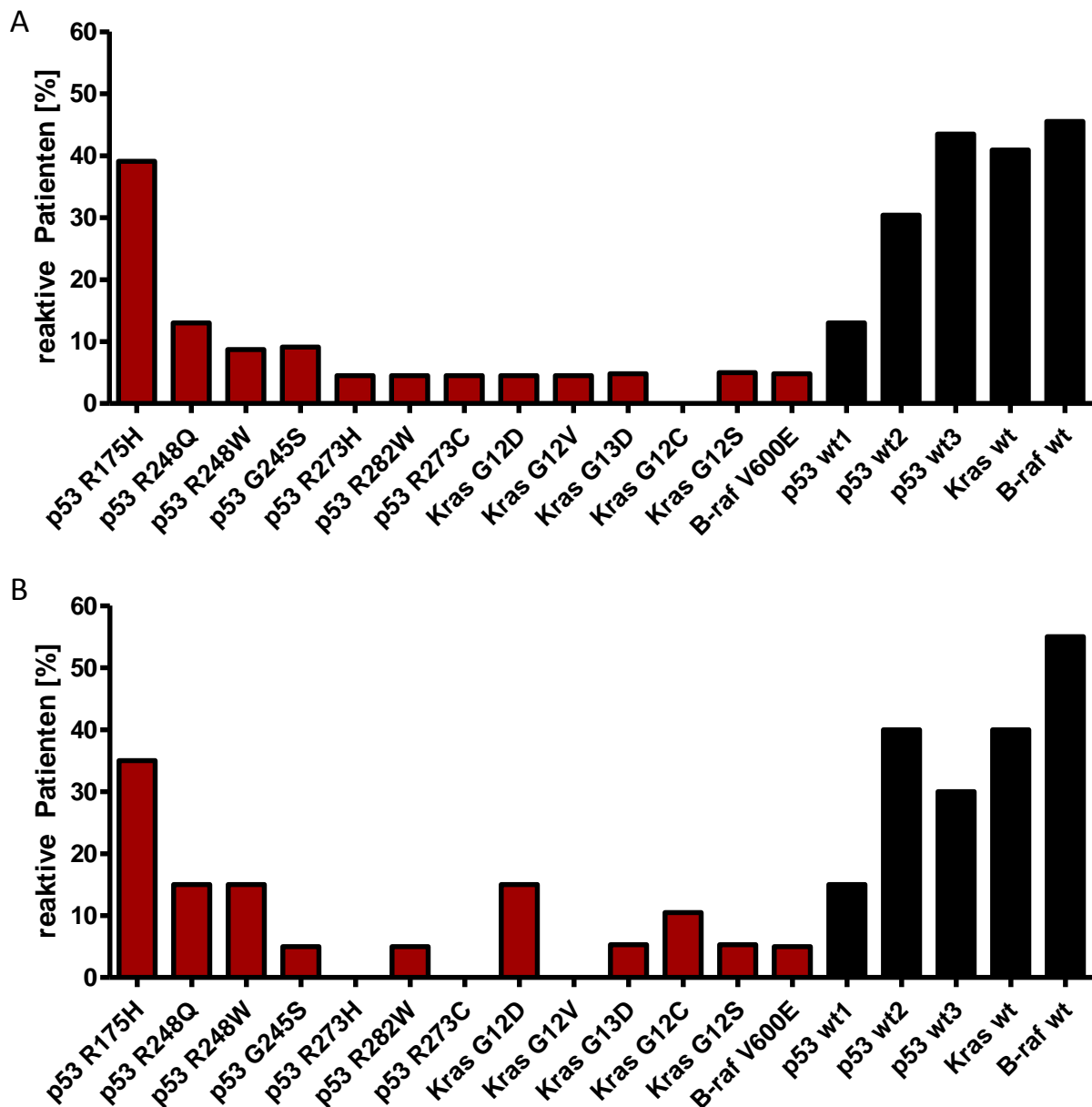


Abbildung 19

Kumulierte Interferon- γ -Antworten von T-Zellen, die aus peripheren Blut (**A**) oder Knochenmark (**B**) isoliert wurden. Rote Säulen zeigen den Anteil der Patienten, bei denen Peptide mit mutierten Sequenzen signifikant höhere Antworten erzeugten als die Wildtyp-Sequenzen und die Negativ-Kontrolle. Die schwarzen Säulen zeigen den Anteil der Patienten, deren T-Zellen signifikant auf Wildtyp-Antigene reagiert haben.

Bemerkenswerterweise zeigen T-Zellen aus dem Knochenmark des gleichen Patienten (Abb. 18B) sehr ähnliche Reaktivitäten. Die meisten Peptide zeigen eine vergleichbare Antwort. Lediglich das Kras-Peptid ist im Gegensatz zum ELISpot mit T-Zellen aus dem Blut nicht signifikant höher als die Kontrolle. Außerdem ist ein weiteres mutiertes Peptid von p53 signifikant positiv: R248W ist sowohl stärker als die Negativ-Kontrolle als auch stärker als das zugehörige Wildtyp-Peptid.

Die kumulierten Daten von 26 Patienten (Abb. 19) zeigen, dass es gegen jedes der verwendeten Peptide mit mutierten Sequenzen T-Zell-Antworten gibt, die sowohl signifikant höher als die Wildtyp-Antwort war, als auch signifikant höher als die Negativ-Kontrolle. Sowohl mit T-Zellen aus dem peripheren Blut (Abb. 19A) als auch mit Zellen aus dem Knochenmark (Abb. 19B) löst das Peptid R175H mit Abstand am häufigsten eine signifikante T-Zell-Reaktion bei den Patienten aus. Auch das Peptid R248Q löst mit T-Zellen aus dem Blut in 13 % und mit T-Zellen aus dem Knochenmark in 15 % der Patienten eine signifikante Antwort aus. Für Knochenmarks-T-Zellen gilt dasselbe wie für das p53-Peptid R248W und das Kras-Peptid G12D. Die Wildtyp-Peptide von p53, Kras und B-raf lösen in 40-55 % der Patienten signifikante T-Zell-Reaktionen aus.

Betrachtet man die Frequenzen der antigenspezifischen T-Zellen, finden sich eine höhere Anzahl reaktiver T-Zellen im peripheren Blut als im Knochenmark (Abb. 20A). Bereits hier ist zu erkennen, dass die Anzahl der T-Zellen, die gegen mutierte Antigene gerichtet sind (rote Punkte), höher ist als gegen Wildtyp-Peptide. Ein direkter Vergleich der Frequenzen (Abb. 20B) beweist, dass tatsächlich mehr T-Zellen im Körper der Patienten vorkommen, die spezifisch für mutierte Peptide sind.

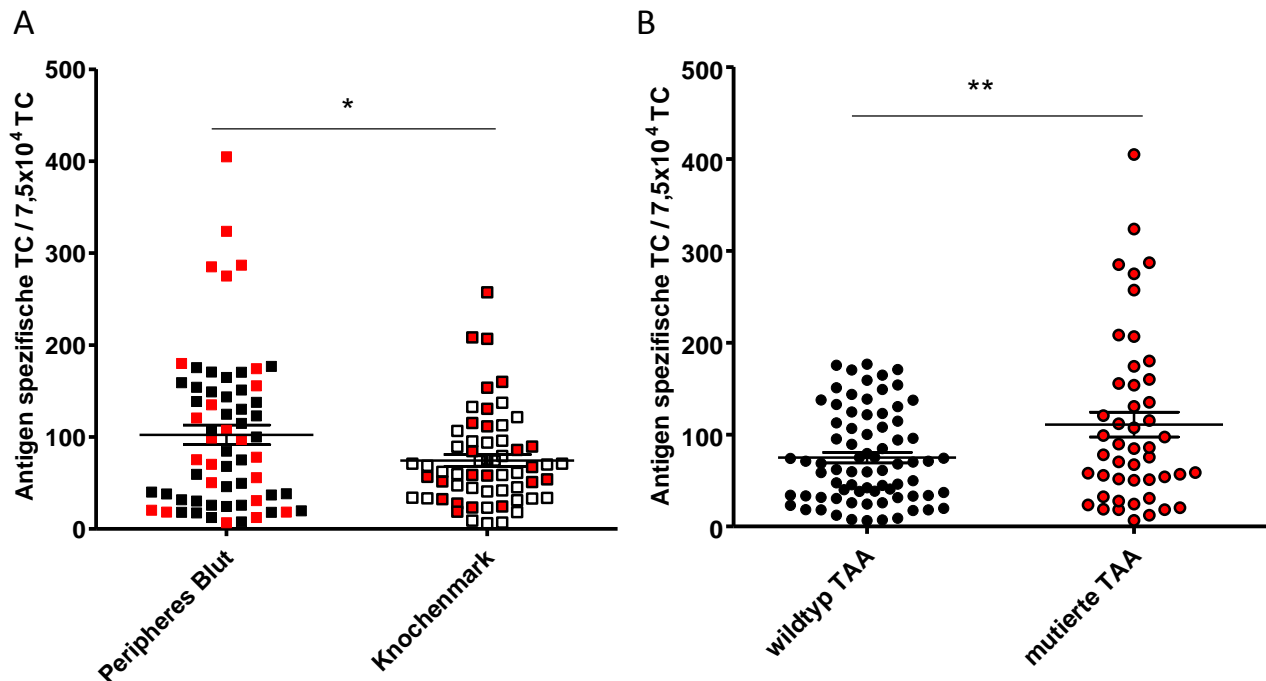


Abbildung 20

Die Frequenz antigenspezifischer T-Zellen aus peripherem Blut oder Knochenmark (A) und die Frequenzen im Vergleich gegen Wildtyp- und mutierte Antigene (B). Jeder Punkt in der Grafik entspricht der Anzahl spezifischer T-Zellen je $7,5 \times 10^4$ T-Zellen. Rote Punkte markieren Antworten gegen mutierte Antigene, schwarze Punkte gegen Wildtyp-Antigene.

** $P < 0,005$; * $P < 0,05$ (zweiseitiger Student-t Test)

4.2.2 Mutationsanalyse von Patienten mit kolorektalem Karzinom

Um einen besseren Einblick in die physiologisch bedeutsame Rolle von Mutationen bei der T-Zell-Antwort gegen Tumore zu bekommen, wurde eine Sequenzanalyse bei 24 der 26 Patienten durchgeführt, die bereits im ELISpot auf ihre Reaktivität getestet wurden. Die Analyse umfasste die gleichen *Hot-Spot*-Bereiche, von denen die mutierten Peptide abgeleitet wurden (3 Exons von p53, je 1 Exon von B-raf und Kras). Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit von Gewebe konnte nur bei einigen Patienten sowohl Tumor als auch Metastase untersucht werden. Die detaillierten Ergebnisse finden sich im Anhang.

Bei 20 der 24 Patienten wurde mindestens eine Mutation im untersuchten Bereich gefunden, was einer Rate von 83,3 % entspricht. Darunter waren 23 verschiedene Punktmutationen, die alle zu einer veränderten Aminosäuresequenz im Protein führten. Bei vier der Patienten führte diese Punktmutation zu einem Stop-Codon im p53-Gen und somit zu einem nicht funktionalen Protein. Ein weiterer Patient besaß eine Mutation an einer Splice-Donorstelle,

was wohl ebenfalls zu einem Abbruch der p53-Synthese führt. Insgesamt hatten 18 Patienten (75 %) mindestens eine Mutation in einem der drei p53-Exons. Bei Kras lag die Mutationshäufigkeit im ersten Exon bei 29,2 % (sieben Patienten). Nur bei B-raf konnte keine Mutation im untersuchten Exon gefunden werden. Interessanterweise wurde bei einem Patienten, Patient 1678, bei dem sowohl Gewebe vom Primärtumor als auch von der Metastase untersucht werden konnte, eine komplexe Verteilung von Mutationen entdeckt. So wurden im Primärtumor drei Mutationen in p53 gefunden: R180C, G244D und G278E. In der Lebermetastase fand sich hingegen nur die Mutation R180C. Die Sequenz an den Stellen G244 und G278 entsprach dem Wildtyp. Zusätzlich hatte die Metastase jedoch eine weitere Mutation im Kras-Gen: G12D. Diese kam wiederum im Primärtumor nicht vor. Dies weist darauf hin, dass sich Zellen vom Primärtumor lösten, als nur die Mutation R180C vorhanden war. Später bildete eine dieser Zellen die Lebermetastase, die eine weitere Mutation im Kras-Gen entwickelte, während der Primärtumor seinerseits ebenfalls weitere Mutationen, im p53-Gen, erwarb. Nur bei drei weiteren Patienten konnte Tumor- und Metastasen-Gewebe sequenziell untersucht werden. Alle drei wiesen in beiden Geweben die gleichen Mutationen auf. Bei einem Patienten wurden zwei verschiedene Lebermetastasen untersucht, die ebenfalls die gleiche Mutationssignatur trugen.

Ein letzter und wichtiger Aspekt der Sequenzanalyse war, herauszufinden, wie viele der Patienten eine Mutation trugen, die bereits in den ELISpot-Analysen untersucht worden waren. Tatsächlich hatte mehr als die Hälfte der 20 Patienten (55 %), welche Mutationen in diesem Bereich aufwiesen, eine Mutation, die bereits im ELISpot getestet worden war. Für diese Patienten wurde nun untersucht, wie stark die im ELISpot gemessenen T-Zell-Reaktivitäten mit den Daten aus der Sequenzanalyse zusammenhängen.

4.2.3 Korrelation der Sequenzanalyse mit den ELISpot Ergebnissen

Für die folgende Betrachtung bietet sich die Einteilung der Patienten in zwei Gruppen an. Zur ersten Gruppe zählen Patienten, bei denen die Sequenzanalyse eine ELISpot-relevante Mutation nachgewiesen hat. Die zweite Gruppe besteht hingegen aus Patienten, bei denen eine solche Mutation nicht nachgewiesen werden konnte.

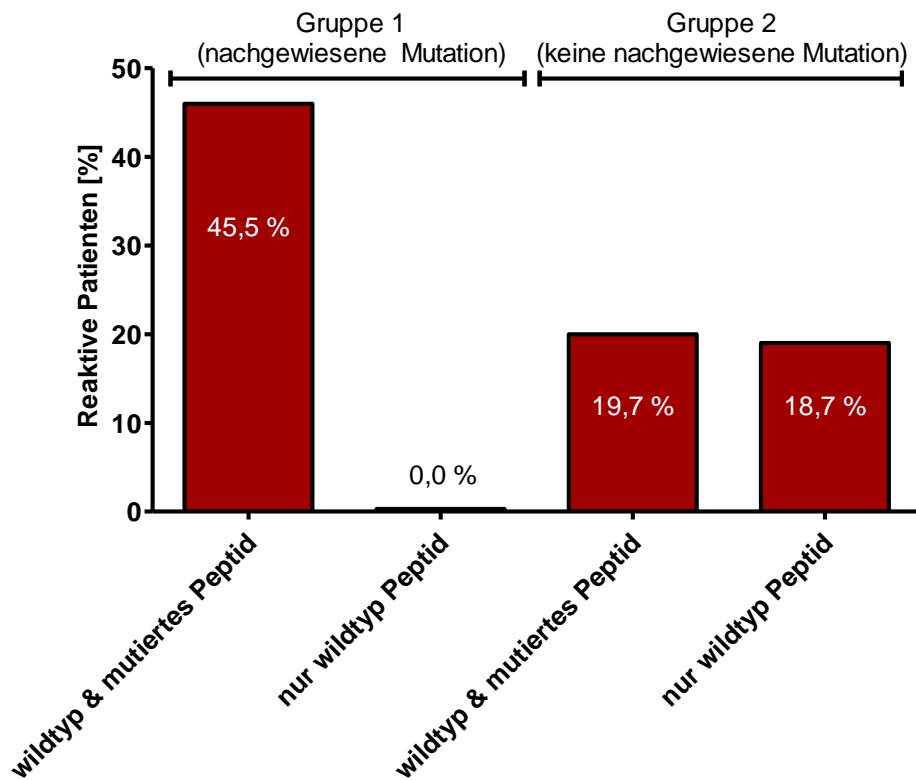


Abbildung 21

ELISpot-Reaktivität von Patienten mit nachgewiesener Mutation (Gruppe 1) und nicht nachgewiesener Mutation (Gruppe 2). Es ist jeweils die Reaktion gegen das individuelle mutierte Peptid und das zugehörige Wildtyp-Peptid dargestellt, sowie die Reaktivität nur gegen das Wildtyp-Peptid.

Es zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen den Gruppen. In Gruppe 1, in welcher die Patienten eine ELISpot-relevante Mutation besitzen, reagieren fast die Hälfte (45,5 %) im ELISpot sowohl auf das mutierte Peptid als auch auf das zugehörige Peptid mit der Wildtypsequenz (Abb. 21). Kein Patient aus dieser Gruppe reagiert hingegen nur auf das Wildtyp-Peptid. In Gruppe 2 zeigt sich hingegen kein großer Unterschied. Jeweils knapp ein Fünftel der Patienten (19,7 % und 18,7 %) sind doppelt positiv gegen mutiertes Peptid und Wildtyp-Peptid oder einfach positiv gegenüber dem Wildtyp-Peptid.

Dies könnte bedeuten, dass bei einer vorliegenden Mutation, die Reaktion der T-Zellen zwar gegen das mutierte Peptid gerichtet ist, aber sich auch auf das Wildtyp-Peptid ausweiten kann, was damit zu einer verstärkten Immunreaktion gegen den Tumor führt.

In Gruppe 1 reagierten zusätzlich 18,2 % der Patienten ausschließlich auf das mutierte Peptid. Dies führt zu einer Reaktionsrate gegen den Tumor von insgesamt 63,7 % der Patienten (Abb. 22). In Gruppe 2, in der die Patienten keine nachgewiesene Mutation besitzen, lag die Gesamtrate im ELISpot bei 36,3 % (Abb.22).

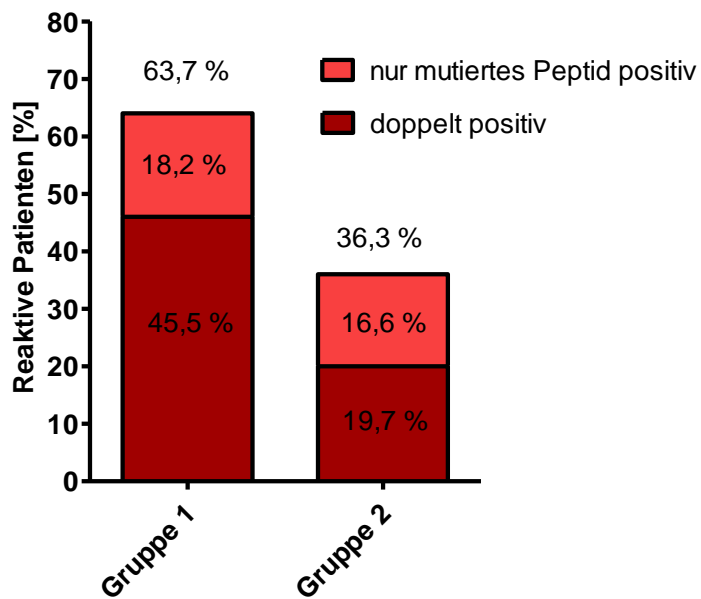


Abbildung 22

T-Zell-Reaktivitäten im ELISpot. Vergleich der reaktiven Patienten bei Vorliegen einer nachgewiesenen Mutation (Gruppe 1) mit den Ergebnissen bei keiner bestätigten Mutation (Gruppe 2). Dunkelrot markiert sind doppelt positive Ergebnisse, d.h. Reaktivitäten die sowohl auf das mutierte Peptid als auch auf das Wildtyp-Peptid gerichtet war. Hellrot ist der Anteil der Patienten, die nur für das mutierte Peptid signifikant positiv waren.

Interessant ist auch die Beobachtung, dass bei Gruppe 1 entweder immer eine Reaktion gegen das mutierte Peptid vorlag, oder aber gar keine Reaktion im ELISpot messbar war, auch nicht gegen Wildtyp-Peptide.

5 Diskussion

Die spezifische Immuntherapie verspricht für die Zukunft eine spürbare Verbesserung der Überlebenschancen und eine Zunahme der Behandlungserfolge bei Patienten mit kolorektalem Karzinom (Khazaie et al. 2009). Die konventionellen Therapien stoßen bei der Behandlung bereits heute häufig an ihre Grenzen. Dies ist besonders bei fortgeschrittenen Tumorstadien der Fall. Beispielsweise können nur 20 % aller Patienten mit kolorektalen Lebermetastasen überhaupt mit einem therapeutischen Ansatz operativ behandelt werden (Lorenz et al. 2000). Die aktive spezifische Immuntherapie hingegen ist schon heute die effektivste Behandlungsoption bei Patienten mit vermutetem, minimal zurückbleibendem kolorektalem Karzinom (Rao et al. 2011). Unter den aktiven spezifischen Immuntherapien bieten beim kolorektalen Karzinom Peptid-Vakzinierungen den höchsten klinischen Nutzen (clinical benefit rate, CBR) (Rao et al. 2011). Die Hoffnung auf noch deutlich größere Behandlungserfolge beruht darauf, dass T-Zellen potentiell in der Lage sind, auch einzelne Zellen wie zurückgebliebene Krebsstammzellen, zirkulierende Tumorzellen oder Mikrometastasen im Körper aufzuspüren und zu vernichten. Die Grundlage der T-Zell-Erkennung von Tumorzellen sind tumorassoziierte Antigene. Dadurch ist die wichtigste Variable einer Immuntherapie, die jeweils passenden TAA für jeden einzelnen Patienten zu identifizieren und einzusetzen. Dabei spielt es keine Rolle, ob diese TAA zukünftig für das Monitoring der Krebserkrankung, für eine Peptid-Vakzinierung mit oder ohne Dendritische Zellen, die Stimulation von autologen T-Zellen für einen adoptiven Transfer oder, davon abgeleitet, als RNA- oder DNA-Impfung eingesetzt werden sollen.

Grundsätzlich sollte in dieser Arbeit untersucht werden, welche tumorassoziierten Antigene tatsächlich physiologische Relevanz für die anti-Tumor Antwort besitzen. Eine Phase-I-Studie mit autologen Tumorzellen hatte gezeigt, dass TAAs eine wichtige Rolle für die Immunantwort spielen, aber die Frage offen gelassen, welche Antigene hauptsächlich für die T-Zell-Reaktion verantwortlich waren. Um die diese TAA zu identifizieren, wurde eine systematische Analyse durchgeführt. Dafür wurde das Proteom einzelner Primärtumore sowie des Primärtumors und der Lebermetastase eines einzelnen Patienten aufgetrennt und die Fraktionen auf die Fähigkeit hin untersucht, spontane Memory-T-Zell-Antworten auslösen zu können. Dabei wurde die Existenz von 21 bisher nicht bekannten

tumorassoziierten Antigenen belegt und außerdem interessante patientenindividuelle Unterschiede aufgedeckt, wodurch sich wichtige Implikationen für zukünftige Immuntherapien ableiten lassen. Außerdem wurde der Einfluss von Mutationen auf die Immunantwort untersucht und gezeigt, dass Mutationen zu stärkeren Immunantworten führen können.

5.1 Analyse der Zielstrukturen spontaner T-Zell-Antworten von Patienten mit kolorektalem Karzinom

Eine der spannendsten Fragen, die sich in den letzten Jahren im Zusammenhang mit der spezifischen Immuntherapie entwickelt hat, ist die der personalisierten Medizin (de Bono und Ashworth 2010; Haber et al. 2011). Diese umfasst zwei wichtige Aspekte: zum einen bedeutet personalisierte Krebsmedizin die umfassende Analyse der biologischen Charakteristika der Tumorerkrankung jedes einzelnen Patienten (Wistuba et al. 2011). Zum anderen bedeutet personalisierte Medizin aber auch, über verlässliche Diagnostik festzustellen, welche Subgruppen von Krebspatienten am meisten von einer bestimmten Behandlung profitieren werden (Wistuba et al. 2011). Neuere Krebsmedikamente, wie Panitumumab oder Cetuximab, setzen bereits beide Aspekte personalisierter Medizin voraus, da diese therapeutischen Antikörper nur bei Patienten ihre Wirkung entfalten können, bei deren Tumor das Signalprotein Kras noch im Wildtyp-Zustand vorliegt (Amado et al. 2008). Hier zeigen sich allerdings auch schon die Schwierigkeiten, die bei einer personalisierten Tumorthherapie auftreten und zu beachten sind. Denn einerseits zeigen Tumore eine grundlegende Gemeinsamkeit, nämlich die Erlangung bestimmter Eigenschaften, wie unbegrenztes Wachstum oder Resistenz gegenüber Apoptose (Hanahan und Weinberg 2011; De Palma und Hanahan 2012). Andererseits zeichnen sich Tumore aber auch durch eine starke Heterogenität auf mehreren Ebenen aus, was von Meric-Bernstam und Mills kürzlich gut zusammengefasst wurde (Meric-Bernstam und Mills 2012). So gleichen sich zwar kolorektale Tumore verschiedener Patienten häufig histologisch, aber sie unterscheiden sich dennoch in ihrer molekularen Struktur und ihrem malignen Potential (Perou et al. 2000; Sørli et al. 2001).

Auch innerhalb eines Patienten zeigt sich die Heterogenität beispielsweise zwischen dem Primärtumor und Metastasen in der Leber (Meric-Bernstam und Mills 2012). Allein die Wandlung der Zellen in der epidermalen-mesenchymalen-Transition (EMT), der Migration als zirkulierende Tumorzellen (CTC) und die Etablierung im neuen Organ führen dazu, dass sich die Tumorzellen der Metastase von den Zellen in Primärtumor unterscheiden. Bemerkenswerterweise können Zellen der Metastase sogar wieder Wildtyp-Proteine exprimieren, die im Primärtumor durch Mutation nicht mehr exprimiert werden konnten (Dupont Jensen et al. 2011; Gonzalez-Angulo et al. 2011; Navin et al. 2011).

Doch auch im Primärtumor selbst herrscht eine Heterogenität vor. Nur ein kleiner Teil der Zellen, die Krebsstammzellen, haben das Potential zur Selbsterneuerung und die Fähigkeit weitere Tumore zu initiieren (Wicha et al. 2006). Die restlichen Tumorzellen unterschieden sich, als Subklone, ebenfalls untereinander in ihrem Differenzierungsstatus oder ihrem proliferativen Potential (Navin et al. 2011).

Diese Heterogenität macht die Nutzung von tumorassoziierten Antigenen für die anti-Krebstherapie als personalisierte Medizin noch wichtiger, und erfordert die Identifikation der passgenauen Antigene.

Die einfachste Möglichkeit, die relevanten Tumorantigene zur Impfung zu verwenden, besteht in der Nutzung von autologen Tumorzellen oder Tumorlysate. Bei der Anwendung der autologen Tumorzell-Vakzine bei Patienten mit kolorektalem Karzinom in unserer Phase-I-Studie zeigt das Immunmonitoring eine starke Induktion der T-Zell-Antwort nach jeder einzelnen Impfung (Abb. 1 und Abb. 24A im Anhang). Speziell nach der allerersten Impfung steigt die Zahl antigenspezifischer T-Zellen im peripheren Blut der Patienten deutlich an (Abb. 24B im Anhang).

Zwar zeigen ähnliche Studien, die ebenfalls NDV-infizierte autologe Tumorzellen verwenden, dass sich allein dadurch ein erhöhtes tumorfreies Überleben, verbesserte 2-Jahresüberlebensraten und ein verlängertes, metastasenfreies Überleben erreichen lässt (Lehner et al. 1990), (Hagmuller et al. 1995), (Schulze et al. 2009) und außerdem dadurch eine starke Immunantwort gegen den Tumor ausgelöst wird (Aigner et al. 2008). Die Frage bleibt aber, genau gegen welche Strukturen die hauptsächliche T-Zell-Antwort gerichtet ist.

Unsere Experimente zeigen, dass die Reaktion gegen bestimmte Peptide von tumorassozierten Antigenen stärker ist, als die Reaktion gegen das Tumorlysate (Abb. 1 und Abb. 26). Dazu reagieren manche Patienten auf bestimmte TAA sehr stark, aber auf andere TAA schwach oder gar nicht, wie Patient 1630 gegen Mage-3 oder Patient 1678 gegen Her2-neu (Abb. 26).

Um die bestmögliche anti-Tumorantwort zu erreichen, ist deshalb eine systematische Analyse des Proteoms notwendig, um die relevanten Antigene für eine personalisierte Behandlung zu identifizieren.

5.1.1 Die differentielle Erkennung von tumorassozierten Antigenen

Bei der systematischen Analyse wurden zuerst die kolorektalen Primärtumore von zwei Patienten untersucht. Dabei wurde das Tumorlysate jeweils in verschiedene Fraktionen aufgeteilt und T-Zellen aus dem peripheren Blut auf ihre Reaktion gegen diese Fraktionen getestet.

Ein Vergleich der beiden Patienten zeigt bereits bei der T-Zell-Antwort gegen die Fraktionen der ersten Dimension (Abb. 3), dass die T-Zell-Reaktionen gegen unterschiedliche Proteine gerichtet sein müssen. In der reaktiven Fraktion 10 von Patient 2241 (Abb. 3A) befinden sich Proteine mit einem isoelektrischen Punkt um pH 7,9. Die erste Reaktion bei Patient 2295 ist bei Fraktion 15 zu sehen (Abb. 3B), was einem isoelektrischen Punkt um pH 6,4 entspricht. Analog dazu reagieren die T-Zellen von Patient 2295 auch gegen Fraktion 22 bei einem pH von 4,3. Bei Patient 2241 ist dagegen unter pH 5,8 keine Reaktion mehr zu sehen. Dies deutet bereits auf eine Erkennung von individuellen tumorassozierten Antigenen (TAA) bei diesen beiden Patienten hin.

Durch diese Unterschiede bereits in der ersten Dimension ist die zweite Dimension unter den Patienten nicht mehr vergleichbar. Als Konsequenz daraus zeigt sich auch bereits bei den potentiellen Antigenen (Tab. 1 und Tab. 3) keine Überlappung. So sind dann auch die, mit synthetischen Peptiden verifizierten, neuen TAA zwischen den Patienten verschieden (Tab. 2 und Tab. 4).

Diese Ergebnisse zeigen, wie wichtig eine personalisierte Immuntherapie ist. Obwohl beide Patienten an kolorektalem Karzinom im gleichen Stadium erkrankt sind, reagieren die T-Zellen dennoch auf komplett unterschiedliche tumorassoziierte Antigene. Eine Therapie, die nur auf die häufigsten Antigene setzt, wird deshalb nur schwer bei einer Mehrzahl der Patienten eine starke Immunreaktion induzieren können.

Ein noch detaillierteres Bild erhält man, wenn auch die Ergebnisse des dritten Patienten, 2215, betrachtet werden. Bei diesem war es uns möglich, sowohl den Primärtumor als auch die Lebermetastase auf reaktive Fraktionen hin zu testen und damit die Frage nach der differentiellen Reaktivität auch auf eine Heterogenität von Primärtumor und Fernmetastase zu untersuchen. Hier zeigt bereits die erste Dimension (Abb. 7) an, dass aus Primärtumor und Metastase unterschiedliche Proteine erkannt werden, da beim Primärtumor eine Fraktion im Bereich von pH 8,5 erkannt wird und bei der Metastase nicht. Nach der zweiten Dimension wird dies nochmals deutlicher (Abb. 8). Dennoch zeigt der Vergleich des Primärtumors mit den Ergebnissen der ersten zwei Patienten, dass hier Fraktionen aus dem gleichen pH-Bereich (Fraktion 17 bzw. Fraktion 16) wie bei Patient 2241 und Patient 2295 erkannt werden (Vergleiche Abb. 3A, 5A und 7B). Dadurch wurden bei Patient 2215 auch einige Proteine in der massenspektrometrischen Analyse identifiziert, die bereits bei Patient 2241 entdeckt wurden, beispielsweise Caspase 14 und Plakoglobin (Vergleiche Tabelle 1 und Tabelle 5). Bei der Verifizierung mit synthetischen Peptiden wurden diese Antigene jedoch nur von T-Zellen jeweils eines der Patienten erkannt (Vergleiche Abb. 4 und Abb. 10).

Der Vergleich von T-Zell-Antworten gegen den Primärtumor und die Metastase eines Patienten zeigt damit, dass es in späten Stadien vermutlich nicht ausreicht, nur den Primärtumor für die Auswahl geeigneter tumorassoziierter Antigene zu analysieren. Vielmehr müsste die gesamte Tumorerkrankung betrachtet werden um sicher zu stellen, dass eine breite Immunreaktion eingeleitet werden kann.

5.1.2 Die physiologische Bedeutung der neuen tumorassozierten Antigene

Ein genauerer Blick auf die 21 neu identifizierten tumorassozierte Antigene zeigt, dass sich darunter interessanterweise keine bereits bekannten TAA des kolorektalen Karzinoms wie EpCAM (Nagorsen et al. 2000), MUC (Bohm et al. 1998) oder p53 (Umano et al. 2001)

befinden. Dadurch stellt sich natürlich die Frage, welche Aufgabe diese neu entdeckten Antigene im Tumor erfüllen und ob sie möglicherweise auch eine aktive Rolle bei der Tumorprogression spielen. Eine erste Analyse zeigt, dass die neuen TAA bereits in ihrer subzellulären Expression sehr heterogen sind, was durch eine Datenbank-Analyse (Abb. 11) ebenso wie durch die immunhistologische Färbung einiger TAA deutlich wird (Abb. 12). Außerdem ist der Großteil der neuen TAA auch in vielen verschiedenen Geweben exprimiert (Abb. 13A) und kann durch seine Funktionen entweder als tumorfördernd oder tumorsuppressiv bezeichnet werden – nur ein kleinerer Teil der Proteine hat Funktionen bei der Regulation des Immunsystems (Abb. 14). Eine detaillierte Übersicht über die bekannten Funktionen aller Proteine findet sich im Anhang (Abschnitt 6.2).

Die interessanteste physiologische Verbindung zum potentiellen Beitrag der TAA zur Tumorprogression lieferte aber die Genexpressionsanalyse von Krebsstammzellen. Hier ist zu erkennen, dass vier der neuen tumorassoziierten Antigene eine erhöhte Expression auf tumorinitiierenden Zellen (TIC) oder sogar (stark) metastasierenden TIC zeigen. Dies sind BUB3, die Elongationsfaktoren 1-alpha und 1-gamma sowie Annexin A2 (Tab. 7).

BUB3 kann in seiner Wildtyp-Form als Tumorsuppressor wirken. Es ist Bestandteil des SAC-Komplexes (spindle assembly checkpoint), der in der Zelle während der Zellteilung die korrekte Ausbildung des Spindelapparats überwacht (Tomasini et al. 2009). BUB3 wird dabei für das korrekte Anheften der Microtubuli an die Kinetochore benötigt (Logarinho et al. 2008). Kommt es nicht zu einem korrekten Anheften der Mikrotubuli oder treten sonstige Fehler beim Segregieren der Chromosomen auf, wirkt BUB3 als Mediator, der den Caspase-unabhängigen mitotischen Zelltod (CIMD) einleitet (Niikura et al. 2010).

Auf den ersten Blick mag eine erhöhte Expression von BUB3 in tumorinitiierenden Zellen daher überraschen, jedoch ist auch der bekannteste Tumorsuppressor, p53, in verschiedenen Tumorarten überexprimiert, darunter auch beim kolorektalen Karzinom (Nasif et al. 2006; Rossner et al. 2009). Diese Überexpression von p53 im kolorektalen Karzinom ist mit bestimmten Mutationen assoziiert (Lee et al. 2006) und hat auch Implikationen auf die Prognose (Diez et al. 2000; Nasif et al. 2006; Lan et al. 2007). Ähnlich könnte es sich bei BUB3 verhalten. Womöglich ist BUB3 durch seine Funktion bei der Anheftung der Mikrotubuli während der Zellteilung essentiell für die proliferierenden TIC. Deshalb könnten sich Zellen durchsetzen, die im Zytoplasma hohe Mengen mutiertes BUB3

aufweisen, welches noch alle Funktionen für die Zellteilung erfüllt, jedoch seine Funktion als Mediator des Zelltods verloren hat.

Den Elongationsfaktoren 1-alpha und 1-gamma und Annexin A2 hingegen wird onkogenes Potential zugeschrieben. Der eukaryotische Translation-Elongationsfaktor 1 (EF1) besteht neben EF1-alpha und EF1-gamma aus zwei weiteren Untereinheiten. Der Komplex spielt eine Schlüsselrolle bei der Proteintranslation (Abbott und Proud 2004). EF1-alpha ist die am besten charakterisierte Untereinheit, über die Untereinheit EF1-gamma ist dagegen deutlich weniger bekannt. EF1-alpha spielt unter anderem eine Rolle bei Apoptose und Zellproliferation. So schützt eine Überexpression von EF1-alpha vor Caspasen-induzierter Apoptose und das Fehlen von EF1-alpha führt zu erhöhter Apoptose (Potter et al. 1998). Des Weiteren schützt es vor Apoptose nach Interleukin-3-Entzug (Talapatra et al. 2002) und die Überexpression führt zu einer Resistenz gegenüber Cisplatin in humanen Zelllinien von Kopf-Hals-Karzinomen (Johnsson et al. 2000). Diese Eigenschaften passen zur Entdeckung, dass EF1-alpha in TIC höher exprimiert ist als in Primärtumoren (Tab. 7). Die Menge an EF1-alpha im Zytoplasma korreliert außerdem direkt mit der Zellzyklus-Rate (Cavallius et al. 1986; Duttaroy et al. 1998; Grassi et al. 2007), was erklären könnte, dass es auch in stark metastasierenden TIC höher exprimiert wird (Tab. 7). Auch frühere Studien haben gezeigt, dass es in kolorektalen Karzinomen häufig überexprimiert ist (Schlegel et al. 1995).

Auch Annexin A2 ist in vielen Tumorarten, wie Brust-, Leber-, Prostata- und Pankreaskarzinom, hochreguliert (Vishwanatha et al. 1993; Sharma et al. 2006; Mohammad et al. 2008; Inokuchi et al. 2009). Auch beim kolorektalen Karzinom ist Annexin A2 überexprimiert und korreliert mit einer erhöhten Tumorstufe (Duncan et al. 2008). In mehreren Tumorarten, darunter auch bei kolorektalen Karzinomen wurde gezeigt, dass Annexin A2 im Zusammenspiel mit weiteren Proteinen an der Zellmembran co-lokalisiert ist und zu einem Abbau der extrazellulären Matrix beiträgt (Puisieux et al. 1996; Mai et al. 2000; Lokman et al. 2011). Dies führt auch zu einer erhöhten Invasionsfähigkeit (Ohno et al. 2009; Zheng et al. 2011).

Die Erkenntnis, dass einige der neu entdeckten tumorassoziierten Antigene speziell auf Krebsstammzellen und stark metastasierenden tumorinitiierenden Zellen vorkommen, lässt für eine Immuntherapie mit diesen Antigenen ein hohes Potential vermuten. Wenn es gelingt, beispielsweise nach einer operativen Resektion des Hauptteils des Tumors, durch

eine T-Zell-Therapie die verbliebenen tumorinitiierenden Krebsstammzellen zu vernichten, dürfte daraus eine sehr gute Prognose und möglicherweise die finale Zerstörung des Tumors resultieren.

Jedes der 21 neu identifizierten Proteine besitzt zelluläre Funktionen, die generell für Tumorerkrankungen von Bedeutung sein könnten und über eine individuelle Rolle bei Patienten mit kolorektalem Karzinom hinausgeht. Die ersten Versuche haben dennoch keine überlappende Reaktivität für eines der Antigene festgestellt. Dies könnte auf die geringe Probengröße von drei Patienten zurückzuführen sein, denn es wurde schon mehrmals gezeigt, dass viele Patienten der gleichen Tumorart spontane T-Zell-Antworten gegen definierte Antigene besitzen (Beckhove et al. 2004; Koch et al. 2006; Melief und van der Burg 2008; Bonertz et al. 2009).

Die weiteren Analysen zeigen dann, dass andere Patienten mit kolorektalem Karzinom ebenfalls über Memory-T-Zellen verfügen, die spontane Immunreaktionen gegen die neuen TAA induzieren können (Abb. 16). Interessanterweise ist der Anteil reaktiver Patienten bei einigen TAA sehr hoch. So führen Caspase 14 und der Elongationsfaktor 1 gamma (EF1 gamma) bei über 45 % der untersuchten Patienten zu einer signifikanten T-Zell-Antwort. Diese Ergebnisse liegen höher als bei früheren Analysen unseres Labors mit bekannten Antigenen (Abb. 16). Nur mit isolierten CD8+ T-Zellen konnten ähnliche Ergebnisse erzielt werden (Bonertz et al. 2009). Im Blut der Patienten finden wir außerdem hohe Frequenzen von Memory-T-Zellen, welche spezifisch auf die neu identifizierten Antigene reagieren (Abb. 17B). Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass die neuen tumorassoziierten Antigene ein hohes immunogenes Potential besitzen und in zukünftigen Therapien sinnvoll eingesetzt werden könnten. Ein Aspekt wurde bisher jedoch vollkommen außer Acht gelassen: der individuelle Mutationsstatus der Tumore.

5.2 Auswirkung von Mutationen auf die T-Zell-Reaktivität

Die Erkennung von Tumorzellen durch T-Zellen basiert auf vielfältigen Mechanismen, wie beispielsweise Überexpression oder der veränderten Glykosylierung von Proteinen. Am eindeutigsten unterscheiden sich Tumorzellen von gesunden Körperzellen jedoch durch Mutationen. Mutierte Antigene besitzen unter den Selbstantigenen vermutlich auch das

höchste immunogene Potential, da T-Zellen mit einer hohen Rezeptor-Affinität gegen solche Peptide nicht während der Entwicklung im Thymus negativ selektioniert werden. Die physiologische Rolle von Mutationen für die anti-Tumor-Antwort ist trotz ihrer Bedeutung bisher wenig untersucht worden. In unseren Versuchen analysierten wir daher die spontanen T-Zell-Antworten von Patienten mit kolorektalem Karzinom gegen Peptide mit den häufigsten Mutationen von p53, Kras und B-raf und verglichen diese mit den tatsächlich im Gewebe vorkommenden Mutationen.

Die Proteine p53, Kras und B-raf spielen beim kolorektalen Karzinom eine wichtige Rolle (Ogino et al. 2011; Lopez et al. 2012). So ist p53, der „Wächter des Genoms“, bei 54,5 % der kolorektalen Tumor-Patienten mutiert (Lopez et al. 2012). Unsere Peptide wurden nach den am häufigsten auftretenden Mutationen ausgewählt, die fast ausschließlich in sogenannten Hot Spot-Bereichen auftreten, die für die Bindung von p53 an die DNA verantwortlich sind (Brosh und Rotter 2009). Kras ist in kolorektalen Tumoren bei 52,5 % der Patienten mutiert, wovon bei 42,3 % „aktivierende Mutationen“ vorlagen (Yen et al. 2010). Bei dieser GTPase verwendeten wir deshalb Peptide, welche Mutationen an den Aminosäurepositionen G12 und G13 tragen. Veränderungen von Kras an diesen Stellen verhindert die Hydrolyse von gebundenem GTP und sorgt so dafür, das Kras konstitutiv aktiv ist (Boguski und McCormick 1993). Die häufigsten Mutationen in gastrointestinalen Tumoren führen zu einem G12D Phänotyp (44,4 %), gefolgt von G12V (22,2 %), G12S (14,8 %) und G12C (3,8 %) (Ugorcakova et al. 2012). Bei B-raf wurde die bekannteste Mutation V600E verwendet. Diese Veränderung an der enzymatisch aktiven Stelle, die dazu führt, dass B-raf unabhängig von einer Aktivierung durch Kras wird, ist in etwa 10 % der CRC-Patienten nachzuweisen (Tie et al. 2011).

Einen guten Einblick in die Bedeutung von p53, Kras und B-raf beim kolorektalen Karzinom liefert die Analyse eines exemplarischen Patienten (Abb. 18). T-Zellen aus dem peripheren Blut (Abb. 18A) reagieren signifikant auf Wildtyp-Peptide aller drei Proteine. Bei Kras und B-raf, bei denen kein mutiertes Antigen signifikant höher als die Wildtyp-Sequenz ist, könnte das darauf hinweisen, dass hier zwar keine Mutation vorliegt, Kras und B-raf aber eventuell überexprimiert sind und sich deshalb spezifische Memory-T-Zellen im Blut des Patienten zu finden sind. Anders verhält es sich bei p53: hier sind zwei Peptide, die eine Mutation tragen, signifikant zum Wildtyp erhöht (Abb. 18A) – mit T-Zellen aus dem Knochenmark des

Patienten sogar drei (Abb. 18B) – was zeigt, dass hier mutationsspezifische Memory-Zellen vorhanden sind.

Nach der Untersuchung von 26 Patienten zeigt sich, dass ein sehr hoher Anteil der Patienten spezifische T-Zell-Antworten gegen das p53-Peptid R175H besitzt (Abb. 19). Dies könnte auf eine besondere Bedeutung dieses Aminosäureaustauschs hinweisen. Tatsächlich ist die R175H Mutation alleine in der Lage, das Verhalten der Zelle zu verändern. So vermindert R175H die Apoptose-Rate und vermittelt eine Resistenz gegenüber Zytostatika wie Doxorubicin, Cisplatin und einer Bestrahlung mit gamma-Strahlen in Tumorzelllinien (Tsang et al. 2005). Außerdem ist R175H auch in der Lage, Twist1, einem Regulator für die Epidermale-Mesenchymale-Transition, hochzuregulieren, was zu einer verstärkten Invasion der Tumorzellen führt (Kogan-Sakin et al. 2011).

Auch die Peptide R248Q und R248W zeigen bei bis zu 15 % der Patienten signifikante T-Zell-Antworten (Abb. 19A und 19B). Trotz der Mutation im gleichen Codon, unterscheidet sich diese Veränderung physiologisch stark: So führt die Mutation R248Q zu einer deutlich höheren Fähigkeit zur Invasion von Tumorzelllinien als p53-Proteine mit einer Veränderung zu R248W (Yoshikawa et al. 2010).

Bei Kras besitzt das Peptid G12D die höchste Reaktivität mit bis zu 15 % bei der Analyse mit T-Zellen aus dem Knochenmark (Abb. 19B). Dies ist auch die am häufigsten vorkommende Mutation bei Kras in gastrointestinalen Tumoren (Ugorcakova et al. 2012). Das einzige verwendete B-raf Peptid V600E, zeigt nur in etwa 5 % der Patienten eine mutationsspezifische T-Zell-Reaktion (Abb. 19), was jedoch auch an der geringeren Mutationshäufigkeit von etwa 10 % beruhen kann (Tie et al. 2011). Bemerkenswert sind die hohen Reaktionsraten gegen die Wildtyp-Peptide. Dies könnte darauf hindeuten, dass auch die Wildtyp-Proteine durch Überexpression zu einer höheren Avidität der T-Zell-Rezeptorbindung führen und damit eine Erkennung der Tumorzelle und das Entstehen von Memory-T-Zellen erlaubt.

Die Sequenzanalyse aller 24 Patienten zeigt, dass 75 % eine Mutation in einem der drei untersuchten p53-Exons besitzen. Das ist im Vergleich zu anderen Untersuchungen, zusammengefasst von Russo et al. (Russo et al. 2005), recht hoch, jedoch ist die Gruppe von 24 Patienten relativ klein. Für Kras wurde bei 29,2 % der Patienten eine Mutation gefunden,

bei B-raf keine Mutation. Bei Kras und B-raf wurde jedoch nur ein Exon des jeweiligen Gens sequenziert.

Äußerst interessant ist der Blick auf die einzelnen Patienten. Besonders Patient 1678, bei dem sowohl der Primärtumor als auch die Lebermetastase analysiert werden konnte, zeigt ein komplexes Muster an Mutationen. Die Tatsache, dass sich Primärtumorzellen und Metastasenzellen einige Mutationen teilen, aber ebenso individuelle Mutationen besitzen, wirft ein Licht auf die Entwicklung der Krebserkrankung. Früh in der Primärtumorentwicklung, nachdem eine p53-Mutation bereits aufgetreten war, haben sich vermutlich Zellen abgelöst und sind in die Zirkulation eingetreten. Solche zirkulierenden Tumorzellen (CTC) können bereits in sehr frühen Stadien bei kolorektalen Krebspatienten nachgewiesen werden (Hiraiwa et al. 2008). Nachdem diese CTC aus der Zirkulation ausgetreten waren und eine Metastase bildeten, häuften sie weitere Mutationen an. Ebenso entwickelten sich auch im Primärtumor weitere DNA-Schäden. (?) Diese Einzelfallbetrachtung zeigt noch einmal, wie wichtig eine genaue Analyse der tumorassoziierten Antigene sein wird.

Der Vergleich mit den ELISpot-Daten zeigt, dass bei fast 64 % der Patienten, bei welchen eine Mutation festgestellt werden konnte, auch die spezifische Memory-T-Zell-Antwort im ELISpot detektiert werden kann (Abb. 22). Außerdem reagiert diese Gruppe häufig sowohl gegen das mutierte Peptid als auch gegen das Wildtyp-Antigen (Abb. 21). Der Vergleich zeigt auch, dass in Gruppe 1, in der bei jedem Patienten eine Mutation im Tumorgewebe vorliegt, in keinem Fall ausschließlich das Wildtyp-Peptid erkannt wurde (Abb. 21). Dies lässt darauf schließen, dass die mutierten Antigene eine hohe Immunogenität bei diesen Patienten besitzen. Dass, trotz vorliegender Mutation, bei 36 % der Patienten keine T-Zellantwort – weder gegen Wildtyp, noch gegen mutierte Peptide – nachweisen lässt, könnte mit der Aktivität von regulatorischen T-Zellen (Treg) zusammenhängen (Deng et al. 2010). Treg sind in der Lage, spezifische Immunantworten im Tumor zu unterdrücken und eine Depletion der Treg führt zu einer Aufdeckung antigenspezifischer T-Zell-Antworten (Clarke et al. 2006; Bonertz et al. 2009). In Gruppe 2, in der keine Mutation bei den Patienten nachgewiesen werden konnte, zeigen sich in geringerem Umfang ebenfalls mutationsspezifische T-Zell-Antworten im ELISpot (Abb. 22). Dieser Gruppe könnten jedoch auch Patienten zugeordnet sein, welche eine Mutation tragen, da nicht ausgeschlossen werden kann, dass bei

zirkulierenden Tumorzellen oder in Mikrometastasen die betreffenden Mutationen vorkommen, welche jedoch bei der Sequenzierung nicht gefunden werden können.

Auch wenn sich aufgrund der geringen Patientenzahl keine solide statistische Aussage machen lässt, zeigt die Analyse, dass T-Zell-Antworten gegen mutierte Proteine eine wichtige Rolle in der anti-Tumor-Antwort spielen und entsprechende Peptide in Zukunft eine sinnvolle Option für Therapien beim kolorektalen Karzinom sein können.

5.3 Ausblick

Diese Arbeit zeigt durch zwei verschiedene Herangehensweisen auf, wie individuelle tumorassoziierte Antigene bei Krebspatienten identifiziert werden können.

Die PF2D-Analyse mit anschließender Massenspektrometrie ermöglicht, unvoreingenommen zu überprüfen, gegen welche Proteine die T-Zell-Antwort tatsächlich gerichtet ist. Die Sequenzanalyse zeigt darüber hinaus, welche mutationsspezifischen Antigene bei jedem Patienten eine Rolle spielen könnten. Da die Kosten für viele Techniken, beispielsweise die komplette Genomanalyse, weiter sinken, könnten in Zukunft beide Verfahren kombiniert und standardmäßig angewandt werden. Einem Patienten würde dann nach Möglichkeit, beispielsweise bei der Operation zur Resektion, Gewebe von Primärtumor und Metastase entnommen. Aus den Geweben würden dann die Krebsstammzellen isoliert und nach Möglichkeit diese sowie die restlichen Tumorzellen zur Sequenzanalyse und für die PF2D-Methode verwendet. Wenn die Antigen-Kandidaten nach der PF2D-Analyse feststehen, würde überprüft werden, ob bei diesem Patienten speziell in diesen Proteinen und allgemein Mutationen vorliegen. Geeignete mutationsspezifische Peptide könnten dann zusammen mit den PF2D-Kandidaten zur Verifikation im ELISpot verwendet werden. Mit besonderer Beachtung der Krebsstammzellen könnte so individuell für jeden Patienten eine personalisierte Auswahl der idealen tumorassoziierten Antigene zusammengestellt werden. Somit wäre die optimale Voraussetzung für eine effektive Immuntherapie gelegt.

6 Anhang

6.1 Möglichkeiten zur Verstärkung der anti-Tumor-Immunreaktion mit Viren – Immunmonitoring einer Phase-I-Studie

Das Wissen um die Reaktivitäten der T-Zellen bei einer Krebserkrankung ist eine wichtige Grundlage für mögliche Therapien. Es stellt sich aber auch dann noch die Frage, wie das Immunsystem effektiv – und gezielt gegen den Tumor gerichtet – stimuliert werden kann. Eine bloße Stimulation der Immunreaktion ohne den spezifischen Anteil ist nicht zielführend, da dies zur Auslösung von Autoimmunkrankheiten führen kann. Somit muss bei einer potentiellen Impfung des Patienten mit stimulierenden Agenzien, auch gleichzeitig etwas beinhaltet sein, das die Tumorspezifität sicherstellt.

Diese beiden Aspekte sind in dem bei dieser Phase-I-Studie verwendeten Impfstoff vorhanden. Durch die Nutzung von autologen Tumorzellen ist die Spezifität sichergestellt. Die Stimulation des Immunsystems soll durch zwei verschiedene Mechanismen erreicht werden. Zum einen werden die autologen Tumorzellen vor der Verabreichung durch Bestrahlung abgetötet. Dies dient, neben dem Sicherheitsaspekt, auch dazu, durch die absterbenden Zellen viele stimulierende Signale freizusetzen. Eine weitere Komponente, um das Immunsystem zu aktivieren, ist der Einsatz von bi-spezifischen Antikörpern (bsAb). Diese besitzen zwei Spezifitäten, eine gegen die Tumorzelle und eine gegen T-Zellen. Damit können T-Zellen direkt mit den Tumorzellen vernetzt werden, was die Bindungsavidität erhöht. Eine Besonderheit liegt in den Spezifitäten der bi-spezifischen Antikörper. Da sich zwar jede Tumorzelle durch ihre besonderen Antigene von normalen Körperzellen unterscheidet, diese Antigene aber bei jeden Patienten individuell sind, galt es, ein Ziel-Antigen für die bi-spezifischen Antikörper zu finden, das bei jedem Patienten eingesetzt werden kann. Die Lösung lag in der Infektion der patienteneigenen Tumorzellen mit Newcastle-Disease-Viren (NDV). Durch die Infektion der Tumorzellen besitzen diese ein einzigartiges Antigen auf ihrer Oberfläche als Ziel für den Antikörper, das virale Hämagglutinin. Der zweite Arm des Antikörpers, der gegen T-Zellen gerichtet ist, hatte CD28 als Zielstruktur. Dadurch wird die T-Zelle nicht nur mit der Tumorzelle vernetzt, sondern erhält auch noch einen hilfreiches co-stimulierendes Signal.

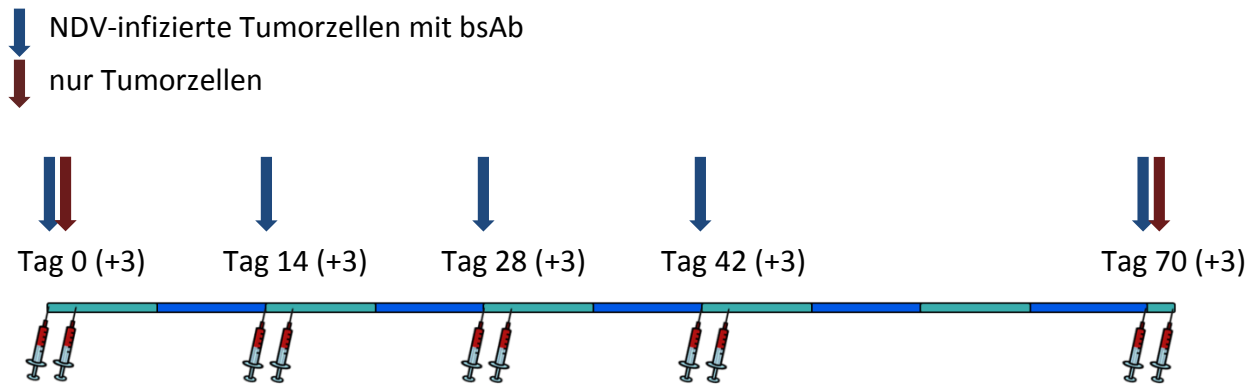


Abbildung 23

Schematische Darstellung des Impfprotokolls. Die Patienten erhielten 4 Impfungen im Abstand von jeweils 14 Tagen und eine letzte, 5. Impfung, nach insgesamt 70 Tagen. Jede Impfung erfolgte mit bestrahlten autologen Tumorzellen, die mit NDV infiziert und mit bispezifischen Antikörpern bedeckt waren. Bei der ersten und fünften Impfung wurden zusätzlich noch weitere bestrahlte Tumorzellen, ohne NDV Infektion und bsAb, als Antigenquelle verabreicht. Jeweils direkt vor der Impfung, sowie drei Tage nach der Impfung wurde Blut abgenommen um die Immunreaktion zu verfolgen.

Die Patienten erhielten insgesamt fünf Impfungen nach dem Schema in Abbildung 23. Bei der ersten und der letzten Impfung wurden zusätzlich zu den Tumorzellen mit den bispezifischen Antikörpern auch noch nur bestrahlte Tumorzellen als zusätzliche Antigenquelle verabreicht.

6.1.1 Auswirkung der Impfung auf die Aktivität des Immunsystems

Zur Kontrolle der Immunreaktion während der Impfung wurden den Patienten jeweils direkt vor der Impfung und drei Tage später peripheres Blut abgenommen. Mit den daraus gewonnenen Zellen wurden ELISpot-Analysen durchgeführt und die Reaktion der T-Zellen auf bekannte Tumorantigene wie auch auf autologes Tumorlysat untersucht. Obwohl die Phase-I-Studie vor allem die Untersuchung der Sicherheit der Impfung als Zweck hat, lassen sich eindeutige Auswirkungen auf das Immunsystem feststellen.

Wie in Abbildung 24A zu sehen ist, erhöht sich die relative Anzahl antigenspezifischer T-Zellen im Blut, wenn man jeweils die Zeitpunkte vor der Impfung und direkt nach der Impfung vergleicht. Dieser Anstieg der spezifischen T-Zellen ist direkt nach der allerersten

Impfung am stärksten. Abbildung 24B zeigt den hochsignifikanten Anstieg der T-Zellen im peripheren Blut der Patienten von Tag 0 auf Tag 3.

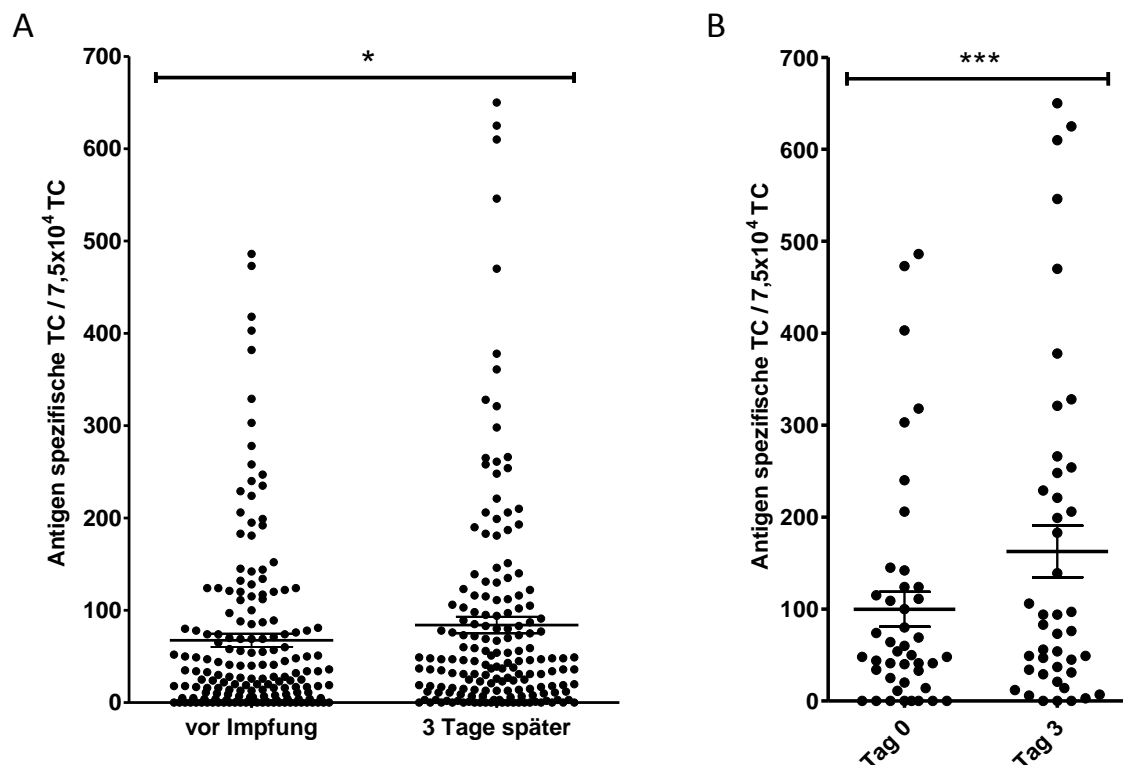


Abbildung 24

Die Frequenz antigenspezifischer T-Zellen aus peripherem Blut vor allen Impfungen im Vergleich zu 3 Tagen nach den Impfungen (A) und die Veränderung der Frequenzen als Effekt der 1. Impfung von Tag 0 auf Tag 3 (B). Jeder Punkt in der Grafik entspricht der Anzahl spezifischer T-Zellen je $7,5 \times 10^4$ T-Zellen.

*** $P < 0,0005$; * $P < 0,05$ (zweiseitiger Student-t Test)

Neben der T-Zell-Antwort ist auch die Verfolgung der humoralen Immunantwort interessant. Die Induktion von spezifischen Antikörpern gegen Oberflächenproteine von Tumorzellen kann die natürliche Immunität gegen den Tumor z.B. über antikörper-vermittelte Zytotoxizität unterstützen. Andererseits ist eine Dominanz der humoralen Immunantwort dann nachteilig wenn dadurch die zytotoxische T-Zell-Antwort der $CD8^+$ T-Zellen unterdrückt wird.

Die Untersuchung von spezifischen Antikörpern gegen drei verschiedene tumorassoziierte Antigene zeigt ein gemischtes Bild. Antikörper gegen p53 (Abb. 25A) sind vor den Impfungen in sechs Patienten nachweisbar. Nach den Impfungen zeigen drei Patienten einen Anstieg

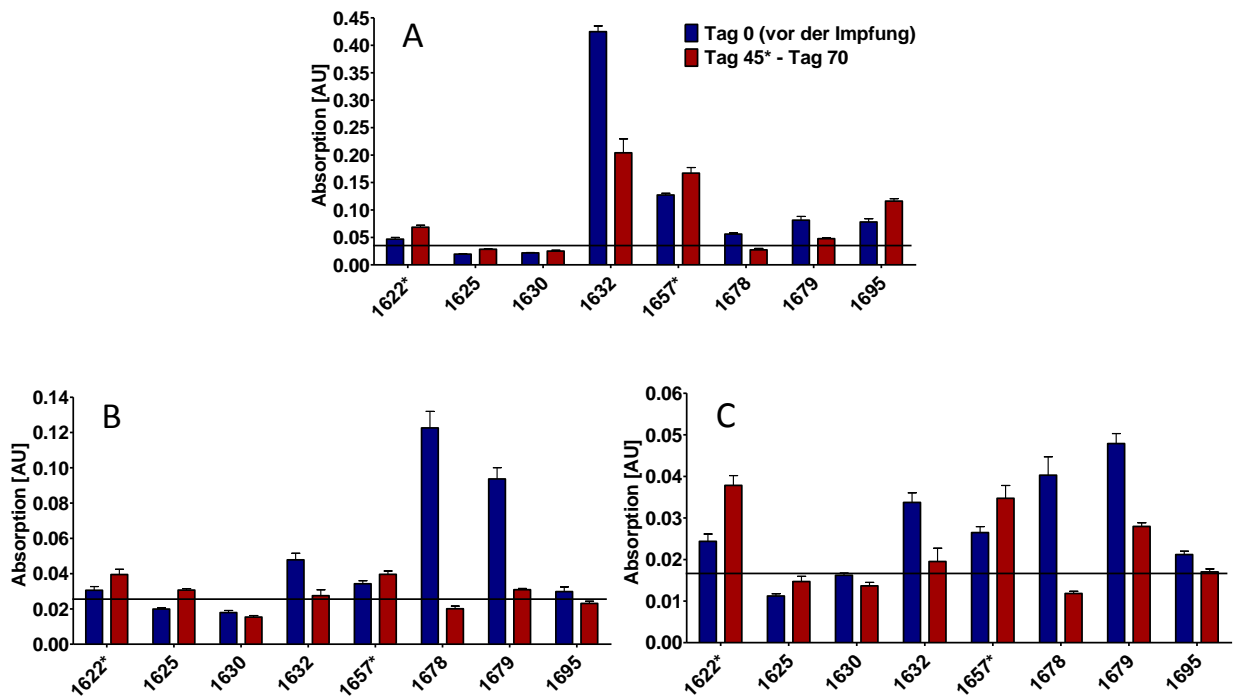


Abbildung 25

GST-ELISA zur Bestimmung der relativen Menge von Antikörpern aus peripherem Blut. Im Vergleich zu sehen sind Antikörper vor Beginn der Impfungen (blaue Balken) und gegen Ende der Impfungen (rote Balken) gegen p53 (A), Survivin (B) und Mage-3 (C). Die durchgezogene Linie markiert die Grenze zum unspezifischen Hintergrund.

der Antikörper-Titer und ebenfalls drei einen, zum Teil sehr deutlichen, Abfall des Titers. Bei Survivin (Abb. 25B) zeigt sich ein ähnliches Bild auch wenn hier die Abnahme der Titer zu überwiegen scheint. Bei den Antikörpern gegen Mage-3 überwiegt ebenfalls der Rückgang der spezifischen Antikörper. Vier von sechs Patienten zeigen einen deutlichen Abfall der Titer, bei zwei Patienten ist eine Zunahme erkennbar.

6.1.2 Zusammenhang der T-Zell-Reaktivität gegenüber autologem Tumorlysat und gegenüber synthetischen Peptiden

Für die Beurteilung des Erfolgs einer Impfung ist die vorangegangene Betrachtung der kumulativen Daten sehr wichtig. Aber auch von den individuellen Verläufen der Immunreaktionen einzelner Patienten lassen sich wichtige Erkenntnisse gewinnen. Besonders interessant ist ein Blick auf die T-Zell-Antworten gegenüber autologem

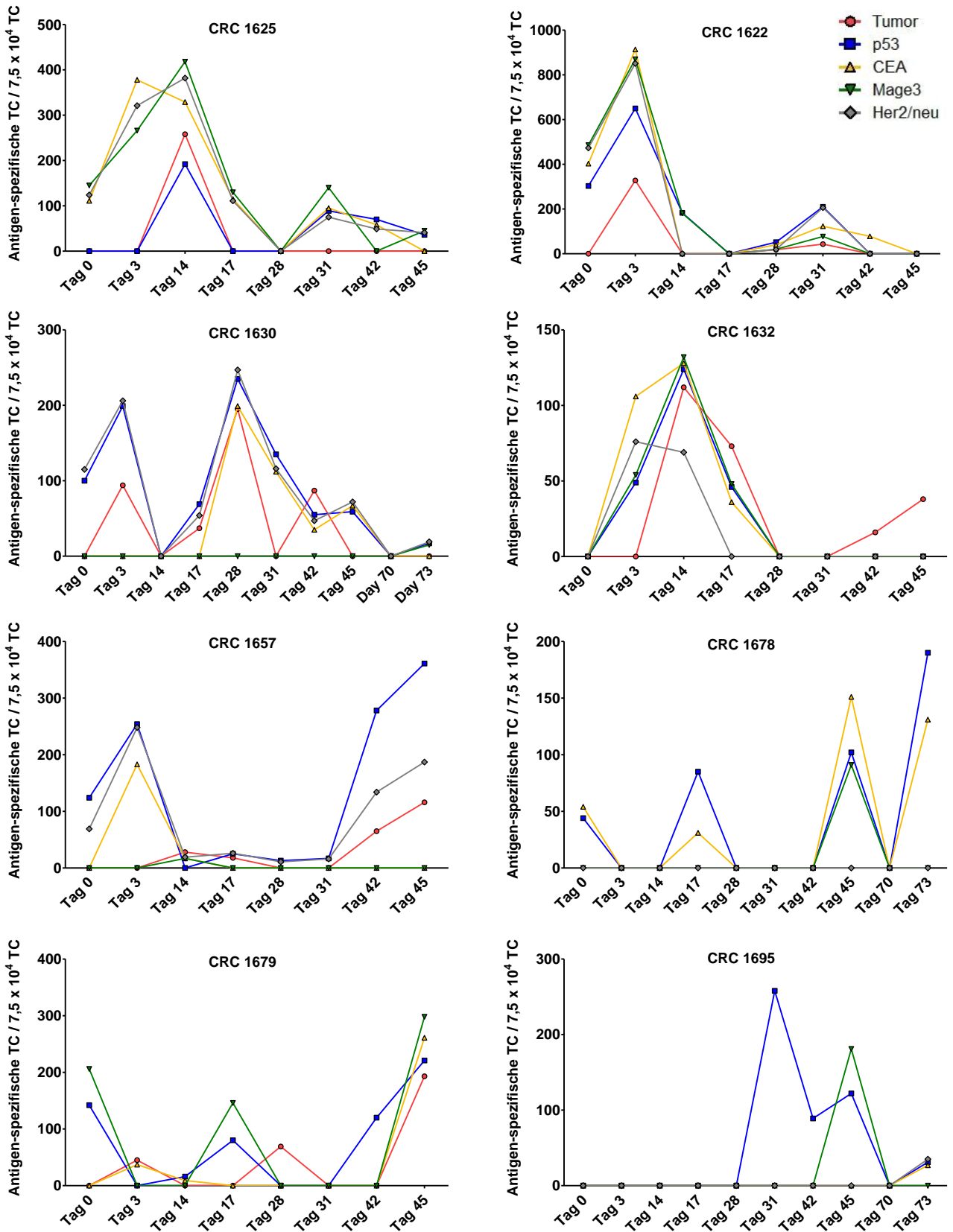


Abbildung 26

Die individuellen Verläufe der Frequenzen antigenspezifischer T-Zellen im peripheren Blut der verschiedenen Patienten. Jeder Punkt in der Grafik entspricht der Anzahl spezifischer T-Zellen je $7,5 \times 10^4$ T-Zellen gegen autologes Tumorlysate (rot) oder synthetische Antigene (farbig). Bei den Patienten 1695 und 1678 konnte kein Tumorlysate getestet werden.

Tumorlysat im Vergleich mit synthetischen Peptiden bekannter tumorassoziierter Antigene: Mage-3, p53, Her2/neu und CEA.

Ein erster Blick zeigt, dass es teilweise sehr unterschiedliche Verläufe der T-Zell-Reaktivität bei den einzelnen Patienten gibt (Abb. 26). So reagieren einige Patienten, wie beispielsweise Patient 1632, im gesamten Verlauf auf alle eingesetzten Peptide sowie auf das autologe Tumorlysat. Die T-Zell-Reaktivität anderer Patienten ist dagegen zum Teil deutlich begrenzter. Bei Patient 1695 beispielsweise reagieren die T-Zellen an neun von zehn getesteten Zeitpunkten nur gegen zwei Antigene. Autologes Tumorlysat konnte bei diesem Patienten und bei Patient 1678 jedoch nicht getestet werden. Auffällig ist auch, dass am Tag 0, das bedeutet vor Beginn der Impfungen, bei keinem der Patienten genug T-Zellen im peripheren Blut vorhanden war, um eine signifikante T-Zell-Antwort auszulösen. Dies war bei keinem der verwendeten TAA der Fall. Das p53-Peptid wurde von 62,5 % der Patienten an Tag 0 erkannt. Her2/neu bei 50 % der Patienten und CEA und Mage-3 immerhin noch bei 37,5 % aller Patienten. Das autologe Tumorlysat jedoch bei keinem der Patienten (0 %).

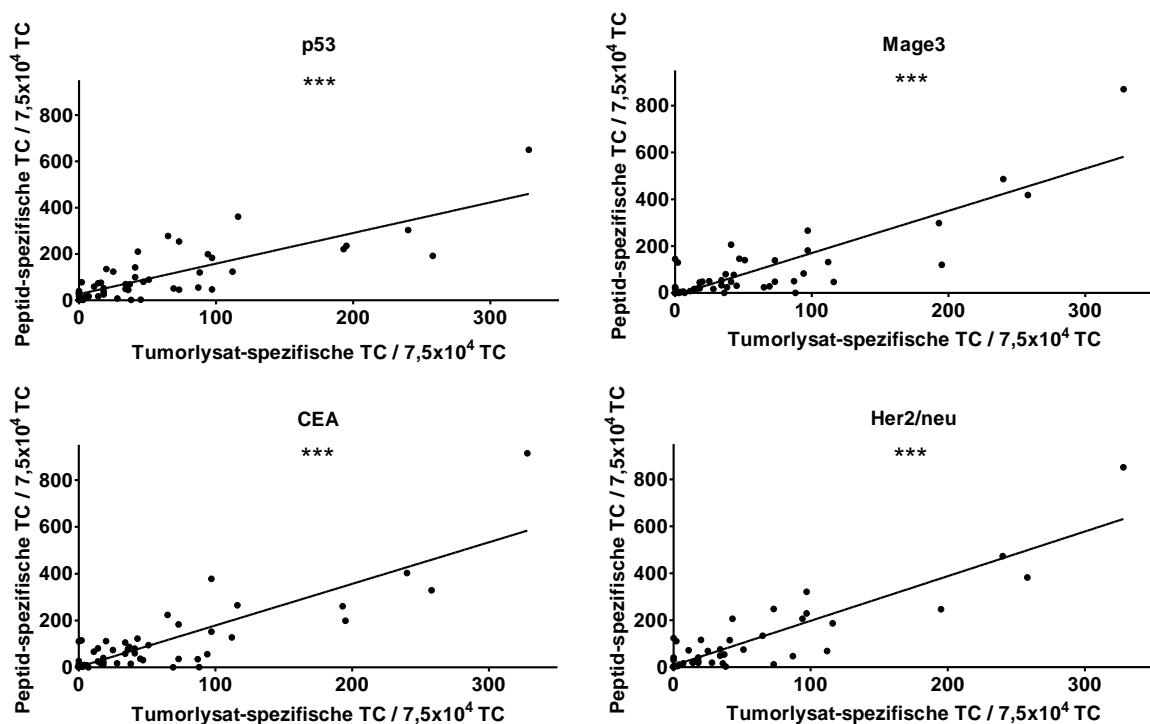


Abbildung 27

Korrelation der spezifischen T-Zellen im peripheren Blut gegen Peptide bekannter TAA (y-Achse) und gegen autologes Tumorlysat (x-Achse). Jeder Punkt in der Grafik entspricht der Anzahl spezifischer T-Zellen je $7,5 \times 10^4$ T-Zellen.

*** P < 0,0005 (zweiseitiger P-Wert bei Pearson's Correlation Test)

Ebenfalls auffällig ist das synchrone Verhalten der T-Zell-Reaktivität gegenüber vielen Antigenen wie auch dem Tumorlysat. Ein Anstieg in der Reaktivität gegenüber den Peptiden ist auch häufig mit einem Anstieg der Reaktivität gegen das Tumorlysat verbunden. Diese positive Korrelation ist äußerst signifikant für alle Peptide (Abb. 27). Außerdem ist bei vielen Patienten auch ein spezielles Muster des Verlaufs erkennbar (Abb. 26). Vor der Impfung an Tag 0 besitzen, wie bereits angesprochen, viele Patienten bereits T-Zellen im peripheren Blut, die auf TAA jedoch nicht auf Tumorlysat reagieren. Nach der ersten Impfung an Tag 0 steigt die Anzahl der antigenspezifischen T-Zellen in den folgenden Tagen deutlich an, was auch in jedem getesteten Fall zu einer Reaktivität gegenüber dem Tumorlysat an Tag 3 oder Tag 14 führt. Die Anzahl der reaktiven T-Zellen, sowohl gegenüber den Peptiden als auch gegenüber dem Tumorlysat, erreicht dann einen ersten Höhepunkt. In den folgenden Tagen und Wochen nimmt die Anzahl der T-Zellen wieder ab und ist teilweise nicht mehr nachweisbar. Kurz darauf kommt es jedoch bei allen Patienten zu einem erneuten Anstieg der T-Zell-Zahlen im peripheren Blut, was bei manchen Patienten zu einer zweiten Welle führt, die wieder abnimmt, und bei anderen Patienten bis zum Ende der Testperiode stark ansteigt. Bei einigen Patienten erreicht auch die Zahl der T-Zellen, die gegen das Tumorlysat reagieren hier ihren Höhepunkt.

6.2 Eine detaillierte Betrachtung der 21 neu identifizierten TAA

Auch wenn für die Funktion als tumorassoziiertes Antigen, die genaue Funktion eines Proteins nur zweitrangig erscheint, gebietet nicht nur die wissenschaftliche Neugier eine detailliertere Betrachtung. Durch die Funktion lassen sich möglicherweise auch Rückschlüsse auf die Tumorentwicklung und die metastatische Kaskade ziehen. Zuerst soll mit der Betrachtung von sieben Proteinen begonnen werden, die potentiell als Tumor-Suppressoren wirken können.

BUB3 ist Bestandteil des SAC-Komplexes (*spindle assembly checkpoint*), der in der Zelle während der Zellteilung die korrekte Ausbildung des Spindelapparats überwacht (Tomasini et al. 2009). BUB3 wird dabei für das korrekte Anheften der Microtubuli an die Kinetochore benötigt (Logarinho et al. 2008). Kommt es nicht zu einem korrekten Anheften der Microtubuli oder treten sonstige Fehler beim Segregieren der Chromosomen auf, wirkt BUB3

als Mediator, der den Caspase-unabhängigen mitotischen Zelltod (CIMD) einleitet (Niikura et al. 2010).

Schon länger ist bekannt, dass die gezielte Einnahme von Selen über die Nahrung die Entstehung von kolorekalen Karzinomen schützt (Feng et al. 1999). Das Selen-bindenden Protein *Selenium-binding protein 1* ist in gesundem Darmgewebe hoch exprimiert und in späten Stadien des kolorektalen Karzinoms reduziert, was gleichzeitig mit einer schlechten Prognose einhergeht (Kim et al. 2006; Li et al. 2008). Außerdem erhöhen genetische Varianten des Proteins das Risiko für kolorekale Tumore (Meplan et al. 2010). Erst kürzlich wurde vermutlich die dahinterliegende physiologische Ursache entdeckt. Selen-bindende Proteine aktivieren die DNA-Reparaturantwort und wirken so Mutationen entgegen (Qi et al. 2010).

Transgelin (auch als SM22 bekannt) ist ein Protein, das hauptsächlich in der glatten Muskulatur vorkommt (Thweatt et al. 1992). Nair et al. konnten zeigen, dass Transgelin ein Repressor der Matrix-Metalloprotease 9 (MMP-9) ist. So reduziert eine Überexpression von Transgelin die Menge von MMP-9 in der Zelle und verhindert, *in-vitro*, auch die Invasion von Tumorzelllinien (Nair et al. 2006). Dies geschieht über eine Inhibition des ERK1 und ERK2 Signalweges (Nair et al. 2006). Des Weiteren wirkt Transgelin auch als negativer Regulator des Androgen-Rezeptors und mindert so das Wachstum von Prostata-Tumorzellen (Yang et al. 2007).

Homeobox Prox 1 ist ein Transkriptionsfaktor, der die Proliferation epithelialer Zellen kontrolliert. In den immunhistologischen Experimenten konnten wir sehen, dass Prox1 im Tumorgewebe unregelmäßig exprimiert war (Abb. 9). Manche Zellen zeigten punktuelle Expression in den Zellkernen und andere eine sehr starke Expression auch im Zytoplasma (Abb.9). Dyer et al berichten, dass Prox 1 den Austritt von Vorläuferzellen aus dem Zellzyklus reguliert (Dyer et al. 2003). In einem Maus-Modell wurde bereits früher gezeigt, dass die Inaktivierung von Prox 1 zu abnormaler Proliferation, einer Herunterregulation der Zellzyklus-Inhibitoren Cdkn1b und Cdkn1c, einer veränderten Expression von E-cadherin sowie zu einer gestörten Apoptose führt (Wigle et al. 1999).

Plakoglobin gehört zur Familie der beta-Catenine und sorgt so für die stabile Verbindung von Zellenverbänden untereinander sowie einer Regulation der Adhäsion (Chitavet et al. 1998). Allein dadurch hat Plakoglobin eine wichtige Funktion, da in vielen Krebserkrankungen ein

Verlust der Zelladhäsion eine Bedingung für die Metastasierung der Zellen ist (Hajra und Fearon 2002). Neben der reinen physischen Verbindung hat Plakoglobin jedoch auch eine Rolle als Signalmolekül und reguliert die Genexpression. So wirkt das Protein als einer der wichtigsten Inhibitoren von c-myc als Tumorsuppressor (Williamson et al. 2006).

Interessant ist auch das sekretierte Protein Zn-alpha2GP. Es stimuliert die Lipid-Degradation in Adipozyten und spielt vermutlich auch eine wichtige Rolle bei dem extensiven Fettverlust von Patienten bei manchen Krebserkrankungen und gilt auch als Tumormarker für verschiedene Karzinome (Hassan et al. 2008). So gilt es beispielsweise als präziser Marker für das Risiko einer metastatischen Progression beim Prostata-Karzinom (Henshall et al. 2006). Neueste Studien zeigen die Funktion von Zn-alpha2GP als Tumorsuppressor: es inhibiert den TGF- β -vermittelten ERK Signalweg, der die Epitheliale-Mesenchymale-Transition (EMT) initiiert (Kong et al. 2010). Der Verlust von Zn-alpha2GP durch Deacetylierung von Histonen in Adenokarzinomzellen des Pankreas führte zu einer starken Erhöhung der Invasion, begleitet von der Umwandlung in einen mesenchymalen Zelltyp (Kong et al. 2010). Rekombinantes Zn-alpha2GP verhinderte hingegen diese morphologischen Veränderungen durch eine Blockade der ERK2-Phosphorylierung (Kong et al. 2010).

Mit Caspase 14 konnten wir auch ein recht bekanntes Protein als neues tumorassoziiertes Antigen identifizieren. Caspase 14 gehört zur den Proteasen, die hauptsächlich bei Entzündungsreaktionen und der Apoptose beteiligt sind (Denecker et al. 2008). Neuere Studien zeigen aber auch eine Beteiligung an der Proliferation und Differenzierung von Zellen (Denecker et al. 2008). Zwar wurde Caspase 14 bisher nicht als TAA angesehen, jedoch ist das Gen in gastrointestinalen Tumoren häufig von Mutationen betroffen, welche in der Folge zu einer Veränderung der apoptotischen Funktion führen können (Kim et al. 2009).

Im Gegensatz zu diesen sieben Proteinen, die in ihrer physiologischen Funktion dem Tumorwachstum entgegenstehen, befinden sich unter den 21 neu identifizierten tumorassoziierten Antigenen auch Proteine, die durch ihre Funktion das Tumorwachstum direkt oder indirekt fördern können (Abb.11).

Das Protein hnRNP A1 (*Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1*), ist ein Transportprotein, das mRNA aus dem Zellkern ins Zytoplasma zu den Ribosomen transportiert und über die Kontrolle des mRNA Metabolismus zur Steuerung der Gen-

Expression beiträgt (Cammass et al. 2007). Außerdem kann hnRNP A1 auch an bestimmte DNA-Bereiche binden und so Einfluss auf die Genexpression nehmen. So bindet es beispielsweise spezifisch und mit hoher Affinität im Bereich des Kras-Promotors (Paramasivam et al. 2009). Die Translation des hnRNP A1 Proteins wird durch c-Myc stark erhöht, wodurch es in vielen Krebszellen überexprimiert ist (David et al. 2010). Die großen Mengen von hnRNP A1 führen, über alternatives Splicing, zu einer Erhöhung der Menge der Pyruvat-Kinase PKM2, welche wiederum die Energie-Gewinnung über aerobe Glykolyse erlaubt, was für das Wachstum von Tumorzellen sehr förderlich ist (David et al. 2010). Indirekt scheint also hnRNP A1 das Tumorwachstum zu unterstützen.

Der eukaryotische Translation-Elongationsfaktor 1 (EF1) besteht aus vier Untereinheiten, von denen zwei, EF1-alpha und EF1-gamma, als neue tumorassoziierte Antigene identifiziert werden konnten (Abb. 3). Der Translation-Elongationsfaktor EF 1 spielt eine Schlüsselrolle bei der Proteintranslation (Abbott und Proud 2004). Die am besten charakterisierte Untereinheit ist EF1-alpha. Neben seiner Funktion bei der Übersetzung von mRNA in Aminosäuresequenzen, interagiert das Protein auch mit dem Zytoskelett (Condeelis 1995), und spielt ebenso eine Rolle bei Apoptose und Zellproliferation. So schützt eine Überexpression von EF1-alpha vor Caspasen-induzierter Apoptose und das Fehlen von EF1-alpha führt zu erhöhter Apoptose (Potter et al. 1998). Des Weiteren schützt es vor Apoptose nach Interleukin-3-Entzug (Talapatra et al. 2002) und die Überexpression führt zu einer Resistenz gegenüber Cisplatin in humanen Zelllinien von Kopf-Hals-Karzinomen (Johnsson et al. 2000). Die Menge an EF1-alpha im Zytoplasma korreliert direkt mit der Zellzyklus-Rate (Cavallius et al. 1986; Duttaroy et al. 1998; Grassi et al. 2007). Durch diese Eigenschaften gilt es als Onkogen beim Ovarialkarzinom (Anand et al. 2002). In kolorektalen Karzinomen ist EF1-alpha häufig überexprimiert (Schlegel et al. 1995). Interessanterweise wird über eine verkürzte Splice-Variante von EF1-alpha berichtet, die als Suppressor des Zervixkarzinoms gilt, da diese Form des Proteins Apoptose induziert (Rho et al. 2006). Über die Untereinheit EF1-gamma ist deutlich weniger bekannt. So wird berichtet, dass dieses Protein, zusammen mit anderen Untereinheiten, in Zellen des Pankreaskarzinoms stark hochreguliert ist (Lew et al. 1992). Die genaue Funktion dieser Untereinheit ist bisher nicht bekannt.

Über die physiologische Funktion des Proteins AGR2 (*Anterior gradient protein 2 homolog*) war lange Zeit sehr wenig bekannt. Neuere Ergebnisse bringen es mit der Mucus-Produktion

im Darm in Verbindung (Park et al. 2009). In der Krebsforschung ist das AGR2-Protein jedoch schon länger bekannt. So wurde 1998 gezeigt, dass AGR2 bei Brustkrebs mit dem Östrogen-Rezeptor co-exprimiert ist (Thompson und Weigel 1998). Später fand man AGR2 auch in anderen Tumorarten überexprimiert, beispielsweise beim Prostatakarzinom (Zhang et al. 2005), Pankreaskarzinom (Ramachandran et al. 2008), bei Brust- und Eierstockkrebs (Barraclough et al. 2009; Park et al. 2011). AGR2 führt zu einer erhöhten Proliferation und einer verstärkten Invasion von Pankreas-Tumorzellen *in vitro* und das Ausschalten von AGR2 über si-RNA zu einem reduzierten Tumorwachstum *in vivo* sowie einem verbesserten Ansprechen auf Gemcitabine (Ramachandran et al. 2008). Auch in Zelllinien des Ovarialkarzinoms erhöhte AGR2 die Proliferation und die Migration der Zellen (Park et al. 2011). Diese Effekte sind wohl auf vielfältige Funktionen von AGR2 zurückzuführen. So induziert die Überexpression von AGR2 das Zellzyklusprotein Cyclin D1. Die Reduktion über si-RNA führte zu erhöhter Apoptose in vier verschiedenen Brustkrebszelllinien und verminderte auch die Menge an Survivin und c-Myc in den Zellen (Vanderlaag et al. 2010). Neueste Forschungen zeigen auch, dass AGR2 in Verbindung mit einem weiteren neu identifizierten TAA steht: Cathepsin B. Dumartin et al. konnten nachweisen, dass AGR2 eine Vielzahl zellulärer Proteine hochreguliert, darunter die Cathepsine, und dass die Menge von AGR2 proportional zur und essentiell für die Fähigkeit zur Invasion von Pankreas-Tumorzellen ist (Dumartin et al. 2011).

Das gerade angesprochene Cathepsin B wurde ebenfalls als neues tumorassoziiertes Antigen identifiziert. Diese Cystein-Protease besitzt durch seine enzymatischen Funktionen die Fähigkeit positiv wie auch negativ auf das Tumorwachstum zu wirken. So kann Cathepsin B die Apoptose in Tumorzellen einleiten und ist auch für die Generation von Peptiden für MHC-Klasse-II Moleküle von Bedeutung (Conus und Simon 2008). Andererseits gilt Cathepsin B als schlechter prognostischer Faktor bei pankreatischen Adenokarzinomen, da er mit dem Tumorstadium sowie der lymphatischen Invasion korreliert (Niedergethmann et al. 2004). Beim kolorektalen Karzinom ist Cathepsin B durchschnittlich 3,7-fach erhöht und wird auch von umgebenden Stromazellen exprimiert (Hirai et al. 1999). Auch hier gibt es starke Hinweise darauf, dass Cathepsin B sowohl in frühen Stadien bei der lokalen Invasion als auch in späteren Phasen bei der Ausbildung von Fernmetastasen mitwirkt (Hirai et al. 1999).

Annexin A2 ist ein Calcium-abhängiges phospholipidbindendes Protein, das in zahlreichen Zelltypen vorkommt. Das Protein ist in vielen Tumortypen, wie Brust-, Leber-, Prostata- und Pankreaskarzinom, hochreguliert (Vishwanatha et al. 1993; Sharma et al. 2006; Mohammad et al. 2008; Inokuchi et al. 2009). Auch beim kolorektalen Karzinom ist Annexin A2 stark erhöht und korreliert mit einer erhöhten Tumorstufe (Duncan et al. 2008). Annexin A2 hat vielfältige Funktionen bei der Regulation zellulärer Funktionen. So wurde in mehreren Tumorarten, darunter auch kolorektale Tumore, gezeigt, dass Annexin A2 im Zusammenspiel mit weiteren Proteinen an der Zellmembran co-lokalisiert ist und zu einem Abbau der extrazellulären Matrix beiträgt (Puisieux et al. 1996; Mai et al. 2000; Lokman et al. 2011). Dies führt auch zu einer erhöhten Fähigkeit zur Invasion bei unterschiedlichen Tumorarten (Ohno et al. 2009; Zheng et al. 2011).

Fibronectin wurde bereits 1980 als Tumormarker im Urin für Prostatakrebs-Patienten vorgeschlagen (Webb und Lin 1980). In den nächsten Jahren wurden auch erhöhte Fibronectin-Werte im Serum von Patienten mit Brustkrebs, akuten Leukämien und kolorektalen Tumoren festgestellt, wobei sich Fibronectin jedoch nicht als Marker durchsetzte (Choate und Mosher 1983). In den 1990er Jahren wurde diskutiert, ob das Fibronectin immunsuppressiv wirkt oder die Proliferation von T-Zellen verstärkt und auf diese Weise Einfluss auf das Tumorwachstum nimmt (Olt et al. 1992; Mizobata et al. 1996). Erst später wurden nach und nach die zellulären Wirkungen von Fibronectin bekannt. So zeigte sich, dass Fibronectin den Signalweg von Proteinkinase C aktiviert (Margolis et al. 1996). Kurze Zeit danach wurde entdeckt, dass Fibronectin zur Sekretion von Matrix-Metalloprotease 9 (MMP-9) und damit zu einer verstärkten Invasion bei Zelllinien von Ovarialtumoren führt (Shibata et al. 1997). In den nächsten Jahren wurden die zugrundeliegenden Signalwege zunehmend aufgedeckt (Thant et al. 2000; Mukai et al. 2002). Dabei zeigte sich auch, dass Fibronectin nicht nur über die MMP-9 Expression das Tumorwachstum fördert, sondern auch direkt über den Akt-Survivin-Signalweg Tumorzellen vor induzierter Apoptose schützt (Fornaro et al. 2003). Auch bei kolorektalen Tumoren ist Fibronectin überexprimiert und korreliert deutlich mit dem Fortschreiten der Krebserkrankung (Saito et al. 2008). Auch hier erhöht Fibronectin die Migration und Invasion der Tumorzellen (Ding et al. 2008; Wei et al. 2011).

LPP bekam seinen Namen, *Lipoma preferred partner*, durch die Beobachtung, dass LPP häufig Fusionsproteine bei Lipomen ausbildet (Petit et al. 1996). Zuerst wurde eine Beteiligung von LPP bei benignen Tumoren beschrieben (Petit et al. 1996; Lemke et al. 2001), später jedoch auch bei malignen Erkrankungen wie Sarkomen, Lungenkarzinomen und Leukämien (Daheron et al. 2001; Grunewald et al. 2009). LPP wurde als ein Shuttle-Protein beschrieben, das zwischen Punkten der Zelladhäsion und dem Zellkern wandert, Teil der Signaltransduktion ist und auch die Transkription aktivieren kann (Petit et al. 2000). Außerdem interagiert LPP mit dem Shuttle-Protein Zyxin und dem Tumorsuppressor Scrib (Petit et al. 2005). Bei Muskelzellen der glatten Muskulatur ist LPP an der Reorganisation des Zytoskeletts bei der Migration der Zellen beteiligt (Majesky 2006). Aufgrund der Formation von onkogenen Fusionsproteinen in vielen Tumoren und der Tatsache, dass bei einer LPP Überexpression der LPP-Signalweg onkogene Signale an den Zellkern übermittelt, wurde LPP 2009 als Protoonkogen eingestuft (Grunewald et al. 2009).

Unter den 21 neu identifizierten tumorassoziierten Antigenen befinden sich neben den bereits besprochenen Proteinen, die entweder einen gewissen Schutz vor der Tumorentwicklung bieten oder aber das Tumorwachstum tendenziell fördern, eine dritte interessante Gruppe: Proteine, die das Immunsystem beeinflussen (Abb. 11). Dazu zählen S100A7, S100A9 und der nukleare Co-Repressor KAP-1.

Die S100-Familie besteht aus mehr als 20 Proteinen, die alle zumindest ein Ca^{2+} -bindendes EF-Hand-Motiv besitzen. Alle Proteine dieser Familie erfüllen vielfältige Aufgaben in der Zelle. Bei unseren Analysen sind zwei Vertreter dieser Familie als neue tumorassoziierte Antigene charakterisiert worden: S100A7 und S100A9. S100A7, auch Psoriasin genannt, wurde als chemotaktisches Protein beschrieben, aber seine genaue Funktion ist noch nicht gut verstanden (Jinquan et al. 1996). Psoriasin ist in einigen Tumoren, darunter in Brust- und Blasen Tumoren sowie in epithelialen Hauttumoren, überexprimiert (Moubayed et al. 2007). Seine chemotaktische Funktion gegenüber Leukozyten übt Psoriasin über die Bindung an RAGE-Rezeptoren (*receptor for advanced glycation end products*) aus (Wolf et al. 2008). Darüber hinaus induziert Psoriasin die Expression von Genen, die für die MHC-Klasse-II-Rezeptoren, die Antigen-Prozessierung und -Präsentation sowie die Immunzellaktivierung wichtig sind (Mandal et al. 2007). Neben den chemotaktischen Funktionen wird Psoriasin

auch eine Rolle bei der Abwehr gegen Bakterien und Einfluss auf die Zellvitalität zugesprochen (Emberley et al. 2005; Lee und Eckert 2007). Über das zweite Protein der Familie, S100A9, ist ähnlich wenig bekannt. In kolorektalen Tumoren ist S100A9 überexprimiert und könnte als serologischer Marker dienen (Kim et al. 2009). Genau wie für Psoriasin wurde auch bei S100A9 chemotaktisches Potential, vor allem für neutrophile Granulozyten sowie Monozyten, nachgewiesen (Ryckman et al. 2003). Dies könnte zu einer Akkumulation von myeloiden Suppressorzellen im Tumorgewebe führen und dadurch die Immunreaktion gegen den Tumor erschweren (Cheng et al. 2008).

KAP-1, das über seine KRAB-Domäne (*Krüppel associated box*-Domäne) an DNA binden kann, ist ein universaler Co-Repressor, der auch das Immunsystem beeinflusst (Friedman et al. 1996). So wurde gezeigt, dass KAP-1 die Transkription von STAT-Proteinen (*Signal transducers and activators of transcription*) reguliert, die bei der Immunantwort eine wichtige Rolle spielen (Tsuruma et al. 2008). Dadurch ist KAP-1 in der Lage, beispielsweise die Interferon-Antwort zu hemmen (Kamitani et al. 2008).

Ein Protein, das in keine der drei oben beschriebenen Kategorien eingeordnet werden kann, ist Sorcin, da es weder das Tumorstadium fördert noch hemmt und auch keine Verbindung zum Immunsystem aufweist. Als physiologische Rolle des Calcium-bindenden Proteins wird eine Regulation der Calcium-Homöostase in der Herzmuskulatur beschrieben (Farrell et al. 2003; Meyers et al. 2003). Dennoch wurde Sorcin bereits in den 1980er Jahren in Verbindung mit Multi-Resistenzen bei Tumorzellen entdeckt (Van der Bliek et al. 1988). In den nächsten Jahren wurde nachgewiesen, dass Sorcin in verschiedenen weiteren Tumorarten, darunter bei Leukämien, bei Eierstock- und Brustkrebs, beim nicht-kleinzellige Lungenkarzinom, bei Magenkarzinomen und auch beim kolorektalen Karzinom für die Resistenz gegen verschiedene Zytostatika verantwortlich ist (Parekh et al. 2002; Zhou et al. 2006; Qu et al. 2010; He et al. 2011; Maddalena et al. 2011). Ein Teil dieses Effekts ist vermutlich auf eine anti-apoptotische Wirkung von Sorcin im Verbund mit TRAP1 zurückzuführen (Landriscina et al. 2010). Des Weiteren sorgt eine Isoform von Sorcin für eine Akkumulation von Calcium im Endoplasmatischen Retikulum von kolorektalen Tumorzellen, was zu einer Verminderung des Zellstress und einer Resistenz gegenüber 5-Fluorouracil, Oxaliplatin und Irinotecan führt (Maddalena et al. 2011). Eine Herunterregulation von Sorcin

fürte dagegen zu einer verbesserten Wirkung der Medikamente und zu einer Aktivierung von Caspase-3, Caspase-12, und GRP78/BiP, was zu einer Auslösung der Apoptose durch den mitochondrialen Signalweg führte (Maddalena et al. 2011).

Den Abschluss der neu entdeckten tumorassoziierten Antigene bilden Proteine, die keine bekannten oder noch unklare Assoziationen zu Krebserkrankungen oder dem Immunsystem aufweisen: die ATP-Synthase und ERp44.

Die ATP-Synthase ist für die aerobe Energiegewinnung der Zelle essentiell. Tumorzellen nutzen jedoch häufig anaerobe Mechanismen zur Gewinnung von ATP, was bereits 1927 dem deutschen Arzt Otto Warburg aufgefallen war und zur Formulierung der Warburg-Hypothese führte (Warburg et al. 1927). Auch heute noch gilt eine Veränderung des bioenergetischen Phänotyps als wichtiges Merkmal von Krebserkrankungen (Isidoro et al. 2004). In diesem Zusammenhang wird auch über die Funktion der ATP-Synthase diskutiert. So wird eine Rolle der ATP-Synthase bei der Auslösung der Apoptose oder der Resistenz gegenüber 5-Floururacil vermutet (Comelli et al. 2003; Shin et al. 2005). Außerdem gibt es Hinweise auf eine Korrelation der Expression der ATP-Synthase und der Mutationshäufigkeit von p53 sowie genomischer Instabilität (Seth et al. 2009).

ERp44 ist bisher nur sehr rudimentär charakterisiert. Das Protein ist im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert und übernimmt Funktionen bei der Faltung von Proteinen (Anelli et al. 2002). Darüber hinaus ist ERp44 auch für die Regulation der Sekretion von Proteinen, der Redox-Regulation und der Signalweiterleitung über Ca^{2+} beteiligt (Cortini und Sitia 2010). Eine Verbindung zu Krebserkrankungen ist bisher nicht bekannt.

6.3 Übersicht über die ELISpot-Reaktivität und die Ergebnisse der Sequenzanalyse

Abbildung 28 (untenstehend)

Übersicht über die ELISpot-Reaktivität sowie die Ergebnisse der Sequenzanalyse. Links oben steht jeweils die Patientenummer und der Hinweis ob Periphers Blut (PB) und/oder Knochenmark (BM) Quelle der T-Zellen war. In der Tabelle steht das Kürzel dann jeweils für ein signifikantes Ergebnis im ELISpot. Außerdem ist links oben angegeben ob Primärtumor (Tu) und/oder Lebermetastasen (LM) sequenziell untersucht wurden. In der Tabelle ist das Sequenzierergebnis jeweils als Text oder Aminosäureaustausch angegeben.

1616 PB				1619 BM				1620 PB+BM				1621 PB+BM			
Tu		ELISpot reactivity	Sequence analysis	Tu		ELISpot reactivity	Sequence analysis	Met+Met		ELISpot reactivity	Sequence analysis	Tu		ELISpot reactivity	Sequence analysis
<u>d53 wt</u>		PB		<u>d53 wt</u>		BM	F133S (Tu)	<u>d53 wt</u>	PB+BM	PB+BM	R175H (2xMet)	<u>d53 wt</u>		PB+BM	
R175H	/			R175H	/	BM		R175H	/			R175H	/	PB	
G245S	/			G245S	/			G245S	/			G245S	/		
R248W	/			R248W	/			R248W	/			R248W	/		
R248Q	/			R248Q	/	BM		R248Q	/			R248Q	/		
R273H	/			R273H	/			R273H	/			R273H	/		
R273C	/		R277?T	R273C	/			R273C	/			R273C	/		
R282W	/			R282W	/			R282W	/			R282W	/		
<u>Kras wt</u>				<u>Kras wt</u>		BM		<u>Kras wt</u>		BM		<u>Kras wt</u>		PB+BM	
G12D	/			G12D	/			G12D	/			G12D	/		
G12V	/			G12V	/			G12V	/			G12V	/		
G12C	/			G12C	/			G12C	/			G12C	/		
G12S	/			G12S	/			G12S	/			G12S	/		
G13D	/			G13D	/			G13D	/			G13D	/		
<u>B-raf wt</u>				<u>B-raf wt</u>		BM		<u>B-raf wt</u>		PB+BM		<u>B-raf wt</u>		PB+BM	
V600E	/			V600E	/			V600E	/			V600E	/		
1622 PB+BM				1623 PB+BM				1624 PB+BM				1625 PB+BM			
Met		ELISpot reactivity	Sequence analysis	Met		ELISpot reactivity	Sequence analysis	Met		ELISpot reactivity	Sequence analysis	Tu+Met		ELISpot reactivity	Sequence analysis
<u>d53 wt</u>		PB+BM		<u>d53 wt</u>		BM		<u>d53 wt</u>		PB+BM	Splicefehler?	<u>d53 wt</u>		PB+BM	
R175H	/			R175H	/	BM		R175H	/	PB+BM		R175H	/		
G245S	/			G245S	/			G245S	/	PB	V216?M	G245S	/		G245S (Tu+Met)
R248W	/	BM		R248W	/			R248W	/			R248W	/		
R248Q	/	PB+BM		R248Q	/			R248Q	/			R248Q	/		
R273H	/			R273H	/			R273H	/			R273H	/		
R273C	/			R273C	/			R273C	/	PB		R273C	/		
R282W	/			R282W	/			R282W	/	PB	G302E	R282W	/		
<u>Kras wt</u>		PB		<u>Kras wt</u>		BM		<u>Kras wt</u>		/		<u>Kras wt</u>		PB+BM	
G12D	/			G12D	/			G12D	/	/		G12D	/		
G12V	/			G12V	/			G12V	/	/		G12V	/		
G12C	/			G12C	/			G12C	/	/		G12C	/		
G12S	/			G12S	/			G12S	/	/		G12S	/		
G13D	/		G13D (Met)	G13D	/			G13D	/	/		G13D	/		PB
<u>B-raf wt</u>		PB+BM		<u>B-raf wt</u>		BM		<u>B-raf wt</u>		/		<u>B-raf wt</u>		PB+BM	
V600E	/			V600E	/			V600E	/	PB		V600E	/		

1678				1679				1680				1685			
Tu+Met		ELISpot reactivity	Sequence analysis	PB		ELISpot reactivity	Sequence analysis	Met		ELISpot reactivity	Sequence analysis	PB+BM		ELISpot reactivity	Sequence analysis
<u>p53 wt</u>		NA	R180C (Tu+Met) G244D (Tu)	<u>p53 wt</u>		PB	R213STOP	<u>p53 wt</u>		PB+BM	R196STOP	<u>p53 wt</u>		BM	
R175H	NA			R175H	/			R175H	/			R175H	/		
G245S	NA			G245S	/			G245S	/			G245S	/		
R248W	NA			R248W	/			R248W	PB			R248W	/		
R248Q	NA			R248Q	/			R248Q	PB			R248Q	/		
R273H	NA			R273H	/			R273H	/			R273H	/		
R273C	NA			R273C	/			R273C	/			R273C	/		
R282W	NA		G278E (Tu)	R282W	/			R282W	/			R282W	/		
<u>Kras wt</u>				<u>Kras wt</u>				<u>Kras wt</u>				<u>Kras wt</u>			
G12D	NA		G12D (Met)	G12D	/			G12D	BM			G12D	/		
G12V	NA			G12V	/		G12V					G12V	/		
G12C	NA			G12C	/			G12C	/			G12C	/		
G12S	NA			G12S	/			G12S	/			G12S	/		
G13D	NA			G13D	/			G13D	/		G13D	/			
<u>B-raf wt</u>				<u>B-raf wt</u>				<u>B-raf wt</u>				<u>B-raf wt</u>			
V600E	NA			V600E	/			V600E	BM			V600E	/		
<u>V600E</u>				<u>V600E</u>				<u>V600E</u>				<u>V600E</u>			
1686 PB+BM				1687 BM				1688 PB+BM				1689 PB+BM			
Tu		ELISpot reactivity	Sequence analysis	Tu		ELISpot reactivity	Sequence analysis	Kein Tumor		ELISpot reactivity	Sequence analysis	Tu		ELISpot reactivity	Sequence analysis
<u>p53 wt</u>		BM	Y220P	<u>p53 wt</u>		/ <th>G245S</th> <th colspan="2"><u>p53 wt</u></th> <th>PB+BM</th> <th>NA</th> <th colspan="2"><u>p53 wt</u></th> <th>PB</th> <th></th>	G245S	<u>p53 wt</u>		PB+BM	NA	<u>p53 wt</u>		PB	
R175H	/			R175H	/			R175H	/			R175H	PB		
G245S	/			G245S	/			G245S	/			G245S	/		
R248W	/			R248W	/			R248W	/			R248W	/		
R248Q	/			R248Q	/			R248Q	/			R248Q	/		
R273H	/			R273H	/			R273H	PB			R273H	PB+BM		
R273C	/			R273C	/			R273C	/			R273C	/		
R282W	/			R282W	/			R282W	/			R282W	/		R282W
<u>Kras wt</u>				<u>Kras wt</u>				<u>Kras wt</u>				<u>Kras wt</u>			
G12D	BM			G12D	/			G12D	/			G12D	/		
G12V	PB			G12V	/			G12V	/			G12V	/		
G12C	/			G12C	/			G12C	/			G12C	/		
G12S	/			G12S	BM			G12S	/			G12S	PB		
G13D	/			G13D	/			G13D	/			G13D	/		
<u>B-raf wt</u>				<u>B-raf wt</u>				<u>B-raf wt</u>				<u>B-raf wt</u>			
V600E	/			V600E	BM			V600E	/			V600E	PB		
<u>V600E</u>				<u>V600E</u>				<u>V600E</u>				<u>V600E</u>			

1692 PB+BM		ELISpot reactivity	Sequence analysis
Tu		BM	
d53 wt			
R175H	/		
G245S	/		
R248W	/		
R248Q	/		
R273H	/		
R273C	/		
R282W	/		
<hr/>			
<u>Kras wt</u>		PB+BM	
G12D	BM		
G12V	/		
G12C	BM		
G12S	/		
G13D	/		
<hr/>			
<u>B-raf wt</u>		BM	
V600E	/		

1693 PB		ELISpot reactivity	Sequence analysis
Tu		PB	P190R
d53 wt			
R175H	/		
G245S	/		
R248W	/		
R248Q	/		
R273H	/		
R273C	/		
R282W	/		
<hr/>			
<u>Kras wt</u>		/	
G12D	/		
G12V	/		
G12C	/		
G12S	/		
G13D	/		
<hr/>			
<u>B-raf wt</u>		/	
V600E	/		

7 Abkürzungsverzeichnis

(w/v)	Massenprozent zu Volumenprozent
®	registrierte Warenmarke (<i>engl. registered trade-mark</i>)
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
7-AAD	7-aminoactinomycine-D
ADCC	Antikörper-vermittelte zelluläre Zytotoxizität
AP	Alkalische Phosphatase
APC	Antigen-präsentierende Zellen <i>oder</i> Allophycocyanin
BCA	Bicinchroninsäure
BM	Knochenmark (<i>engl. bone marrow</i>)
BMMC	Knochenmark mononukleäre Zellen
B-raf	Serine/threonine-protein kinase B-raf
BSA	Bovines Serum Albumin
bsAb	bi-spezifischer Antikörper
CD	<i>engl. Cluster of Differentiation</i>
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CIMD	Caspase-unabhängigen mitotischen Zelltod
CO ₂	Kohlendioxid
CSC	Krebsstammzellen (<i>engl. cancer stem cells</i>)
CTC	zirkulierende Tumorzellen (<i>engl. circulating tumor cells</i>)
CTLA-4	Zytotoxisches T-Lymphocyten Antigen 4
Cu	Kupfer
DC	Dendritische Zelle
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Deoxyribunuclease
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Egfl7	EGF-beinhaltende Domänen-Protein 7
EGFR	Epidermaler-Wachstumsfaktor-Rezeptor

ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ELISpot	Enzyme-linked Immunospot (Assay)
EMT	epitheliale-mesenchymale Transition
EpCAM	Epitheliales Zelladhäsionsmolekül
FACS	Durchflusszytometrie (<i>engl. fluorescence activated cell sorting</i>)
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluoreszin; 2-(6-Hydroxy-3-oxo-(3H)-xanthen-9-yl)-benzoesäure
g	Einheit Gramm <i>oder</i> Schwerebeschleunigung der Erde $\approx 9,81 \text{ m/s}^2$
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Koloniestimulierender Faktor
Gy	Gray (Energiedosis für ionisierende Strahlung)
h	Stunde(n)
H ₂ O	Wasser
HA	Hämagglutinin
HE	Hämatoxylin-Eosin
Hepa(ranase)	Heparansulfat-Endoglycosidase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Her2/neu	Humaner epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor 2
HGF	Hepatozyten-Wachstumsfaktor
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
ICAM	Intrazelluläres Adhäsionsmolekül
Ig	Immunglobulin
IGF1-R	Insulin-Wachstumsfaktor-1-Rezeptor
IL	Interleukin
Kras	GTPase KRas
MACS	<i>engl. Magnetic cell separation</i>
MAGE 3	Melanoma-assoziiertes Antigen 3
MET	mesenchymale-epitheliale Transition
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
ml	Milliliter
MMP-9	Matrix-Metalloprotease 9
MUC	Mucin-1

NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NDV	Newcastle-Disease-Virus
nm	Nanometer
p53	Tumor suppressor p53
PAP	prostataspezifische saure Phosphatase
PB	Peripheres Blut
PBMC	Peripheres Blut mononukleäre Zellen
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin
PF2D	Proteinfraktionierung in zwei Dimensionen
PGF	Plazenta-Wachstumsfaktor
PI	Propidiumiodid
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SB3-10	N-decyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propane sulfonate
Survivin	Apoptosis-Inhibitor Survivin
Tag	<i>engl. Markierung</i>
TC	T-Zelle
Telomerase	Telomerase reverse Transkriptase
TFA	Trifluoressigsäure
TIC	tumorinitiierende Zellen
TIL	Tumor-infiltrierende Lymphozyten
TRAIL	TNF-verwandter Apoptose-induzierender Ligand
Treg	regulatorische T-Zelle
™	unregistrierte Warenmarke (<i>engl. unregistered trade-mark</i>)
U	Einheiten (<i>engl. Units</i>)
U/min	Umdrehungen pro Minute
UICC	Vereinigung der internationalen Krebskontrolle
VCAM	Vaskuläres Zell-Adhäsionsmolekül
VEGF	vaskulärer-endothelialer Wachstumsfaktor
wt	Wildtyp
z.T.	zum Teil

8 Referenzen

Abbott, CM and Proud, CG (2004). "Translation factors: in sickness and in health." *Trends Biochem Sci* **29**(1): 25-31.

Aigner, M, Janke, M, Lulei, M, et al. (2008). "An effective tumor vaccine optimized for costimulation via bispecific and trispecific fusion proteins." *Int J Oncol* **32**(4): 777-789.

Al-Hajj, M, Wicha, MS, Benito-Hernandez, A, et al. (2003). "Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(7): 3983-3988.

Amado, RG, Wolf, M, Peeters, M, et al. (2008). "Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer." *J Clin Oncol* **26**(10): 1626-1634.

Anand, N, Murthy, S, Amann, G, et al. (2002). "Protein elongation factor EEF1A2 is a putative oncogene in ovarian cancer." *Nat Genet* **31**(3): 301-305.

Anelli, T, Alessio, M, Mezghrani, A, et al. (2002). "ERp44, a novel endoplasmic reticulum folding assistant of the thioredoxin family." *EMBO J* **21**(4): 835-844.

Antony, PA, Piccirillo, CA, Akpinarli, A, et al. (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." *J Immunol* **174**(5): 2591-2601.

Aschele, C, Bergamo, F and Lonardi, S (2009). "Chemotherapy for operable and advanced colorectal cancer." *Cancer Treat Rev* **35**(6): 509-516.

Balkwill, F and Taylor-Papadimitriou, J (1978). "Interferon affects both G1 and S+G2 in cells stimulated from quiescence to growth." *Nature* **274**(5673): 798-800.

Banchereau, J and Palucka, AK (2005). "Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer." *Nat Rev Immunol* **5**(4): 296-306.

Barracough, DL, Platt-Higgins, A, de Silva Rudland, S, et al. (2009). "The metastasis-associated anterior gradient 2 protein is correlated with poor survival of breast cancer patients." *Am J Pathol* **175**(5): 1848-1857.

Beckhove, P, Feuerer, M, Dolenc, M, et al. (2004). "Specifically activated memory T cell subsets from cancer patients recognize and reject xenotransplanted autologous tumors." *J Clin Invest* **114**(1): 67-76.

Belich, MP, Glynn, RJ, Senger, G, et al. (1994). "Proteasome components with reciprocal expression to that of the MHC-encoded LMP proteins." *Curr Biol* **4**(9): 769-776.

Berger, C, Krengel, U, Stang, E, et al. (2011). "Nimotuzumab and cetuximab block ligand-independent EGF receptor signaling efficiently at different concentrations." *J Immunother* **34**(7): 550-555.

Bijker, MS, van den Eeden, SJ, Franken, KL, et al. (2008). "Superior induction of anti-tumor CTL immunity by extended peptide vaccines involves prolonged, DC-focused antigen presentation." *Eur J Immunol* **38**(4): 1033-1042.

Boehm, U, Klamp, T, Groot, M, et al. (1997). "Cellular responses to interferon-gamma." *Annu Rev Immunol* **15**: 749-795.

Boguski, MS and McCormick, F (1993). "Proteins regulating Ras and its relatives." *Nature* **366**(6456): 643-654.

Bohm, CM, Hanski, ML, Stefanovic, S, et al. (1998). "Identification of HLA-A2-restricted epitopes of the tumor-associated antigen MUC2 recognized by human cytotoxic T cells." *Int J Cancer* **75**(5): 688-693.

Bonertz, A, Weitz, J, Pietsch, DH, et al. (2009). "Antigen-specific Tregs control T cell responses against a limited repertoire of tumor antigens in patients with colorectal carcinoma." *J Clin Invest* **119**(11): 3311-3321.

Bozic, I, Antal, T, Ohtsuki, H, et al. (2010). "Accumulation of driver and passenger mutations during tumor progression." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(43): 18545-18550.

Brosh, R and Rotter, V (2009). "When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field." *Nat Rev Cancer* **9**(10): 701-713.

Burgdorf, SK, Fischer, A, Claesson, MH, et al. (2006). "Vaccination with melanoma lysate-pulsed dendritic cells, of patients with advanced colorectal carcinoma: report from a phase I study." *J Exp Clin Cancer Res* **25**(2): 201-206.

Burnet, M (1957). "Cancer: a biological approach. I. The processes of control." *Br Med J* **1**(5022): 779-786.

Burnet, M (1957). "Cancer: a biological approach. III. Viruses associated with neoplastic conditions. IV. Practical applications." *Br Med J* **1**(5023): 841-847.

Camidge, DR, Herbst, RS, Gordon, MS, et al. (2010). "A phase I safety and pharmacokinetic study of the death receptor 5 agonistic antibody PRO95780 in patients with advanced malignancies." *Clin Cancer Res* **16**(4): 1256-1263.

Cammas, A, Pileur, F, Bonnal, S, et al. (2007). "Cytoplasmic relocation of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 controls translation initiation of specific mRNAs." *Mol Biol Cell* **18**(12): 5048-5059.

Campos, FG, Calijuri-Hamra, MC, Imperiale, AR, et al. (2011). "Locally advanced colorectal cancer: results of surgical treatment and prognostic factors." *Arq Gastroenterol* **48**(4): 270-275.

Cavallius, J, Rattan, SI and Clark, BF (1986). "Changes in activity and amount of active elongation factor 1 alpha in aging and immortal human fibroblast cultures." *Exp Gerontol* **21**(3): 149-157.

Cheng, P, Corzo, CA, Luetteke, N, et al. (2008). "Inhibition of dendritic cell differentiation and accumulation of myeloid-derived suppressor cells in cancer is regulated by S100A9 protein." *J Exp Med* **205**(10): 2235-2249.

Chiappa, A, Zbar, AP, Biella, F, et al. (1999). "Survival after repeat hepatic resection for recurrent colorectal metastases." *Hepatogastroenterology* **46**(26): 1065-1070.

Chin, YE, Kitagawa, M, Kuida, K, et al. (1997). "Activation of the STAT signaling pathway can cause expression of caspase 1 and apoptosis." *Mol Cell Biol* **17**(9): 5328-5337.

Chitaev, NA, Averbakh, AZ, Troyanovsky, RB, et al. (1998). "Molecular organization of the desmoglein-plakoglobin complex." *J Cell Sci* **111 (Pt 14)**: 1941-1949.

Choate, JJ and Mosher, DF (1983). "Fibronectin concentration in plasma of patients with breast cancer, colon cancer, and acute leukemia." *Cancer* **51**(6): 1142-1147.

Chung, KY, Gore, I, Fong, L, et al. (2010). "Phase II study of the anti-cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 monoclonal antibody, tremelimumab, in patients with refractory metastatic colorectal cancer." *J Clin Oncol* **28**(21): 3485-3490.

Clarke, SL, Betts, GJ, Plant, A, et al. (2006). "CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells suppress anti-tumor immune responses in patients with colorectal cancer." *PLoS One* **1**: e129.

Coley, WB (1891). "The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas: With a report of ten original cases." *Am J Med Sci* **105**(487).

Comelli, M, Di Pancrazio, F and Mavelli, I (2003). "Apoptosis is induced by decline of mitochondrial ATP synthesis in erythroleukemia cells." *Free Radic Biol Med* **34**(9): 1190-1199.

Condeelis, J (1995). "Elongation factor 1 alpha, translation and the cytoskeleton." *Trends Biochem Sci* **20**(5): 169-170.

Conus, S and Simon, HU (2008). "Cathepsins: key modulators of cell death and inflammatory responses." *Biochem Pharmacol* **76**(11): 1374-1382.

Cortini, M and Sitia, R (2010). "From antibodies to adiponectin: role of ERp44 in sizing and timing protein secretion." *Diabetes Obes Metab* **12 Suppl 2**: 39-47.

Czerkinsky, CC, Nilsson, LA, Nygren, H, et al. (1983). "A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells." *J Immunol Methods* **65**(1-2): 109-121.

Daheron, L, Veinstein, A, Brizard, F, et al. (2001). "Human LPP gene is fused to MLL in a secondary acute leukemia with a t(3;11) (q28;q23)." *Genes Chromosomes Cancer* **31**(4): 382-389.

David, CJ, Chen, M, Assanah, M, et al. (2010). "HnRNP proteins controlled by c-Myc deregulate pyruvate kinase mRNA splicing in cancer." *Nature* **463**(7279): 364-368.

de Bono, JS and Ashworth, A (2010). "Translating cancer research into targeted therapeutics." *Nature* **467**(7315): 543-549.

De Palma, M and Hanahan, D (2012). "The biology of personalized cancer medicine: Facing individual complexities underlying hallmark capabilities." *Mol Oncol*.

De Plaen, E, Lurquin, C, Van Pel, A, et al. (1988). "Immunogenic (tum-) variants of mouse tumor P815: cloning of the gene of tum- antigen P91A and identification of the tum- mutation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(7): 2274-2278.

Dean, M, Fojo, T and Bates, S (2005). "Tumour stem cells and drug resistance." *Nat Rev Cancer* **5**(4): 275-284.

Degiovanni, G, Lahaye, T, Herin, M, et al. (1988). "Antigenic heterogeneity of a human melanoma tumor detected by autologous CTL clones." *Eur J Immunol* **18**(5): 671-676.

Delfortrie, S, Pinte, S, Mattot, V, et al. (2011). "Egfr7 promotes tumor escape from immunity by repressing endothelial cell activation." *Cancer Res* **71**(23): 7176-7186.

Denecker, G, Ovaere, P, Vandenabeele, P, et al. (2008). "Caspase-14 reveals its secrets." *J Cell Biol* **180**(3): 451-458.

Deng, L, Zhang, H, Luan, Y, et al. (2010). "Accumulation of foxp3+ T regulatory cells in draining lymph nodes correlates with disease progression and immune suppression in colorectal cancer patients." *Clin Cancer Res* **16**(16): 4105-4112.

Derbinski, J, Schulte, A, Kyewski, B, et al. (2001). "Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self." *Nat Immunol* **2**(11): 1032-1039.

Deyhle, P (1980). "Results of endoscopic polypectomy in the gastrointestinal tract." *Endoscopy*(Suppl): 35-46.

Dick, TP, Ruppert, T, Groettrup, M, et al. (1996). "Coordinated dual cleavages induced by the proteasome regulator PA28 lead to dominant MHC ligands." *Cell* **86**(2): 253-262.

Dieter, SM, Ball, CR, Hoffmann, CM, et al. (2011). "Distinct types of tumor-initiating cells form human colon cancer tumors and metastases." *Cell Stem Cell* **9**(4): 357-365.

Diez, M, Pollan, M, Muguerza, JM, et al. (2000). "Time-dependency of the prognostic effect of carcinoembryonic antigen and p53 protein in colorectal adenocarcinoma." *Cancer* **88**(1): 35-41.

Dillman, RO (2011). "Cancer immunotherapy." *Cancer Biother Radiopharm* **26**(1): 1-64.

Dillman, RO, Hurwitz, SR, Schiltz, PM, et al. (1997). "Tumor localization by tumor infiltrating lymphocytes labeled with indium-111 in patients with metastatic renal cell carcinoma, melanoma, and colorectal cancer." *Cancer Biother Radiopharm* **12**(2): 65-71.

Ding, J, Li, D, Wang, X, et al. (2008). "Fibronectin promotes invasiveness and focal adhesion kinase tyrosine phosphorylation of human colon cancer cell." *Hepatogastroenterology* **55**(88): 2072-2076.

Dumartin, L, Whiteman, HJ, Weeks, ME, et al. (2011). "AGR2 is a novel surface antigen that promotes the dissemination of pancreatic cancer cells through regulation of cathepsins B and D." *Cancer Res* **71**(22): 7091-7102.

Duncan, R, Carpenter, B, Main, LC, et al. (2008). "Characterisation and protein expression profiling of annexins in colorectal cancer." *Br J Cancer* **98**(2): 426-433.

Dunn, GP, Bruce, AT, Ikeda, H, et al. (2002). "Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape." *Nat Immunol* **3**(11): 991-998.

Dunn, GP, Old, LJ and Schreiber, RD (2004). "The three Es of cancer immunoediting." *Annu Rev Immunol* **22**: 329-360.

Dupont Jensen, J, Laenkholm, AV, Knoop, A, et al. (2011). "PIK3CA mutations may be discordant between primary and corresponding metastatic disease in breast cancer." *Clin Cancer Res* **17**(4): 667-677.

Duttaroy, A, Bourbeau, D, Wang, XL, et al. (1998). "Apoptosis rate can be accelerated or decelerated by overexpression or reduction of the level of elongation factor-1 alpha." *Exp Cell Res* **238**(1): 168-176.

Dyer, MA, Livesey, FJ, Cepko, CL, et al. (2003). "Prox1 function controls progenitor cell proliferation and horizontal cell genesis in the mammalian retina." *Nat Genet* **34**(1): 53-58.

Eder, M and Weiss, M (1991). "[Hematogenous liver metastases--human pathologic principles]." *Chirurg* **62**(10): 705-709.

Ehrlich, P (1909). "Über den jetzigen stand der Karzinomforschung." *Ned. Tijdschr. Geneesk.* **5**: 273-290.

Emberley, ED, Niu, Y, Curtis, L, et al. (2005). "The S100A7-c-Jun activation domain binding protein 1 pathway enhances prosurvival pathways in breast cancer." *Cancer Res* **65**(13): 5696-5702.

Farrell, EF, Antaramian, A, Rueda, A, et al. (2003). "Sorcin inhibits calcium release and modulates excitation-contraction coupling in the heart." *J Biol Chem* **278**(36): 34660-34666.

Faure, F, Mantegazza, A, Sadaka, C, et al. (2009). "Long-lasting cross-presentation of tumor antigen in human DC." *Eur J Immunol* **39**(2): 380-390.

Feng, Y, Finley, JW, Davis, CD, et al. (1999). "Dietary selenium reduces the formation of aberrant crypts in rats administered 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl." *Toxicol Appl Pharmacol* **157**(1): 36-42.

Ferrara, JL and Deeg, HJ (1991). "Graft-versus-host disease." *N Engl J Med* **324**(10): 667-674.

Ferrara, N and Kerbel, RS (2005). "Angiogenesis as a therapeutic target." *Nature* **438**(7070): 967-974.

Fidler, IJ and Kripke, ML (1977). "Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor." *Science* **197**(4306): 893-895.

Fornaro, M, Plescia, J, Chheang, S, et al. (2003). "Fibronectin protects prostate cancer cells from tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis via the AKT/survivin pathway." *J Biol Chem* **278**(50): 50402-50411.

Franz, M, Hansen, T, Richter, P, et al. (2006). "Complex formation of the laminin-5 gamma2 chain and large unspliced tenascin-C in oral squamous cell carcinoma in vitro and in situ: implications for sequential modulation of extracellular matrix in the invasive tumor front." *Histochem Cell Biol* **126**(1): 125-131.

Friedman, JR, Fredericks, WJ, Jensen, DE, et al. (1996). "KAP-1, a novel corepressor for the highly conserved KRAB repression domain." *Genes Dev* **10**(16): 2067-2078.

Gajewski, TF and Fitch, FW (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." *J Immunol* **140**(12): 4245-4252.

Gallick, GE, Kurzrock, R, Kloetzer, WS, et al. (1985). "Expression of p21ras in fresh primary and metastatic human colorectal tumors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**(6): 1795-1799.

Gardini, A, Ercolani, G, Riccobon, A, et al. (2004). "Adjuvant, adoptive immunotherapy with tumor infiltrating lymphocytes plus interleukin-2 after radical hepatic resection for colorectal liver metastases: 5-year analysis." *J Surg Oncol* **87**(1): 46-52.

Gonzalez-Angulo, AM, Ferrer-Lozano, J, Stemke-Hale, K, et al. (2011). "PI3K pathway mutations and PTEN levels in primary and metastatic breast cancer." *Mol Cancer Ther* **10**(6): 1093-1101.

Grassi, G, Scaggiante, B, Farra, R, et al. (2007). "The expression levels of the translational factors eEF1A 1/2 correlate with cell growth but not apoptosis in hepatocellular carcinoma cell lines with different differentiation grade." *Biochimie* **89**(12): 1544-1552.

Greenburg, G and Hay, ED (1982). "Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells." *J Cell Biol* **95**(1): 333-339.

Grimes, OF and Bell, HG (1952). "Carcinoma of the colon." *Calif Med* **77**(5): 310-314.

Grunewald, TG, Pasedag, SM and Butt, E (2009). "Cell Adhesion and Transcriptional Activity - Defining the Role of the Novel Protooncogene LPP." *Transl Oncol* **2**(3): 107-116.

Haber, DA, Gray, NS and Baselga, J (2011). "The evolving war on cancer." *Cell* **145**(1): 19-24.

Hagmuller, E, Beck, N, Ockert, D, et al. (1995). "[Adjuvant therapy of liver metastases: active specific immunotherapy]." *Zentralbl Chir* **120**(10): 780-785.

Hajra, KM and Fearon, ER (2002). "Cadherin and catenin alterations in human cancer." *Genes Chromosomes Cancer* **34**(3): 255-268.

Hamburger, AW and Salmon, SE (1977). "Primary bioassay of human tumor stem cells." *Science* **197**(4302): 461-463.

- Hanahan, D and Weinberg, RA (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell* **144**(5): 646-674.
- Harvat, BL, Seth, P and Jetten, AM (1997). "The role of p27Kip1 in gamma interferon-mediated growth arrest of mammary epithelial cells and related defects in mammary carcinoma cells." *Oncogene* **14**(17): 2111-2122.
- Hassan, MI, Waheed, A, Yadav, S, et al. (2008). "Zinc alpha 2-glycoprotein: a multidisciplinary protein." *Mol Cancer Res* **6**(6): 892-906.
- He, Q, Zhang, G, Hou, D, et al. (2011). "Overexpression of sorcin results in multidrug resistance in gastric cancer cells with up-regulation of P-gp." *Oncol Rep* **25**(1): 237-243.
- Henshall, SM, Horvath, LG, Quinn, DI, et al. (2006). "Zinc-alpha2-glycoprotein expression as a predictor of metastatic prostate cancer following radical prostatectomy." *J Natl Cancer Inst* **98**(19): 1420-1424.
- Hernandez, A, Smith, F, Wang, Q, et al. (2000). "Assessment of differential gene expression patterns in human colon cancers." *Ann Surg* **232**(4): 576-585.
- Hirai, K, Yokoyama, M, Asano, G, et al. (1999). "Expression of cathepsin B and cystatin C in human colorectal cancer." *Hum Pathol* **30**(6): 680-686.
- Hiraiwa, K, Takeuchi, H, Hasegawa, H, et al. (2008). "Clinical significance of circulating tumor cells in blood from patients with gastrointestinal cancers." *Ann Surg Oncol* **15**(11): 3092-3100.
- Huber, CH and Wolfel, T (2004). "Immunotherapy of cancer: from vision to standard clinical practice." *J Cancer Res Clin Oncol* **130**(7): 367-374.
- Hunder, NN, Wallen, H, Cao, J, et al. (2008). "Treatment of metastatic melanoma with autologous CD4+ T cells against NY-ESO-1." *N Engl J Med* **358**(25): 2698-2703.
- Inokuchi, J, Narula, N, Yee, DS, et al. (2009). "Annexin A2 positively contributes to the malignant phenotype and secretion of IL-6 in DU145 prostate cancer cells." *Int J Cancer* **124**(1): 68-74.
- Isidoro, A, Martinez, M, Fernandez, PL, et al. (2004). "Alteration of the bioenergetic phenotype of mitochondria is a hallmark of breast, gastric, lung and oesophageal cancer." *Biochem J* **378**(Pt 1): 17-20.
- Jemal, A, Center, MM, DeSantis, C, et al. (2010). "Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **19**(8): 1893-1907.
- Jinquan, T, Vorum, H, Larsen, CG, et al. (1996). "Psoriasin: a novel chemotactic protein." *J Invest Dermatol* **107**(1): 5-10.
- Johnsson, A, Zeelenberg, I, Min, Y, et al. (2000). "Identification of genes differentially expressed in association with acquired cisplatin resistance." *Br J Cancer* **83**(8): 1047-1054.

Jonker, DJ, O'Callaghan, CJ, Karapetis, CS, et al. (2007). "Cetuximab for the treatment of colorectal cancer." *N Engl J Med* **357**(20): 2040-2048.

Kamitani, S, Ohbayashi, N, Ikeda, O, et al. (2008). "KAP1 regulates type I interferon/STAT1-mediated IRF-1 gene expression." *Biochem Biophys Res Commun* **370**(2): 366-370.

Kantoff, PW, Higano, CS, Shore, ND, et al. (2010). "Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer." *N Engl J Med* **363**(5): 411-422.

Kaplan, DH, Shankaran, V, Dighe, AS, et al. (1998). "Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(13): 7556-7561.

Kavanagh, B, Ko, A, Venook, A, et al. (2007). "Vaccination of metastatic colorectal cancer patients with matured dendritic cells loaded with multiple major histocompatibility complex class I peptides." *J Immunother* **30**(7): 762-772.

Keast, D (1970). "Immunosurveillance and cancer." *Lancet* **2**(7675): 710-712.

Khazaie, K, Bonertz, A and Beckhove, P (2009). "Current developments with peptide-based human tumor vaccines." *Curr Opin Oncol* **21**(6): 524-530.

Kim, H, Kang, HJ, You, KT, et al. (2006). "Suppression of human selenium-binding protein 1 is a late event in colorectal carcinogenesis and is associated with poor survival." *Proteomics* **6**(11): 3466-3476.

Kim, HJ, Kang, HJ, Lee, H, et al. (2009). "Identification of S100A8 and S100A9 as serological markers for colorectal cancer." *J Proteome Res* **8**(3): 1368-1379.

Kim, HS, Park, HM, Park, JS, et al. (2010). "Dendritic cell vaccine in addition to FOLFIRI regimen improve antitumor effects through the inhibition of immunosuppressive cells in murine colorectal cancer model." *Vaccine* **28**(49): 7787-7796.

Kim, YR, Kim, KM, Yoo, NJ, et al. (2009). "Mutational analysis of CASP1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, and 14 genes in gastrointestinal stromal tumors." *Hum Pathol* **40**(6): 868-871.

Knuth, A, Wolfel, T, Klehmann, E, et al. (1989). "Cytolytic T-cell clones against an autologous human melanoma: specificity study and definition of three antigens by immunoselection." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(8): 2804-2808.

Koch, M, Beckhove, P, Op den Winkel, J, et al. (2006). "Tumor infiltrating T lymphocytes in colorectal cancer: Tumor-selective activation and cytotoxic activity in situ." *Ann Surg* **244**(6): 986-992; discussion 992-983.

Kogan-Sakin, I, Tabach, Y, Buganim, Y, et al. (2011). "Mutant p53(R175H) upregulates Twist1 expression and promotes epithelial-mesenchymal transition in immortalized prostate cells." *Cell Death Differ* **18**(2): 271-281.

Kong, B, Michalski, CW, Hong, X, et al. (2010). "AZGP1 is a tumor suppressor in pancreatic cancer inducing mesenchymal-to-epithelial transdifferentiation by inhibiting TGF-beta-mediated ERK signaling." *Oncogene* **29**(37): 5146-5158.

Koten, JW and Den Otter, W (1991). "The transition of benign to malignant in epithelial and mesenchymal tumours." *Anticancer Res* **11**(2): 567-568.

Kramer, RH and Nicolson, GL (1979). "Interactions of tumor cells with vascular endothelial cell monolayers: a model for metastatic invasion." *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(11): 5704-5708.

Kucia, M and Ratajczak, MZ (2006). "Stem cells as a two edged sword--from regeneration to tumor formation." *J Physiol Pharmacol* **57 Suppl 7**: 5-16.

Lan, YT, Chang, SC, Li, AF, et al. (2007). "p53 protein accumulation as a prognostic marker in sporadic colorectal cancer." *Int J Colorectal Dis* **22**(5): 499-506.

Landriscina, M, Laudiero, G, Maddalena, F, et al. (2010). "Mitochondrial chaperone Trap1 and the calcium binding protein Sorcin interact and protect cells against apoptosis induced by antitumoral agents." *Cancer Res* **70**(16): 6577-6586.

Lapidot, T, Sirard, C, Vormoor, J, et al. (1994). "A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice." *Nature* **367**(6464): 645-648.

Lassen, U, Nielsen, DL, Sorensen, M, et al. (2012). "A phase I, dose-escalation study of TB-403, a monoclonal antibody directed against PlGF, in patients with advanced solid tumours." *Br J Cancer* **106**(4): 678-684.

Lee, JM, Shun, CT, Wu, MT, et al. (2006). "The associations of p53 overexpression with p53 codon 72 genetic polymorphism in esophageal cancer." *Mutat Res* **594**(1-2): 181-188.

Lee, KC and Eckert, RL (2007). "S100A7 (Psoriasin)--mechanism of antibacterial action in wounds." *J Invest Dermatol* **127**(4): 945-957.

Lehner, B, Schlag, P, Liebrich, W, et al. (1990). "Postoperative active specific immunization in curatively resected colorectal cancer patients with a virus-modified autologous tumor cell vaccine." *Cancer Immunol Immunother* **32**(3): 173-178.

Lemke, I, Rogalla, P and Bullerdiek, J (2001). "A novel LPP fusion gene indicates the crucial role of truncated LPP proteins in lipomas and pulmonary chondroid hamartomas." *Cytogenet Cell Genet* **95**(3-4): 153-156.

Lew, Y, Jones, DV, Mars, WM, et al. (1992). "Expression of elongation factor-1 gamma-related sequence in human pancreatic cancer." *Pancreas* **7**(2): 144-152.

Li, F, Liu, YH, Li, YW, et al. (2012). "Human anti-EGFL7 recombinant full-length antibodies selected from a mammalian cell-based antibody display library." *Mol Cell Biochem*.

Li, T, Yang, W, Li, M, et al. (2008). "Expression of selenium-binding protein 1 characterizes intestinal cell maturation and predicts survival for patients with colorectal cancer." *Mol Nutr Food Res* **52**(11): 1289-1299.

Liang, W, Wang, H, Sun, TM, et al. (2003). "Application of autologous tumor cell vaccine and NDV vaccine in treatment of tumors of digestive tract." *World J Gastroenterol* **9**(3): 495-498.

Logarinho, E, Resende, T, Torres, C, et al. (2008). "The human spindle assembly checkpoint protein Bub3 is required for the establishment of efficient kinetochore-microtubule attachments." *Mol Biol Cell* **19**(4): 1798-1813.

Lokman, NA, Ween, MP, Oehler, MK, et al. (2011). "The role of annexin A2 in tumorigenesis and cancer progression." *Cancer Microenviron* **4**(2): 199-208.

Lopez, I, Oliveira, LP, Tucci, P, et al. (2012). "Different mutation profiles associated to P53 accumulation in colorectal cancer." *Gene*.

Lorenz, M, Staib-Sebler, E, Hochmuth, K, et al. (2000). "Surgical resection of liver metastases of colorectal carcinoma: short and long-term results." *Semin Oncol* **27**(5 Suppl 10): 112-119.

Lubman, DM, Kachman, MT, Wang, H, et al. (2002). "Two-dimensional liquid separations-mass mapping of proteins from human cancer cell lysates." *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **782**(1-2): 183-196.

Lundqvist, A and Childs, R (2005). "Allogeneic hematopoietic cell transplantation as immunotherapy for solid tumors: current status and future directions." *J Immunother* **28**(4): 281-288.

Maddalena, F, Laudiero, G, Piscazzi, A, et al. (2011). "Sorcin induces a drug-resistant phenotype in human colorectal cancer by modulating Ca(2+) homeostasis." *Cancer Res* **71**(24): 7659-7669.

Mai, J, Waisman, DM and Sloane, BF (2000). "Cell surface complex of cathepsin B/annexin II tetramer in malignant progression." *Biochim Biophys Acta* **1477**(1-2): 215-230.

Majesky, MW (2006). "Organizing motility: LIM domains, LPP, and smooth muscle migration." *Circ Res* **98**(3): 306-308.

Mandal, S, Curtis, L, Pind, M, et al. (2007). "S100A7 (psoriasin) influences immune response genes in human breast cancer." *Exp Cell Res* **313**(14): 3016-3025.

Margolis, EJ, Choi, JC, Shu, WP, et al. (1996). "Specific sequences of fibronectin activate the protein kinase C signal transduction pathway in invasive bladder cancer." *Cancer Lett* **100**(1-2): 163-168.

Masson, D, Zamai, M and Tschopp, J (1986). "Identification of granzyme A isolated from cytotoxic T-lymphocyte-granules as one of the proteases encoded by CTL-specific genes." *FEBS Lett* **208**(1): 84-88.

Mehlen, P and Puisieux, A (2006). "Metastasis: a question of life or death." *Nat Rev Cancer* **6**(6): 449-458.

Melief, CJ and van der Burg, SH (2008). "Immunotherapy of established (pre)malignant disease by synthetic long peptide vaccines." *Nat Rev Cancer* **8**(5): 351-360.

Mendelsohn, J and Baselga, J (2003). "Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer." *J Clin Oncol* **21**(14): 2787-2799.

Meplan, C, Hughes, DJ, Pardini, B, et al. (2010). "Genetic variants in selenoprotein genes increase risk of colorectal cancer." *Carcinogenesis* **31**(6): 1074-1079.

Meric-Bernstam, F and Mills, GB (2012). "Overcoming implementation challenges of personalized cancer therapy." *Nat Rev Clin Oncol*.

Meyers, MB, Fischer, A, Sun, YJ, et al. (2003). "Sorcin regulates excitation-contraction coupling in the heart." *J Biol Chem* **278**(31): 28865-28871.

Mizobata, S, Tanimura, H, Yamaue, H, et al. (1996). "Fibronectin promotes the proliferation of cytotoxic T lymphocytes generated from cancer patients." *Br J Cancer* **74**(10): 1598-1604.

Mohammad, HS, Kurokohchi, K, Yoneyama, H, et al. (2008). "Annexin A2 expression and phosphorylation are up-regulated in hepatocellular carcinoma." *Int J Oncol* **33**(6): 1157-1163.

Moubayed, N, Weichenthal, M, Harder, J, et al. (2007). "Psoriasin (S100A7) is significantly up-regulated in human epithelial skin tumours." *J Cancer Res Clin Oncol* **133**(4): 253-261.

Mukai, M, Togawa, A, Imamura, F, et al. (2002). "Sustained tyrosine-phosphorylation of FAK through Rho-dependent adhesion to fibronectin is essential for cancer cell migration." *Anticancer Res* **22**(6A): 3175-3184.

Nagata, S (1997). "Apoptosis by death factor." *Cell* **88**(3): 355-365.

Nagorsen, D, Keilholz, U, Rivoltini, L, et al. (2000). "Natural T-cell response against MHC class I epitopes of epithelial cell adhesion molecule, her-2/neu, and carcinoembryonic antigen in patients with colorectal cancer." *Cancer Res* **60**(17): 4850-4854.

Nagorsen, D and Thiel, E (2006). "Clinical and immunologic responses to active specific cancer vaccines in human colorectal cancer." *Clin Cancer Res* **12**(10): 3064-3069.

Nair, RR, Solway, J and Boyd, DD (2006). "Expression cloning identifies transgelin (SM22) as a novel repressor of 92-kDa type IV collagenase (MMP-9) expression." *J Biol Chem* **281**(36): 26424-26436.

Nasif, WA, Lotfy, M, El-Sayed, IH, et al. (2006). "Implications of CEA and p53 overexpression in the poor prognosis of colorectal cancer." *Med Oncol* **23**(2): 237-244.

Navin, N, Kendall, J, Troge, J, et al. (2011). "Tumour evolution inferred by single-cell sequencing." *Nature* **472**(7341): 90-94.

Niedergethmann, M, Wostbrock, B, Sturm, JW, et al. (2004). "Prognostic impact of cysteine proteases cathepsin B and cathepsin L in pancreatic adenocarcinoma." *Pancreas* **29**(3): 204-211.

Niikura, Y, Ogi, H, Kikuchi, K, et al. (2010). "BUB3 that dissociates from BUB1 activates caspase-independent mitotic death (CIMD)." *Cell Death Differ* **17**(6): 1011-1024.

Ogino, S, Galon, J, Fuchs, CS, et al. (2011). "Cancer immunology--analysis of host and tumor factors for personalized medicine." *Nat Rev Clin Oncol* **8**(12): 711-719.

Ohno, Y, Izumi, M, Kawamura, T, et al. (2009). "Annexin II represents metastatic potential in clear-cell renal cell carcinoma." *Br J Cancer* **101**(2): 287-294.

Old, LJ and Boyse, EA (1964). "Immunology of Experimental Tumors." *Annu Rev Med* **15**: 167-186.

Olt, G, Berchuck, A, Soisson, AP, et al. (1992). "Fibronectin is an immunosuppressive substance associated with epithelial ovarian cancer." *Cancer* **70**(8): 2137-2142.

Pages, F, Berger, A, Camus, M, et al. (2005). "Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer." *N Engl J Med* **353**(25): 2654-2666.

Pan, Q, Chantry, Y, Liang, WC, et al. (2007). "Blocking neuropilin-1 function has an additive effect with anti-VEGF to inhibit tumor growth." *Cancer Cell* **11**(1): 53-67.

Paramasivam, M, Membrino, A, Cogoi, S, et al. (2009). "Protein hnRNP A1 and its derivative Up1 unfold quadruplex DNA in the human KRAS promoter: implications for transcription." *Nucleic Acids Res* **37**(9): 2841-2853.

Parekh, HK, Deng, HB, Choudhary, K, et al. (2002). "Overexpression of sorcin, a calcium-binding protein, induces a low level of paclitaxel resistance in human ovarian and breast cancer cells." *Biochem Pharmacol* **63**(6): 1149-1158.

Park, K, Chung, YJ, So, H, et al. (2011). "AGR2, a mucinous ovarian cancer marker, promotes cell proliferation and migration." *Exp Mol Med* **43**(2): 91-100.

Park, SW, Zhen, G, Verhaeghe, C, et al. (2009). "The protein disulfide isomerase AGR2 is essential for production of intestinal mucus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(17): 6950-6955.

Pastrnak, A and Jansa, P (1989). "Tumor-infiltrating cells and their possible prognostic significance." *Acta Univ Palacki Olomuc Fac Med* **124**: 7-71.

Perou, CM, Sorlie, T, Eisen, MB, et al. (2000). "Molecular portraits of human breast tumours." *Nature* **406**(6797): 747-752.

Petit, MM, Fradelizi, J, Golsteyn, RM, et al. (2000). "LPP, an actin cytoskeleton protein related to zyxin, harbors a nuclear export signal and transcriptional activation capacity." *Mol Biol Cell* **11**(1): 117-129.

Petit, MM, Meulemans, SM, Alen, P, et al. (2005). "The tumor suppressor Scrib interacts with the zyxin-related protein LPP, which shuttles between cell adhesion sites and the nucleus." *BMC Cell Biol* **6**(1): 1.

Petit, MM, Mols, R, Schoenmakers, EF, et al. (1996). "LPP, the preferred fusion partner gene of HMGIC in lipomas, is a novel member of the LIM protein gene family." *Genomics* **36**(1): 118-129.

Plasswilm, L, Tannapfel, A, Cordes, N, et al. (2000). "Hypoxia-induced tumour cell migration in an in vivo chicken model." *Pathobiology* **68**(3): 99-105.

Potter, M, Bernstein, A and Lee, JM (1998). "The wst gene regulates multiple forms of thymocyte apoptosis." *Cell Immunol* **188**(2): 111-117.

Potter, VR (1978). "Phenotypic diversity in experimental hepatomas: the concept of partially blocked ontogeny. The 10th Walter Hubert Lecture." *Br J Cancer* **38**(1): 1-23.

Puisieux, A, Ji, J and Ozturk, M (1996). "Annexin II up-regulates cellular levels of p11 protein by a post-translational mechanisms." *Biochem J* **313** (Pt 1): 51-55.

Qi, Y, Schoene, NW, Lartey, FM, et al. (2010). "Selenium compounds activate ATM-dependent DNA damage response via the mismatch repair protein hMLH1 in colorectal cancer cells." *J Biol Chem* **285**(43): 33010-33017.

Qu, Y, Yang, Y, Liu, B, et al. (2010). "Comparative proteomic profiling identified sorcin being associated with gemcitabine resistance in non-small cell lung cancer." *Med Oncol* **27**(4): 1303-1308.

Ramachandran, V, Arumugam, T, Wang, H, et al. (2008). "Anterior gradient 2 is expressed and secreted during the development of pancreatic cancer and promotes cancer cell survival." *Cancer Res* **68**(19): 7811-7818.

Ramana, CV, Grammatikakis, N, Chernov, M, et al. (2000). "Regulation of c-myc expression by IFN-gamma through Stat1-dependent and -independent pathways." *EMBO J* **19**(2): 263-272.

Rammensee, H, Bachmann, J, Emmerich, NP, et al. (1999). "SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs." *Immunogenetics* **50**(3-4): 213-219.

Rao, B, Han, M, Wang, L, et al. (2011). "Clinical outcomes of active specific immunotherapy in advanced colorectal cancer and suspected minimal residual colorectal cancer: a meta-analysis and system review." *J Transl Med* **9**: 17.

Read, S, Malmstrom, V and 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." *J Exp Med* **192**(2): 295-302.

Rech, AJ and Vonderheide, RH (2009). "Clinical use of anti-CD25 antibody daclizumab to enhance immune responses to tumor antigen vaccination by targeting regulatory T cells." *Ann N Y Acad Sci* **1174**: 99-106.

Rho, SB, Park, YG, Park, K, et al. (2006). "A novel cervical cancer suppressor 3 (CCS-3) interacts with the BTB domain of PLZF and inhibits the cell growth by inducing apoptosis." *FEBS Lett* **580**(17): 4073-4080.

Roberts, SS, Hengesh, JW, McGrath, RG, et al. (1967). "Prognostic significance of cancer cells in the circulating blood. A ten year evaluation." *Am J Surg* **113**(6): 757-762.

Roos, G, Leanderson, T and Lundgren, E (1984). "Interferon-induced cell cycle changes in human hematopoietic cell lines and fresh leukemic cells." *Cancer Res* **44**(6): 2358-2362.

Rosen, PJ, Sweeney, CJ, Park, DJ, et al. (2010). "A phase Ib study of AMG 102 in combination with bevacizumab or motesanib in patients with advanced solid tumors." *Clin Cancer Res* **16**(9): 2677-2687.

Rosenberg, SA, Spiess, P and Lafreniere, R (1986). "A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes." *Science* **233**(4770): 1318-1321.

Rossner, P, Jr., Gammon, MD, Zhang, YJ, et al. (2009). "Mutations in p53, p53 protein overexpression and breast cancer survival." *J Cell Mol Med* **13**(9B): 3847-3857.

Russo, A, Bazan, V, Iacopetta, B, et al. (2005). "The TP53 colorectal cancer international collaborative study on the prognostic and predictive significance of p53 mutation: influence of tumor site, type of mutation, and adjuvant treatment." *J Clin Oncol* **23**(30): 7518-7528.

Ryckman, C, Vandal, K, Rouleau, P, et al. (2003). "Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion." *J Immunol* **170**(6): 3233-3242.

Saito, N, Nishimura, H and Kameoka, S (2008). "Clinical significance of fibronectin expression in colorectal cancer." *Mol Med Report* **1**(1): 77-81.

Sakaguchi, S, Sakaguchi, N, Shimizu, J, et al. (2001). "Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance." *Immunol Rev* **182**: 18-32.

Scheele, J, Stangl, R, Schmidt, K, et al. (1995). "[Recurrent tumor after R0 resection of colorectal liver metastases. Incidence, resectability and prognosis]." *Chirurg* **66**(10): 965-973.

Schlegel, J, Stumm, G, Scherthan, H, et al. (1995). "Comparative genomic in situ hybridization of colon carcinomas with replication error." *Cancer Res* **55**(24): 6002-6005.

Schmiegel, W, Pox, C, Adler, G, et al. (2004). "[S3-Guidelines Conference "Colorectal Carcinoma" 2004]." *Z Gastroenterol* **42**(10): 1129-1177.

Schmiegel, W, Pox, C, Reinacher-Schick, A, et al. (2010). "S3 guidelines for colorectal carcinoma: results of an evidence-based consensus conference on February 6/7, 2004 and June 8/9, 2007 (for the topics IV, VI and VII)." *Z Gastroenterol* **48**(1): 65-136.

Schreiber, RD, Old, LJ and Smyth, MJ (2011). "Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion." *Science* **331**(6024): 1565-1570.

Schulze, T, Kemmner, W, Weitz, J, et al. (2009). "Efficiency of adjuvant active specific immunization with Newcastle disease virus modified tumor cells in colorectal cancer patients following resection of liver metastases: results of a prospective randomized trial." *Cancer Immunol Immunother* **58**(1): 61-69.

Segal, NH and Saltz, LB (2009). "Evolving treatment of advanced colon cancer." *Annu Rev Med* **60**: 207-219.

Sehr, P, Zumbach, K and Pawlita, M (2001). "A generic capture ELISA for recombinant proteins fused to glutathione S-transferase: validation for HPV serology." *J Immunol Methods* **253**(1-2): 153-162.

Seth, R, Keeley, J, Abu-Ali, G, et al. (2009). "The putative tumour modifier gene ATP5A1 is not mutated in human colorectal cancer cell lines but expression levels correlate with TP53 mutations and chromosomal instability." *J Clin Pathol* **62**(7): 598-603.

Shankaran, V, Ikeda, H, Bruce, AT, et al. (2001). "IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity." *Nature* **410**(6832): 1107-1111.

Sharma, MR, Koltowski, L, Ownbey, RT, et al. (2006). "Angiogenesis-associated protein annexin II in breast cancer: selective expression in invasive breast cancer and contribution to tumor invasion and progression." *Exp Mol Pathol* **81**(2): 146-156.

Shibata, K, Kikkawa, F, Nawa, A, et al. (1997). "Fibronectin secretion from human peritoneal tissue induces Mr 92,000 type IV collagenase expression and invasion in ovarian cancer cell lines." *Cancer Res* **57**(23): 5416-5420.

Shin, YK, Yoo, BC, Chang, HJ, et al. (2005). "Down-regulation of mitochondrial F1F0-ATP synthase in human colon cancer cells with induced 5-fluorouracil resistance." *Cancer Res* **65**(8): 3162-3170.

Simon, MM, Fruth, U, Simon, HG, et al. (1987). "Evidence for the involvement of a T-cell-associated serine protease (TSP-1) in cell killing." *Ann Inst Pasteur Immunol* **138**(2): 309-314.

Smith, BJ (1984). "Quantification of proteins on polyacrylamide gels (nonradioactive)." *Methods Mol Biol* **1**: 119-125.

Soker, S, Takashima, S, Miao, HQ, et al. (1998). "Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor." *Cell* **92**(6): 735-745.

Sørli, T, Perou, CM, Tibshirani, R, et al. (2001). "Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(19): 10869-10874.

Speetjens, FM, Kuppen, PJ, Welters, MJ, et al. (2009). "Induction of p53-specific immunity by a p53 synthetic long peptide vaccine in patients treated for metastatic colorectal cancer." *Clin Cancer Res* **15**(3): 1086-1095.

Spratlin, J (2011). "Ramucirumab (IMC-1121B): Monoclonal antibody inhibition of vascular endothelial growth factor receptor-2." *Curr Oncol Rep* **13**(2): 97-102.

Stutman, O (1974). "Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic-nude mice." *Science* **183**(4124): 534-536.

Stutman, O (1975). "Immunodepression and malignancy." *Adv Cancer Res* **22**: 261-422.

Swinton, NW, Sr., Nahra, KS, Khazei, AM, et al. (1968). "The evolution of colorectal cancer." *Dis Colon Rectum* **11**(6): 413-419.

Talapatra, S, Wagner, JD and Thompson, CB (2002). "Elongation factor-1 alpha is a selective regulator of growth factor withdrawal and ER stress-induced apoptosis." *Cell Death Differ* **9**(8): 856-861.

Taub, DD, Conlon, K, Lloyd, AR, et al. (1993). "Preferential migration of activated CD4+ and CD8+ T cells in response to MIP-1 alpha and MIP-1 beta." *Science* **260**(5106): 355-358.

Thant, AA, Nawa, A, Kikkawa, F, et al. (2000). "Fibronectin activates matrix metalloproteinase-9 secretion via the MEK1-MAPK and the PI3K-Akt pathways in ovarian cancer cells." *Clin Exp Metastasis* **18**(5): 423-428.

Thompson, DA and Weigel, RJ (1998). "hAG-2, the human homologue of the *Xenopus laevis* cement gland gene XAG-2, is coexpressed with estrogen receptor in breast cancer cell lines." *Biochem Biophys Res Commun* **251**(1): 111-116.

Thorburn, A (2004). "Death receptor-induced cell killing." *Cell Signal* **16**(2): 139-144.

Thweatt, R, Lumpkin, CK, Jr. and Goldstein, S (1992). "A novel gene encoding a smooth muscle protein is overexpressed in senescent human fibroblasts." *Biochem Biophys Res Commun* **187**(1): 1-7.

Tie, J, Gibbs, P, Lipton, L, et al. (2011). "Optimizing targeted therapeutic development: analysis of a colorectal cancer patient population with the BRAF(V600E) mutation." *Int J Cancer* **128**(9): 2075-2084.

Tolcher, AW, Sarantopoulos, J, Patnaik, A, et al. (2009). "Phase I, pharmacokinetic, and pharmacodynamic study of AMG 479, a fully human monoclonal antibody to insulin-like growth factor receptor 1." *J Clin Oncol* **27**(34): 5800-5807.

Tomasini, R, Tsuchihara, K, Tsuda, C, et al. (2009). "TAp73 regulates the spindle assembly checkpoint by modulating BubR1 activity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(3): 797-802.

Trauth, BC, Klas, C, Peters, AM, et al. (1989). "Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis." *Science* **245**(4915): 301-305.

Tsang, WP, Ho, FY, Fung, KP, et al. (2005). "p53-R175H mutant gains new function in regulation of doxorubicin-induced apoptosis." *Int J Cancer* **114**(3): 331-336.

Tsuruma, R, Ohbayashi, N, Kamitani, S, et al. (2008). "Physical and functional interactions between STAT3 and KAP1." *Oncogene* **27**(21): 3054-3059.

Ugorcakova, J, Hlavaty, T, Novotna, T, et al. (2012). "Detection of point mutations in KRAS oncogene by real-time PCR-based genotyping assay in GIT diseases." *Bratisl Lek Listy* **113**(2): 73-79.

Umano, Y, Tsunoda, T, Tanaka, H, et al. (2001). "Generation of cytotoxic T cell responses to an HLA-A24 restricted epitope peptide derived from wild-type p53." *Br J Cancer* **84**(8): 1052-1057.

Van der Blik, AM, Baas, F, Van der Velde-Koerts, T, et al. (1988). "Genes amplified and overexpressed in human multidrug-resistant cell lines." *Cancer Res* **48**(21): 5927-5932.

van der Most, RG, Currie, AJ, Mahendran, S, et al. (2009). "Tumor eradication after cyclophosphamide depends on concurrent depletion of regulatory T cells: a role for cycling TNFR2-expressing effector-suppressor T cells in limiting effective chemotherapy." *Cancer Immunol Immunother* **58**(8): 1219-1228.

Vanderlaag, KE, Hudak, S, Bald, L, et al. (2010). "Anterior gradient-2 plays a critical role in breast cancer cell growth and survival by modulating cyclin D1, estrogen receptor-alpha and survivin." *Breast Cancer Res* **12**(3): R32.

Viadana, E, Bross, ID and Pickren, JW (1978). "The metastatic spread of cancers of the digestive system in man." *Oncology* **35**(3): 114-126.

Virchow, R (1855). "Editorial." *Virchows Archiv fuer Pathologische Anatomie und Physiologie und fuer Klinische Medizin* **3**(23).

Vishwanatha, JK, Chiang, Y, Kumble, KD, et al. (1993). "Enhanced expression of annexin II in human pancreatic carcinoma cells and primary pancreatic cancers." *Carcinogenesis* **14**(12): 2575-2579.

Vogelstein, B, Fearon, ER, Hamilton, SR, et al. (1988). "Genetic alterations during colorectal-tumor development." *N Engl J Med* **319**(9): 525-532.

Wagner, P, Koch, M, Nummer, D, et al. (2008). "Detection and functional analysis of tumor infiltrating T-lymphocytes (TIL) in liver metastases from colorectal cancer." *Ann Surg Oncol* **15**(8): 2310-2317.

Wang, JC and Dick, JE (2005). "Cancer stem cells: lessons from leukemia." *Trends Cell Biol* **15**(9): 494-501.

Warburg, O, Wind, F and Negelein, E (1927). "The Metabolism of Tumors in the Body." *J Gen Physiol* **8**(6): 519-530.

Webb, KS and Lin, GH (1980). "Urinary fibronectin: potential as a biomarker in prostatic cancer." *Invest Urol* **17**(5): 401-404.

Wei, PL, Kuo, LJ, Huang, MT, et al. (2011). "Nicotine enhances colon cancer cell migration by induction of fibronectin." *Ann Surg Oncol* **18**(6): 1782-1790.

Weiden, PL, Flournoy, N, Thomas, ED, et al. (1979). "Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts." *N Engl J Med* **300**(19): 1068-1073.

Weiss, L (1992). "Biomechanical interactions of cancer cells with the microvasculature during hematogenous metastasis." *Cancer Metastasis Rev* **11**(3-4): 227-235.

Wexler, H, Sindelar, WF and Ketcham, AS (1976). "The role of immune factors in the survival of circulating tumor cells." *Cancer* **37**(4): 1701-1706.

Wicha, MS, Liu, S and Dontu, G (2006). "Cancer stem cells: an old idea--a paradigm shift." *Cancer Res* **66**(4): 1883-1890; discussion 1895-1886.

Wigle, JT, Chowdhury, K, Gruss, P, et al. (1999). "Prox1 function is crucial for mouse lens-fibre elongation." *Nat Genet* **21**(3): 318-322.

Williamson, L, Raess, NA, Caldelari, R, et al. (2006). "Pemphigus vulgaris identifies plakoglobin as key suppressor of c-Myc in the skin." *EMBO J* **25**(14): 3298-3309.

Wilson, DB, Marshak, A and Howard, JC (1976). "SPECIFIC positive and negative selection of rat lymphocytes reactive to strong histocompatibility antigens: activation with alloantigens in vitro and in vivo." *J Immunol* **116**(4): 1030-1040.

Wistuba, II, Gelovani, JG, Jacoby, JJ, et al. (2011). "Methodological and practical challenges for personalized cancer therapies." *Nat Rev Clin Oncol* **8**(3): 135-141.

Wolf, R, Howard, OM, Dong, HF, et al. (2008). "Chemotactic activity of S100A7 (Psoriasin) is mediated by the receptor for advanced glycation end products and potentiates inflammation with highly homologous but functionally distinct S100A15." *J Immunol* **181**(2): 1499-1506.

Yang, Z, Chang, YJ, Miyamoto, H, et al. (2007). "Transgelin functions as a suppressor via inhibition of ARA54-enhanced androgen receptor transactivation and prostate cancer cell growth." *Mol Endocrinol* **21**(2): 343-358.

Yen, LC, Uen, YH, Wu, DC, et al. (2010). "Activating KRAS mutations and overexpression of epidermal growth factor receptor as independent predictors in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab." *Ann Surg* **251**(2): 254-260.

Yoshikawa, K, Hamada, J, Tada, M, et al. (2010). "Mutant p53 R248Q but not R248W enhances in vitro invasiveness of human lung cancer NCI-H1299 cells." *Biomed Res* **31**(6): 401-411.

Zhang, JS, Gong, A, Cheville, JC, et al. (2005). "AGR2, an androgen-inducible secretory protein overexpressed in prostate cancer." *Genes Chromosomes Cancer* **43**(3): 249-259.

Zhang, L, Dermawan, K, Jin, M, et al. (2008). "Differential impairment of regulatory T cells rather than effector T cells by paclitaxel-based chemotherapy." *Clin Immunol* **129**(2): 219-229.

Zheng, L, Foley, K, Huang, L, et al. (2011). "Tyrosine 23 phosphorylation-dependent cell-surface localization of annexin A2 is required for invasion and metastases of pancreatic cancer." *PLoS One* **6**(4): e19390.

Zhou, Y, Xu, Y, Tan, Y, et al. (2006). "Sorcin, an important gene associated with multidrug-resistance in human leukemia cells." *Leuk Res* **30**(4): 469-476.