

HLA-Liganden für die aktiv personalisierte Immuntherapie von Leberkrebs und Gliomen

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Dipl. Biochem. Nico Patrick Trautwein

aus Reutlingen

Tübingen 2019

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Prüfung: 09.04.2019

Dekan: Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter Prof. Dr. Stefan Stevanović

2. Berichterstatter Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee

Inhalt

1. Einleitung.....	1
1.1 <i>Human Leukocyte Antigen</i>	1
1.1.1 Struktur und Funktion der HLA-Moleküle	3
1.1.2 Antigenprozessierung und Antigenpräsentation auf HLA-Molekülen	6
1.2 Leberkrebs.....	14
1.2.1 Neuerkrankungsraten und Todesfälle.....	14
1.2.2 Diagnostik, Klassifikation und Behandlung von HCC.....	16
1.3 Gliom	22
1.3.1 Erkrankungsdaten und Todesfälle.....	22
1.3.2 Diagnose, Klassifikation und Behandlung von Gliomen	22
1.3.3 Prognostische Bedeutung von Alkylierungen im Promotor der O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase und von Mutationen im Gen der Isocitratdehydrogenase 1 und 2.....	25
1.4 Immuntherapie.....	26
1.4.1 Allgemeine Grundlagen der Immuntherapie und Krebsimmuntherapie	26
1.4.2 Peptidvakzine zur Behandlung von Krebserkrankungen.....	29
1.5 Individualisierte Krebsimmuntherapie.....	31
1.6 Zielsetzung der Arbeit	34
2. Materialien und Methoden	37
2.1 Materialien	37
2.2 HLA-Immunpräzipitation und HLA-Ligandenisolation.....	41
2.2.1 Kopplung der Antikörper	41
2.2.2 HLA-Immunpräzipitation und HLA Liganden-Isolation aus Gewebe	43
2.2.3 HLA-Immunpräzipitation und HLA-Ligandenisolation aus Zelllinien und Hinweise für Arbeiten mit geringen Probenmengen	44
2.2.4 Immunaффinitätschromatographie und Elution	44
2.2.5 Probenvorbereitung für die massenspektrometrische Analyse.....	46
2.3 Massenspektrometrie (MS) für HLA-Ligandomics.....	47
2.3.1 uHPLC-Chromatographie.....	47

2.3.2	Massenspektrometrische Standardmethode.....	48
2.3.3	Gezielte Suche nach bestimmten HLA-Liganden.....	49
2.3.4	Prozessieren der aufgenommenen Massenspektren.....	50
2.4	Analyse der identifizierten HLA-Liganden	51
2.4.1	Tumor-assoziierte Antigene (TAA) und von Liganden abgeleitete Tumor-assoziierte Antigene (LiTAA).....	51
2.4.2	Tumor-spezifische Antigene	52
2.4.3	Abschätzung des messbaren Gesamtligandoms	52
2.4.4	Filterkriterien für NGS-Experimente	53
2.4.5	Auswahl der Peptidsequenzen welche durch SIM-Experimente untersucht wurden	53
3.	Ergebnisse	55
3.1	Peptidvakzine für Hepatozelluläre Karzinome	55
3.1.1	Tumor-assoziierte Antigene	60
3.1.2	Tumor-spezifische Antigene	73
3.2	HLA-Liganden aus Isocitrat-Dehydrogenase I.....	85
3.2.1	Ligandomanalysen.....	86
3.2.2	Gezielte Suche nach IDH1-R132H Peptiden auf HLA-Klasse II.....	87
3.3	Individuelle Heilversuche	95
3.3.1	Patient CCC009	97
3.3.2	Patient HCC021.....	99
3.3.3	Patientin mit Ovarialcarcinom.....	104
3.3.4	Patient mit B-ALL	106
4.	Diskussion.....	108
4.1	Peptidvakzine für Hepatozelluläre Karzinome	108
4.1.1	Tumor-assoziierte Antigene	110
4.1.2	Tumor-spezifische Antigene	114
4.1.3	Suche nach tumorspezifischen Antigenen bei HCC025, HCC26 und HCC027	115
4.1.4	Ausblick.....	116

4.2 HLA-Liganden aus Isocitrat-Dehydrogenase I.....	119
4.2.1 Ligandom-Analysen	119
4.2.2 Gezielte Suche nach IDH1-R132H Peptiden auf HLA-Klasse II.....	119
4.2.3 Ausblick.....	120
4.3 Individualisierte Heilversuche	122
4.3.1 Patientin CCC009	122
4.3.2 Patient HCC021.....	122
4.3.3 Patientin mit Ovarialkarzinom.....	123
4.3.4 Patient mit B-ALL	124
4.3.5 Ausblick.....	125
5. Zusammenfassung.....	128
6. Anhang.....	129
6.1 Vergleich der Spektren von Patient HCC025	130
6.2 Vergleich der Spektren von Patient HCC026	135
6.3 Vergleich der Spektren von Patient HCC027	140
7. Abkürzungsverzeichnis	153
8. Publikationen.....	156
9. Literaturverzeichnis.....	158

1. Einleitung

1.1 *Human Leukocyte Antigen*

Das *Human Leukocyte Antigen* (HLA)-System ist eine Gruppe menschlicher Gene, die unter dem Namen *Major Histocompatibility Complex* (MHC) in allen Wirbeltieren vertreten ist und ursprünglich bei Transplantationsexperimenten zwischen verschiedenen Mausstämmen entdeckt wurde [1]. Der HLA-Lokus befindet sich auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 und umfasst ungefähr 260 verschiedene Gene und vier Millionen Basenpaare [2]. Es können drei Regionen innerhalb des HLA-Systems unterschieden werden (HLA Klasse I bis III) [3]. Diese Regionen codieren für Proteine, welche wichtige Bestandteile des Immunsystems darstellen und die für dessen Funktionalität unabdingbar sind [4]. Die HLA-Klasse I-Region beherbergt unter anderem die Gene für die α -Ketten der klassischen HLA-Moleküle HLA-A, HLA-B und HLA-C [4, 5]. Die HLA-Klasse II-Region beherbergt, neben den nicht-klassischen HLA-Molekülen DM und DO, die α - und β -Ketten der HLA-Klasse II-Moleküle HLA-DR, HLA-DP und HLA-DQ [6]. Jeder HLA-Klasse II-Lokus codiert für eine funktionale α - und eine funktionale β -Kette. Manche HLA-DR Haplotypen verfügen zusätzlich über eine zweite HLA-DR β -Kette. In der HLA-Klasse II-Region sind zusätzlich noch andere Proteine codiert, welche wichtige Funktionen bei der Antigenprozessierung haben. Dazu gehören der *Transporter Associated with Antigen Processing* (TAP), das Chaperon Tapasin und die Untereinheiten des Immunproteasoms LMP2 und LMP7 [7, 8]. Die für das Immunsystem wichtigsten Proteine, die durch die HLA-Klasse III-Region codiert werden sind Faktoren des Komplementsystems wie C4 und C2 sowie das Zytokin *Tumor Necrosis Factor* (TNF) [9].

Die HLA-Klasse I- und Klasse II-Gene sind nicht nur polygen, sondern gehören auch zu den Genen mit den häufigsten Polymorphismen überhaupt [10]. Inzwischen sind über 9000 HLA-Klasse I-Allele und fast 3000 HLA-Klasse II-Allele in der IMGT/HLA-Datenbank verzeichnet (siehe Tabellen 1 und 2) [11]. Zudem werden die HLA-Gene kodominant vererbt. Ein Mensch besitzt und exprimiert in der Regel sechs verschiedene HLA-Klasse I Allele und sechs verschiedene Klasse II-Allele. Eine wichtige Aufgabe der HLA-Moleküle ist die Präsentation von Peptidantigenen an die T-Zellen des Immunsystems [12, 13]. Durch die Expression mehrerer HLA-Moleküle ist ein Individuum in der Lage ein breiteres Spektrum an Antigenen zu präsentieren und Immunreaktionen gegen eine Vielzahl von Krankheiten auszulösen. Durch die große Zahl an Polymorphismen unterscheidet sich die Antigenpräsentation

1. Einleitung

zwischen verschiedenen Individuen wesentlich. Dies führt zu einem noch breiteren Präsentationsrepertoire innerhalb einer Gemeinschaft. Jedes Individuum reagiert folglich unterschiedlich auf eine Infektion mit einem Krankheitserreger, was schlussendlich für das Überleben der Gemeinschaft von Vorteil ist [14].

Das Expressionsmuster von HLA-Klasse I-Molekülen und Klasse II-Molekülen unterscheidet sich deutlich. Während Klasse I-Moleküle auf fast jeder kernhaltigen Zelle des menschlichen Körpers vorkommen ist die Expression von Klasse II-Molekülen meist auf spezialisierte Zellen des Immunsystems begrenzt [15, 16]. Bei diesen Zellen handelt es sich um sogenannte professionell Antigen präsentierende Zellen, z.B. dendritische Zellen, B-Zellen oder Macrophagen [17]. Zusätzlich sind andere Zellen des Immunsystems wie Mastzellen oder Granulozyten sowie Endothel- bzw. Epithelzellen unter gewissen Umständen in der Lage HLA-Klasse II-Moleküle zu exprimieren [18].

Tabelle 1: Anzahl der bekannten HLA-Klasse I-Allele/Proteine [11]

HLA-Klasse I			
Gene	HLA-A	HLA-B	HLA-C
Allele	3107	3887	2623
Proteine	2185	2870	1850

Tabelle 2: Anzahl der bekannten HLA-Klasse II-Allele/Proteine [11]

HLA-Klasse II						
Gene	DRA	DRB	DQA1	DQB1	DPA1	DPB1
Allele	7	1829	54	780	39	520
Proteine	2	1335	32	515	20	424

1. Einleitung

1.1.1 Struktur und Funktion der HLA-Moleküle

HLA-Klasse I-Moleküle bestehen aus zwei Untereinheiten: Einer 43 kDa schweren α -Kette, auch als schwere Kette bekannt, und einer leichten invarianten Kette, dem β 2-Microglobulin, welche eine Masse von 13 kDa besitzt [19]. Das β 2-Microglobulin ist im Gegensatz zu den polymorphen α -Ketten auf Chromosom 15 codiert [20]. Die α -Kette besteht aus drei extrazellulären Domänen, einem Transmembranabschnitt und einem kurzen intrazellulären Sequenzabschnitt. Die drei extrazellulären Domänen werden α 1, α 2 bzw. α 3 genannt, wobei das β 2-Microglobulin mit der α 1-Domäne interagiert (siehe Abbildung 1). Zusätzlich bildet die α 1-Domäne zusammen mit der α 2-Domäne eine sogenannte Bindefurche, an welche Peptide mit einer Länge von acht bis zwölf Aminosäuren binden können. Die Bindefurche wird durch jeweils vier β -Faltblätter und eine α -Helix von jeder der beteiligten Domänen gebildet. Die insgesamt acht β -Faltblätter sind antiparallel angeordnet und bilden den Boden der Bindefurche, die zwei α -Helices begrenzen sie zu den Seiten hin [5]. Die Bindefurche ist nach oben hin offen und ermöglicht so die Interaktion zwischen dem T-Zell-Rezeptor von CD8-positiven T-Zellen und dem im HLA-Klasse I-Molekül gebundenem Peptid [21]. Die Bindung der Peptide an das HLA-Klasse I-Molekül wird durch die Interaktion konservierter Aminosäuren im HLA-Molekül mit dem C- und N-Terminus des Peptids erreicht [22], zusätzlich besitzt die Bindefurche der HLA-Klasse I-Moleküle sechs Bindetaschen, die mit den Seitenketten der Aminosäuren des Peptide interagieren können. Diese Bindetaschen, welche mit den Buchstaben A bis F bezeichnet werden, unterscheiden sich stark in ihrer Größe und ihren chemischen Eigenschaften innerhalb der verschiedenen HLA-Allele [23, 24]. Bei den meisten HLA-Allelen findet die stärkste Interaktion des Peptids mit der B- und der F-Tasche statt, was zur Bindung bevorzugter Aminosäuren an zweiter und C-terminaler Peptidposition führt. Diese Positionen nennt man Ankeramino-säuren, welche zusammen mit Nebenankern, welche durch schwächere Interaktionen der anderen Bindetaschen mit dem Peptid entstehen, das sogenannte Peptidmotiv eines HLA-Klasse I-Moleküls ausmachen [25-28]. Die Funktion der α 3-Domäne ist die Interaktion mit dem Corezeptor CD8 der T-Zellen [29]. Sie ist wie das β 2-Microglobulin zu einer *immunoglobulin-like* Domäne gefaltet und beide spielen keine direkte Rolle bei der Peptidbindung.

Die Peptide, die auf den HLA-Klasse I-Molekülen gebunden werden stammen hauptsächlich aus intrazellulären Proteinen und werden den CD8-positiven T-Zellen des Immunsystems präsentiert. Auf diese Weise ist das Immunsystem in der Lage zu überprüfen, welche Proteine in einer Zelle synthetisiert werden. Dies spielt vor allem bei der Infektion mit Viren oder bei einer malignen Transformation einer Zelle eine wichtige Rolle [30]. Im Falle einer Infektion mit einem Virus werden

1. Einleitung

fremde, virale Proteine in einer Zelle gebildet und im Idealfall auf einem HLA-Molekül dem Immunsystem präsentiert. T-Zellen erkennen diese Peptide als fremd und können die infizierte Zelle daraufhin abtöten. Dies geschieht durch die Expression von Fas-Ligand auf der Oberfläche der T-Zelle sowie dem Ausschütten von *Perforin* und *Granzyme B* [31, 32]. Durch die maligne Transformation einer Zelle, der Entstehung von Krebs, verändert sich die Genexpression einer Zelle. Die Veränderungen schlagen sich in der Zusammensetzung der Proteine im Zellinneren nieder, welche wiederum das Repertoire der auf HLA präsentierten Peptide beeinflusst [33]. Diese Veränderungen können ebenfalls von T-Zellen erkannt und die betroffenen Zellen entsprechend bekämpft werden. Zusätzlich können Mutationen die bei der Entstehung von Krebs auftreten ebenfalls von T-Zellen erkannt werden, sofern diese transkribiert und translatiert sowie prozessiert und auf HLA präsentiert werden [34, 35].

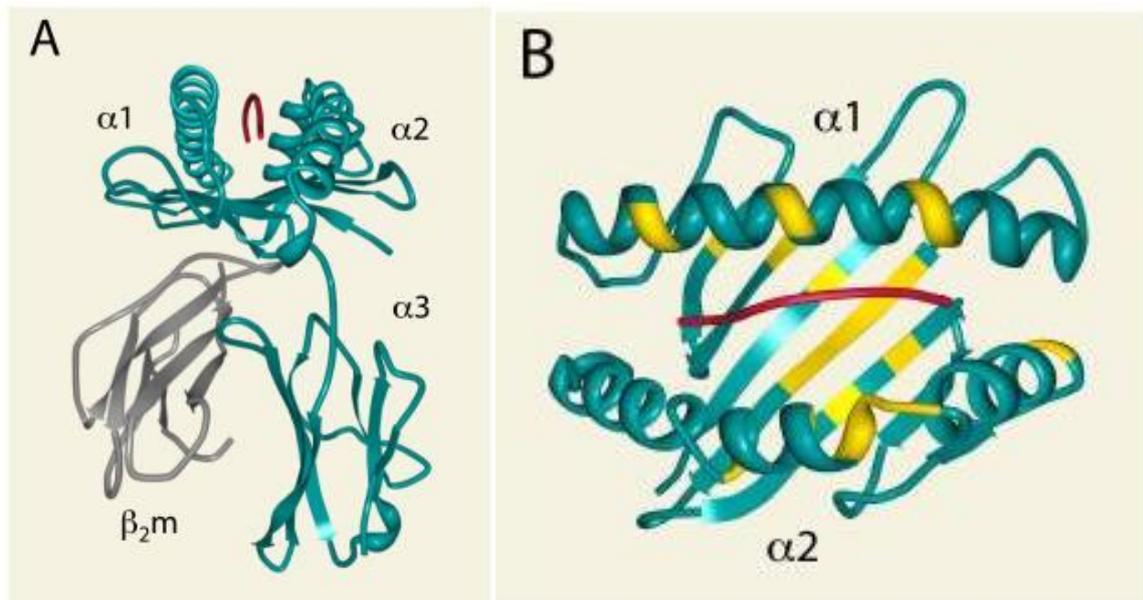


Abbildung 1: Dreidimensionale Struktur des HLA-Klasse I-Moleküls HLA-A2 im Komplex mit einem Peptid aus dem Influenza Matrix Protein (A). Die Schwere Kette ist in blau, das β_2m in grau, das Peptid in rot dargestellt (A und B). Aufsicht auf die Peptidbindungsfurche, in der das Peptid gebunden ist (B). Hochpolymorphe Regionen der HLA-A-Moleküle sind gelb markiert (B) [36].

HLA-Klasse II-Moleküle unterscheiden sich in ihrer Struktur und Funktion von denen der Klasse I. Klasse II-Moleküle bestehen aus zwei Untereinheiten, welche mit 34 kDa für die α -Kette und 29 kDa für die β -Kette ungefähr gleich schwer sind [37]. Beide Untereinheiten bestehen aus zwei extrazellulären Domänen, einem Transmembranabschnitt und einem intrazellulären Teil. Sowohl α - als auch β -Kette sind polymorph, wobei die β -Ketten deutlich mehr Varianz zeigen. Zusammen mit

1. Einleitung

der α 1-Domäne bildet die β -Domäne die Bindefurche der HLA-Klasse II-Moleküle. Diese Furche besitzt eine sehr ähnliche Struktur wie die Bindefurche der HLA-Klasse I-Moleküle, ist zu den Seiten hin aber offen. Dies führt dazu, dass deutlich längere Peptide von bis zu 25 Aminosäuren von HLA-Klasse II-Molekülen gebunden werden können [38]. Von den präsentierten Peptiden wird nur ein Sequenzabschnitt von sieben bis neun Aminosäuren gebunden. Die restlichen Aminosäuren können durch die offenen Seiten aus der Bindefurche herausragen. Dadurch können verschiedene Längenvarianten eines Peptids mit derselben Kernsequenz an HLA-Klasse II-Moleküle binden [39]. Zusätzlich zeigen HLA-Klasse II-Moleküle eine deutlich geringere Spezifität, was die gebundenen Aminosäuren betrifft [40]. Diese Faktoren führen dazu, dass die Peptidmotive von HLA-Klasse II-Molekülen deutlich weniger definiert sind, als von HLA-Molekülen der Klasse I [41]. Die auf HLA-Klasse II-Molekülen präsentierten Peptide stammen hauptsächlich aus extrazellulären Proteinen und werden an CD4-positive T-Zellen präsentiert [42]. Die Aktivierung von CD4-positiven T-Zellen spielt eine zentrale Rolle im Immunsystem, sowohl bei der Bekämpfung von Krankheiten sowie auch bei der Entstehung von zahlreichen Autoimmunkrankheiten [43]. Je nachdem welchen Zytokinen die T-Zellen bei ihrer Aktivierung ausgesetzt sind differenzieren sie in unterschiedliche Subtypen, welche unterschiedliche Rollen bei der Immunreaktion spielen und die Immunreaktion in verschiedene Richtungen lenken können. Dies ist bedeutend bei Infektionen mit Parasiten, Bakterien, Viren oder Pilzen sowie bei Krebs und Autoimmunkrankheiten. CD4-positive T-Zellen sind sogar in der Lage sich in sogenannte regulatorische T-Zellen zu differenzieren und Immunreaktionen zu hemmen [44]. HLA-Klasse II-Moleküle stehen also durch ihre Interaktion mit CD4-positiven T-Zellen an einem zentralen Punkt des Immunsystems und sind von großer Bedeutung.

1. Einleitung

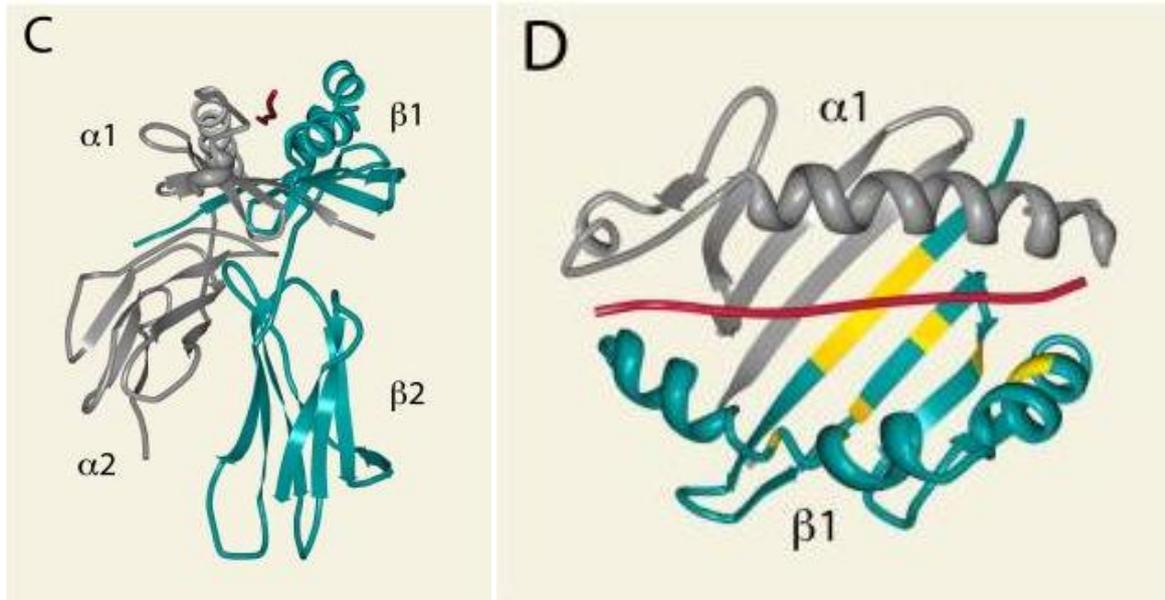


Abbildung 2: Dreidimensionale Struktur des HLA-Klasse II-Moleküls HLA-DR1 im Komplex mit einem Peptid aus Influenza Hämagglutinin (C). Die α -Kette ist in grau, die β -Kette blau, das Peptid in Rot dargestellt (C und D). Aufsicht auf die Peptidbindungsfurche, in der ein Peptid gebunden ist (D). Hochpolymorphe Regionen der HLA-DR-Moleküle sind gelb markiert [36].

1.1.2 Antigenprozessierung und Antigenpräsentation auf HLA-Molekülen

Unter Antigenprozessierung versteht man die zahlreichen Schritte, die zur natürlichen Präsentation von Peptiden auf HLA-Molekülen führen. HLA-Moleküle der Klasse I präsentieren vorwiegend Peptide aus intrazellulären Proteinen, Klasse II-Moleküle hingegen Peptide aus Proteinen die dem extrazellulären Raum entstammen. Dies beruht auf unterschiedlichen Mechanismen bei der Prozessierung der entsprechenden Antigene bzw. Proteine [45-47].

1. Einleitung

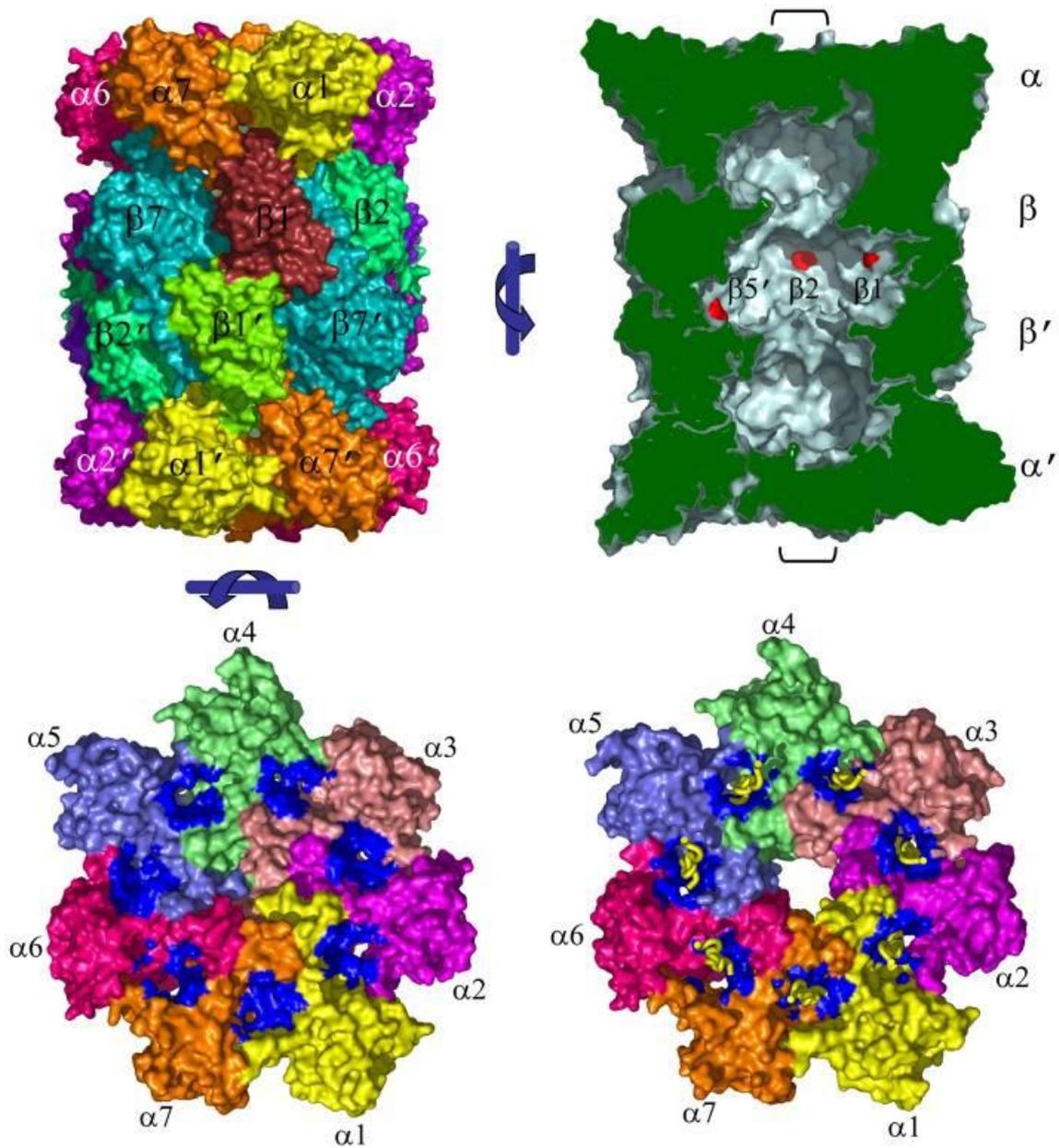


Abbildung 3: Dreidimensionale Struktur der zentralen Untereinheit des 26S-Proteasoms. Die α - und β -Untereinheiten sind in verschiedenen Farben dargestellt. Zu sehen sind die vier heptameren Ringe sowie die Lokalisation der proteolytisch aktiven Bereiche der Untereinheiten $\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 5$ (rot, rechts oben) [48].

Die Antigenprozessierung für von HLA-Klasse I-Molekülen präsentierte Peptide beginnt im Zytosol. Dort werden gealterte, denaturierte oder fehlgefaltete Proteine mit Ubiquitin für den Abbau im Proteasom markiert [49]. Dabei wird Ubiquitin, selbst ein kleines Protein, kovalent an das abzubauenende Protein gebunden [50]. Beim (26S-) Proteasom handelt es sich um einen großen Multiproteinkomplex bestehend aus einer zentralen 20S-Untereinheit und zwei 19S-Untereinheiten. Jede dieser Untereinheiten besteht ihrerseits aus mehreren Proteinen [48]. Die 20S-Untereinheit

1. Einleitung

besteht aus vier übereinander angeordneten Ringen, von denen jeder jeweils aus sieben Untereinheiten zusammengesetzt ist (Abbildung 3). Die zwei äußeren Ringe erkennen die für den Abbau bestimmten Proteine, sorgen für deren Entfaltung und transportieren diese ins Innere des Proteasoms, wofür ATP benötigt wird. Die Untereinheiten der äußeren Ringe werden mit $\alpha 1$ bis $\alpha 7$ bezeichnet. Die Untereinheiten der zwei inneren Ringe werden mit $\beta 1$ bis $\beta 7$ bezeichnet und besitzen teilweise Proteaseaktivität [51]. Die $\beta 1$ -Untereinheit schneidet die Proteine vorwiegend nach sauren Aminosäuren, sie besitzt eine Spezifität ähnlich der von Caspasen. Die $\beta 2$ -Untereinheit schneidet bevorzugt nach basischen Aminosäuren, vergleichbar mit Trypsin. Die $\beta 5$ -Untereinheit besitzt eine Chymotrypsin-ähnliche Proteasespezifität, sie schneidet nach hydrophoben Aminosäuren [48]. Dadurch werden vorwiegend Peptide mit einer Länge von drei bis 25 Aminosäuren generiert [12].

Unter dem Einfluss von Interferon- γ (IFN- γ) oder Tumornekrosefaktor (TNF) werden die katalytisch aktiven Untereinheiten mit den induzierbaren β -Untereinheiten LMP2, MECL-1 und LMP7 ausgetauscht. Die resultierende Struktur wird als Immunproteasom bezeichnet [52]. Das Immunproteasom hat eine veränderte Substratspezifität und generiert hauptsächlich Peptide mit basischen oder hydrophoben C-Termini. Zusätzlich zum Austausch der katalytischen Untereinheiten bewirkt IFN- γ die Anlagerung der PA28-Untereinheit an das Proteasom, was zu einer erhöhten Peptidproduktion führt und die durchschnittliche Länge der erzeugten Peptide auf acht bis zehn Aminosäuren senkt. Der C-Terminus der auf HLA-Klasse I-Molekülen präsentierten Peptide wird bereits durch die Schnittspezifität des Proteasoms bzw. Immunproteasoms festgelegt [53]. Der N-Terminus hingegen wird von verschiedenen Proteasen im Zytosol bzw. im endoplasmatischen Retikulum (ER) erzeugt [54-56]. Dieser Vorgang wird als *trimming* bezeichnet und erzeugt Peptide mit einer optimalen Länge von 8 bis 12 Aminosäuren für die Beladung von HLA-Klasse I-Molekülen im ER. Der Transport der Peptide in das ER wird durch den *transporter associated with antigen processing* (TAP) ermöglicht [57]. Dieser heterodimere Transporter der ABC-Familie durchzieht die ER-Membran und schleust Adenosintriphosphat (ATP)-abhängig bevorzugt Peptide einer Länge von acht bis 16 Aminosäuren mit hydrophobem oder basischem C-Terminus aus dem Zytosol ins ER [58]. TAP ist im ER mit dem sogenannten *Peptide Loading Complex* (PLC) assoziiert. Dieser Komplex besteht aus den Chaperonen *Tapasin*, ERp57 und *Calreticulin* (CRT) [59]. Zusätzlich enthält der Komplex intakte, gefaltete HLA-Klasse I-Moleküle und ermöglicht deren Beladung mit geeigneten Peptiden. Peptidbeladene HLA-Moleküle werden dann über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche transportiert, wo sie in der Lage sind die beladenen Peptide an CD8-positiven T-Zellen zu präsentieren [60]. Bei den Peptiden, die auf HLA-Klasse I Molekülen präsentiert werden, handelt es sich nicht ausschließlich um Peptide aus gealterten und ausgedienten Proteinen. Tatsächlich stammen viele Peptide aus sogenannten DRiPs (*Defective Ribosomal Products*) [61]. Dabei handelt es

1. Einleitung

sich um Proteine, welche direkt nach ihrer Synthese im Ribosom aufgrund ihrer fehlerhaften Faltung nicht funktional sind und durch Ubiquitinierung dem Proteasom zugeführt werden. Dieser Mechanismus ermöglicht es, dass zusätzlich zu Peptiden aus zytosolischen Proteinen Peptide aus allen in einer Zelle synthetisierten Proteinen auf HLA-Molekülen präsentiert werden können. Zusätzlich sind Zellen in der Lage Peptide die endozytierten, extrazellulären Proteinen oder Membranproteinen entstammen [62, 63] auf HLA-Klasse I-Molekülen zu präsentieren. Hierfür gibt es mehrere Modelle, welche unter dem Namen *Cross Presentation* zusammengefasst werden, z.B. können Antigene aus Endo- bzw. Phagosomen in das Zytosol gelangen und dort dem Proteasom zugeführt werden. Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass die Phagosomen mit dem ER fusionieren. Vom ER aus können die Antigene dann durch den Transporter SEC61 ins Zytosol befördert werden, wo sie dann dem Proteasom zugeführt werden [64].

1. Einleitung

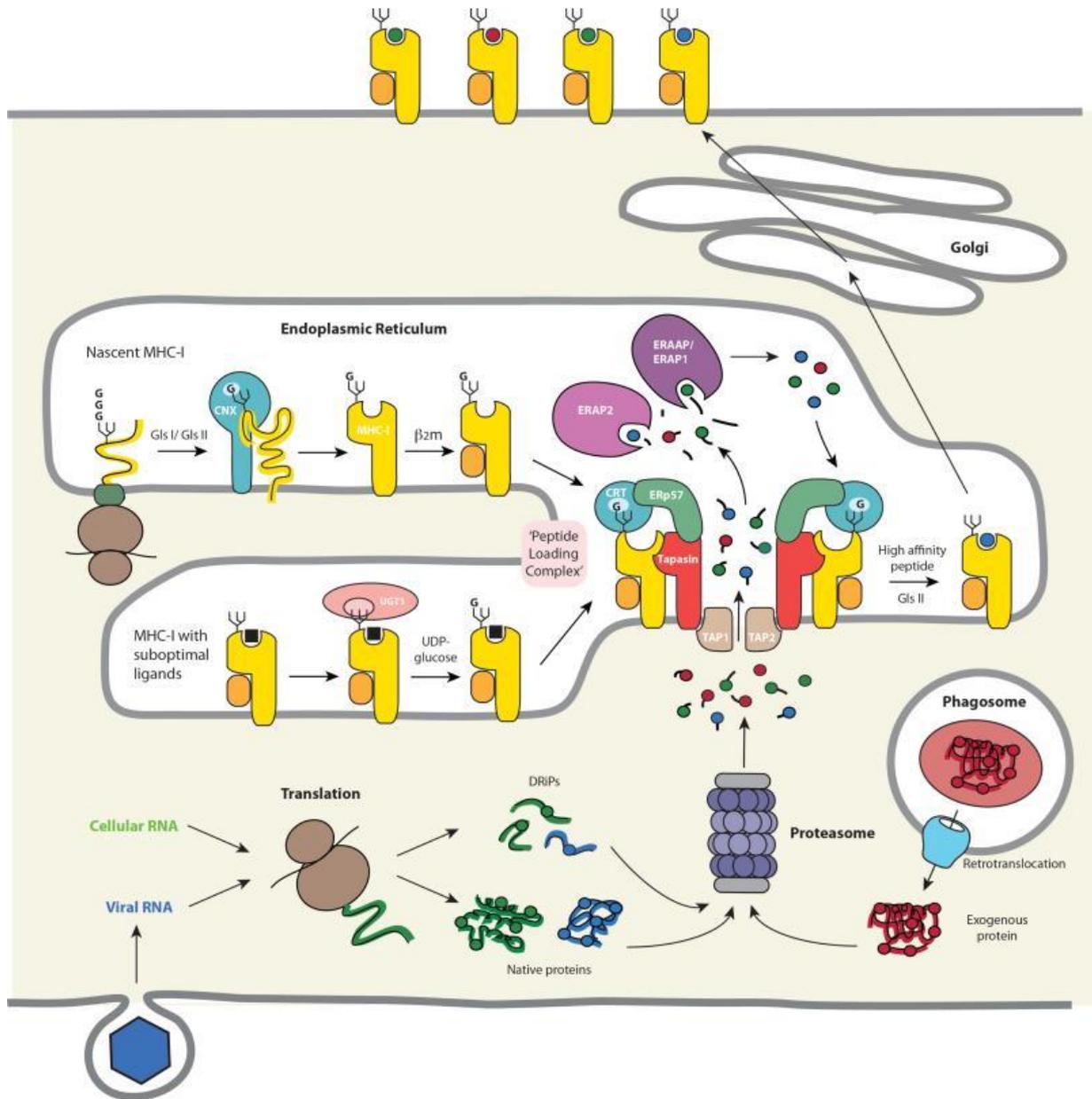


Abbildung 4: HLA-Klasse I-Molekül-Biosynthese, Prozessierung von HLA-Klasse I-präsentierten Antigenen und Beladung von HLA-Klasse I-Molekülen. Von links oben: Synthese des HLA-Klasse I-Moleküls direkt in das Lumen des ERs. Glucosidasen (Gls I /Gls II) entfernen alle Glucosereste des Glycans am HLA-Molekül bis auf einen terminalen Glucoserest, was die Assoziation mit dem Chaperon Calnexin (CNX) auslöst. Dies ermöglicht die initiale Faltung des HLA-Moleküls und die Anlagerung des β_2 -Microglobulin. Das leere HLA-Molekül wird dann mit Hilfe von Calreticulin (CRT) in den PLC rekrutiert. Dort werden die HLA-Moleküle mit hochaffinen Peptiden beladen. Links Mitte: HLA-Moleküle, welche niederaffine Peptide gebunden haben stellen Substrate für das Enzym UGT1 dar. UGT1 reglycosyliert die schwere Kette des HLA-Moleküls, was zur Freisetzung des ungeeigneten Peptids und zur erneuten Aufnahme des HLA-Moleküls in den PLC führt. Unten links: Virale oder zelluläre Proteine werden am Ribosom translatiert. Die entstehenden nativen Proteine oder DRiPs werden ubiquitiniert und im Proteasom zu kurzen Peptiden abgebaut. Zytosolische Proteasen sowie Proteasen im ER (z.B. ERAAP, ERAP1/2) trimmen die Peptide auf eine Länge von 8 bis 12 Aminosäuren. Die Peptide werden durch den Peptidtransporter TAP vom Zytosol in das Lumen des ERs transportiert und werden im PLC in die leeren HLA-Moleküle gebunden. Es folgt der Transport an die Zelloberfläche. Rechts unten: Der Transport von Proteinen aus Phagosomen in das Zytosol ermöglicht deren Abbau im Proteasom und die Präsentation der aus ihnen entstehenden Peptide auf HLA-Molekülen der Klasse I. Hierbei kann es sich z.B. um extrazelluläre Proteine oder Transmembranproteine handeln [36]

1. Einleitung

Für Peptide, welche auf HLA-Klasse II-Molekülen präsentiert werden, beginnt die Prozessierung in den meisten Fällen außerhalb der Zelle. Extrazelluläre oder membranständige Proteine gelangen durch Phago- oder Endozytose in das Innere der Zelle. Auch extrazelluläre Pathogene können auf diese Weise von professionellen Antigen-präsentierenden Zellen aufgenommen werden. Die Endo- bzw. Phagosomen fusionieren daraufhin mit Lysosomen. Der niedrige pH-Wert in den Lysosomen, Reduktasen sowie Cathepsine und andere Proteasen ermöglichen den Abbau der Proteine bzw. Pathogene zu Peptiden, welche auf HLA-Klasse II-Molekülen präsentiert werden können. Die Beladung der HLA-Klasse II-Moleküle findet in einem spezialisierten Zellkompartiment statt, dem sogenannten MIIC (*MHC Class II Compartment*). Lysosomen sind in der Lage mit dem MIIC zu fusionieren und so die zu präsentierenden Peptide den HLA-Klasse II-Molekülen zuzuführen [13, 65, 66].

Die α - und β -Ketten der HLA-Klasse II-Moleküle binden direkt nach ihrer Synthese im Lumen des ERs an das Protein Ii (*Invariant Chain*, invariante Kette). Die invariante Kette besetzt die Bindefurche des HLA-Klasse II-Moleküls und stabilisiert dieses dadurch. Zusätzlich verhindert die invariante Kette die Beladung der HLA-Moleküle mit Selbstpeptiden aus dem ER. Die invariante Kette wird nach dem Transport des Ii/HLA-Molekül-Komplexes in das MIIC durch Cathepsin S zum kurzen Peptid CLIP (*Class II Associated Ii Peptide*) abgebaut. Das Chaperon HLA-DM, welches ebenfalls in das MIIC transportiert wird, kann nun den Austausch des CLIPs mit den lysosomal abgebauten Peptiden katalysieren. Ein weiteres HLA-Molekül, HLA-DO, kann durch die Hemmung von HLA-DM dafür sorgen, dass der Peptidaustausch erst im sauren Milieu des MIIC stattfindet [67]. Nach Beladung der HLA-Klasse II-Moleküle mit Peptiden von extrazellulären Antigenen werden die HLA/Peptid-Komplexe an die Zelloberfläche transportiert, wo sie in Kontakt mit CD4-positiven T-Zellen treten können.

HLA-Klasse II-Moleküle sind jedoch auch in der Lage Peptide aus intrazellulären Proteinen zu präsentieren [68]. Durch Autophagie werden Teile des Zytosols und sogar ganze Zellorganellen in so genannte Autophagosomen eingeschlossen. Diese Autophagosomen sind in der Lage mit Lysosomen zu fusionieren, was zum Abbau der eingeschlossenen Proteine führt. Hier laufen die zwei Wege der HLA-Klasse II-Prozessierung zusammen, die Lysosomen fusionieren mit dem MIIC, in dem die Beladung der HLA-Klasse II-Moleküle stattfindet. Durch den anschließenden Transport der beladenen HLA-Peptid-Komplexe an die Zelloberfläche werden somit auch Peptide aus intrazellulären Antigenen auf HLA-Klasse II-Molekülen an CD4-positive T-Zellen präsentiert.

1. Einleitung

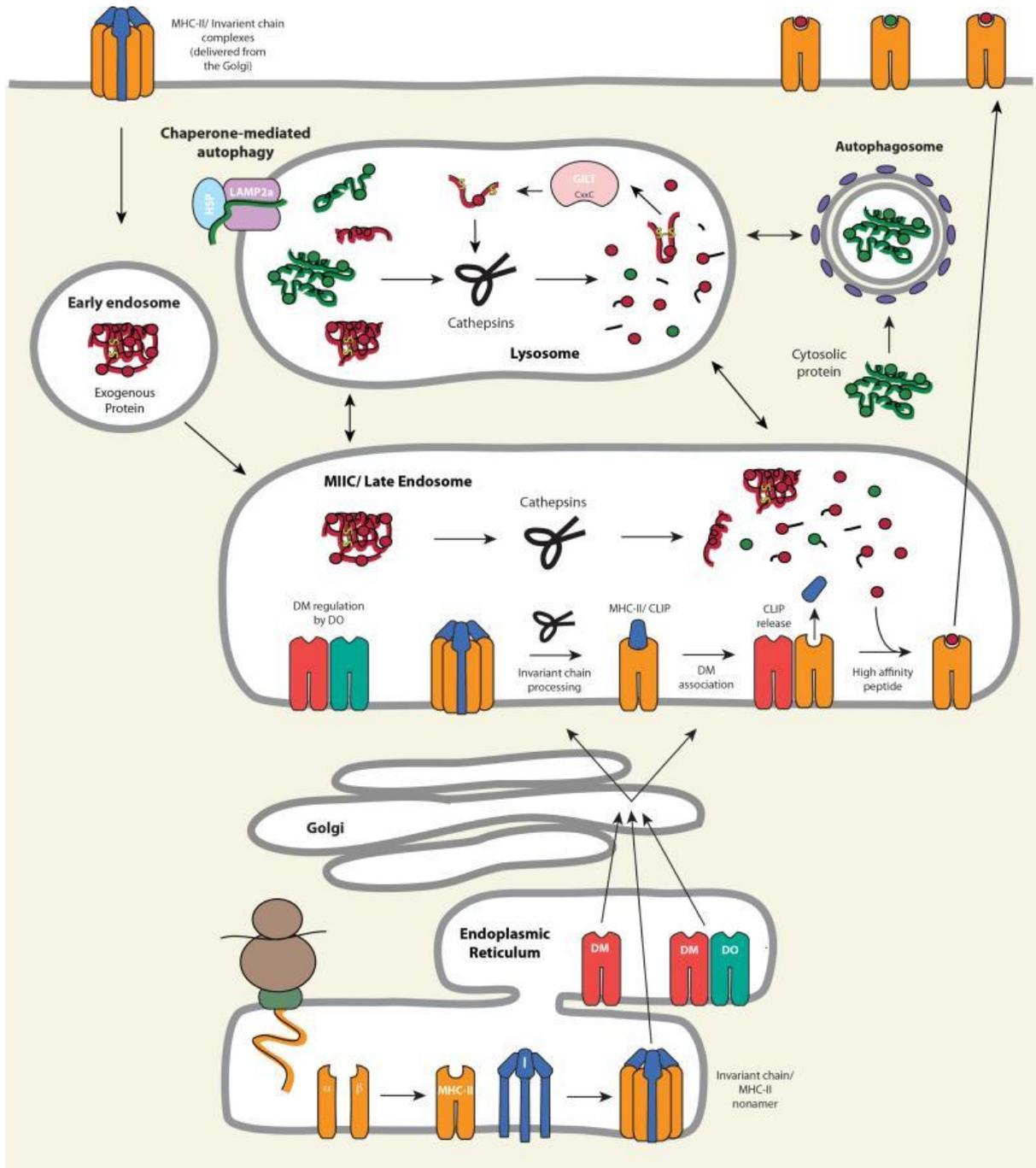


Abbildung 5: HLA-Klasse II-Molekül-Biosynthese, Prozessierung von HLA-Klasse II-präsentierten Antigenen und Beladung von HLA-Klasse II-Molekülen. Oben: Peptide, die auf HLA-Klasse II-Molekülen präsentiert werden, können aus extrazellulären Proteinen stammen. Diese Proteine werden durch Endozytose, Pinozytose oder Phagozytose in die Zelle aufgenommen und in das MIIC transportiert, um dort von Proteasen (z.B. Cathepsinen) zu Peptiden abgebaut zu werden. Zusätzlich können zelluläre Proteine durch Autophagie über Lysososome in das MIIC gelangen um dort ebenfalls abgebaut zu werden. Unten: Synthese der HLA-Klasse II-Molekül α - und β -Ketten in das Lumen des ERs hinein. Drei HLA-Moleküle bilden mit einem Ii-Trimer einen nonameren Komplex und werden in das MIIC transportiert. Mitte: Im MIIC wird Ii durch Cathepsine zum kurzen Peptid CLIP abgebaut, welches die Peptidbindungsfurche der HLA-Klasse II-Moleküle besetzt. HLA-DM, welches von HLA-DO reguliert wird, katalysiert den Austausch von CLIP mit Peptiden aus dem lysosomalen Abbau. Um an T-Zellen präsentiert zu werden, werden die peptidbeladenen HLA-Klasse II-Moleküle an die Zelloberfläche transportiert. [36].

1. Einleitung

HLA-Klasse II-Moleküle werden hauptsächlich von professionellen Antigen präsentierenden Zellen exprimiert [69]. Hierbei handelt es sich z.B. um Macrophagen, dendritische Zellen und B-Zellen. Während Makrophagen und dendritische Zellen relativ unspezifisch extrazelluläres Material endozytieren, besitzt jede B-Zelle einen antigenspezifischen B-Zell-Rezeptor, welcher die Endozytose in diesem Zelltyp einleitet [70]. Präsentieren B-Zellen Peptide, welche von CD4-positiven T-Zellen als fremd erkannt werden und werden diese B-Zellen daraufhin aktiviert, sind sie in der Lage zu Plasmazellen zu differenzieren, zu proliferieren und entsprechende Antikörper zu produzieren [71]. Diese Antikörper weisen dieselbe Antigenpezifität wie der ursprüngliche B-Zell-Rezeptor auf. Auf diese Weise können z.B. Virusinfektionen bekämpft werden. Viruspartikel werden von B-Zellen nach der Bindung an den B-Zell-Rezeptor endozytiert und die viralen Peptide anschließend auf HLA-Klasse II-Molekülen präsentiert. Die nach Aktivierung der B-Zellen produzierten Antikörper sind dann in der Lage weitere Viruspartikel desselben Typs zu binden und zu neutralisieren [72].

1. Einleitung

1.2 Leberkrebs

1.2.1 Neuerkrankungsraten und Todesfälle

Leberkrebs gehört mit jährlich über 8000 Neuerkrankungen zwar nicht zu den häufigsten Krebserkrankungen in Deutschland, er ist allerdings aufgrund seiner schlechten Prognose einer der zehn häufigsten Krebstodesursachen [73]. Es überleben nur ca. 10 % der Patienten die ersten 5 Jahre nach Diagnose. Weltweit hingegen erkranken jedes Jahr knapp 800.000 Menschen an Leberkrebs, bei ca. 750.000 Krebstoten, was Leberkrebs zur fünfthäufigsten Tumorerkrankung weltweit macht. Abbildung 6 zeigt die Neuerkrankungen und Krebstodesfälle 2011 pro 100.000 Einwohner weltweit [74]. Abbildung 7 zeigt die absolute Überlebensrate bis zehn Jahre nach Diagnose in Deutschland.

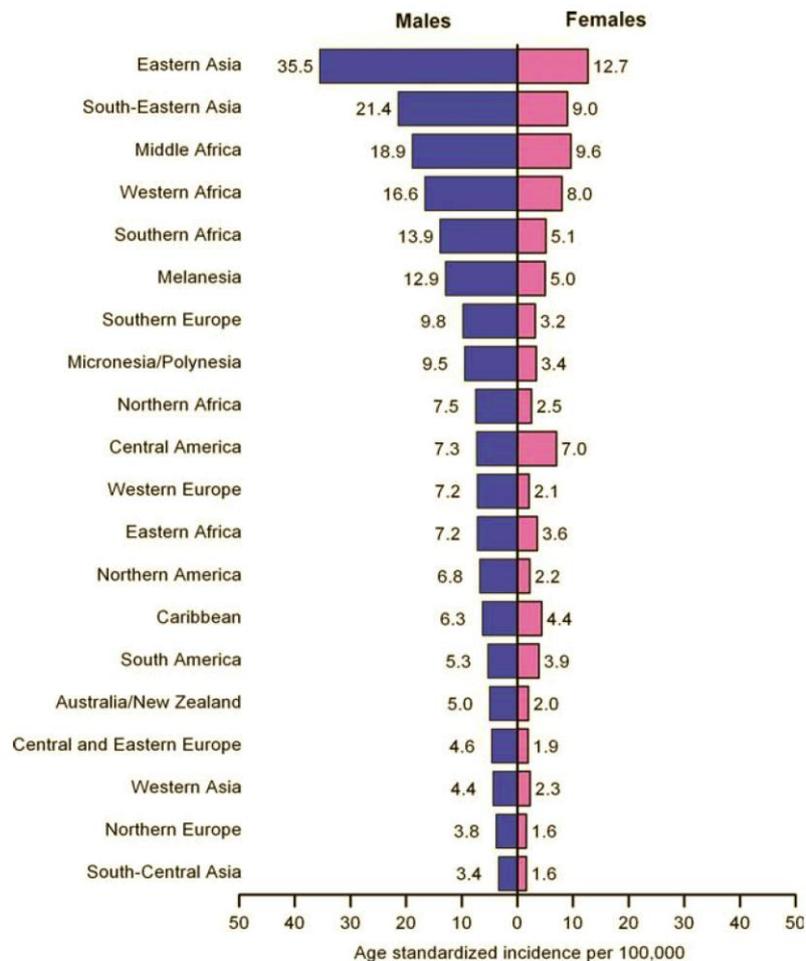


Abbildung 6: Weltweite Leberkrebs-Erkrankungsrate und Krebstode 2011 [74]

1. Einleitung

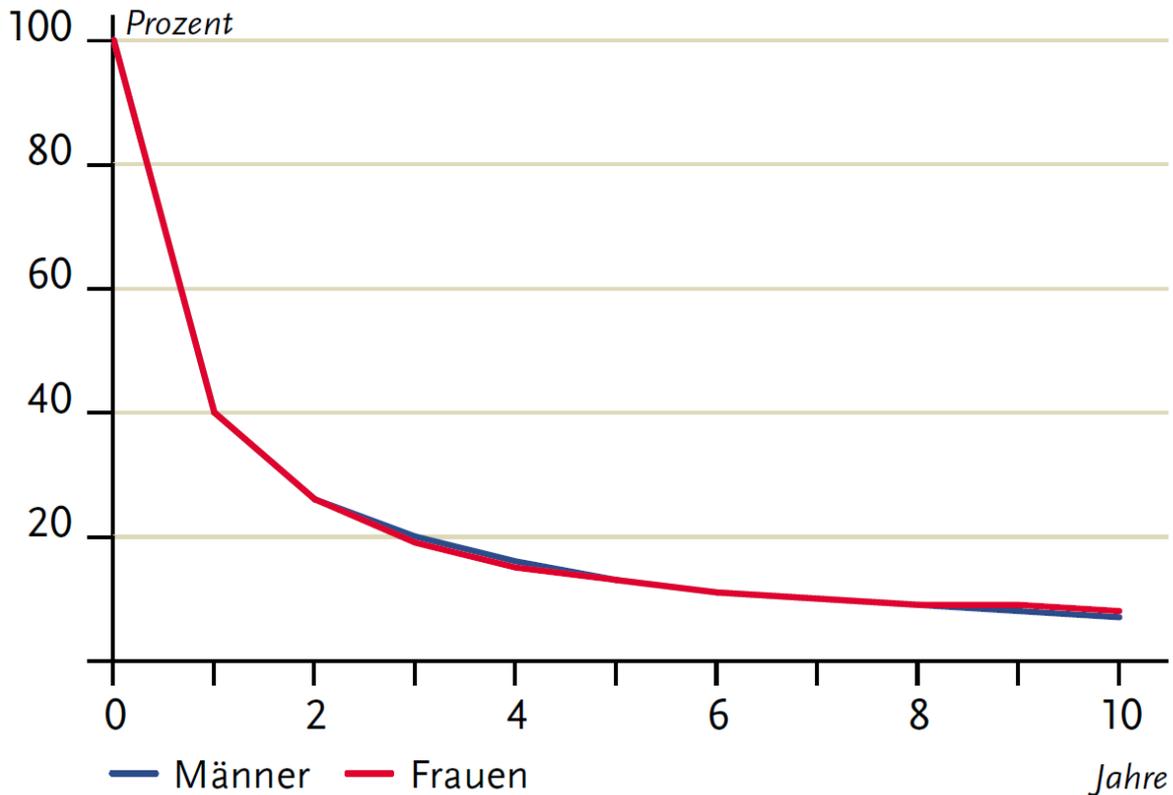


Abbildung 7: Absolute Überlebensraten bis 10 Jahre nach Diagnose bei Leberkrebspatienten in Deutschland [73]

Beim primären Leberkrebs im Erwachsenenalter spielen hauptsächlich das Hepatozelluläre Karzinom (HCC), welches ca. 65% der bösartigen Lebertumore ausmacht und das Cholangiozelluläre Karzinom (CCC) welches ca. 25% ausmacht eine Rolle. HCC entsteht aus Leberzellen (Hepatozyten), CCC in den meisten Fällen aus Zellen der intrahepatischen Gallengänge aber auch aus Zellen der großen Gallengänge, der Gallenblase oder der Hepaticusgabel. Bei Frauen liegt der Anteil an CCC im Vergleich zu Männern deutlich höher. HCC ist vor allem in weniger entwickelten Ländern im asiatischen Raum und speziell in China, wo jedes Jahr 50% der Neuerkrankungen auftreten, ein signifikantes medizinisches Problem. Auch viele südostasiatische Länder sind stark betroffen, was an einer weiten Verbreitung von chronischen Hepatitis-B-Viruserkrankungen liegt [75]. Außerdem ist die Infektion mit Hepatitis-C-Viren ein Hauptrisikofaktor. Weiterhin kann die Kontamination von Lebensmitteln mit Aflatoxin B1 (dem Gift bestimmter Schimmelpilze) HCC auslösen. In Deutschland und anderen westlichen Ländern begünstigen vor allem Alkoholkonsum oder eine nicht-alkoholische Fettlebererkrankung die Entstehung von HCC [75]. Letzteres hat in Folge von *Diabetes Mellitus* und des metabolischem Syndroms in den letzten 20 Jahren deutlich zugenommen [76]. Generell haben Patienten mit einer Leberzirrhose unabhängig der Ätiologie ein erhöhtes Risiko an HCC zu erkranken

1. Einleitung

[76]. Dazu zählt z.B. auch die Erberkrankung Hämochromatose, eine Störung des Eisenstoffwechsels, die eine Leberzirrhose bedingen und damit auch die Entstehung von HCC begünstigen kann.

1.2.2 Diagnostik, Klassifikation und Behandlung von HCC

Abbildung 8 zeigt die diagnostischen Pfade zum Nachweis von HCC [76]. Eine Biopsie mit anschließender histologischer Sicherung oder eine Bildgebung mit Kontrastmittel führen zur Diagnose HCC. Bei der Kontrastmitteluntersuchung wird bei HCC in der Bildgebung eine charakteristische Auswaschung des Kontrastmittels, die dann zur Kontrastumkehr führt, beobachtet [77]. Das MRT bietet hierbei die höchste diagnostische Treffsicherheit. Es gibt für HCC keinen etablierten Tumormarker im Serum, der für die sichere Diagnose eingesetzt werden könnte, da die Kandidaten eine zu geringe Spezifität haben [75]. Allerdings können Tumormarker wie α -Fetoprotein (AFP) in der Verlaufsbeurteilung des HCC hilfreich sein [78]. Weitere Tumormarker, die für die Diagnostik getestet wurden, sind z.B. Des-Gamma-Carboxyprothrombin, α -Fukosidase oder Glypikan 3, ihre Verwendung wird aber nicht empfohlen [79].

1. Einleitung

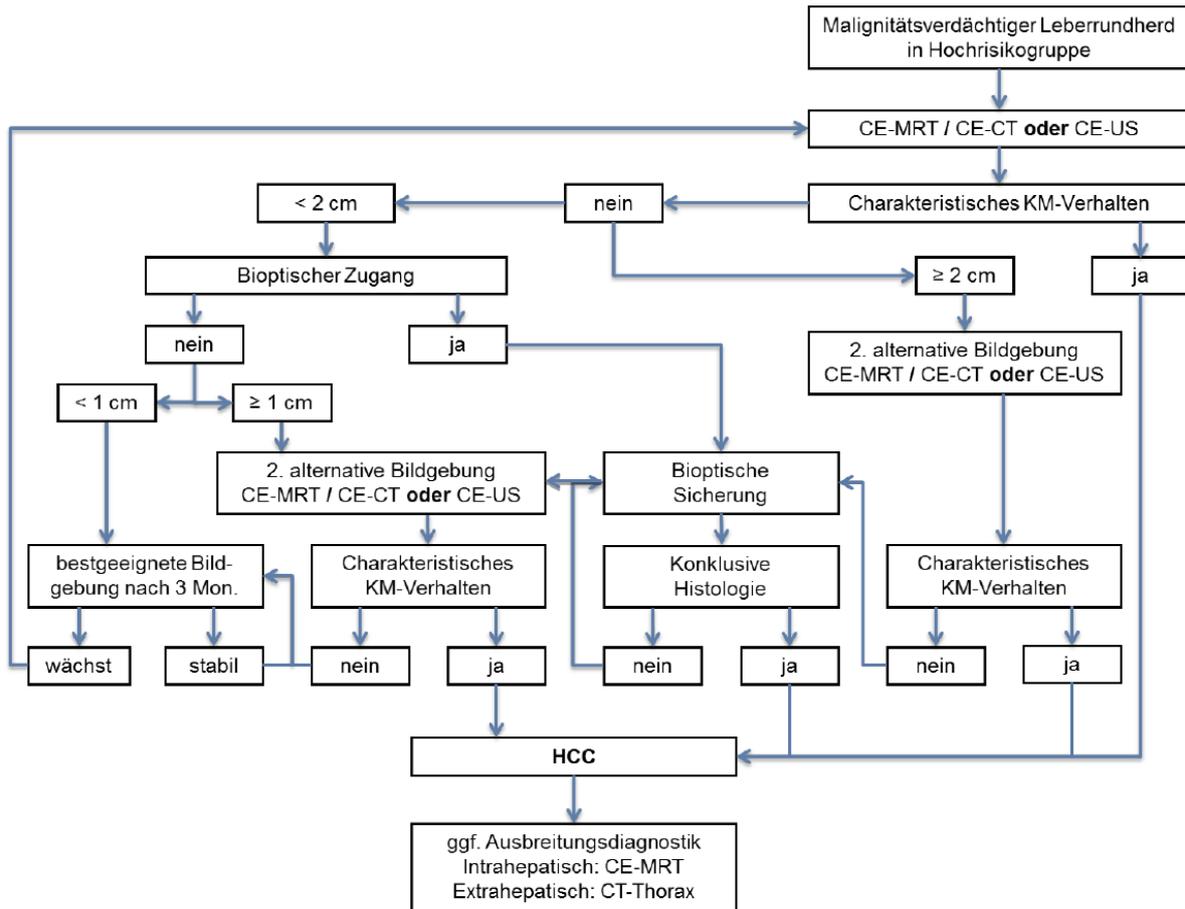


Abbildung 8: Flussdiagramm diagnostischer Pfade zum Nachweis von HCC. Diagnostisch für HCC ist ein charakteristisches Kontrastmittelverhalten in der Bildgebung. Alternativ kann eine Biopsie des Gewebes fraglicher Dignität mit histopathologischer Begutachtung die Diagnose sichern. Ist durch beide Methoden nicht eindeutig zu klären ob ein HCC vorliegt wird nach drei Monaten eine erneute Diagnostik eingeleitet. KM: Kontrastmittel, CE-MRT: Kontrastmittelverstärkte Magnetresonanztomographie, CE-CT: Kontrastmittelverstärkte Computertomographie, CE-US: Kontrastmittelverstärkte Ultraschalluntersuchung [76].

Bei der Klassifikation von HCC spielt nicht nur das jeweilige Tumorstadium, also Anzahl und Größe der Tumorherde sowie Metastasierung in lokale Lymphknoten und Fernmetastasierung eine Rolle, sondern auch die Leberfunktion sowie der Allgemeinzustand des Patienten [80]. Da eine Leberzirrhose mit erheblich reduzierter Organfunktion mit stark erhöhtem Mortalitätsrisiko einhergeht, bestimmt der Gesamtzustand der Leber maßgeblich die Prognose und Therapie des Patienten. Dies steht im Gegensatz zu anderen Tumorerkrankungen, bei denen ausschließlich das Tumorstadium und der Gesamtzustand des Patienten zur Prognose herangezogen werden. Bei HCC wird dazu die *Barcelona-Clinic Liver Cancer* (BCLC) Klassifikation herangezogen [81]. Tabelle 3 zeigt die verschiedenen Stadien der BCLC-Klassifikation. Der Allgemeinzustand des Patienten wird hierbei durch den *Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status* (ECOG), kurz *Performance Status* (PS), beschrieben, die Leberfunktion durch den *Child-Pugh-Score* [82-84]. Die Tabellen 4 und 5 zeigen

1. Einleitung

die Einteilung der Patienten nach diesen Kriterien. Die Punkte aus Tabelle 5 werden zu Bemessung des *Child-Pugh-Scores* addiert. Tabelle 6 zeigt die Einteilung in die verschiedenen *Child-Pugh* Stadien korreliert mit den entsprechenden Überlebensraten.

Tabelle 3: BCLC-Klassifikation von Lebertumoren: Neben der Größe und dem Grad der Metastasierung spielen der Allgemeinzustand (ECOG Performance Status, PS) sowie die Leberfunktion des Patienten bei der Tumorklassifikation von HCC eine wichtige Rolle[81].

BCLC-Stadium	Allgemeinzustand	Tumor	Leberfunktion
A1	PS 0	1 Herd < 5 cm	Keine portale Hypertension, normales Bilirubin
A2	PS 0	1 Herd < 5 cm	portale Hypertension, normales Bilirubin
A3	PS 0	1 Herd < 5 cm	Portale Hypertension, erhöhtes Bilirubin
A4	PS 0	<= 3 Herde, < 3 cm	<i>Child-Pugh</i> A oder B
B	PS 0	Groß multilokulär	<i>Child-Pugh</i> A oder B
C	PS 1-2	Gefäßinvasion oder Metastasen	<i>Child-Pugh</i> A oder B
D	PS 3-4	Alle Stadien	<i>Child-Pugh</i> C

1. Einleitung

Tabelle 4: Kriterien zur Einteilung von Patienten nach ECOG-Performance Status: Der ECOG-Performance Status beschreibt den Allgemeinzustand eines Patienten[83].

Grad	ECOG-Performance Status
0	Keine Symptome
1	Symptomatisch, jedoch voll mobil. Einschränkungen bei schwerer körperlicher Arbeit
2	< 50% im Bett während des Tages, fähig zur Selbstversorgung, aber unfähig zu arbeiten
3	> 50% im Bett während des Tages, nur eingeschränkt fähig zur Selbstversorgung
4	Bettlägerig, nicht befähigt zur Selbstversorgung, auf Bett bzw. Stuhl angewiesen
5	Tod

Tabelle 5: Tabelle zur Beurteilung des Child-Pugh Score für Patienten. Für jedes Kriterium können ein bis drei Punkte vergeben werden. Diese Punkte werden aufaddiert und führen zu einer Überlebensprognose nach Tabelle 6 [84].

Kriterium	1 Punkt	2 Punkte	3 Punkte
Serum-Bilirubin	< 2 mg/dl	2-3 mg/dl	>3 mg/dl
Serum-Albumin	> 3,5 g/dl	2,8 g/dl -3,5 g/dl	< 2,8 g/dl
Quick-Wert	> 70%	40%-70%	< 40%
Aszites im Ultraschall	Keiner	Leicht	Mittelgradig
Hepatische Enzephalopathie	-	Stadium I-II	Stadium III-IV

Tabelle 6: Einteilung in Child-Pugh Stadium nach Punkten aus Tabelle 3 mit Überlebensraten und perioperativer Mortalität [84].

Punkte	Stadium	1-Jahres-Überlebensrate	5-Jahres-Überlebensrate	10-Jahres-Überlebensrate	perioperative Mortalität
5-6	A	84%	44%	27%	10%
7-9	B	62%	20%	10%	30%
10-15	C	42%	21%	0%	82%

1. Einleitung

Die Behandlung von HCC richtet sich in der Regel nach den Empfehlungen der *American Association for the Study of Liver Diseases* (AASLD) [75]. Allerdings stehen nur begrenzt Optionen zur Behandlung von HCC zur Verfügung. Als Maßnahmen mit Aussicht auf Heilung (kurativ) ist neben der vollständigen chirurgischen Entfernung des Tumors und einer Lebertransplantation lediglich die *Radiofrequency Ablation* (RFA) verfügbar [85]. Hierbei wird eine Sonde von außen in das Tumorgewebe gebracht, an die eine hochfrequente elektrische Spannung angelegt wird. Bei ca. 400 bis 500 kHz Frequenz und ca. 200 bis 300 Watt fließen dabei Ströme von ca. 1 Ampère. Dies führt zu einer starken Wärmeentwicklung und folglich zu einer thermischen Zerstörung des Gewebes durch die Hitze. Nach 12-20 Minuten entsteht eine Koagulationsnekrose bis zur Verkohlung im Gewebe in unmittelbarer Nähe zur Elektrode, wobei Gase entstehen. Dadurch steigt der elektrische Widerstand stark an und es wird keine Energie mehr an das umliegende Gewebe übertragen. Die Lage der RFA-Sonde wird bei dieser Art der Behandlung stets mit Hilfe eines bildgebenden Verfahrens wie z.B. der Sonographie oder der Computertomographie überprüft. Diese Behandlungsoption wird allerdings nur in frühen HCC-Stadien mit bis zu drei Tumorherden verwendet. Für weiter fortgeschrittene HCCs wird lediglich mit palliativer Intension behandelt, dafür steht Sorafenib, ein Tyrosinkinaseinhibitor, oder eine transarteriellen Chemoembolisation (TACE) zur Verfügung [82, 86-89]. Sorafenib inhibiert zahlreiche Tyrosinkinasen wie z.B. den *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor* (VEGFR) oder den *Platelet-Derived Growth Factor Receptor* (PDGFR). Außerdem werden einige intrazelluläre Serin-/ bzw. Threoninkinasen wie C-RAF oder B-RAF gehemmt. Sorafenib verlängert jedoch *median survival* und *time to progression* lediglich um je drei Monate. Bei der TACE wird die für HCC charakteristische arterielle Durchblutung, die überwiegend von sehr kleinen Gefäßästen der Leberarterie und nicht aus der Pfortader gebildet werden ausgenutzt. Zuerst werden diese Gefäße embolisiert. Das bedeutet, dass kleine Partikel mithilfe eines Katheters in die Leberarterie gespritzt werden. Dabei kann es sich um eine Emulsion von Lipiodol (einem ölhaltigen Kontrastmittel) oder um kleine Plastik- oder Gelatinekügelchen handeln. Es kommt zu einer Blockade der Blutgefäße wodurch die Nährstoff- und Sauerstoffversorgung des Tumors abnimmt. Gleichzeitig wird ebenfalls durch den Katheter ein Chemotherapeutikum injiziert. Es kommen dafür zum Beispiel Doxorubicin, Carboplatin und Mitomycin zum Einsatz. Durch diesen lokalen Einsatz der Chemotherapeutika können deutlich höhere Dosierungen im Tumor erreicht werden als bei konventioneller systemischer Anwendung und das für einen längeren Zeitraum. Weiterhin werden die systemischen Nebenwirkungen der Chemotherapie verringert. Abbildung 9 zeigt die Behandlungsoptionen in Anbetracht der Diagnose des Patienten. Wie aus der Abbildung ersichtlich wird spielt neben dem Tumorstadium der allgemeine Zustand der Leber (*Child-Pugh-score*) eine maßgebliche Rolle bei der Wahl der möglichen Therapien.

1. Einleitung

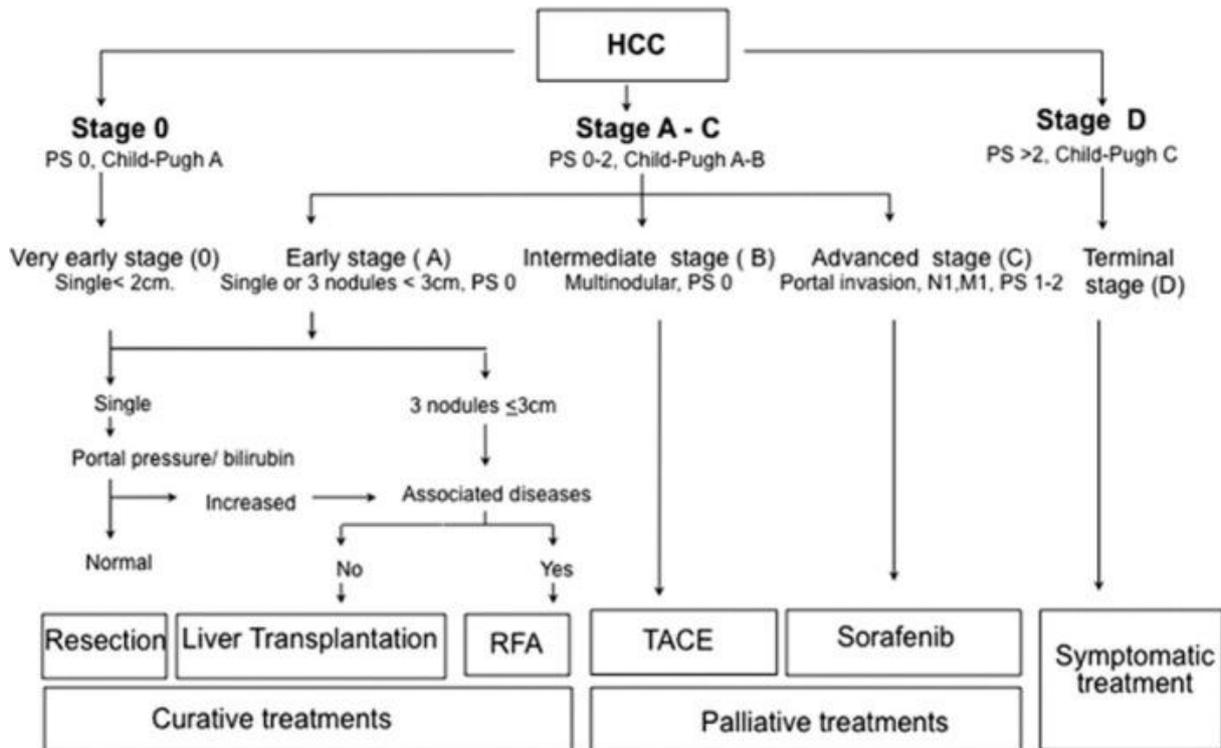


Abbildung 9: Therapieoptionen für HCC-Patienten nach BCLC (PS: Performance Status, *Staging* nach BCLC-Klassifikation): Die Vorgehensweise bei der Behandlung richtet sich nach dem Child-Pugh-score und dem Allgemeinzustand (PS) des Patienten. Links: Eine kurative Behandlung ist in der Regel nur bei sehr frühen Tumorstadien und gutem PS sowie erhaltener Leberfunktion möglich. In diesem Fall stehen die chirurgische Entfernung des Tumors sowie eine Lebertransplantation oder RFA im Vordergrund. Rechts: Ist der Tumor zu groß oder bereits metastasiert wird palliativ mit TACE, Sorafenib bzw. lediglich symptomatisch behandelt [75].

1.3 Gliom

1.3.1 Erkrankungsraten und Todesfälle

Der Begriff Gliom umfasst verschiedene Hirntumoren des zentralen Nervensystems. Sie entstehen aus Gliazellen, dem Stützgewebe das sich zwischen den Nervenzellen befindet. Weltweit gibt es jährlich ca. 250 000 Neuerkrankungsfälle von Hirntumoren [74]. In Deutschland erkranken ca. 7000 Personen jedes Jahr an einem Hirntumor. Gliome machen ca. 80% dieser Erkrankungen aus [73]. Die Prognose für Patienten, die mit einem Gliom diagnostiziert werden variiert allerdings sehr stark. Dies liegt daran, dass es viele verschiedene Arten von Gliomen gibt und diese auch in unterschiedlichen Hirnregionen auftreten können.

1.3.2 Diagnose, Klassifikation und Behandlung von Gliomen

Typische Krankheitssymptome wie Kopfschmerzen, Krämpfe, Gedächtnisverlust, Schwäche, Sehstörungen, Sprachstörungen und Persönlichkeitsveränderungen treten zwar oft in Verbindung mit einem Gliom auf, sind jedoch sehr unspezifisch [90]. Die Diagnose erfolgt daher meist durch eine Biopsie oder ein bildgebendes Verfahren mit einem Kontrastmittel, hierbei ist die Magnetresonanztomographie (MRT) der Computertomographie (CT) überlegen. Biopsien werden meist stereotaktisch durchgeführt [91]. Das bedeutet, dass der Kopf des Patienten fixiert und die Führung der Biopsienadel durch MRT oder CT kontrolliert wird. Dieses minimalinvasive Verfahren stellt sicher, dass die Biopsie den Tumor trifft. Durch die Verwendung von Positronen-Emissions-Tomographie (PET)-MRT kann die Genauigkeit der Operation noch weiter gesteigert werden, da so metabolisch aktive Tumorregionen gezielt biopsiert werden können [92].

Gliome lassen sich auf Grund des Zelltyps, dem sie am meisten ähneln in vier Gruppen einteilen: Astrozytome, Oligodendrogliome, Ependymome und Mischgliome [93]. Die genannten Tumoren müssen jedoch nicht zwangsweise auch aus diesem Zelltyp entstanden sein. Die verschiedenen Tumorarten lassen sich ebenfalls in verschiedene Kategorien einteilen. Die Einteilung erfolgt nach der WHO-Klassifikation der Tumore des zentralen Nervensystems [94, 95]. Tabelle 7 zeigt die Einteilung, welche den Malignitätsgrad der Tumoren berücksichtigt.

1. Einleitung

Tabelle 7: WHO-Klassifikation der Tumore des Zentralen Nervensystems in Grad I bis IV mit Prognose [95]

Klassifikation	Beschreibung	Prognose
Grad I	Läsionen mit niedriger Proliferation, gutartig	Heilung üblich
Grad II	Niedrige Proliferation, neigen zu Rezidiven, können sich zu maligneren Formen entwickeln	> 5 Jahre
Grad III	Maligne Tumoren, mitotisch aktiv, atypische Zellkerne	2-3 Jahre
Grad IV	Hochgradig maligne, mitotisch aktiv, Nekrosen vorhanden, meist tödlich	< 1 Jahr

Tumoren der Grade I und II (*Low Grade*) lassen sich in der Regel durch eine vollständige operative Entfernung des Tumors gut behandeln. Ab Grad III (*High Grade*) wird in der Regel adjuvant mit Bestrahlung oder Chemotherapie behandelt. Aufgrund dieser Einteilung können Prognosen für das mittlere Überleben der Patienten getroffen werden. Diese Einteilung ist aber nur ein Kriterium. Alter des Patienten, Lage des Tumors, klinische Manifestation des Tumors, Therapieoptionen sowie ein Ansprechen auf Therapien sind weitere relevante Prognosefaktoren.

Die verschiedenen Arten der Gliome lassen sich nun den verschiedenen WHO-Graden zuordnen. Tabelle 8 stellt diese Einteilung dar.

1. Einleitung

Tabelle 8: Klassifikation der verschiedenen Gliome nach der WHO [95]

Tumor	WHO-Grad			
	I	II	III	IV
Astrozytäre Tumore				
Subependymales Riesenzell-Astrozytom	x			
Pilozytisches Astrozytom	x			
Pilomyxoides Astrozytom		x		
Diffuses Astrozytom		x		
Pleomorphisches Xanthoastrozytom		x		
Anaplastisches Astrozytom			x	
Glioblastom				x
Riesenzell-Glioblastom				x
Gliosarcom				x
Oligodendrogliale Tumore				
Oligodendrogliom		x		
Anaplastisches Oligodendrogliom			x	
Oligoastrozytäre Tumore				
Oligoastrozytom		x		
Anaplastisches Oligoastrozytom			x	
Ependymale Tumore				
Subependymom	x			
Myxopapilläres Ependymom	x			
Ependymom		x		
Anaplastisches Ependymom			x	

1. Einleitung

1.3.3 Prognostische Bedeutung von Alkylierungen im Promotor der O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase und von Mutationen im Gen der Isocitratdehydrogenase 1 und 2

Neben histologischen und klinischen Parametern gibt es nur wenige molekulare Marker, die prognostische Signifikanz besitzen. Einer davon ist ein methylierter O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT)-Promotor bei Glioblastom [96-100]. MGMT ist ein Protein, das alkylierte DNA repariert. Insbesondere kann die Alkylierung von Guanin zu 6-O-Methylguanin rückgängig gemacht werden. Der Alkylrest wird hierbei auf MGMT übertragen, MGMT wird bei diesem Vorgang verbraucht und ist somit streng genommen kein Enzym. Eine Methylierung des MGMT-Promotors führt zu einer Inaktivierung des MGMT-Gens, Alkylierungen der DNA können folglich nicht mehr repariert werden. Patienten mit Tumoren, in denen der MGMT-Promotor methyliert ist haben eine bessere Prognose. Außerdem sprechen diese Patienten besser auf eine Chemotherapie mit Temozolomid an [96, 101]. Temozolomid ist ein alkylierendes Zytostatikum, es verursacht also Schäden in der DNA des Tumors, die in dieser Patientengruppe nicht mehr repariert werden können. Ein möglicher Mechanismus, wie der MGMT-Promoter methyliert wird, sind bestimmte Mutationen in denen Genen von Isocitratdehydrogenase 1 bzw. 2 (IDH1 bzw. 2) [97]. Mutiert Arginin 132 zu Histidin (R132H) wird das katalytische Zentrum des Enzyms so verändert, dass eine neue enzymatische Funktion entsteht. Es wird der Oncometabolit 2-Hydroxyglutarat gebildet [102, 103]. Dies führt zu einem hypermethylierten Phänotyp, genetischer Instabilität, Ansammlung zusätzlicher Mutationen und schlussendlich zur Bildung von Krebs [104]. Ca. 70% der diffusen Grad II- und Grad III-Gliome tragen diese Mutation [105]. Es wird vermutet, dass die IDHR132H-Mutation auch zur Methylierung des MGMT-Promotors führt [97]. Sie ist jedoch auch unabhängig davon ein prognostischer Marker bei Grad II- bis Grad IV-Gliomen [105, 106]. Die IDHR132H-Mutation ist z.B. auch in Glioblastom-Patienten angereichert, die besonders lange überleben [107]. Die IDHR132H-Mutation kommt zudem nicht nur in Gliomen vor, sie findet sich auch bei myeloiden Leukämien und in Sarkomen [108-110].

1.4 Immuntherapie

1.4.1 Allgemeine Grundlagen der Immuntherapie und Krebsimmuntherapie

Unter Immuntherapie wird allgemein die Manipulation des Immunsystems durch Behandlungen verschiedenster Art verstanden. Diese können sowohl aktivierende als auch hemmende Wirkungen zum Ziel haben. Beispielsweise muss nach einer Organtransplantation das Immunsystem eines Patienten gehemmt werden, damit das neue Organ nicht wieder abgestoßen wird. Andere Beispiele für Anwendungsmöglichkeiten einer immunsuppressiven Behandlung sind Autoimmunkrankheiten oder Allergien. Die wohl am längsten etablierte immunstimulierende Behandlung ist die Impfung. Der erste Impfstoff wurde bereits 1796 von Edward Jenner entwickelt [111, 112]. Mit Hilfe dieses Impfstoffes konnte der Infektion mit Pocken vorgebeugt werden. Ein aktuelleres Beispiel ist die Impfung gegen Papillom-Viren, die vermutlich dem Zervixkarzinom vorbeugen kann [113]. Es gibt zahlreiche weitere Impfstoffe, die auf der ganzen Welt mit großem Erfolg eingesetzt werden. Der vielleicht größte Erfolg ist die Ausrottung der Pocken durch eine weltweite Impfkampagne [112].

Da das Immunsystem sowohl bei der Entstehung als auch der Behandlung von Krebs eine wichtige Rolle spielt, nimmt in den letzten Jahren die Beachtung für die Krebsimmuntherapie zu [114]. Im Jahr 2013 wurde die Krebsimmuntherapie von der amerikanischen Wissenschaftszeitschrift *Science* als Durchbruch des Jahres gefeiert [115]. Im Rahmen der Krebsimmuntherapien sollen Zellen des Immunsystems dazu gebracht werden den Krebs eines Patienten abzutöten bzw. dessen Wachstum zu hemmen. Um dieses Ziel zu erreichen können zahlreiche Strategien verfolgt werden [116, 117].

Es können z.B. rekombinante Antikörper oder molekularbiologisch erzeugte Antikörperkonstrukte, die bestimmte Strukturen auf Tumorzellen erkennen, eingesetzt werden [118-120]. Je nach Art des Antikörpers können natürliche Killerzellen (NK-Zellen) oder auch T-Zellen zum Abtöten von Krebszellen rekrutiert werden. Es gibt dazu eine Vielzahl an möglichen Antikörpervarianten [121]. Als Beispiel sei hier einerseits ein klassischer Antikörper genannt, der durch seinen Fc-Teil an NK-Zellen bindet und diese aktiviert, sowie durch Bindung an sein Antigen auf den Tumorzellen eine räumliche Nähe zwischen NK-Zelle und Tumorzelle herstellt. Die NK-Zellen sind dadurch in der Lage die Tumorzellen zu töten. Diesen Mechanismus nennt man *Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity* (ADCC). Außerdem können auf der Oberfläche von Tumorzellen gebundene Antikörper das Komplementsystem aktivieren was zur so genannten *Complement-Dependent Cytotoxicity* (CDC) führt. Ein Beispiel für einen solchen Antikörper ist Rituximab, er bindet CD20, ein Antigen das auf B-

1. Einleitung

Zellen vorkommt [122]. Er wird für die Behandlung von B-Zell-Lymphomen eingesetzt. Andererseits gibt es diverse Antikörperkonstrukte wie die sogenannten *Bi-specific T-Cell engagers* (BiTE), die die Spezifitäten von zwei Antikörpern in einem Molekül vereinen [123]. Als Beispiel sei hier Blinatumomab genannt [118]. Dieser Antikörper hat einerseits eine CD19- andererseits eine CD3-Bindesepezifität und findet ebenfalls bei der Behandlung von B-Zell-Leukämien Verwendung [124]. CD19 kommt auf B-Zellen, CD3 hauptsächlich auf T-Zellen vor und spielt eine wichtige Rolle bei deren Aktivierung [125]. Der Antikörper nähert Tumorzellen und T-Zellen einander an und aktiviert letztere durch die Bindung an CD3. Dadurch sind die T-Zellen in der Lage die Tumorzellen zu töten. Blinatumomab wurde im Dezember 2014 von der *US Food and Drug Administration* (FDA) für die Behandlung von akuter lymphoblastischer Leukämie (ALL) zugelassen [118]. In der Europäischen Union erfolgte die Zulassung von Blinatumomab 2015 [126].

Eine weitere Möglichkeit stellt der adoptive T-Zell-Transfer dar [127]. Es gibt sehr viele Möglichkeiten an tumorspezifische T-Zellen zu gelangen. Beispielsweise können T-Zellen direkt aus dem Tumor oder aus dem Blut des Patienten isoliert und dann im Labor (*ex vivo*) vermehrt und aktiviert werden. Die T-Zellen werden nachfolgend zurück in den Patienten gegeben und sind nun in der Lage den Tumor zu bekämpfen. Da die Zellen *ex vivo* aktiviert werden, unterliegen sie nicht denselben immunsuppressiven Bedingungen die zum Teil im Inneren des Tumors herrschen und die dortige T-Zellaktivierung verhindern. Eine Spezialanwendung sind die sogenannten *Chimeric Antigen Receptors* (CARs) [128, 129]. Hierbei werden T-Zellen, bevor sie in den Patienten gegeben werden, mit einem solchen CAR transfiziert. Dabei wird der extrazelluläre Teil des T-Zell-Rezeptors durch den antigenbindenden Teil eines Antikörpers ersetzt, um einen CAR zu erzeugen. Die transfizierten T-Zellen können nun an Antigene auf der Oberfläche der Tumorzellen binden und diese bekämpfen. CARs werden ständig weiterentwickelt, wobei die intrazelluläre Domäne immer weiter modifiziert und verändert wird um eine verstärkte Aktivierung der T-Zellen zu erreichen [130]. Je potenter die T-Zellen durch die weiteren Modifikationen werden, desto größer ist jedoch auch das Risiko für Nebenwirkungen, da die Antigene, gegen die die CARs gerichtet sind, auch auf gesunden Zellen vorkommen können. Im Gegensatz zu Antikörpern, die eine relativ kurze Halbwertszeit im Patienten haben, können sich CAR-T-Zellen im Patienten bei Aktivierung stark vermehren und sind schwer wieder zu entfernen. Beim Auftreten von Nebenwirkungen kann dies deshalb oft schwerwiegende Folgen für den Patienten haben [131]. Durch die Einführung so genannter Suizid-Gene in die CAR-T-Zellen soll die Sicherheit dieser Behandlungsstrategie erhöht werden, da man bei evtl. Nebenwirkungen die CAR-T-Zellen jederzeit gezielt töten kann [131].

1. Einleitung

Zudem wird an zahlreichen Möglichkeiten geforscht um das Immunsystem generell zu aktivieren. Dazu zählt die Gabe von Interleukin 2 zur Behandlung von Melanomen und auch Nierenkrebs [132]. So genannte Immun-*checkpoint*-Inhibitoren wie Ipilimumab und Nivolumab haben bei der Behandlung von Hautkrebs zu einem klinischen Durchbruch geführt [119, 120]. Diese rekombinanten Antikörper blockieren inhibierende Signale, die auf T-Zellen wirken, und aktivieren diese dadurch. Bei der Behandlung von Melanomen wurde beobachtet, dass bei 53% der Patienten, die mit einer Kombination beider Antikörper behandelt wurden, die Tumorlast um mehr als 80% abnahm und dass dies bereits nach 24 Wochen erreicht wurde. Der Vorteil dieses Ansatzes ist, dass er sich im Prinzip für die Behandlung aller Krebsarten eignet, bei dem die betroffenen Patienten über funktionale T-Zellen verfügen. Die Effektivität der Behandlung hängt jedoch auch von der Mutationslast des jeweiligen Tumors ab [133]. Ein Nachteil der unspezifischen Aktivierung des Immunsystems sind die dabei auftretenden Nebenwirkungen, die auf ebenfalls verstärkte Autoimmunreaktionen zurückzuführen sind. Im schlimmsten Fall können diese sogar den Tod des Patienten bedingen.

1. Einleitung

1.4.2 Peptidvakzine zur Behandlung von Krebserkrankungen

Bei Peptidvakzinen werden Krebspatienten synthetische Peptide unter oder in die Haut gespritzt. Diese Peptide sollen dort von dendritischen Zellen auf HLA-Molekülen präsentiert werden. Kurze Peptide sind theoretisch in der Lage direkt auf die HLA-Klasse I Moleküle verschiedenster Zellen zu binden, indem sie die dort präsentierten Peptide verdrängen. Die Sequenzen der injizierten Peptide stammen in der Regel aus Tumorantigenen [134-140]. Diese Tumorantigene werden von Tumorzellen exprimiert und ebenfalls auf deren HLA-Molekülen präsentiert. Durch Zugabe eines Adjuvans im Rahmen der Impfung werden Immunzellen an die Impfstelle gelockt und aktiviert. T-Zellen sollen die Impfpeptide an der Impfstelle erkennen und dadurch aktiviert werden. Nach Proliferation der T-Zellen sollen diese in den Tumor einwandern und dort beginnen diesen zu bekämpfen. Es gibt generell zwei Strategien für Peptidvakzine gegen Krebs [141]. Zum einen können kurze Peptide verwendet werden, die auf die HLA-Moleküle des Patienten abgestimmt sind, so dass sie auf diese binden können. Zum anderen werden lange Peptide verwendet, welche patientenunabhängig eingesetzt werden können, jedoch erst von Antigen-präsentierenden Zellen prozessiert und präsentiert werden müssen [142]. Außerdem gibt es verschiedene Kategorien von Antigenen, welche für Peptidvakzine in Betracht gezogen werden können. Beispielsweise kann auf Antigene zurückgegriffen werden, die lediglich in dem Gewebe von dem der Krebs ausging vorkommen, wenn dieses Gewebe nicht für das Überleben des Patienten notwendig ist. Ein klassisches Beispiel hierfür sind Prostata-spezifische Antigene für die Behandlung von Prostatakrebs, sogenannte Differenzierungsantigene. Auch bei einer chirurgischen Entfernung eines Prostatakarzinoms wird die Prostata in der Regel komplett entfernt. Die einzigen Zellen, die außerdem prostataspezifische Antigene tragen sind also evtl. gestreute Tumorzellen, die sich unter Umständen zu Metastasen weiterentwickeln können. In diese Kategorie fallen Antigene wie *Prostate Specific Antigen (PSA)* oder *Prostatic Acid Phosphatase (PAP)*. In die zweite Kategorie fallen Antigene die auf Tumorzellen, aber auch auf gesundem Gewebe vorkommen, allerdings auf den Tumorzellen stark überrepräsentiert vorkommen. Diese Antigene werden TAA genannt, was für *Tumor Associated Antigens* steht. Peptide aus diesen Proteinen nennt man TUMAPs (*Tumor Associated Peptides*). Beispiele für solche TUMAPs finden sich im Peptidimpfcocktail IMA901 der Firma IMMATICS, der für die Behandlung von Nierenkrebs entwickelt wurde [33]. Die letzte Kategorie beinhaltet tumorspezifische Antigene (TSA) [34, 35, 143-152]. Diese Antigene können entweder viralen Ursprungs sein oder von somatischen tumorspezifischen Mutationen herrühren. Es gibt einige Krebsarten, die durch Viruserkrankungen hervorgerufen werden, in diesen Fällen besitzen die Krebszellen virale Antigene, die prinzipiell durch Peptidvakzine angegriffen werden können. Beispielsweise kann das Epstein-Barr-Virus verschiedene

1. Einleitung

Arten von Lymphomen hervorrufen, Infektionen mit Papillomviren können zu Gebärmutterhalskrebs führen und Patienten die mit Hepatitis-Viren infiziert sind können Leberkrebs entwickeln [153, 154]. Solche Viren nennt man deshalb Onkoviren. Antigene, die auf Mutationen beruhen können grundsätzlich entweder von häufig mutierten Genen stammen und sie sind somit in verschiedenen Patienten zu finden. Oder sie beruhen auf Tumor- und patientenspezifischen Mutationen, was dann eine individuelle Untersuchung des Patienten-Genoms voraussetzt, um diese mit einem individuellen Peptidvakzin zu behandeln [143, 155]. Häufig auftretende Mutationen sind z.B. das BCR-ABL Fusionsprotein bei Leukämien oder die V600E-Mutation im B-RAF-Gen bei Darmkrebs und Melanomen. Abbildung 10 zeigt die drei Kategorien der Tumorantigene [156].

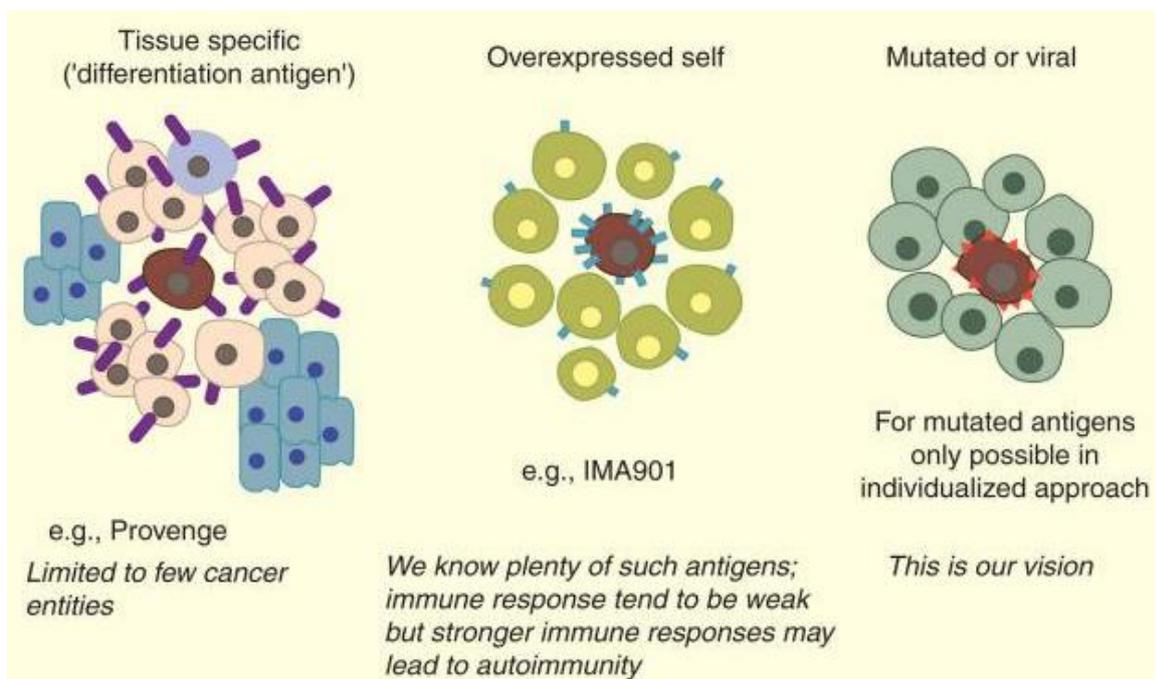


Abbildung 10: Die drei Kategorien von Tumorantigenen: Links: Gewebsspezifische Antigene, die nur auf vom Krebs betroffenen Gewebe vorkommen. Dieses Gewebe darf allerdings nicht überlebenswichtig sein. Mitte: TAAs, Antigene die nicht exklusiv aber verstärkt auf den HLA-Molekülen eines Tumors präsentiert werden. Rechts: TSAs, Antigene, die exklusiv im Tumor vorkommen und aus viralen oder mutierten Proteinen stammen. [156]

1.5 Individualisierte Krebsimmuntherapie

Ein Patient gleicht nie genau einem anderen, genau so wenig wie der Krebs eines Patienten genau dem eines Anderen gleicht [157, 158]. Dieselbe Behandlung mag dem einen Patienten helfen, bei einem anderen jedoch keinen Effekt zeigen. Es macht aus diesem Blickwinkel gesehen Sinn jeden Patienten individuell zu betrachten und auch zu behandeln, um seine Heilungschancen zu maximieren. Der Grad und die Art der Individualisierung können dabei sehr unterschiedlich ausfallen, Abbildung 11 zeigt drei mögliche Kategorien, nach denen sich individualisierte Behandlungen einteilen lassen [159].

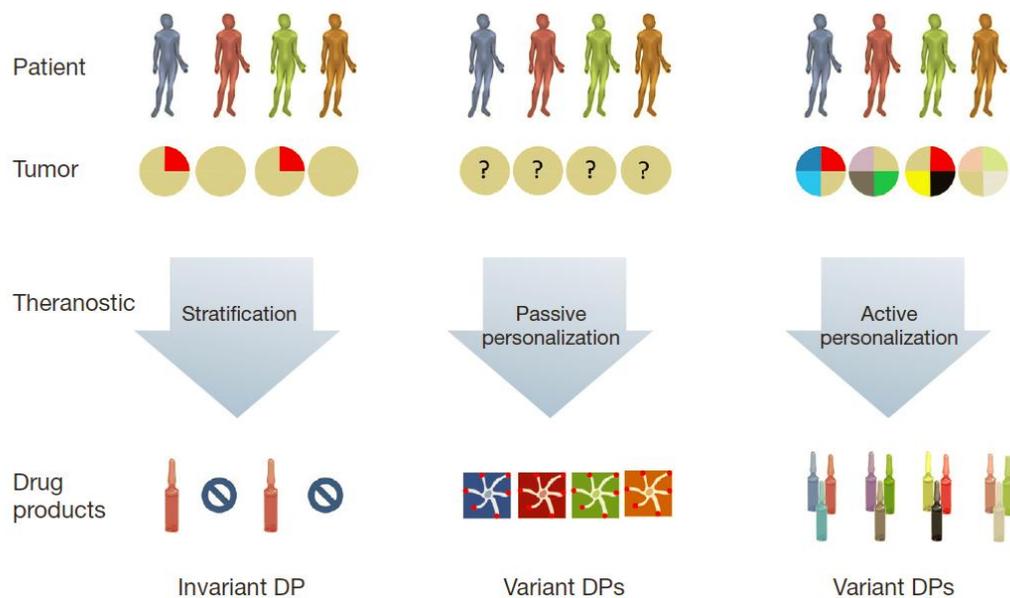


Abbildung 11: Die drei Kategorien der Individualisierten Medizin: Links: Stratifizierung: Patienten werden nur dann mit einem Medikament behandelt, wenn sie die für den Wirkmechanismus essentielle molekulare Voraussetzungen besitzen. Mitte: Passive Personalisierung: Die Herstellungsprozedur des Medikaments beruht auf Patientenmaterial, unterscheidet sich aber im Vorgehen nicht zwischen verschiedenen Patienten. Rechts: Aktive Personalisierung: Für jeden Patient wird das Medikament individuell hergestellt. Die Herstellung unterscheidet sich von Patient zu Patient und ist abhängig von der molekularen Beschaffenheit des Patienten, sowie seiner Krebserkrankung. [159]

Es können z.B. Patienten ausgewählt werden, die eine bestimmte Zielstruktur für eine bestimmte Behandlung besitzen. Diesen Patienten kann dann ein Medikament verabreicht werden, welches genau diese Zielstruktur benutzt um gegen den Krebs zu wirken. Es macht entsprechend nur Sinn einen Krebspatienten mit dem oben genannten Blinatumomab zu behandeln, wenn dessen Krebszellen auch CD19 tragen. Diese Zielstrukturen sind sogenannte Biomarker. Durch Biomarker

1. Einleitung

lassen sich schon vor Behandlungsbeginn Aussagen über die Eignung einer optionalen Therapie treffen [160]. Patienten können also eingeteilt werden, je nachdem ob eine bestimmte Therapie Erfolgsaussichten besitzt oder nicht und dementsprechend behandelt werden. Das Medikament bleibt hierbei jedoch stets das Selbe. Weitere Beispiele für diese erste Kategorie der Individualisierung sind die HER2-Überexpression in Tumoren bei der Behandlung von Brust- und Magenkrebs mit dem Antikörper Trastuzumab [161] oder die bereits erwähnte BCR-ABL-Translokation bei der Behandlung mit Imatinib [162]. In dieselbe Kategorie fällt auch der Peptidcocktail IMA901 der nur für HLA-A*02-positive Nierenkrebs-Patienten geeignet ist [33, 163]. Eine weitere Möglichkeit zur individualisierten Behandlung ist die Verwendung von autologen Komponenten aus dem Patienten bei der Herstellung des Medikaments. Ein solches Medikament unterscheidet sich bei der Behandlung jedes Patienten und ist somit individuell angepasst. Jedoch ist der Prozess der Herstellung immer derselbe. Ein Beispiel hierfür ist Sipuleucel-T zur Behandlung von Prostatakrebs [164] oder auch die Behandlung von Patienten mit CAR-T-Zellen [128]. Diese Kategorie wird als passive Individualisierung bezeichnet. Die letzte Kategorie umfasst die aktiv individualisierten Behandlungen, unter die auch der gewählte Ansatz fällt, der in dieser Arbeit verfolgt werden soll. Hierbei ist das Ziel aufgrund von verschiedenen Biomarkern für jeden behandelten Patient ein maßgeschneidertes Medikament her- oder zusammenzustellen. In der Regel umfasst dies eine Untersuchung des Genoms bzw. Exoms des Patienten und dessen Krebserkrankung, um patienten- und tumorspezifische Mutationen zu ermitteln und diese als Angriffspunkte für eine Therapie zu verwenden [34, 35, 143-152]. Dieses Konzept kann für die Herstellung eines HLA-Peptidvazins angewendet werden. Mutationen, die spezifisch im Tumorgewebe eines Patienten vorkommen, jedoch nicht auf gesunden Zellen sind ideale Ziele für eine Therapie. Werden diese Mutationen transkribiert und als Protein exprimiert, besteht die Chance, dass diese auch als HLA-Ligand auf der Oberfläche der Krebszelle präsentiert werden. Um solche tumorspezifischen Antigene (TSA) oder auch Neoepitope als HLA-Liganden zu identifizieren und dann gegebenenfalls zu impfen, müssen allerdings zuerst die tumorspezifischen Mutationen identifiziert werden. Dies wird durch Exom-Sequenzierung des Tumors und korrespondierenden gesunden Gewebes ermöglicht. Die so identifizierten Mutationen werden dann in Proteinsequenzen übersetzt. HLA-Liganden können nachfolgend aufgrund der individuellen HLA-Allele des Patienten vorhergesagt werden. Diese Liganden werden dann gezielt mit Hilfe der Massenspektrometrie gesucht bzw. im Erfolgsfall im Labor chemisch für eine Impfung hergestellt. Ein solches Peptidvazins sollte theoretisch hochspezifisch gegen den Tumor wirken, solange es von den T-Zellen des Patienten erkannt wird, und keinerlei Nebenwirkungen zeigen, da die geimpften Antigene nur auf Tumorzellen vorkommen [156]. Es gibt weiterhin ähnliche Ansätze, bei denen die TSAs als synthetische RNAs

1. Einleitung

geimpft werden [165]. Bei einem solchen Vorgehen muss ist die HLA-Typisierung des Patienten nicht von Belang.

Es können aber auch individuell selektierte Impfcocktails aus TUMAPS für die Patienten zusammengestellt werden. Hierzu wird das HLA-Ligandom, also die Gesamtheit der präsentierten HLA-Liganden, des Patienten untersucht und nach bekannten Impfpeptiden durchsucht [166]. Sind diese vorhanden können sie ebenfalls chemisch synthetisiert und in einem Impfcocktail für diesen Patienten verwendet werden. Diese Vorgehensweise kann deshalb auch als aktiv personalisierte Therapie bezeichnet werden.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Leberkrebs (insbesondere HCC) ist sowohl in Europa und den USA als auch in Asien und anderen Teilen der Welt ein ernstzunehmendes medizinisches Problem. Mit Hepatitis-Infektionen und übermäßigem Alkoholkonsum als Hauptrisikofaktoren ist mit zukünftig weiter steigenden Erkrankungsrate zu rechnen. Dazu kommt ein Mangel an effektiven Behandlungsmethoden insbesondere in fortgeschrittenen Stadien und eine hohe Rate an Rezidiven nach chirurgischer Entfernung des Primärtumors. All diese Faktoren unterstreichen die Notwendigkeit neue Therapieansätze zu erforschen. Eine interessante Option ist dabei die individualisierte Immuntherapie in Form einer Impfung mit HLA-Liganden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten geeignete, auf HLA-Klasse I Molekülen präsentierte, HLA-Liganden zur therapeutischen, individualisierten Impfung von Leberkrebspatienten identifiziert werden. Dies sollte durch die Isolation von HLA-Liganden aus Tumorgewebe sowie nichtmalignem angrenzendem Lebergewebe von Patienten mit Leberkrebs und der anschließenden Analyse dieser Peptide im Massenspektrometer erzielt werden. Für die Identifikation von geeigneten Impfpeptiden sollten zwei unterschiedliche Strategien Verwendung finden. Zum einen sollten die HLA-Liganden von Tumorgewebe mit denen auf gesundem Gewebe verglichen werden, um tumorassoziierte HLA-Liganden zu identifizieren. Zum anderen sollten tumorspezifische HLA-Liganden identifiziert werden, welche aufgrund von Mutationen spezifisch in den Tumoren der einzelnen Patienten entstehen. Um diese HLA-Liganden zu identifizieren sind genaue Kenntnisse der patienten- und tumorspezifischen Mutationen erforderlich. Dies sollte durch die Exom- sowie Transkriptomsequenzierung von Tumor- und gesundem Patientengewebe erreicht werden. Dazu wurden sowohl Proben von HCC- wie auch von CCC-Patienten aus der Allgemein-, Viszeral-, und Transplantationschirurgie des Universitätsklinikums Tübingen verwendet. Leberkrebs besitzt einige Charakteristika, die ihn interessant für eine mögliche Immuntherapie machen. Zum einen sind die Therapieoptionen sehr eingeschränkt, was nach neuen Ansätzen verlangt um die Heilungschancen für die Patienten zu verbessern. Außerdem sind Patienten, die operiert werden, zumindest teilweise in einem guten Allgemeinzustand, was den Ärzten und Wissenschaftlern etwas Zeit gibt, das Tumorgewebe zu untersuchen und evtl. eine HLA-Peptidvaccine zusammenzustellen. Ein Rezidiv tritt bei erfolgreicher und restloser chirurgischer Entfernung des Tumors in der Regel mit einem gewissen Zeitversatz auf. Bis zu diesem Zeitpunkt könnte eine Immuntherapie bereits angelaufen sein und das Auftreten bzw. das Wachstum von Metastasen verhindern. Ein möglicher Nachteil von Leberkrebs als Ziel einer Immuntherapie ist die in gewisser Weise immunprivilegierte Stellung der Leber. Dies äußert sich

1. Einleitung

unter anderem in chronischen Virusinfektionen, selten abgestoßenen Lebertransplantaten und äußerst seltenen Fällen von Autoimmunerkrankungen. Mit dem Wissen, welche Peptide auf den HLA-Molekülen des Patienten präsentiert werden, können dann für jeden Patienten individuell Peptide für eine Impfung zusammengestellt werden (Abbildung 12).

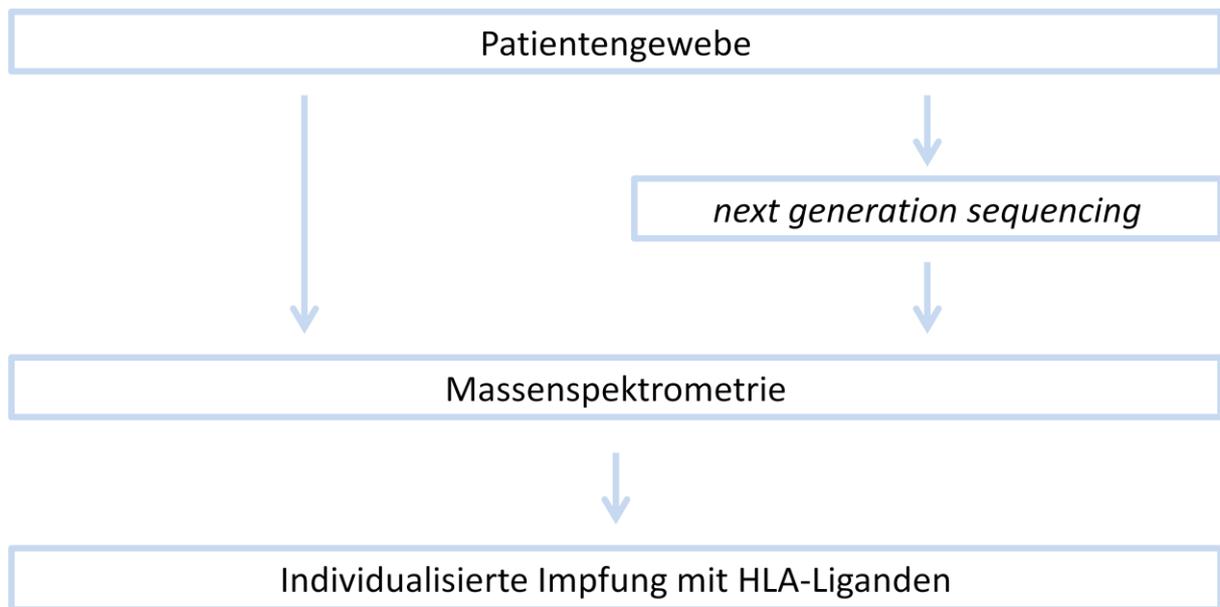


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Strategie zur Identifikation geeigneter Peptide für eine individualisierte Impfung mit HLA-Liganden.

Ein zweiter Aspekt dieser Arbeit war die Identifikation von tumorspezifischen HLA-Liganden, welche aufgrund der Mutation R132H im Gen der Isocitrat-Dehydrogenase I (IDH1) entstehen. Diese Mutation kommt bei einer Vielzahl von Krebserkrankungen vor, unter anderem auch sehr häufig in Gliomen und stellt dadurch ein vielversprechendes Ziel für eine Immuntherapie dar. Die Suche nach diesen Liganden sollte im Rahmen einer Kooperation mit Lukas Bunse und Theresa Schuhmacher aus der Arbeitsgruppe von Michael Platten vom DKFZ in Heidelberg geschehen. Ziel dieser Kooperation war die Identifikation von Liganden, durch die diese Mutation auf HLA-Klasse II-Molekülen präsentiert wird. Die Kollegen aus Heidelberg waren bereits in der Lage die Existenz dieser Peptide unter Anwendung eines spezifischen Antikörpers nachzuweisen, wollten aber zusätzlich eine unabhängige Identifikation durch die Verwendung von Massenspektrometrie. In diesem Zuge wurden verschiedene Tumorproben sowie Zellpellets verschiedener Transfektanten der Zelllinie LN229 erhalten und analysiert. Es wurde gezielt nach verschiedenen 15-meren Peptiden gesucht, welche die Mutation enthalten. Zusätzlich zu den TSA-Peptiden wurden die wildtypischen HLA-

1. Einleitung

Liganden von Tumoren und Zellen analysiert. Im Gegensatz zum ersten Teil der Arbeit, in dem der Fokus auf Liganden von HLA-Klasse I Molekülen lag, sollten hier Liganden gefunden werden, welche auf HLA-Klasse II Molekülen präsentiert werden.

2. Materialien und Methoden

2.1 Materialien

Tabelle 9: Geräte und Zubehör

Gerät	Hersteller
LTQ Orbitrap XL	Thermo
Ultimate 3000 RSLC nano	Dionex
nHPLC-Column (Acclaim PepMap RSLC 2µm 100Å, 75 µm I.D., 50 cm)	Dionex
nHPLC-Column (Acclaim PepMap RSLC 2µm 100Å, 50 µm I.D., 25 cm)	Dionex
Trap-Column (Acclaim PepMap)	Dionex
Tischzentrifuge	Eppendorf
Tischzentrifuge	Heraeus
Gefrierfalle	H. Saur Laborbedarf
Vakuumpumpe RC6	Vacuubrand
Waage	Sartorius
pH-Meter	Knick
Pipetten	Gilson
Vakuuszentrifuge	Bachofen
Drehrad	Bachofen
Ultraschallbad (Sonores Super RK514 BH)	Bandelin
Ultraschallstab	Branson Ultrasonic
Vortex	IKA-Works Inc.
Gefriertrockner	Zirbus
Zentrifuge	Heraeus
Persistaltikpumpe	Pharmacia
Homogenisator	Rotwerk
Homogenisator Glasgefäße	Novodirekt

2. Materialien und Methoden

Tabelle 10: Verbrauchsmittel

Verbrauchsmittel	Hersteller
Sterilfilter 0,45 µm	Corning
CHAPS	Applchem
Proteaseinhibitortabletten	Roche
CNBr-Sephrose	GE Healthcare
Amicon Filter 4 ml	Merck-Millipore
Micro spin columns	Merck-Millipore
1,5 ml-Reaktionsgefäß	Eppendorf
2 ml-Reaktionsgefäß	Eppendorf
15 ml-Reaktionsgefäß	Corning
50 ml-Reaktionsgefäß	Corning
Glasflaschen	Schott
ZipTips	Millipore
Pipettenspitzen	Corning

Tabelle 11: Chemikalien und Lösungsmittel

Chemikalie oder Lösungsmittel	Hersteller
Acetonitril	Merck
Ameisensäure	Merck
Trifluoressigsäure	Merck
Wasser (LCMS-rein)	Baker
Glycin	Roth
Natriumcarbonat	Merck
PBS (<i>phosphate buffered saline</i>)	Claudia Falkenburger
Salzsäure	Roth

2. Materialien und Methoden

Tabelle 12: Puffer und Fließmittel

Puffer oder Fließmittel	Zusammensetzung
A	2% Acetonitril, 0,05% Ameisensäure
B	80% Acetonitril, 0,05% Ameisensäure
A*	0,1% Trifluoressigsäure
B*	80% Acetonitril, 0,1% Trifluoressigsäure
Aload	2% Acetonitril, 0,1% Trifluoressigsäure
Lysepuffer	Proteaseinhibitor, 1,2% (m/v) CHAPS, PBS
Kopplungspuffer	0,5 M NaCl, 0,1 M NaHCO ₃
Lösung für Elution	0,2% Trifluoressigsäure

Tabelle 13: Antikörper

Antikörper*	Spezifität
W6/32	HLA-A, -B, -C
BB 7.2	HLA-A*02
B 1.23.2	HLA-B, -C
L243	HLA-DR
Tü39	HLA-DR, -DQ, -DP

*Alle Antikörper wurden am Interfakultären Institut für Zellbiologie der Universität Tübingen in der Abteilung Immunologie durch Claudia Falkenburger hergestellt

2. Materialien und Methoden

Tabelle 14: Software und Datenbanken

Software oder Datenbank	Entwickler
Proteome Discoverer 1.4	Thermo
Mascot Server 2.2.04	Matrix Science
XCalibur 2.0.7	Thermo
SYFPEITHI	Abteilung Immunologie, Universität Tübingen
GEO Profiles	NCBI
GraphPad Prism	GraphPad Software
Microsoft Word	Microsoft
Microsoft Excel	Microsoft
Swissprot Human	EMBL-EBI, SIB, PIR

2.2 HLA-Immunpräzipitation und HLA-Ligandenisolation

Bei der HLA-Immunpräzipitation werden HLA-Molekül-spezifische Antikörper, die an Sepharose gekoppelt sind, benutzt, um HLA-Moleküle samt HLA-Liganden aus einem Lysat von Zellen oder Geweben zu isolieren. Die Sepharose dient dabei als Füllmaterial für die Immunaффinitätssäulen über die das Lysat gepumpt wird. Nach dieser Immunaффinitätschromatographie werden die HLA-Liganden von den Säulen eluiert, um dann im Massenspektrometer analysiert werden zu können.

2.2.1 Kopplung der Antikörper

Bei der hier verwendeten Sepharose handelt es sich um das Polysaccharid Agarose, welches in Form kleiner Kügelchen mit einer Partikelgröße von ca. 90 μm und chemisch mit Bromcyan-Gruppen modifiziert geliefert wird. Sepharose ist lediglich der Name des Produkts von GE Healthcare.

Um die gewünschten Antikörper an die Sepharose koppeln zu können muss diese zuerst mit 1 mM Salzsäure aktiviert werden. Hierzu werden 40 mg Sepharose pro mg eingesetzten Antikörper eingewogen und in ein 50 ml-Röhrchen gefüllt. Nach Zugabe von 50 ml 1 mM HCl wird das Röhrchen eine Stunde lang auf einem Drehrad bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wird nach einem Zentrifugationsschritt (Megafuge) mit 300 Umdrehungen pro Minute für 4 Minuten ohne Bremse die sich im Überstand befindliche Salzsäure mit einer Glaspipette abgenommen und verworfen. Jetzt kann der gewünschte Antikörper zusammen mit Kopplungspuffer zu der Sepharose gegeben werden. Dabei wird wieder ein Endvolumen von 50 ml eingestellt. Es folgt ein weiterer Inkubationsschritt auf dem Drehrad für mindestens zwei Stunden. Zur Bestimmung der Kopplungseffizienz werden 0,5 ml des Antikörper/Sepharose/Kopplungspuffer-Gemischs jeweils vor und nach dem zweistündigen Inkubationsschritt entnommen. Es wird von beiden Aliquots die Absorption des Überstandes bei 280 nm im Spektrometer gemessen und verglichen. Ist die Absorption nach der Inkubationszeit kleiner als 5 Prozent der Absorption des Ausgangsgemischs, kann fortgefahren werden. Auf diese Weise wird sichergestellt, dass der Großteil des Antikörpers an die Sepharose gekoppelt wurde und sich nicht mehr im Überstand befindet. Ist dies nicht der Fall, muss die Kopplungszeit erhöht werden. Nach einer erfolgreichen Kopplung des Antikörpers an die Sepharose wird das Gemisch erneut mit 300 Umdrehungen pro Minute für 4 Minuten ohne Bremse zentrifugiert und daraufhin erneut der Überstand abgenommen. Um evtl. verbleibende reaktive Bromcyan-Gruppen der Sepharose zu blockieren, die auch mit Proteinen aus dem Lysat reagieren könnten, wird die Sepharose mit 0,5 M

2. Materialien und Methoden

Glycin für eine halbe Stunde auf dem Drehrad inkubiert. Glycin besitzt, wie die Antikörper, eine Aminogruppe (Antikörper besitzen sehr viele), die mit den Bromcyangruppen der Sepharose reagieren kann und mit dieser eine kovalente Bindung eingeht. Daraufhin wird erneut zentrifugiert und der Überstand entfernt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wird eine Konzentration von 1 mg Antikörper pro ml in PBS eingestellt. Auf diese Weise kann der Antikörper leicht für die HLA-Präzipitation dosiert werden. Die so mit Antikörpern gekoppelte Sepharose kann bei 4°C für mindestens vier Wochen aufbewahrt werden.

2. Materialien und Methoden

2.2.2 HLA-Immunpräzipitation und HLA Liganden-Isolation aus Gewebe

Um HLA-Liganden aus menschlichem oder tierischem Gewebe zu isolieren muss dieses zuerst mechanisch zerkleinert werden. Dafür werden alle folgenden Schritte der Herstellung des Lysats bei 4°C durchgeführt. Für die grobe Zerkleinerung des Gewebes wird in der Regel ein Skalpell benutzt, mit dem das Gewebe in kleine Stücke von ca. 1 bis 2 mm³ geschnitten wird. Schon während des Zerkleinerungsprozesses wird zur Probe Lysepuffer zugesetzt, in einem Volumenverhältnis eins zu eins zur Probe. Das bedeutet, dass zu einem Gewebestück von 1 cm³ 1 ml doppelt konzentrierter Lysepuffer hinzugegeben wird. Der Puffer soll durch den enthaltenen Proteaseinhibitor den enzymatischen Abbau der HLA-Moleküle und ihrer Liganden unterbinden. Des Weiteren wird so die Lyse der Zellen gestartet und das in der Regel gefrorene Gewebe taut schneller auf. Um das Gewebe im Idealfall bis auf Zellebene zu zerkleinern wird die Probe anschließend noch mit einem Homogenisator bearbeitet. Hierzu wird das grobe Lysat in ein Glasgefäß überführt. In dieses Gefäß wird dann der genau passende und sich drehende Homogenisator eingeführt. Durch das auf und ab bewegen des Gefäßes und die, durch die Drehung erzeugten Scherkräfte wird das Gewebe so lange weiter zerkleinert, bis das Lysat homogen ist. Es ist darauf zu achten, dass sich das Lysat während des Homogenisierens nicht zu sehr erhitzt. In diesem Fall wird das Glasgefäß samt Probe für kurze Zeit auf Eis gestellt. Durch die entstehende Hitze kann der Abbau der Proteine als auch der HLA-Moleküle beschleunigt werden. Nach dem Homogenisieren wird das Lysat in ein 50 ml-Reaktionsgefäß überführt und für eine Stunde auf einem Schüttler bei maximaler Geschwindigkeit geschüttelt. Bei extrem großen Probenvolumina kann das Lysat auch in ein Becherglas überführt werden und mit einem Rührfisch eine Stunde lang gerührt werden. Um die in der Probe enthaltenen Zellen möglichst restlos zu lysieren wird zusätzlich mit einem Sonifikator gearbeitet. Dieser wird auf Stufe 4 drei Mal für je 20 Sekunden in das Lysat gehalten. Zwischen jedem Intervall wird je 20 Sekunden pausiert, ebenfalls um das Lysat nicht zu stark zu erhitzen. Aus demselben Grund wird dieser Schritt auch auf Eis durchgeführt. Nach einer weiteren Stunde Inkubationszeit auf dem Schüttler bzw. im Becherglas wird das Lysat für 90 min bei 4000 Umdrehungen zentrifugiert, um anschließend den Überstand durch einen 0,5 µm-Filter zu filtrieren. Der filtrierte Überstand kann nun für die Immunaффinitätschromatographie verwendet werden.

2. Materialien und Methoden

2.2.3 HLA-Immünpräzipitation und HLA-Ligandenisolation aus Zelllinien und Hinweise für Arbeiten mit geringen Probenmengen

Die Lyse von Zelllinien erfordert dieselben Schritte wie die Lyse von Gewebe. Jedoch kann dabei auf die manuelle Zerkleinerung mit Skalpell oder Gewebezerkleinerer verzichtet werden. Außerdem kann für den Fall von sehr kleinen Probenmengen die Probe mit etwas einfach konzentriertem Lysepuffer versetzt werden um sie auf ein Volumen von ca. 5 ml zu verdünnen. Volumina kleiner als 5 ml sind schwer zu homogenisieren und zu sonifizieren. Außerdem fällt das Abnehmen des Überstandes nach dem letzten Zentrifugationsschritt schwerer. Zusätzlich ist zu beachten, dass der bei der Filtration verwendete Filter ein nicht zu vernachlässigendes Totvolumen aufweist. Arbeitet man also mit zu kleinen Volumina bleibt unter Umständen ein großer Teil des Lysats ungenutzt im Filter zurück. In diesem Fall sollte der Filter mit ca. 1 ml Lysepuffer nachgespült werden. Diese Hinweise für kleine Probenmengen sind ebenso für Gewebe anwendbar.

2.2.4 Immunaффinitätschromatographie und Elution

Die HLA-Moleküle sollen nun samt ihrer Liganden durch die Bindung an die ihrerseits an Sepharose gebundenen Antikörper isoliert werden. Dazu wird die Sepharose mit dem gewünschten Antikörper in Säulen gefüllt und zunächst eine halbe Stunde lang mit PBS gewaschen. Es wird 1 mg Antikörper, entsprechend 40 mg Sepharose, pro Gramm Gewebe oder pro Milliliter Zellpellet verwendet, jedoch nie weniger als 1 mg. Die Säulen sind mit Ventilen versehen, die es erlauben den Fluss durch die Säulen zu stoppen. Es wird eine Pumpe verwendet, welche das PBS mit ca. 2 ml pro Minute durch die Säulen pumpt. Dabei können mehrere Säulen sequenziell an die Pumpe gehängt werden, je nachdem welche HLA-Moleküle isoliert werden sollen. In der Regel wird für humane Zellen oder Gewebe der Antikörper W6/32 für alle HLA-Klasse I-Moleküle in einer Säule und für HLA-Klasse II-Moleküle eine 1:1 Mischung aus L243 und Tü39 in einer zweiten Säule verwendet. Nach dem Waschvorgang wird das filtrierte Lysat in einem 50-ml Reaktionsröhrchen oder einem Becherglas an die Pumpe angeschlossen. Das Lysat fließt nun über die Säulen und wird danach zurück in das Reaktionsröhrchen bzw. Becherglas geleitet. Das Lysat wird auf diese Weise über Nacht bei 4°C zyklisch über die Affinitätssäulen gepumpt, ebenfalls bei 2 ml pro Minute Durchflussrate. Es ist darauf zu achten, dass bei der Befüllung der Säulen mit Lysat das zuvor zum Waschen benutzte PBS entfernt wird, um eine zu starke Verdünnung des Lysats zu vermeiden. Am nächsten Tag werden die

2. Materialien und Methoden

Säulen zuerst eine halbe Stunde lang mit PBS gewaschen. Das Lysat wird vorher gesammelt und für evtl. auftretende Fragestellungen bei -80°C eingefroren. Es folgt ein weiterer Waschschrift mit Wasser (gefiltert und entionisiert mit Milli-Q) für eine Stunde. Daraufhin wird solange Luft durch die Säulen gepumpt, bis diese komplett trocken gelaufen sind. Die Ventile an den Unterseiten der Säulen werden nun verschlossen, die Säulen von den Pumpen entfernt und auf einen Schüttler überführt. Es wird so viel 0,2% TFA auf die Sepharose gegeben, bis diese vollständig bedeckt ist. Dies entspricht ca. $60\ \mu\text{l}$ 0,2% TFA pro $40\ \mu\text{g}$ verwendeter Sepharose bzw. pro Milligramm Antikörper. Außerdem wird für den ersten Elutionsschritt $1\ \mu\text{l}$ 10% TFA pro Milligramm Antikörper zugegeben, um eine zu starke Verdünnung der TFA durch das noch in der Sepharose enthaltene Wasser zu vermeiden. Die TFA sorgt dafür, dass sich sowohl die Antikörper als auch die HLA-Liganden von den HLA-Molekülen lösen. Durch die Säure werden alle genannten Komponenten protoniert und liegen somit positiv geladen vor. Die elektrostatische Abstoßung der positiven Ladungen und die damit einhergehende Denaturierung der HLA-Moleküle und Antikörper sorgen für die beschriebene Ablösung der einzelnen Komponenten voneinander. Nach 15 bis 20 Minuten Inkubation auf dem Schüttler bei 200 bis 300 Umdrehungen pro Minute und 4°C werden die Säulen vom Schüttler genommen, die Ventile geöffnet und die TFA samt Antikörper, HLA-Molekülen und -Liganden mit einer Spritze in ein geeignetes Gefäß entleert, je nach Probenmenge ein 2 ml- oder ein 15 ml-Reaktionsröhrchen. Nach dem Schließen der Ventile und der erneuten Platzierung der Säulen auf dem Schüttler werden die beschriebenen Schritte 8-mal wiederholt. Die so gesammelte TFA-Lösung beinhaltet nun neben Antikörper- und HLA-Molekülfragmenten auch die gesuchten HLA-Liganden.

2. Materialien und Methoden

2.2.5 Probenvorbereitung für die massenspektrometrische Analyse

Um die HLA-Liganden von den übrigen Bestandteilen des Eluats zu trennen, muss dieses einer Ultrafiltration unterzogen werden. Das Eluat wird für eine Stunde bei -80°C eingefroren und anschließend über Nacht lyophilisiert. Die getrocknete Probe wird in $400\ \mu\text{l}$ B* (80% Acetonitril/ 0,1% TFA) aufgenommen und für 15 min im Ultraschallbad resuspendiert. Die Lösung wird nun in die drei Mal mit B* vorgewaschenen Ultrafiltrationsröhrchen überführt und für eine Stunde bei 13 000 Umdrehungen pro Minute in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der verwendete Filter hat eine Porengröße von 10 kDa, daher passieren HLA-Liganden den Filter und finden sich im Durchfluss wieder, während Antikörperfragmente ebenso wie HLA-Moleküle und β_2 -Microglobulin (ca. 12kDa) oder andere evtl. unspezifisch gebundenen Proteine zurückgehalten werden. Der Durchfluss wird anschließend in einer Vakuumzentrifuge auf ca. $50\ \mu\text{l}$ eingeeengt. Im letzten Schritt der Probenvorbereitung wird die Probe noch entsalzt und weiter aufgereinigt. Hierzu werden ZipTip-Pipettenspitzen benutzt. Diese enthalten hydrophobes C18-Material. Kurze Peptide, wie HLA-Liganden, sind in der Lage in wässrigem Milieu an C18-Ketten zu binden, können jedoch mit organischen Lösemitteln wie Acetonitril wieder eluiert werden. Dieser Vorgang ist vergleichbar mit einer *reversed-phase* Chromatographie. Für diesen Prozess werden in zwei $1,5\ \text{ml}$ -Reaktionsgefäßen je $1\ \text{ml}$ B* bzw. A* (0,1% TFA) vorbereitet. Außerdem werden $50\ \mu\text{l}$ B* in ein für die massenspektrometrische Analyse geeignetes Gefäß vorgelegt. Als erster Schritt wird das C18-Material der ZipTip-Spitze durch zehnmaliges auf und ab pipettieren in B* gewaschen. Anschließend wird die Spitze durch einmaliges auf und ab pipettieren in A* für die Beladung mit der Probe vorbereitet (Äquilibrierung). Zum Beladen der Spitze wird in der Probe vorsichtig zehnmal auf und ab pipettiert. Der folgende Entsaltungsschritt erfolgt durch einmaliges vorsichtiges Pipettieren in Lösung A*. Die Elution der HLA-Liganden wird durch zehnmaliges Pipettieren von B* direkt im MS-Probengefäß erzielt. Um die Liganden möglichst restlos zu überführen werden die Schritte äquilibrieren, laden, entsalzen und eluieren fünfmal wiederholt. Die Probe wird nun ein letztes Mal in der Vakuumzentrifuge eingeeengt und anschließend auf $25\ \mu\text{l}$ mit A_{load} für die Analyse im Massenspektrometer aufgefüllt.

2.3 Massenspektrometrie (MS) für HLA-Ligandomics

Direkt bevor die HLA-Liganden im Massenspektrometer analysiert werden, werden sie mit Hilfe einer uHPLC auf einer C18-Trennsäule ihrer Hydrophobizität folgend aufgetrennt. Dies verringert die Komplexität der Probe, die pro Zeiteinheit im Massenspektrometer gemessen wird und ermöglicht erst so eine breite und tiefe Analyse der Gesamtheit der präsentierten HLA-Liganden (Ligandom).

2.3.1 uHPLC-Chromatographie

Eine typische uHPLC-MS-Messung von HLA-Liganden umfasst fünf technische Replikate. Ein Replikat wird aus 5 µl Probenvolumen gemessen, weswegen die Probe im letzten Schritt der Probenvorbereitung üblicherweise auf 25 µl aufgefüllt wird. Die Probe wird in einem Probengefäß in den *Autosampler* gestellt und von dort direkt von der uHPLC aufgenommen und in der Probenschleife platziert. Daraufhin wird die Probe mit einem Fluss von 4 µl/min in 5,75 Minuten auf die so genannte *Trap*-Säule geladen und in diesem Zug mit 0,1% TFA gewaschen. Nach Umschalten des Ventils wird die Probe dann bei 300 nl/min Flussrate über die Trennsäule direkt ins Massenspektrometer gepumpt. Für die Auftrennung wurden je nach Probe zwei unterschiedliche Säulen mit unterschiedlichen Gradienten benutzt: Zum einen eine 25 cm lange Säule mit einem 90 min langen Gradient zum anderen eine 50 cm lange Säule mit einem 120 min-Gradienten. Das HPLC-Programm beginnt mit einem zehnminütigen isokratischen Schritt bei 2,4% Acetonitril und 0,1% Ameisensäure, auf den der eigentliche Gradient folgt. In diesem Schritt steigt der Acetonitrilgehalt von anfänglich 2,4% Acetonitril auf 32% an. Während dieser Zeit werden die HLA-Liganden von der Säule eluiert. Es folgt ein Waschschrift von 5 min bei 76% Acetonitril. Danach muss die Säule für die nächste Messung wieder mit 2,4% Acetonitril gespült bzw. äquilibriert werden (bei der kurzen Säule für 28 min, bei der langen Säule für 38 min). Die gesamte Zeit für eine solche LC-MS-Methode beläuft sich also auf 125 bzw. 240 min.

2. Materialien und Methoden

2.3.2 Massenspektrometrische Standardmethode

Mit der Standardmethode wird beabsichtigt möglichst viele unterschiedliche HLA-Liganden zu identifizieren. Hierzu wird für HLA-Liganden der Klasse I der Bereich zwischen 400 und 650 m/z vermessen bzw. für Liganden von Klasse II-Molekülen der Bereich zwischen 300 und 1500 m/z. Die ionisierten HLA-Liganden werden, nachdem sie durch die Transferkapillare in das Massenspektrometer gelangen, in die Orbitrap, welche sich im hinteren Teil des Massenspektrometers befindet, geleitet. Dort werden sie mit einer Auflösung von 60 000 analysiert. Dieser so genannte Übersichtsscan dauert eine Sekunde und erfasst dabei alle Massen, die zu diesem Zeitpunkt in das Massenspektrometer gelangen. Aus diesen Massen werden nun die fünf intensivsten zur Fragmentierung ausgewählt. Dies geschieht im vorderen Teil des Massenspektrometers in der Linearen Ionenfalle (LTQ). Dort werden die ausgewählten Ionen isoliert und anschließend durch *Collision-induced-fragmentation* (CID) bei einer normalisierten Kollisionsenergie von 35% und mit einer Aktivierungszeit von 30 ms fragmentiert. Die Isolationsbreite beträgt dabei 2 m/z. Die entstehenden Fragmentionen werden dann ebenfalls in der LTQ vermessen. Die maximale Füllzeit der LTQ beträgt 200 ms und wird in der Regel auch ausgereizt, da die Zielionenzahl von 5000 meist nicht erreicht wird. Das liegt an der geringen Abundanz der HLA-Liganden und den in der Regel sehr begrenzten Probenmengen. Um die Ausbeute an möglichst vielen unterschiedlichen Liganden zu erhöhen, wird eine *Dynamic exclusion* von 3 s verwendet. Das bedeutet, dass ein Ligand, wurde er bereits zum Fragmentieren ausgewählt, für die nächsten 3 s nicht noch einmal für die Fragmentierung ausgewählt werden kann, selbst wenn es sich bei ihm im nächsten Übersichtsscan immer noch um eines der fünf abundantesten Ionen handelt. Um die Analyse von Ionen zu vermeiden, bei denen es sich nicht um HLA-Liganden handelt werden nur Ionen mit einer Ladungszahl von zwei oder drei fragmentiert. Das gilt für Klasse I-Liganden, für Klasse II-Liganden sind zusätzlich Ionen mit einem Ladungszustand von vier und höher zur Fragmentation zugelassen.

2. Materialien und Methoden

2.3.3 Gezielte Suche nach bestimmten HLA-Liganden

Eine gezielte Suche nach bestimmten HLA-Liganden gestaltet sich um einiges aufwändiger als die oben beschriebene Standardmethodik. Dieses Verfahren, welches sich *single ion monitoring* (SIM) nennt, wurde im Rahmen dieser Arbeit verwendet, um HLA-Liganden zu identifizieren, denen tumorspezifische genomische Mutationen zu Grunde liegen. Diese Liganden sind, sofern sie überhaupt existieren, vermutlich nur in sehr geringer Kopienzahl auf dem Tumorgewebe präsentiert. Es erfordert also die größte mögliche Sensitivität im Bereich der Massenspektrometrie um solche Liganden zu identifizieren. Ist die Sequenz des gesuchten Liganden bekannt wird ein synthetisches Peptid mit analoger Sequenz hergestellt. Dieses synthetische Peptid ist jedoch isotopenmarkiert. Das bedeutet, dass mindestens eine der Aminosäuren des Peptids schwere Kohlenstoff- oder Stickstoffisotope enthält. Dieses synthetische Peptid verhält sich nun chemisch nahezu identisch wie der gesuchte natürliche HLA-Ligand ist aber von diesem durch die schwerere Masse zu unterscheiden. Das synthetische Peptid wird nun in einer Matrix von natürlichen HLA-Liganden mit der Standardmethode gemessen um dadurch dessen Retentionszeit zu bestimmen. Nun kann eine maßgeschneiderte Messmethode für das natürliche Gegenstück des Peptids programmiert werden. Das Massenspektrometer wird so eingestellt, dass es zur bestimmten Retentionszeit, bei der das Peptid erwartet wird, alle anderen Massen von der Messung ausschließt und nur die Masse des gesuchten HLA-Liganden misst. Das Isolationsfenster beträgt hierbei 2 m/z . Durch den Ausschluss aller anderen Massen wird die Komplexität der Probe stark verringert. Ionen mit weit höherer Abundanz als die des gesuchten HLA-Liganden werden nicht gemessen und können so auch nicht mehr das Signal des Liganden überdecken. Für den Fall, dass sich in diesem engen Isolationsfenster trotzdem noch andere Ionen mit höherer Abundanz befinden, wird die gesuchte Masse in die so genannte *Parent Mass List* eingetragen. Diese Einstellung priorisiert die Fragmentierung des gesuchten HLA-Liganden gegenüber allen anderen Massen. So können pro Tumor zwischen zehn und zwanzig unterschiedliche HLA-Liganden gezielt untersucht werden. Der Messlauf wird dann abhängig von den Retentionszeiten der Peptide in entsprechend viele Segmente unterteilt. Um sicherzugehen, dass eine solch komplexe Methode richtig funktioniert, wurde vor der Analyse der Tumorprobe die Methode mit den entsprechenden synthetischen Peptiden in einer Matrix aus natürlichen HLA-Liganden getestet. Für die Tumormessung müssen dann lediglich die natürlichen Massen in die *Parent Mass List* eingetragen werden.

2. Materialien und Methoden

2.3.4 Prozessieren der aufgenommenen Massenspektren

Die vom Massenspektrometer aufgenommenen Rohdaten werden nach der Messung gegen das humane Proteom der Swissprot-Datenbank, Stand 12.12.2012, mit 20.225 Einträgen prozessiert. Dazu wird ein Mascot-Server (Version: 2.3.04) und die Software Proteome Discoverer verwendet. Die Fehlertoleranz für die Fragmentmassen wird auf 0,5 m/z, die der Vorläufermassen auf 5 ppm eingestellt. Die Oxidation von Methionin wird als dynamische Modifikation zugelassen. Nach Anlegen von folgenden Filterkriterien erhält man die finale Liste der HLA-Liganden.

- *Search engine rank: 1*
- *Mascot score: > 20*
- Peptidlänge: 8 – 12 für Klasse I bzw. 15-25 für Klasse II
- Vorläufermassengenauigkeit: 3 ppm
- *False discovery rate: < 5%*

2.4 Analyse der identifizierten HLA-Liganden

2.4.1 Tumor-assoziierte Antigene (TAA) und von Liganden abgeleitete Tumor-assoziierte Antigene (LiTAA)

HLA-Liganden, die auf HCC präsentiert werden, jedoch nicht auf gesundem Gewebe identifiziert werden können sind grundsätzlich als Peptidvakzine geeignet. Da sich verschiedene Patienten in der Art ihrer HLA-Allele unterscheiden und deshalb grundsätzlich verschiedene Peptide auf den Oberflächen ihrer Zellen präsentieren, ist es kaum möglich die HLA-Liganden direkt zwischen verschiedenen Patienten zu vergleichen. Um trotzdem einen Vergleich der HLA-Liganden von verschiedenen Patienten zu ermöglichen wurde der Umweg über die Quellproteine der HLA-Liganden gewählt. Das bedeutet, dass man zwischen den Patienten nicht direkt die HLA-Liganden, sondern die Proteine, aus denen diese Liganden entstammen vergleicht. Dies ermöglicht einen vom HLA-Allel unabhängigen Ansatz zur Definition von TAA. Im Rahmen dieser Arbeit werden TAA als Proteine definiert, aus welchen präsentierte HLA-Liganden ausschließlich auf Tumorproben identifiziert werden konnten, allerdings nie auf gesunden Geweben. Liganden aus TAA werden Tumor-assoziierte Peptide (TUMAP) genannt.

Des Weiteren können so *ligandome-derived tumor-associated antigens* (LiTAA) definiert werden. LiTAAs sind Proteine, welche nur auf Tumorgewebe durch HLA-Liganden präsentiert werden, nicht auf gesundem Gewebe, und auf mindestens 20% der untersuchten Patientenproben vorkommen. HLA-Liganden, die aus solchen LiTAAs stammen werden *ligandome-derived tumor associated peptides* (LiTAPs) genannt. Für die Identifikation von LiTAA werden nur Tumorproben in Betracht gezogen, in denen mehr als 200 unterschiedliche Peptididentifikationen nach Standardfilterkriterien identifiziert werden konnten.

Um möglichen autoimmunen Nebenwirkungen eines HLA-Peptid Vakzins vorzubeugen, wurden die Tumorliganden aus HCC-Gewebe nicht nur mit Liganden aus gesunden Lebern verglichen, sondern auch mit Liganden aus allen zur Verfügung stehenden gesunden Geweben. Diese Analyse umfasst Liganden aus gesunden Nieren, Lebern, PBMCs, Därmen, und Ovarien.

2. Materialien und Methoden

2.4.2 Tumor-spezifische Antigene

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Fokus auf die Identifikation von TSA-Peptiden gelegt, die von Tumor-spezifischen Mutationen abstammen, so genannte Neoepitope. Um diese Liganden zu detektieren genügt es nicht das Patientengewebe massenspektrometrisch zu untersuchen. Denn selbst wenn ein solches TSA-Peptid isoliert und gemessen werden konnte, ist es unmöglich es mit Hilfe einer datenbankgestützten Suche, wie sie mit Mascot erfolgt, zu identifizieren. Dies liegt daran, dass die Peptidsequenz primär unbekannt ist und Mascot eine Datenbanksuche mit vorher bekannten hinterlegten Sequenzen durchführt. Im Normalfall umfasst diese Datenbank das gesamte humane Proteom. Bevor man also das gesuchte Peptid massenspektrometrisch identifizieren kann, muss man zunächst einmal dessen genaue Sequenz kennen. Aus diesem Grund wurde das gesamte Exom der Tumorproben vom Institut für medizinische Genetik und angewandte Genomik der Universität Tübingen sequenziert. Da jeder Mensch jedoch auch eine Vielzahl individueller genetischer Veränderungen aufweist und damit diese nicht fälschlicherweise als Tumormutationen interpretiert werden, musste zusätzlich von jedem Patienten auch gesundes Lebergewebe bzw. Blut als Referenz sequenziert werden. Mit Hilfe der *Applied Bioinformatics Group* der Universität Tübingen wurden die so erhobenen Daten ausgewertet. Es wurde für jeden Patienten eine individuelle Datenbank erstellt, welche diese tumorspezifischen Mutationen enthält. Des Weiteren wurden für einzelne Patienten TSA-Peptide vorhergesagt, um diese gezielt mittels SIM zu suchen. Hierfür wurden die Vorhersagesoftware SYFPEITHI und NetMHC unter Berücksichtigung der entsprechenden HLA-Allele des jeweiligen Patienten verwendet.

2.4.3 Abschätzung des messbaren Gesamtligandoms

Um abschätzen zu können wie vollständig das HCC/CCC-Ligandom bzw. das Ligandom der Leber durch die erhobenen Daten abgedeckt ist, wurde die Zunahme der identifizierten Peptide bzw. Proteine in Abhängigkeit von der Anzahl der analysierten Proben untersucht und gegeneinander aufgetragen. Aus dem resultierenden Diagramm lässt sich durch Regressionsanalyse ein Grenzwert ermitteln. Dieser entspricht bei aktuellem Stand der Technik dem Gesamtligandom. Diese Abschätzung wurde sowohl für Peptide als auch für durch Peptide repräsentierte Proteine durchgeführt.

2. Materialien und Methoden

Um Schwankungen auszugleichen wurde für jeden Punkt im Diagramm der Mittelwert aus 1000-mal zufällig ausgewählten HCC/CCC-Proben aus dem untersuchten Patientenkollektiv aufgetragen. Der erste Iterationsschritt zeigt die gemittelte Anzahl an Peptiden bzw. Proteinen aus 1000-mal einer zufällig ausgewählten HCC-Probe. Für den zweiten Punkt wurden dann 1000-mal die Peptid- bzw. Proteinanzahl aus zwei zufälligen Proben addiert und dann gemittelt. Dies wurde für HCC bis zum 15. Iterationsschritt fortgeführt, da 15 HCC-Proben zur Verfügung standen. Für CCC wurden dementsprechend 7 Iterationsschritte durchgeführt. Mit diesem Vorgehen ergeben sich die im Ergebnissteil abgebildeten Diagramme.

Die Berechnungen, welche diesen Diagrammen zugrunde liegen wurden von dem Kollegen Linus Backert durchgeführt.

2.4.4 Filterkriterien für NGS-Experimente

Die Filterkriterien für die NGS-Experimente wurden durch einen Vorversuch mit den Tumoren HCC23 und HCC24 ermittelt. Es wurden jeweils verschiedene technische und biologische Replikate gemessen um die Robustheit und Reproduzierbarkeit der Analysen abzuschätzen und Filterkriterien zu definieren. Die Ergebnisse dieser Vorversuche sind in 3.1.2 beschrieben. Die Filterkriterien wurden auf folgende Werte festgesetzt:

Eine Mutation muss eine Allelfrequenz von mindestens 20% aufweisen.

Eine Mutation muss durch mindestens 10 *reads* abgedeckt sein.

2.4.5 Auswahl der Peptidsequenzen welche durch SIM-Experimente untersucht wurden

Für jeden untersuchten Patienten wurden aufgrund der gefilterten Mutationen HLA-Liganden mit SYFPEITHI und NetMHC vorhergesagt. Die Auswahlkriterien hierfür waren ein SYFPEITHI *score* größer dem halben *Maximalscore* oder eine von NetMHC vorhergesagte IC50 von unter 500 nM. Um die Anzahl von Peptiden pro Patient auf ca. 20 einzugrenzen wurden noch weitere Faktoren betrachtet. Da bei diesen Tumorproben auch deren mRNA sequenziert wurde, wurden nur Peptide ausgewählt, deren zugrundeliegende Mutation auch auf RNA-Ebene nachgewiesen werden konnte. Des Weiteren wurde in den jeweils ersten Replikaten der MS-Messung nach den theoretischen Massen dieser

2. Materialien und Methoden

Peptide gesucht. Außerdem wurde überprüft, ob bereits bekannte Liganden aus denselben Proteinen beziehungsweise sogar der korrespondierende nicht mutierte (wildtypische) Ligand vorhanden sind. Vorhergesagte Ligandensequenzen, bei denen eine BLAST-Suche gegen das humane Proteom 100% Sequenzabdeckung ergab, wurden ebenfalls nicht in Betracht gezogen.

3. Ergebnisse

3.1 Peptidvakzine für Hepatozelluläre Karzinome

Insgesamt wurden im Rahmen dieser Arbeit Proben von 15 HCC-Patienten untersucht. Tabelle 15 zeigt eine Übersicht dieser Analysen. Einige Proben wurden nicht vollständig mit der massenspektrometrischen Standardmethode gemessen, da mit SIM-Versuchen gezielt nach möglichen TSA-Peptiden gesucht werden sollte. Entsprechende Proben sind mit einem Stern (*) markiert. Für HCC021 wurde der Versuch unternommen mit dem Antikörper B1.23.2 zusätzliche Informationen über die präsentierten HLA-Peptide zu erhalten. Dieser Antikörper bindet HLA-B und HLA-C-Moleküle. Auf diese Weise sollte versucht werden, Peptide den HLA-Molekülen zuzuordnen, aus denen sie eluiert wurden. Der Tumoranteil beschreibt den Anteil an Tumorzellen in der jeweiligen Tumorprobe. Diese Werte wurden in der Pathologie des Universitätsklinikums Tübingen erhoben. Die Typisierung der Patienten wurde in der Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Tübingen durchgeführt. Außerdem wurde bei einigen älteren Proben die Isolation der HLA-Liganden von Marc Günder (MG) durchgeführt.

3. Ergebnisse

Tabelle 15: Untersuchte HCC-Patientenproben; TG: Tumor; NG: nicht-malignes Gewebe; MG: HLA-Peptidisolierung durchgeführt von Marc Günder; +: Zusätzlicher Klasse I Antikörper B1.23.2; *: Das erstes Replikat wurde mit der MS-Standardmethode gemessen, der Rest wurde für die SIM-Versuche verwendet.

Patienten ID	TG (g)	NG (g)	TG Peptide	NG Peptide	T-Anteil(%)	HLA-Typisierung	Bemerkung
HCC006	0,9	0,8	337	179	n.a.	A*01 B*08, B*13	MG
HCC007	0,5	0,5	85	170	n.a.	A*11, A*32 B*15, B*55	MG
HCC008	1,0	1,0	854	1015	51-100	A*02 B*39, B*51	MG
HCC013	1,0	1,0	1264	1111	36-100	A*01, A*02 B*38, B*57	MG
HCC018	0,4	1,0	86	-	37-55	A*01, A*29 B*07, B*57	
HCC020	0,5	1,0	105	933	n.a.	A*02, A*25 B*08, B*44	
HCC021	4,0	1,5	2436	1444	74-97	A*01, A*24 B*27, B*58	+
HCC023	20,0	5,0	106	864	95	A*24, A*29 B*37, B*44	*
HCC024	10,0	5,0	1506	1774	95	A*03, A*68 B*15, B*40	*
HCC025	8,0	4,7	1284	740	100	A*02, A*11 B*37, B*44	*
HCC026	12,6	6,1	787	460	100	A*01, A*02 B*08, B*51	*
HCC027	8,3	9,4	1302	1073	95	A*03, A*24 B*18, B*27	*
HCC028	4,2	3,5	1390	1020	>80	A*02, A*24 B*07, B*35	*
HCC030	16,9	1,9	108	-	>80	A*02, A*03 B*14, B*27	*
HCC032	3,5	2,0	1362	852	>80	A*02, A*03 B*13, B*40	*

3. Ergebnisse

Aus Tabelle 15 wird ersichtlich, dass sowohl die Menge des jeweils erhaltenen Gewebes als auch die Peptidausbeute stark variieren. In Abbildung 13 ist die Gewebemenge gegen die Peptidausbeute für Tumorgewebe sowie angrenzendes nicht-malignes Gewebe aufgetragen. Es ist eine gewisse Korrelation zwischen eingesetzter Gewebemasse und resultierender Peptidausbeute zu erkennen. Zwei Proben stechen aber durch ihre geringe Peptidausbeute bei gleichzeitig hoher Probenmenge heraus. Bei diesen zwei Proben handelt es sich um die Tumorgewebeproben von HCC023 und HCC030. Ignoriert man diese Ausreißer und führt eine lineare Regression durch ergibt sich ein Bestimmtheitsmaß von ca. 0.1 ($R^2 = 0.0916$). Dies ist in Abbildung 14 dargestellt. Man erkennt in Abbildung 14 ebenfalls, dass die Peptidausbeute bei ungefähr einem Gramm eingesetzter Probenmenge sprunghaft ansteigt und ab diesem Punkt nicht mehr abhängig von der Probenmenge zunimmt. Im Vergleich zwischen Tumorgewebe und angrenzendem nicht-malignem Lebergewebe ergibt sich dabei kein Unterschied bezüglich der Abhängigkeit der Peptidausbeute von der eingesetzten Probenmenge, wenn man die beschriebenen Ausreißer außer Acht lässt. Lediglich das Bestimmtheitsmaß der Regression ist bei den Tumoren etwas größer ($R^2 = 0,1156$) als das bei den Proben aus angrenzendem nicht-malignem Lebergewebe ($R^2 = 0,0791$). Auch die Schwelle bei einem Gramm Probenmenge ist in beiden Gewebetypen zu beobachten.

Insgesamt konnten durch diese Experimente 13.012 HLA-Liganden aus HCC-Tumorgewebe isoliert und identifiziert werden. Aus nicht-malignem Lebergewebe von den 15 HCC-Patienten waren es lediglich 11.635. Einige der HLA-Liganden wurden auf mehreren Tumoren bzw. nicht-malignen Lebergewebe identifiziert. Betrachtet man also die Anzahl an verschiedenen Liganden für einen Gewebetyp ergeben sich 9.307 Liganden für HCC, 5.233 davon exklusiv für Tumorgewebe, und 7.825 Liganden für nicht-malignes Lebergewebe von HCC Patienten, 3.751 davon exklusiv für diesen Gewebetyp. 4.074 Liganden wurden auf beiden Seiten identifiziert. Betrachtet man alle 21 untersuchten nicht-malignen Lebergewebe (auch die von CCC-Patienten) wurden 15.164 HLA-Liganden von nicht-malignem Gewebe isoliert und identifiziert, davon sind 9.197 Peptide von unterschiedlicher Sequenz. Vergleicht man diesen Datensatz mit den identifizierten HLA-Liganden von HCC-Tumorgewebe sind noch 5.012 Liganden tumorexklusiv, 4.902 Liganden exklusiv für das nicht-maligne Lebergewebe und 4.295 Liganden wurden auf beiden Gewebetypen identifiziert. Insgesamt wurden 14209 unterschiedliche Peptidsequenzen auf allen genannten Gewebeproben identifiziert. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 16 zusammengefasst.

3. Ergebnisse

Tabelle 16: HLA-Liganden identifiziert auf HCC-Tumorgewebe im Vergleich mit nicht-malignen Lebergeweben, einmal gruppiert als nicht-maligne Lebergewebe von 15 HCC-Patienten und einmal als nicht-maligne Lebergewebe von allen untersuchten Proben von 15 HCC- und 6 CCC-Patienten (gesamt 21 nicht-maligne Gewebe). Insgesamt wurden 14209 unterschiedliche Peptidsequenzen auf alle diesen Gewebeproben identifiziert.

HCC-Peptide im Vergleich mit	15 nicht-maligne Lebergewebe von HCC-Patienten	21 nicht-maligne Lebergewebe von HCC- und CCC-Patienten
Tumor exklusiv	5233	5012
Tumor gesamt	9307	9307
Tumor + nicht-maligne	4074	4295
Nicht-maligne gesamt	7825	9197
Nicht-maligne exklusiv	3751	4902

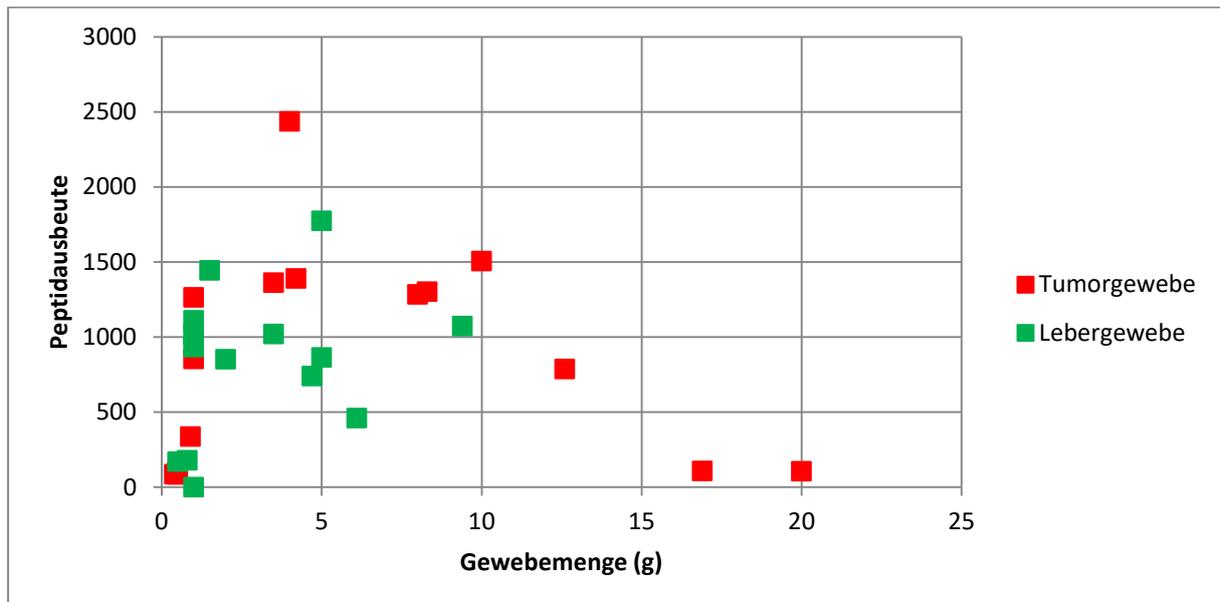


Abbildung 13: Eingesetzte Probenmenge aufgetragen gegen resultierende Peptidausbeute. Rot: Tumorgewebe; Grün: angrenzendes nicht-malignes Lebergewebe von HCC-Patienten. Man kann eine gewisse Korrelation erkennen, jedoch treten mit den Tumorgeweben von HCC023 und HCC030 klare Ausreißer auf. Diese zwei Proben ergaben trotz der höchsten eingesetzten Probenmenge eine sehr geringe Peptidausbeute.

3. Ergebnisse

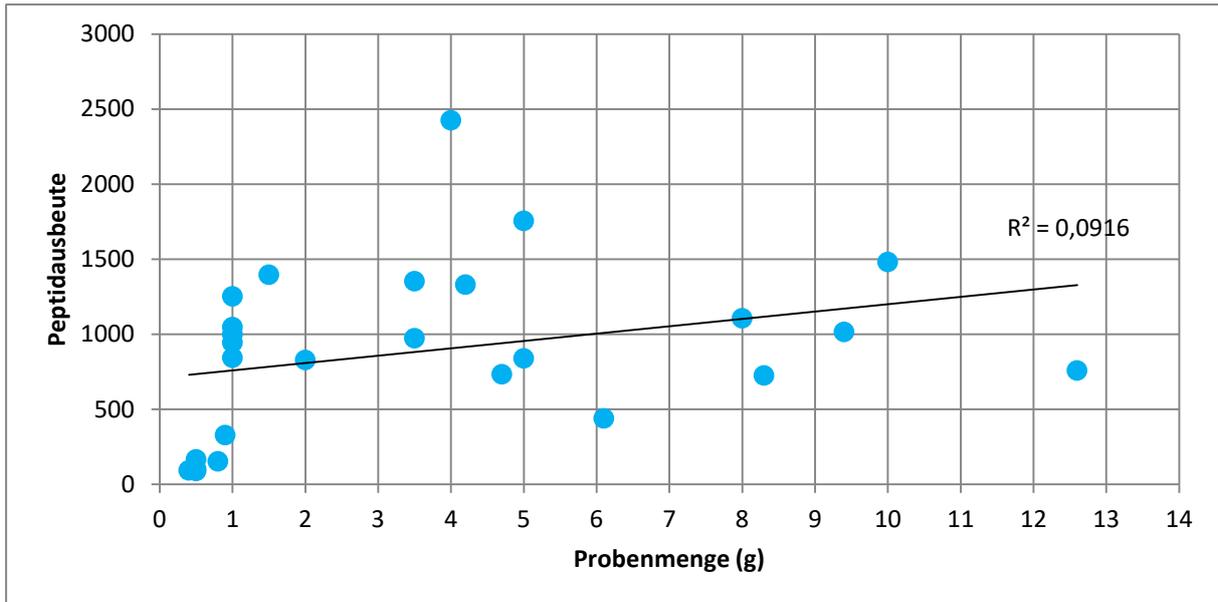


Abbildung 14: Eingesetzte Probenmenge aufgetragen gegen resultierende Peptidausbeute. Die Punkte für die zwei Ausreißer HCC023 Tumor und HCC030 Tumor wurden entfernt. Es wurde eine lineare Regression durchgeführt welche ein Bestimmtheitsmaß von 0,0916 erreichte. Die Regressionsgerade ist ebenfalls abgebildet. Zusätzlich erkennt man einen starken Anstieg der Peptidausbeute bei ca. 1 g Probenmenge. Entlang der x-Achse steigt die Peptidausbeute ab diesem Punkt nicht mehr deutlich in Abhängigkeit zur Probenmenge an.

3. Ergebnisse

3.1.1 Tumor-assoziierte Antigene

Da die verschiedenen Patienten unterschiedliche HLA-Allotypen exprimieren, ist es nicht möglich ihre HLA-Liganden direkt miteinander zu vergleichen. Das liegt daran, dass durch die unterschiedlichen HLA-Allotypen Peptide unterschiedlicher Sequenzeigenschaften, sogenannter Peptidmotive, präsentiert werden. Stellt man aber die Proteine (Quellproteine), aus denen die Peptide stammen, gegenüber ist es möglich einen patientenübergreifenden Vergleich zwischen den HLA-Ligandomen von Tumorgewebe und angrenzenden nicht-malignen Lebergeweben anzustellen. Betrachtet man diese Quellproteine konnten auf HCC-Tumorgeweben 4.815 unterschiedliche Proteine, durch HLA-Liganden repräsentiert, identifiziert werden. Auf allen untersuchten gesunden Lebergeweben waren es 4.778.

Um abschätzen zu können inwieweit die hier durchgeführten Analysen das Gesamtligandom von Tumor- sowie nicht-malignem Gewebe abdecken, wurden die nachfolgenden Sättigungsanalysen durchgeführt. Hierbei wurde durch Auftragung der kumulativen Peptid- bzw. Quellproteinanzahl gegen die Anzahl an untersuchten Proben ein Plateauwert ermittelt, der beim aktuellen Stand der Technik das messbare Gesamtligandom abschätzt. (Die genaue Vorgehensweise zur Erstellung der Diagramme ist wird im Methodenteil im Abschnitt 2.4.3 beschrieben).

3. Ergebnisse

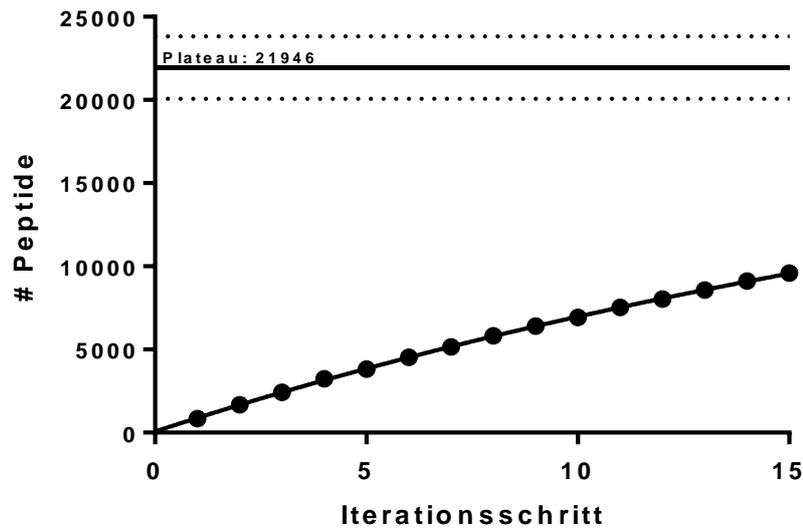


Abbildung 15: Sättigungskurve der präsentierten HLA-Liganden auf HCC (9307) mit Abschätzung des messbaren Gesamtligandoms. Die Kurve durch die Punkte entspricht einer exponentiellen Annäherung. $R^2 = 0,9998$. Plateau: 21946. Gestrichelte Linien: 95% Konfidenzintervall (20.067 bis 23.825). Daraus ergibt sich eine Abdeckung auf Peptidebene von 42%.

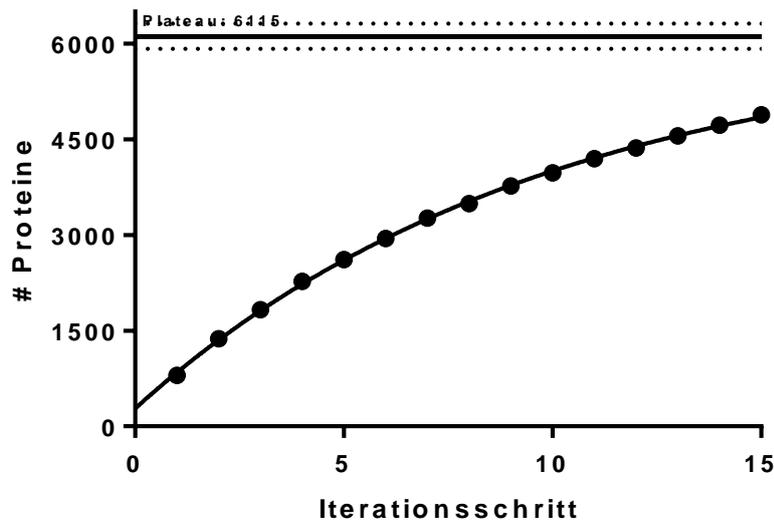


Abbildung 16: Sättigungskurve der Quellproteine der HLA-Liganden auf HCC (4815) mit Abschätzung des messbaren Gesamtligandoms. Die Kurve durch die Punkte entspricht einer exponentiellen Annäherung. $R^2 = 0,9996$. Plateau: 6.115. Gestrichelten Linien: 95% Konfidenzintervall (5.916 bis 6.314). Daraus ergibt sich eine Abdeckung auf Proteinebene von 79%.

3. Ergebnisse

Die Abbildungen 15 und 16 zeigen die Sättigungsanalysen der HCC-HLA-Liganden bzw. deren Quellproteine. Bei den HLA-Liganden wird mit den erhobenen Daten eine Sättigung von 42% erreicht. Das bedeutet, dass bisher weniger als die Hälfte aller messbaren HLA-Liganden auf HCC-Lebergewebe identifiziert werden konnte. Bei den Quellproteinen hingegen wurde eine Abdeckung von 79% erreicht. In den Abbildungen 17 und 18 sind die entsprechenden Analysen für die HLA-Liganden bzw. derer Quellproteine aus nicht-malignem Lebergewebe gezeigt. Hier wurde für HLA-Liganden eine Abdeckung des Gesamtligandoms von 52% erreicht. Sie liegt also etwas höher als bei den HLA-Liganden aus HCC-Gewebe. Außerdem ist das errechnete Plateau im gesunden Gewebe mit 17.777 verschiedenen HLA-Liganden kleiner als das aus HCC-Gewebe (21.946). Das Ligandom von HCC-Tumoren scheint also komplexer zu sein als das in gesundem Lebergewebe. Dies ist entsprechend auch bei den Quellproteinen zu beobachten. Hier liegt die Abdeckung bei gesundem Lebergewebe bei 85% und der Plateauwert bei 5.621 verschiedenen Quellproteinen. Bei den HCC-Quellproteinen liegt das Plateau bei 6.115.

Durch die relativ niedrige Abdeckung des HLA-Ligandoms auf Ligandenebene ist ein Vergleich zwischen HCC- und nicht-malignem Gewebe auf dieser Ebene nicht sinnvoll, da Liganden die in dem hier vorhandenen Datensatz exklusiv auf Tumorgewebe identifiziert wurden mit hoher Wahrscheinlichkeit in zukünftigen Analysen ebenfalls auf gesundem Gewebe identifiziert werden können. Auf Quellproteinebene hingegen ist diese Wahrscheinlichkeit durch die hohe Abdeckung auf gesundem Gewebe von 85% deutlich geringer. Ein Ligandomvergleich auf Quellproteinebene ist deshalb durchaus sinnvoll. Zusätzlich umgeht man so, wie bereits zuvor erwähnt, die Sequenzrestriktionen der einzelnen HLA-Allotypen und kann auf diese Weise identifizierte HLA-Liganden-Quellproteine aus anderen gesunden Geweben und von anderen Patienten mit in den Ligandomvergleich einbeziehen.

3. Ergebnisse

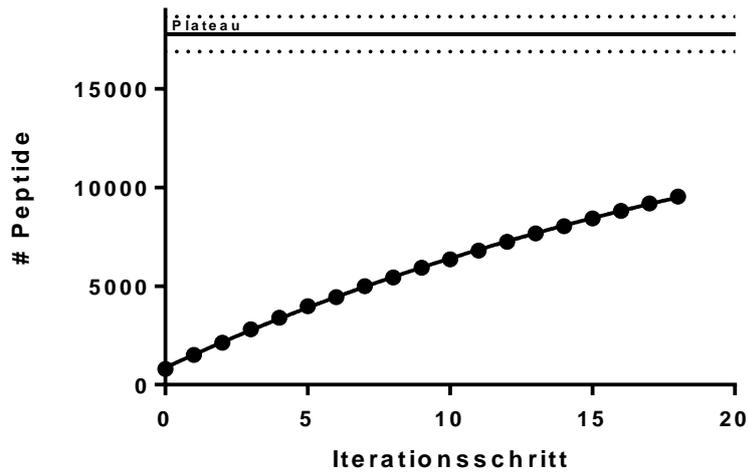


Abbildung 17: Sättigungskurve der präsentierten HLA-Liganden auf nicht-malignem Lebergewebe (9197) mit Abschätzung des messbaren Gesamtligandoms. Die Kurve durch die Punkte entspricht einer exponentiellen Annäherung. $R^2 = 0,9998$. Plateau: 17.777. Gestrichelten Linien: 95% Konfidenzintervall (16.886 bis 18.667). Daraus ergibt sich eine Abdeckung auf Peptidebene von 52%.

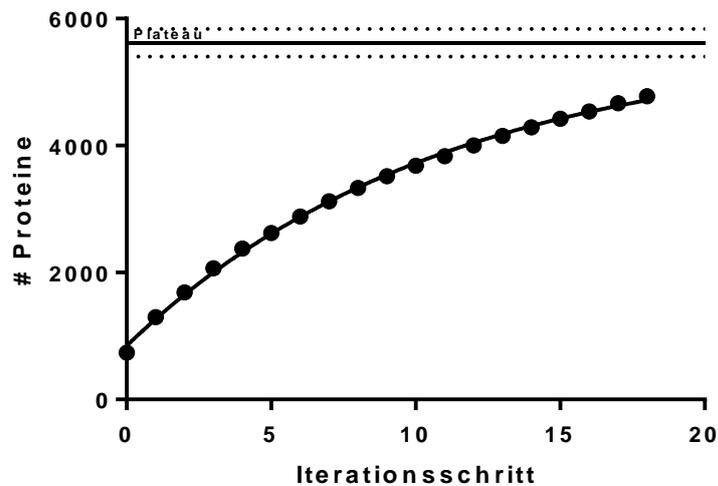


Abbildung 18: Sättigungskurve der Quellproteine der HLA-Liganden auf nicht-malignem Lebergewebe (4778) mit Abschätzung des messbaren Gesamtligandoms. Die Kurve durch die Punkte entspricht einer exponentiellen Annäherung. $R^2 = 0,9986$. Plateau: 5.621. Gestrichelten Linien: 95% Konfidenzintervall (5.403 bis 5.839). Daraus ergibt sich eine Abdeckung auf Proteinebene von 85%.

3. Ergebnisse

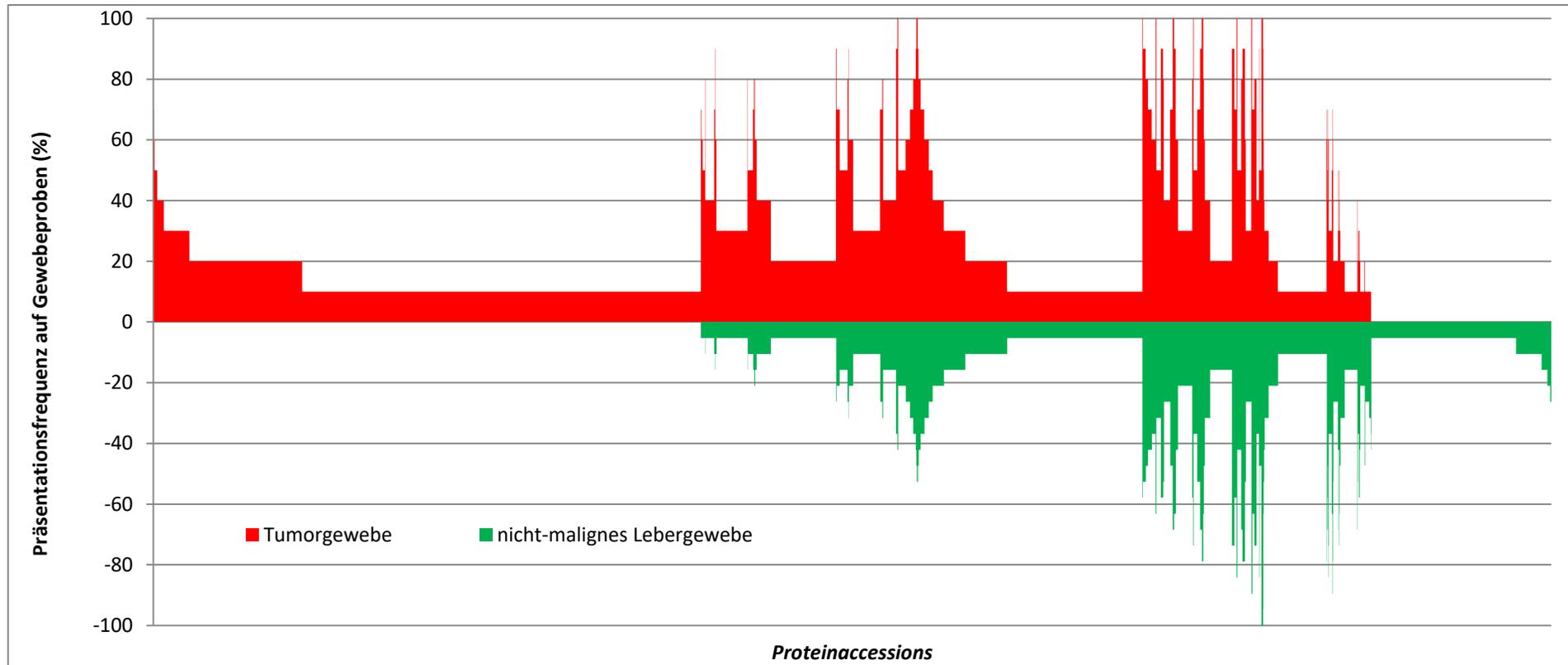


Abbildung 19: Proteinpräsentationsfrequenz der Quellproteine aufgetragen gegen die identifizierten Uniprot-Proteinaccessions; HCC im Vergleich mit gesundem Lebergewebe. Rot: Proteinidentifikationen auf HCC-Tumorgewebe. Grün: Proteinidentifikationen auf nicht-malignem Lebergewebe nach unten, unter die X-Achse aufgetragen.

3. Ergebnisse

In Abbildung 19 ist der Vergleich zwischen HCC-Tumorgewebe und dem nicht-malignen Lebergewebe der untersuchten HCC-Patienten anhand der Quellproteine der identifizierten HLA-Liganden abgebildet. Wie bereits im Methodenteil beschrieben wurden für diese Analyse nur die zehn Tumorproben verwendet, von denen mehr als 200 HLA-Liganden isoliert und identifiziert werden konnten. Für die Analyse der Quellproteine der auf gesundem Gewebe identifizierten HLA-Liganden wurden alle 21 untersuchten nicht-malignen Lebergewebsproben verwendet. Auf der X-Achse sind die Uniprot-*Protein accessions* aufgetragen, auf der Y-Achse die Präsentationsfrequenz auf den untersuchten Geweben. Die Quellprotein-Identifikationen auf Tumorgewebe sind nach oben über die X-Achse aufgetragen die von nicht-malignem Gewebe nach unten. Es ist zu sehen, dass viele Quellproteine sowohl auf Tumor- als auch auf gesundem Gewebe identifiziert werden konnten. Es gibt jedoch auch Proteine die exklusiv auf der Tumorseite bzw. auf der Seite des benignen Lebergewebes auftauchen. Einige der Quellproteine von Tumoren wurde in allen untersuchten Patientengeweben identifiziert. Bei gesundem Gewebe war dies ebenfalls der Fall jedoch deutlich seltener. Insgesamt konnten hier sechs Proteine auf allen untersuchten gesunden Geweben identifiziert werden. Dabei handelte es sich um verschiedene Varianten des Proteins Actin. Betrachtet man diesen Vergleich so wurden insgesamt 2164 verschiedene Proteine ausschließlich auf HCC-Tumorgewebe identifiziert. Die höchste Präsentationsfrequenz eines in diesem Vergleich tumorexklusiven Proteins beträgt 70%. Dieses Protein konnte in sieben der 10 Proben nachgewiesen werden. Bei diesem Protein handelt es sich um Nesprin-2 (Q8WXH0). Es kann mit Actin interagieren und ist Teil des Zytoskeletts.

3. Ergebnisse

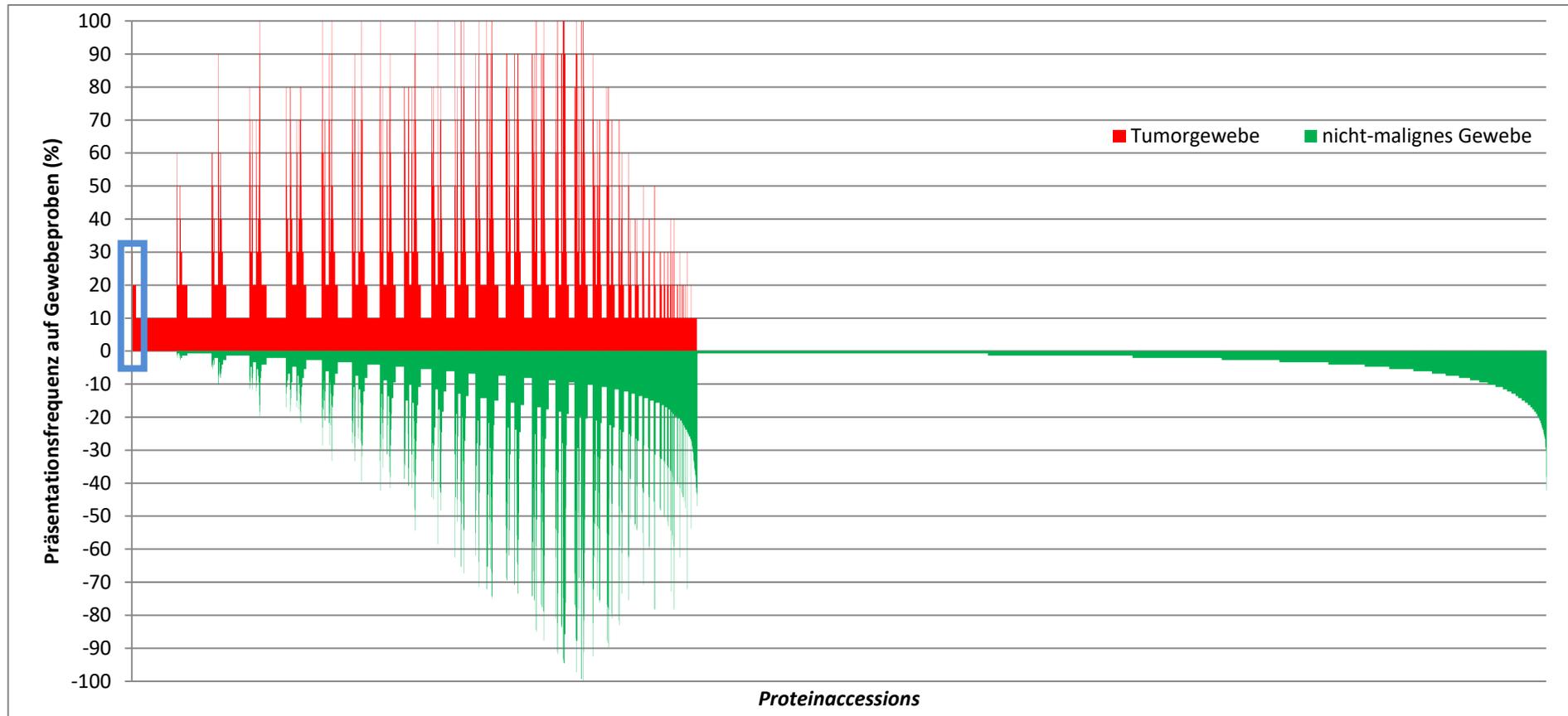


Abbildung 20: Proteinpräsentationsfrequenz der Quellproteine auf HCC-Gewebe im Vergleich mit Quellproteinen auf verschiedensten nicht-malignen Geweben. Rot: Proteinidentifikationen auf HCC-Tumorgewebe. Grün: Proteinidentifikationen auf nicht-malignem Gewebe nach unten unter die X-Achse aufgetragen. Es ist jeweils die prozentuale Präsentationsfrequenz gezeigt. Die Daten repräsentieren 10 HCC-Gewebeprobe und 147 Gewebeprobe aus verschiedenen gesunden Geweben. Der blaue Rahmen zeigt den Ausschnitt der in Abbildung 21 vergrößert dargestellt ist.

3. Ergebnisse

Vergleicht man die auf HCC-Tumorgewebe durch HLA-Liganden abgedeckten identifizierten Proteine mit allen auf gesunden Geweben (n = 147) identifizierten Proteinen, so ergibt sich das Schaubild aus Abbildung 20. Ein Großteil der als HLA-Liganden vertretenen Quellproteinen wurde ausschließlich auf einem oder mehreren gesunden Geweben oder sowohl auf HCC-Tumorgewebe als auch auf gesundem Gewebe identifiziert. Lediglich 382 Proteine konnten exklusiv auf HCC-Tumorproben nachgewiesen werden, 347 davon jeweils nur auf einem einzigen Tumor. Es verbleiben 35 Proteine, die exklusiv auf Tumorgewebe und zusätzlich zwei- oder mehrfach in den Proben identifiziert werden konnten. Nur diese 35 Proteine erfüllen die Definition eines LiTAAs (Definition siehe 2.4.1). Diese Proteine sind in Tabelle 16 aufgelistet. Das vorher erwähnte Protein Nesprin-2, das den Vergleich mit gesundem Lebergewebe standgehalten hat tauchte bei diesem Vergleich auf 82 benignen Geweben auf und erfüllt somit nicht die Kriterien für ein LiTAA.

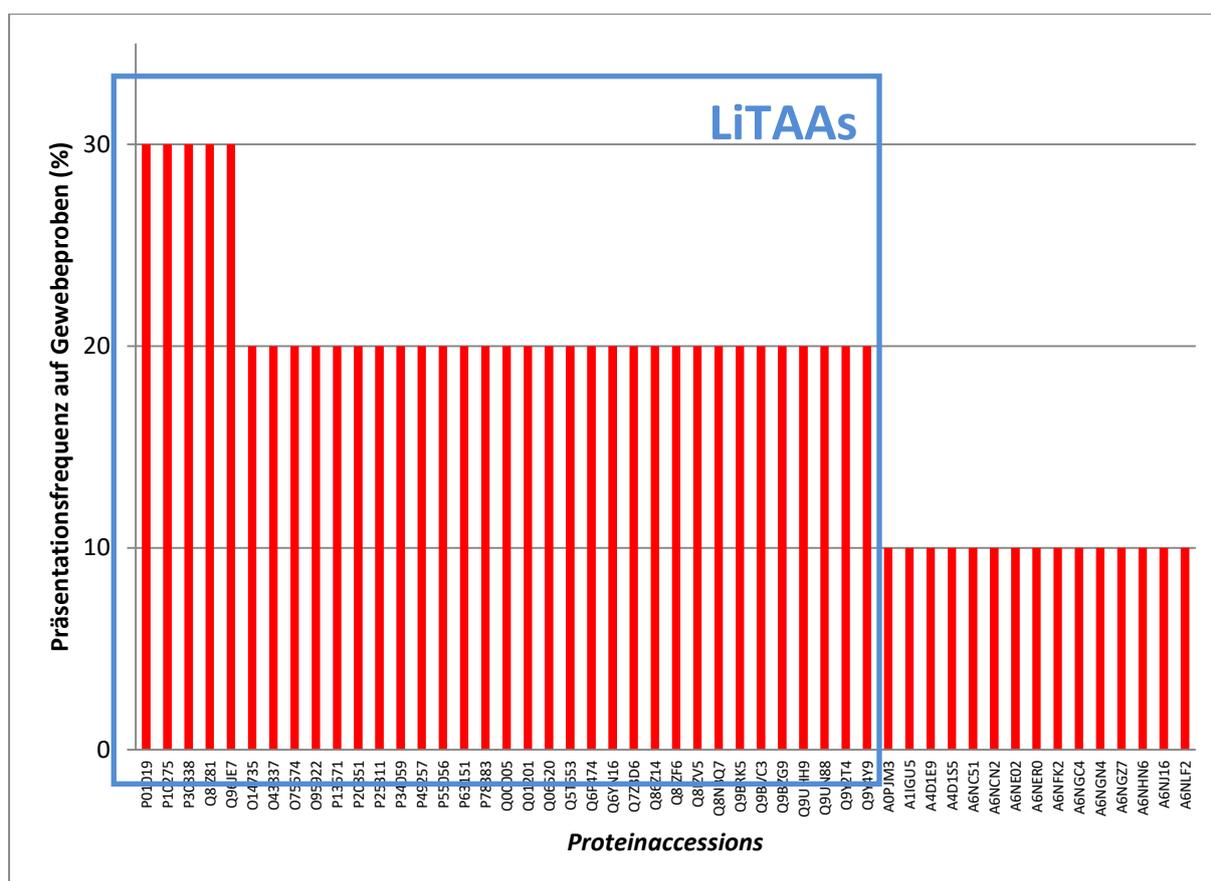


Abbildung 21: Top 50 überrepräsentierte Proteine auf HCC. Zu sehen ist ein vergrößerter Ausschnitt aus Abbildung 20. 35 Proteine sind auf mindestens 20% der HCC-Proben präsentiert und konnten nicht auf gesundem Gewebe identifiziert werden. Diese Proteine erfüllen die Kriterien für ein LiTAA. Dabei kommen lediglich fünf Proteine mit einer Präsentationsfrequenz von mindestens 30% vor; Das entspricht drei Identifikationen auf den insgesamt zehn HCC-Proben, die in die Analyse eingeschlossen wurden

3. Ergebnisse

Nur fünf Proteine konnten als durch HLA-Liganden tumorexklusiv auf mehr als zwei Tumoren identifiziert werden (Abbildung 21). Dies entspricht einem sehr geringen Bruchteil der insgesamt auf Tumorgewebe identifizierten Quellproteine (ca. 0,1%). 30 Proteine konnten tumor-exklusiv auf zwei Tumoren identifiziert werden. Tabelle 17 listet die den LiTAAs zugrundeliegenden HLA-Liganden zusammen mit den Tumoren, auf denen sie identifiziert wurden auf. Es konnten auf diese Weise 62 verschiedene HLA-Liganden identifiziert werden, die die Kriterien für ein LiTAP (Definition siehe 2.4.1) erfüllen. In Tabelle 18 werden diesen LiTAP HLA-Liganden die entsprechenden HLA-Allotypen des Tumorgewebes zugeordnet auf welchen diese vermutlich binden können. Für die LiTAPs wurde mit NetMHCpan 2.8 die Bindungsaffinität für die einzelnen Allotypen des entsprechenden HCC-Patienten bestimmt. Es stand dafür jedoch nur die HLA-Typisierung des HLA-A- und B-Locus zur Verfügung. Für 39 der 62 LiTAPs konnte so zumindest ein passender HLA-Allotyp bestimmt werden.

Tabelle 17: LiTAAs mit Präsentationfrequenzen und Proteinnamen

Uniprotaccession	Proteinname	Präsentationsfrequenz (%)
P01019	Angiotensinogen	30
P10275	Androgen receptor	30
P30838	Aldehyde dehydrogenase, dimeric NADP-preferring	30
Q8IZ81	ELMO domain-containing protein 2	30
Q96JE7	Protein transport protein Sec16B	30
O14735	CDP-diacylglycerol--inositol 3-phosphatidyltransferase	20
O43837	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit beta, mitochondrial	20
O75674	TOM1-like protein 1	20
O95922	Probable tubulin polyglutamylase TTL1	20
P13671	Complement component C6	20
P20851	C4b-binding protein beta chain	20
P25311	Zinc-alpha-2-glycoprotein	20
P34059	N-acetylgalactosamine-6-sulfatase	20
P49257	Protein ERGIC-53	20
P55056	Apolipoprotein C-IV	20
P63151	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 55 kDa regulatory subunit B alpha isoform	20

3. Ergebnisse

Uniprotaccession	Proteinname	Präsentations- Frequenz (%)
P78383	Solute carrier family 35 member B1	20
Q00005	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 55 kDa regulatory subunit B beta isoform	20
Q01201	Transcription factor RelB	20
Q06520	Bile salt sulfotransferase	20
Q5T653	39S ribosomal protein L2, mitochondrial	20
Q6P474	Putative pyridoxal-dependent decarboxylase domain-containing protein 2	20
Q6YN16	Hydroxysteroid dehydrogenase-like protein 2	20
Q7Z3D6	UPF0317 protein C14orf159, mitochondrial	20
Q86Z14	Beta-klotho	20
Q8IZF6	Probable G-protein coupled receptor 112	20
Q8IZV5	Retinol dehydrogenase 10	20
Q8NBQ7	Aquaporin-11	20
Q9BRK5	45 kDa calcium-binding protein	20
Q9BVC3	Sister chromatid cohesion protein DCC1	20
Q9BZG9	Ly-6/neurotoxin-like protein 1	20
Q9UHH9	Inositol hexakisphosphate kinase 2	20
Q9UN88	Gamma-aminobutyric acid receptor subunit theta	20
Q9Y2T4	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 55 kDa regulatory subunit B gamma isoform	20
Q9Y4Y9	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm5	20

3. Ergebnisse

Tabelle 18: LiTAPs mit zugehörigen Quellproteinen (LiTAAs) und Patienten ID der Tumore auf denen sie identifiziert wurden. HLA-Allotypen in Fett: NetMHC Binding < 500nM (NetMHCpan 2.8), Tumore mit *: Tumore von Patienten die zuvor von der Analyse wegen zu niedriger Peptidausbeute ausgeschlossen wurden.

LiTAP	LiTAA (Uniprot Accession)	Patienten ID	HLA-Allele
APAGVSLRA	P01019	HCC006	A*01, B*08, B*13
ALQDQLVLV	P01019	HCC008	A*02 , B*39, B*51
REPTSTQQL	P01019	HCC032	A*02, A*03, B*13, B*40
FTAEEGQLY	P10275	HCC013	A*01 , A*02, B*38, B*57
EISVQVPK	P10275	HCC024	A*03, A*68 , B*15, B*40
YQSRDYYNF	P10275	HCC028	A*02, A*24 , B*07, B*35
SSNDKVIKK	P30838	HCC006	A*01, B*08, B*13
		HCC025	A*02, A*11 , B*37, B*44
		HCC027	A*03 , A*24, B*18, B*27
SNDKVIKK	P30838	HCC025	A*02, A*11, B*37, B*44
ILYTGSTGVGK	P30838	HCC027	A*03 , A*24, B*18, B*27
KVRYPPSPAKM	P30838	HCC027	A*03, A*24, B*18, B*27
LLMPTKKLN	Q8IZ81	HCC025	A*02, A*11, B*37, B*44
		HCC028	A*02, A*24, B*07, B*35
		HCC032	A*02, A*03, B*13, B*40
RQPPVANLI	Q96JE7	HCC013	A*01, A*02, B*38, B*57
FYIPHPVVSF	Q96JE7	HCC028	A*02, A*24 , B*07, B*35
HLWGHALFL	Q96JE7	HCC032	A*02 , A*03, B*13 , B*40
SLISVIHLI	O14735	HCC021	A*01, A*24 , B*27, B*58
		HCC032	A*02 , A*03, B*13, B*40
LVQNPYQFD	O43837	HCC021	A*01, A*24, B*27, B*58
VQNPYQFDVL	O43837	HCC025	A*02, A*11, B*37 , B*44
SLPSSDVTNNLK	O75674	HCC025	A*02, A*11 , B*37, B*44
		HCC027	A*03, A*24, B*18, B*27
SNKEAYVISLY	O95922	HCC013	A*01, A*02, B*38, B*57
RDSKTSSF	O95922	HCC025	A*02, A*11, B*37, B*44
EVLITPFQR	P13671	HCC024	A*03, A*68 , B*15, B*40
LYSRIFDDF	P13671	HCC028	A*02, A*24 , B*07, B*35
HLVGKCTL	P20851	HCC026	A*01, A*02, B*08, B*51
KEVEGQIL	P20851	HCC032	A*02, A*03, B*13 , B*40
RMVPVLLSL	P25311	HCC021	A*01, A*24, B*27 , B*58
EAEPVYVQR	P25311	HCC024	A*03, A*68 , B*15, B*40
APQPPNILLLL	P34059	HCC021	A*01, A*24, B*27, B*58
		HCC028	A*02, A*24, B*07 , B*35
SFKGPHLVQSD	P49257	HCC021	A*01, A*24, B*27, B*58
HDVLSFLTF	P49257	HCC025	A*02, A*11, B*37 , B*44
SLLKKTDSL	P55056	HCC013	A*01, A*02 , B*38, B*57
		HCC020*	A*02 , A*25, B*08 , B*44
		HCC026	A*01, A*02 , B*08 , B*51
YIFQDKVN	P63151, Q00005, Q9Y2T4	HCC021	A*01, A*24, B*27, B*58
		HCC028	A*02, A*24, B*07, B*35

3. Ergebnisse

LiTAP	LiTAA (Uniprot Accession)	Patienten ID	HLA-Allele
RYPAIINYNI	P78383	HCC027	A*03, A*24 , B*18, B*27
		HCC028	A*02, A*24 , B*07, B*35
SQADVHRQI	Q01201	HCC013	A*01, A*02, B*38, B*57
		HCC032	A*02, A*03, B*13 , B*40
SETESPRLF	Q06520	HCC023*	A*24, A*29, B*37, B*44
YVVDKAQLL	Q06520	HCC025	A*02 , A*11, B*37, B*44
KWIQSVPIW	Q06520	HCC028	A*02, A*24 , B*07, B*35
LYGSWFDHI	Q06520	HCC028	A*02, A*24 , B*07, B*35
ESEPGRGAQY	Q5T653	HCC013	A*01 , A*02, B*38, B*57
		HCC026	A*01 , A*02, B*08, B*51
RTKYTITPVK	Q5T653	HCC013	A*01, A*02, B*38, B*57
KPTDKLRAL	Q6P474	HCC028	A*02, A*24, B*07 , B*35
LEKIADPTL	Q6P474	HCC032	A*02, A*03, B*13, B*40
AIKPGHPLQPDF	Q6YN16	HCC021	A*01, A*24, B*27, B*58
SGKPKPTM	Q6YN16	HCC026	A*01, A*02, B*08, B*51
LLKASLSLSH	Q7Z3D6	HCC021	A*01, A*24, B*27, B*58
		HCC024	A*03 , A*68, B*15 , B*40
STDEITTRY	Q86Z14	HCC013	A*01 , A*02, B*38, B*57
VYTVGHNLI	Q86Z14	HCC023*	A*24 , A*29, B*37, B*44
RLFPDGIVTV	Q86Z14	HCC032	A*02 , A*03, B*13, B*40
QMVEFPVLGTR	Q8IZF6	HCC021	A*01, A*24, B*27, B*58
TTQTEINGAI	Q8IZF6	HCC024	A*03, A*68, B*15, B*40
MKSILPFEAVV	Q8IZV5	HCC025	A*02, A*11, B*37, B*44
HESLSHEL	Q8IZV5	HCC032	A*02, A*03, B*13 , B*40
KEVGEVSVL	Q8IZV5	HCC032	A*02, A*03, B*13 , B*40
VYAGGSLTGAVF	Q8NBQ7	HCC027	A*03, A*24 , B*18, B*27
		HCC028	A*02, A*24 , B*07, B*35
ARSVHEEF	Q9BRK5	HCC021	A*01, A*24, B*27, B*58
LSFLHPEHSRG	Q9BRK5	HCC026	A*01, A*02, B*08, B*51
VWQQSVPE	Q9BVC3	HCC024	A*03, A*68, B*15, B*40
		HCC027	A*03, A*24, B*18, B*27
VLMGLPLAQA	Q9BZG9	HCC028	A*02 , A*24, B*07, B*35
		HCC032	A*02 , A*03, B*13, B*40
TNKKHHVL	Q9UHH9	HCC026	A*01, A*02, B*08 , B*51
SLIDIVTEI	Q9UHH9	HCC032	A*02, A*03, B*13, B*40
MLRAAVILL	Q9UN88	HCC021	A*01, A*24, B*27, B*58
IYVTSIEQI	Q9UN88	HCC027	A*03, A*24 , B*18, B*27
LVPGGEGPEV	Q9Y4Y9	HCC027	A*03, A*24, B*18, B*27
		HCC028	A*02, A*24, B*07, B*35

3. Ergebnisse

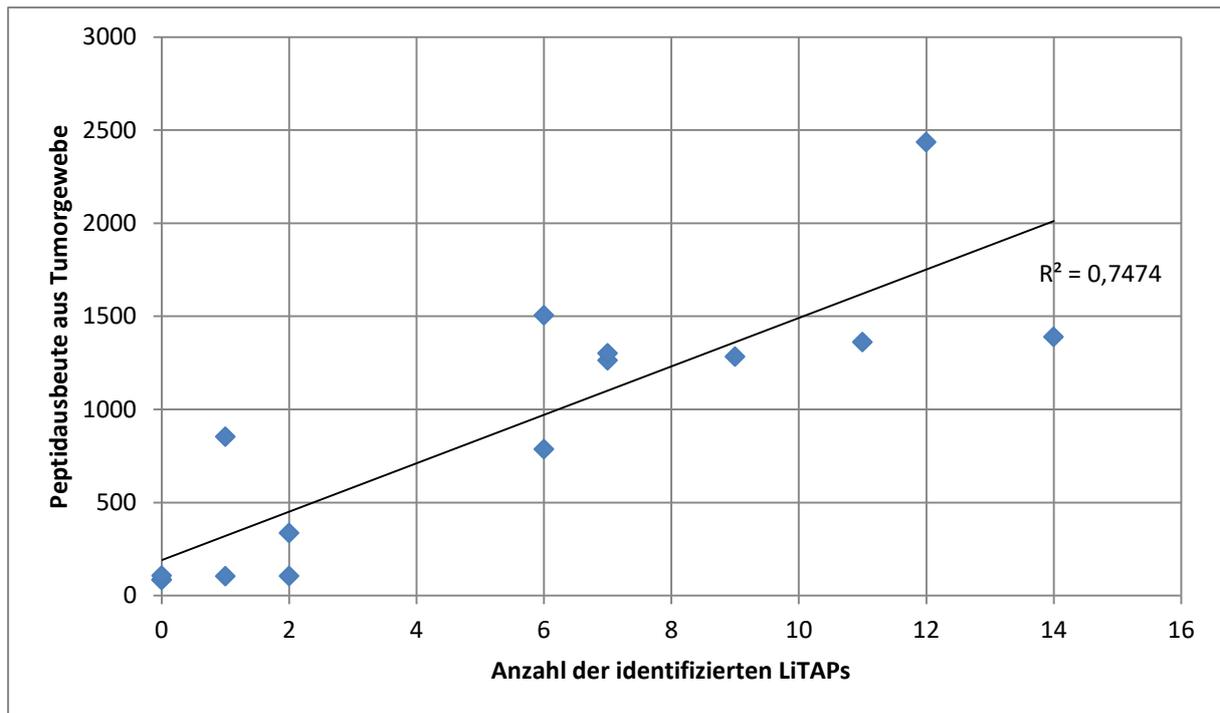


Abbildung 22: Korrelation zwischen Peptidausbeute und identifizierten LiTAPs. Jeder Punkt entspricht einer HCC-Probe. In Proben mit einer höheren Peptidausbeute wurden mehr LiTAPs gefunden. Proben mit einer geringen Peptidausbeute hingegen weisen eine geringere Anzahl an LiTAPs auf. Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0,7474$.

Trägt man die Peptidausbeute der einzelnen HCC-Tumoren gegen die Anzahl der identifizierten LiTAPs in diesen Geweben auf, so ergibt sich eine Korrelation (Abbildung 22). In Tumورproben in denen viele Peptide identifiziert werden konnten, tauchen auch vermehrt LiTAPs auf. Aus den fünf Tumoren mit den geringsten Peptidausbeuten (HCC007, HCC018, HCC020, HCC023, HCC030) konnten in lediglich zwei Fällen überhaupt ein bzw. zwei LiTAPs nachgewiesen werden. Dies sind genau die Tumورproben, die wegen zu geringer Ausbeute für die Identifikation der LiTAAs/LiTAPs aus der Analyse ausgeschlossen wurden (siehe Kapitel 2.4.1). Des Weiteren ist ein Schwellenwert, ähnlich wie bei der Abhängigkeit von Peptidausbeute zur eingesetzten Gewebemenge, zu erkennen. Ab einer Peptidausbeute von ca. 1.000 HLA-Liganden reicht die Anzahl von identifizierten LiTAPs von sechs bis 16. Bei den Proben mit unter 1.000 identifizierten HLA-Liganden konnten in nur einer Tumورprobe sechs LiTAPs identifiziert werden, in allen anderen Fällen waren es zwei oder weniger. In sieben Tumورproben konnten mehr als 1.000 HLA-Liganden identifiziert werden, in acht weniger als 1.000.

3. Ergebnisse

3.1.2 Tumor-spezifische Antigene

Um mutierte Neoantigene zu identifizieren, wurden Exom-Sequenzierungen durchgeführt. Bei soliden Tumoren handelt es sich um ein Zellmosaik verschiedener maligner als auch benigner Zellen. Während des Wachstums des Tumors werden immer mehr Mutationen angehäuft. Es finden sich aber nicht alle Mutationen in allen Zellen des Tumors. Im Extremfall ist keine der Tumorzellen mit einer anderen Tumorzelle exakt identisch; jede trägt ihre eigene Mutationssignatur. Dazu kommt, dass der Tumor stets von gesunden Zellen durchsetzt und mit Immunzellen infiltriert ist. Diese Umstände machen es sehr schwierig eindeutige Mutationen zu identifizieren. Um die Heterogenität innerhalb eines Tumors sowie die technische Reproduzierbarkeit der Sequenzierung abschätzen zu können, wurden verschiedene technische und biologische Replikate gemessen. Diese Tests wurden an den HCCs 023 bis 027 durchgeführt. Der erste Versuch bestand darin drei verschiedene Stellen eines Tumors unabhängig voneinander zu sequenzieren sowie bei einer dieser Stellen drei technische Replikate zu sequenzieren. Es wurden also pro Tumor sechs Sequenzierungsexperimente durchgeführt. Abbildung 23 veranschaulicht die Ergebnisse dieser je sechs unabhängigen Sequenzierungsversuche der Tumoren HCC023 und HCC024.

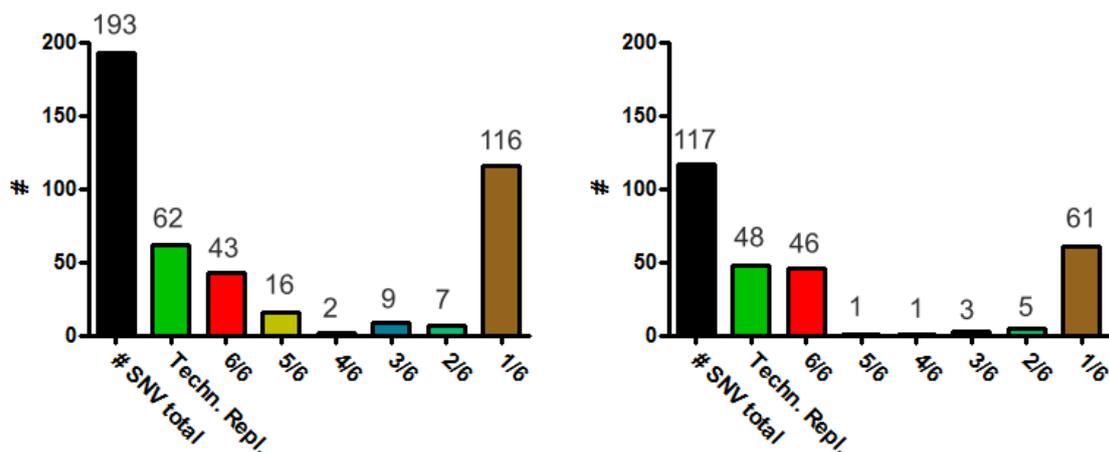


Abbildung 23: HCC023 links: Insgesamt wurden 193 unterschiedliche *single nucleotide variations* (SNV) identifiziert. 62 davon konnten in den technischen Replikaten reproduziert werden. 43 SNV konnten in allen drei technischen sowie den drei biologischen Replikaten identifiziert werden. 116 SNV konnten in nur einem der sechs Sequenzierungsexperimente identifiziert werden. Rechts HCC024: Gesamtzahl an SNV: 117. 48 SNV konnten technisch repliziert werden. 46 SNV wurden in allen sechs Sequenzierungsexperimenten identifiziert. 61 SNV konnten nicht repliziert werden und wurden in nur einem Sequenzierungsexperiment identifiziert.

3. Ergebnisse

Des Weiteren wurden technische Replikate auf zwei verschiedenen Sequenzierern des gleichen Typs (Illumina HiSeq) an unterschiedlichen Standorten durchgeführt: zum einen im Institut für Medizinische Genetik und Angewandte Genomik am Universitätsklinikum Tübingen zum andern am Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg. Anschließend wurden diese beiden Rohdatensätze an zwei unterschiedlichen Standorten ausgewertet, zum einen abermals im Institut für Medizinische Genetik und Angewandte Genomik am Universitätsklinikum Tübingen, zum anderen von einem unabhängigen Unternehmen. Es wurde von drei Patienten (HCC025, HCC026, HCC027) jeweils DNA isoliert und diese dann aliquotiert an die beiden Standorte verteilt. Daraus ergeben sich für drei Patienten je drei Datensätze. Der erste Datensatz (HG) sind die Daten aus der Humangenetik ausgewertet vom Institut für Humangenetik in Tübingen. Der zweite Datensatz (HG HB) sind Daten aus Heidelberg, ausgewertet vom Institut für Humangenetik in Tübingen. Der dritte Datensatz (Co) sind Daten aus Heidelberg, ausgewertet von einem unabhängigen Unternehmen. Abbildung 24 zeigt die Überschneidungen dieser Datensätze anhand der identifizierten *single nucleotide variations* (SNV) in Venn-Diagrammen.

3. Ergebnisse

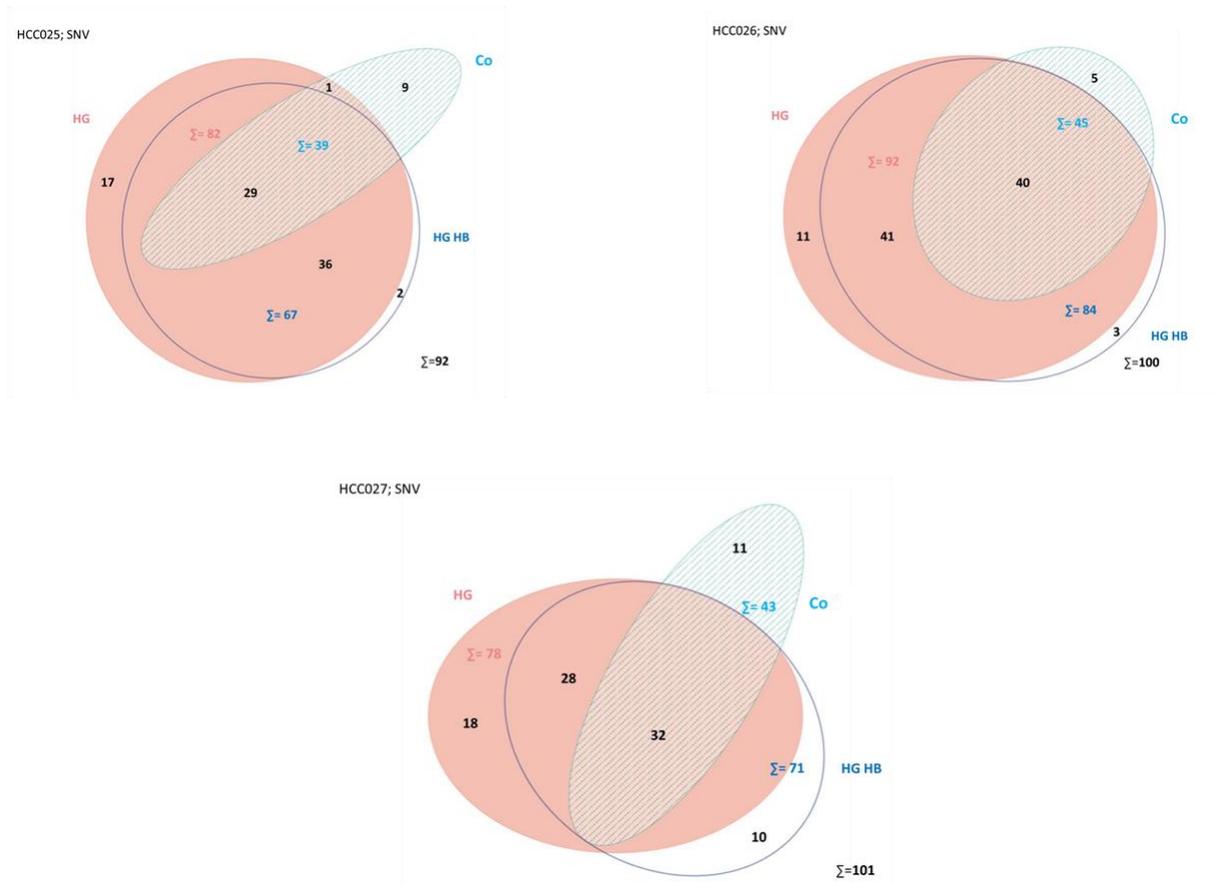


Abbildung 24: HCC025: Insgesamt konnten 92 SNV identifiziert werden. 29 davon konnten in allen drei Datensätzen reproduziert werden. HCC026: 100 SNV wurden insgesamt identifiziert, 40 davon wurden in allen drei Datensätzen gefunden. HCC027: Gesamtanzahl SNV: 101, Kernschnittfläche aller drei Datensätze: 32.

Aufgrund dieser Versuche wurden die Filterkriterien für die Mutationen gewählt, die als Grundlage für die Vorhersage der HLA-Liganden angewendet wurden. Es wurde auf die Charakteristika der Mutationen geachtet, die sowohl technisch als auch biologisch reproduzierbar identifiziert werden konnten. Da die identifizierten Mutationen der Startpunkt der Vorhersage der HLA-Liganden und der gesamten gezielten Suchstrategie sind, ist es sehr wichtig zuverlässige Mutationsdaten zu besitzen. Die aufgrund dieser Versuche gewählten Filterkriterien wurden konservativ angesetzt, um möglichst viele falsch-positive SNV-Identifikationen auszuschließen. Die gewählten Filterkriterien schreiben vor, dass die für die Vorhersagen benutzen Mutationen eine Allelfrequenz von mindestens 20% aufweisen müssen und mit einer Sequenziertiefe von mindestens 10 *reads* identifiziert worden sind.

3. Ergebnisse

3.1.2.1 HCC025

Für HCC025 wurden insgesamt 16 Peptide für die gezielte Suche ausgewählt (Auswahlkriterien siehe 2.4.5). Diese Peptide basieren auf 10 unterschiedlichen tumorspezifischen Mutationen. Tabelle 16 listet diese Peptide auf. Tabelle 17 zeigt die korrespondierenden isotoopenmarkierten synthetischen Peptide sowie die Retentionszeiten dieser Peptide in einer Mischung aus natürlichen HLA-Liganden, welche von JY-Zellen eluiert worden sind. JY-Liganden wurden als Matrix für die synthetischen Peptide verwendet, da sich die Retentionszeit von Peptiden in einer Peptid-haltigen Matrix leicht von der in reiner Lösung unterscheidet. Die Konzentration der JY-Liganden wurde so gewählt, dass eine Peptidausbeute ähnlich der des entsprechenden Tumors erreicht wird.

Tabelle19: Peptidsequenzen der gezielt gesuchten vorhergesagten mutierten Neoantigene von HCC025 (2.4.5). Ein * bei Ligand bedeutet, dass bereits Liganden desselben Proteins identifiziert worden sind. Ein * bei MS1 bedeutet, dass eine entsprechende Masse im 1. Replikat der Tumorprobe gefunden wurde. Die Sequenz im Feld Ligand stellt ein bereits identifiziertes wildtypisches Peptid, welches die von der Mutation betroffene Stelle umfasst, dar.

#	Peptid	Gen	Mutation	HLA	Ligand	MS1
1	VLYHGQVL	HADHA	G341V	A*02		*
2	RLAETYETTL	ALB	K375E	A*02	RLAKTYETTLEK*	*
3	QLNVKNGSFV	DPY19L4	K339N	A*02	*	*
4	VKNGSFVAKI	DPY19L4	K339N	A*02	*	*
5	NVKNGSFVAK	DPY19L4	K339N	A*11	*	*
6	LQLNVKNGSF	DPY19L4	K339N	B*37	*	*
7	YEAAYVGAY	TDG	G343V	B*44	*	*
8	RVATKGAATPK	PTPRM	Q718R	A*11		*
9	RLIERSQSPV	SPEN	P721L	A*02	*	
10	RDRDHERRL	SPEN	P721L	A*02	*	
11	LIERSQSPV	SPEN	P721L	A*02	*	
12	LIERSQSPVHL	SPEN	P721L	A*02	*	*
13	RLVTVLEHRL	XRCC2	I95V	A*02	*	
14	HIYGGGYAL	PKDREJ	T1875I	A*02	*	*
15	SIKDGEAVWV	BLMH	F324V	A*02	*	
16	RLFGFQVGR	SLC38A10	G122R	A*11	*	*

3. Ergebnisse

Tabelle 20: Synthetische Peptide für SIM-Versuche bei HCCC025. Es ist jeweils die Massen des zweifach positiv geladenen Ions vermerkt.

Peptid	Schwere Masse (Th)	RT in JY-Matrix	SIM#	Natürliche Masse (Th)
RLIERSQSP[V(¹³ C5; ¹⁵ N)]	595,8478	31	1	592,8409
LIERSQSPVH[L(¹³ C6; ¹⁵ N)]	643,3705	40	1	639,8619
QLNVKNGSF[V(¹³ C5; ¹⁵ N)]	556,3105	43	1	553,3037
RLVTVLEHR[L(¹³ C6; ¹⁵ N)]	621,8914	45	1	618,3828
HIYGSGGYA[L(¹³ C6; ¹⁵ N)]	522,7648	47	1	519,2562
RDRDHERR[L(¹³ C6; ¹⁵ N)]	630,3431	16	2	626,8345
LIERSQSP[V(¹³ C5; ¹⁵ N)]	517,7973	32	2	514,7904
VKNGSFVAK[I(¹³ C6; ¹⁵ N)]	535,3275	33	2	531,8189
NVKNGSFVA[K(¹³ C6; ¹⁵ N2)]	536,3055	43	2	532,2984
RLAETYETT[L(¹³ C6; ¹⁵ N)]	602,3201	46	2	598,8115
RLFGFQVG[R(¹³ C6; ¹⁵ N4)]	545,3132	49	2	540,3091
RVATKGAATP[K(¹³ C6; ¹⁵ N2)]	554,3398	16	3	550,3327
VLYHGQV[L(¹³ C6; ¹⁵ N)]	468,2748	44	3	464,7662
LQLN[V(¹³ C5; ¹⁵ N)]KNGSF	563,3184	50	3	560,3115
SIKDGEAVW[V(¹³ C5; ¹⁵ N)]	555,2971	52	3	552,2902
YEAAV[V(¹³ C5; ¹⁵ N)]GAY	506,7363	54	3	503,7295

Abbildung 25 zeigt beispielhaft die Massen der ersten fünf synthetischen Peptide gemessen in der JY-Matrix. Jede Masse wurde nach der Messung manuell mit einer Massengenauigkeit von 3 ppm gesucht. Auf diese Weise wurden die Retentionszeiten der Peptide bestimmt, welche für die Planung der SIM-Experimente notwendig sind.

3. Ergebnisse

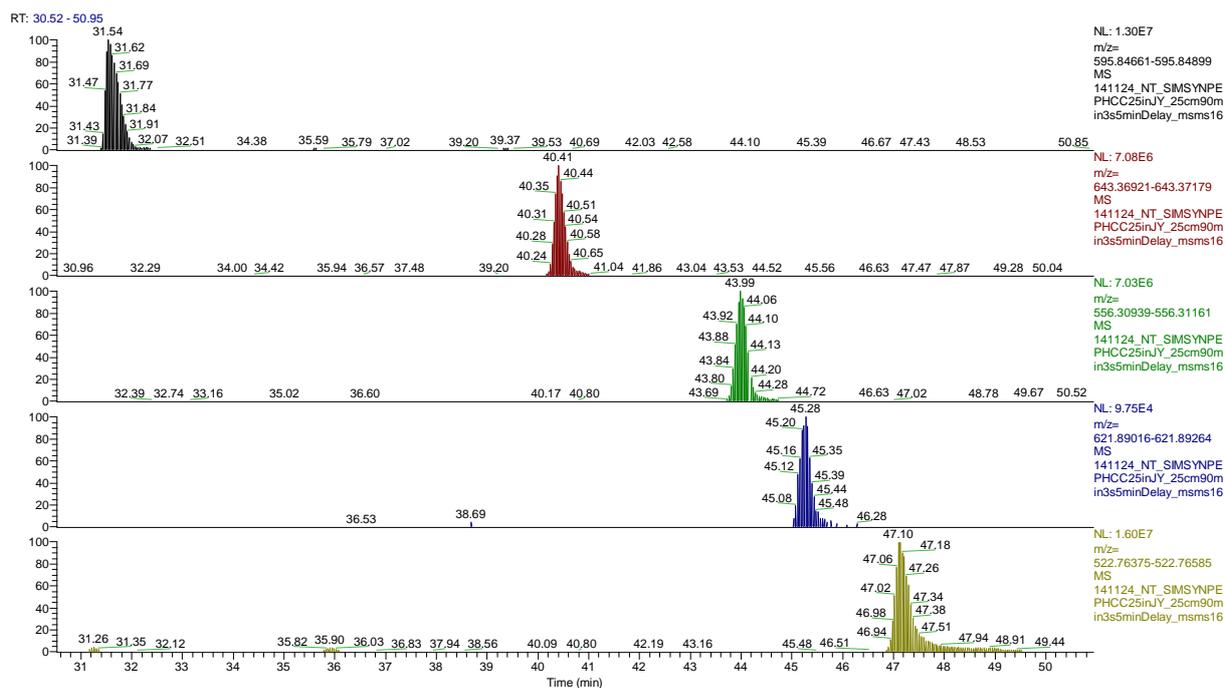


Abbildung 25: Gezeigt sind XICs aus der Messung der mit synthetischen Peptiden versetzten JY-Probe (Erster SIM-Messlauf). Es handelt sich um die XICs der folgenden Peptide: RLIERSQSP[V(13C5; 15N)], LIERSQSPVH[L(13C6; 15N)], QLVNKGSF[V(13C5; 15N)], RLVTVLEHR[L(13C6; 15N)], HIYSGGYA[L(13C6; 15N)]. Die Massen aller synthetischen Peptide konnten in der Messung wiedergefunden und bestätigt werden. Alle Peptide eluieren über einen Zeitraum von jeweils ungefähr einer Minute.

Für die Analyse des Tumors wurde die SIM-Messmethode (siehe 2.3.3) so programmiert, dass das entsprechende SIM-Segment vor dem Intensitätsmaximum des jeweiligen Peptids beginnt. Ein Segment endet dann, wenn das darauffolgende Segment vor Anstieg der Intensität des nächsten Peptids beginnt. Für das letzte SIM-Segment wurde eine Dauer von drei Minuten gewählt. Zu Beginn der Messung und am Ende wurde eine normale Top5 CID-Methode (siehe 2.3.2) programmiert, um nicht komplett auf die Identifikationen von anderen HLA-Liganden zu verzichten.

In Abbildung 26 ist ein *Total Ion Chromatogram* (TIC) des ersten SIM-Laufes von HCC025 zu sehen. Man sieht wie ab Minute 31 der Massenbereich eingeschränkt wird und damit die Gesamtintensität schlagartig abbricht. Da das automatisierte Prozessieren gegen die patientenindividuelle Datenbank keine Treffer hervorbrachte, wurde manuell nach entsprechenden Fragmentspektren der gesuchten Peptide im korrespondierenden Retentionszeitfenster gesucht. Gab es Übereinstimmungen von Masse und Retentionszeit wurde das Fragmentspektrum mit dem Spektrum des synthetischen Peptids unter Berücksichtigung der Isotopenmarkierung verglichen. Abbildung 27 zeigt das entsprechende *Extracted Ion Chromatogram* (XIC) in dem nach den ersten 5 Peptiden gesucht wurde.

3. Ergebnisse

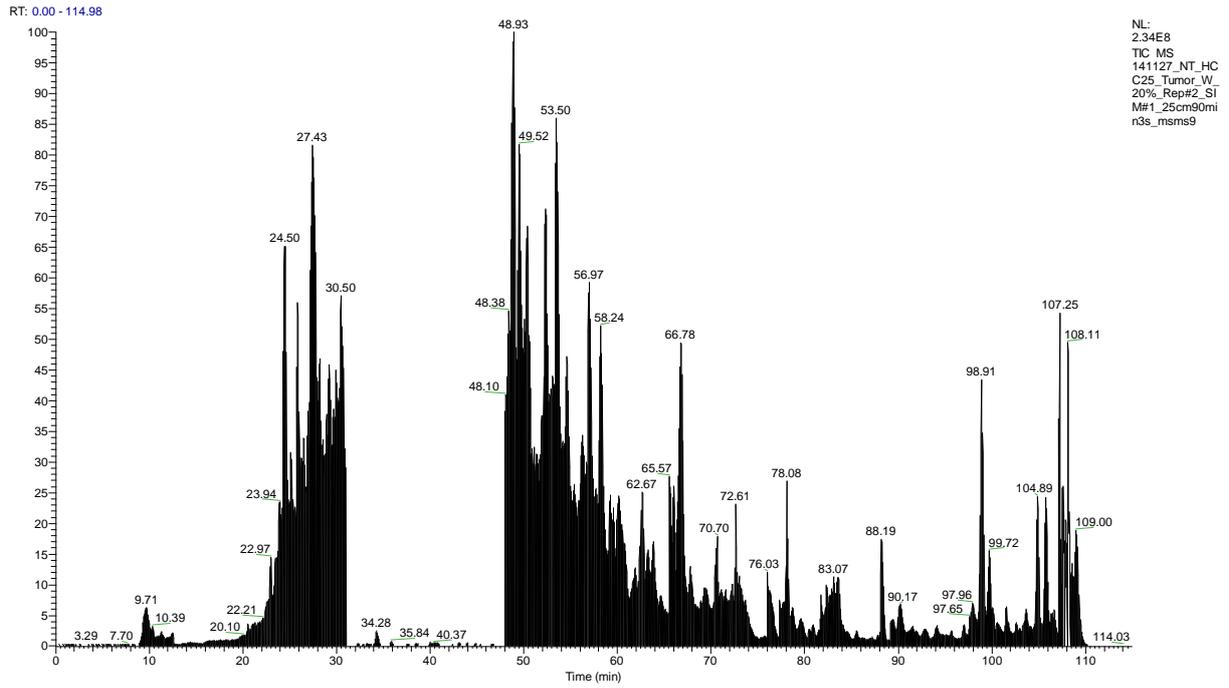


Abbildung 26: TIC des ersten Tumor-SIM-Messlaufes. Zu sehen ist der Einbruch an analysierten Ionen im Bereich der SIM-Scans zwischen Minute 31 und 48.

3. Ergebnisse

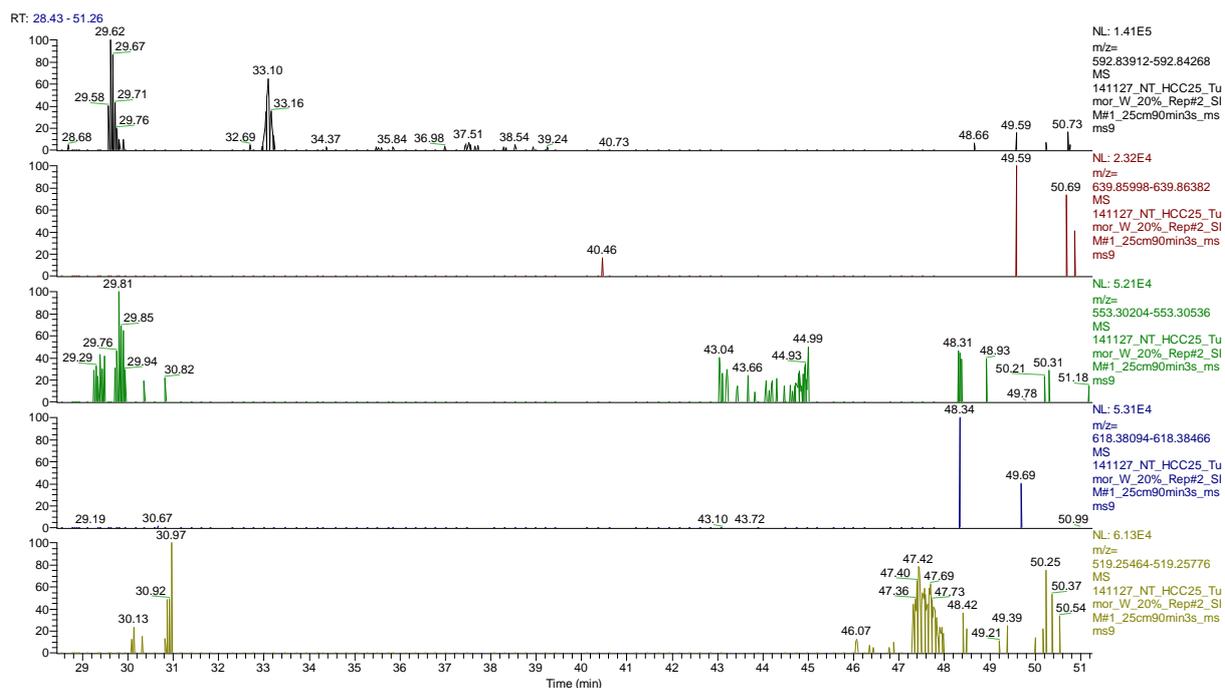


Abbildung 27: XICs der Massen der Peptide des ersten SIM-Messlaufs. Im direkten Vergleich mit Abbildung 25 (synthetische Peptide) kann die Elution der korrekten Masse nicht zu den jeweils erwarteten Elutionszeiten beobachtet werden. Lediglich für die Masse des Peptids in der fünften Spalte (HIYGSGGYAL) kann zur richtigen Elutionszeit (Minute 47-48) die richtige Masse (519,2562 Th) detektiert werden.

Insgesamt wurden bei 5 der 16 gesuchten Peptide Fragmentspektren der korrekten Masse bei der erwarteten Retentionszeit gefunden. Die entsprechenden Fragmentspektren wurden herausgesucht und mit dem jeweilig zugehörigen Spektrum der synthetischen Peptide verglichen (Abbildungen im Anhang unter 6.1). Leider konnte keines dieser Peptide durch den Vergleich der Spektren mit denen der synthetischen Peptide bestätigt werden.

Als besonders interessant galt Peptid #2 (RLAETYETTL). Es stammt aus Albumin, welches in den Transkriptomdaten durch eine sehr starke Expression aufgefallen ist. Außerdem wurde auf einem anderen Tumor (RCC376) bereits ein Peptid identifiziert, welches denselben Sequenzabschnitt beinhaltet, wie das gesuchte Peptid. Weiterhin wurde zusätzlich das Proteom von HCC025 vom Proteomcenter Tübingen (PCT) untersucht. Hierbei konnte die Mutation tatsächlich auf Proteinebene nachgewiesen werden. Leider wurde der vorhergesagte HLA-Ligand trotzdem nicht identifiziert.

3. Ergebnisse

3.1.2.2 HCC026

Für HCC026 wurde dieselbe Vorgehensweise gewählt wie bei HCC025. Insgesamt wurden 20 Peptidkandidaten für die gezielte Suche ausgewählt. Diese 20 Peptide basieren auf 12 unterschiedlichen Mutationen und sind in Tabelle 21 aufgelistet. Die entsprechenden synthetischen Gegenstücke samt Retentionszeitverhalten und Masse können aus Tabelle 22 entnommen werden.

Tabelle 21: Peptidsequenzen der gezielt gesuchten vorhergesagten mutierten Neoantigene von HCC026. * bei Ligand bedeutet, dass bereits Liganden desselben Proteins identifiziert worden sind. Ein * bei MS1 bedeutet, dass eine entsprechende Masse im 1. Replikat der Tumorprobe gefunden wurde. Die Sequenz im Feld Ligand stellt ein bereits identifiziertes Peptid, welches die von der Mutation betroffene Stelle umfasst, dar.

#	Peptide	Gen	Mutation	HLA	Ligand	MS1
1	QSYLDSGIHY	CTNNB1	S37Y	A*01	*	
2	WILKSTVAV	SLC4A4	A973V	A*02	*	
3	ILKSTVAVI	SLC4A4	A973V	A*02, B*08	*	*
4	WILKSTVAVI	SLC4A4	A973V	A*02	*	
5	TVAVIIFPV	SLC4A4	A973V	A*02	*	
6	NSKRKAETL	STK38	W271L	B*08	NSKRKAETW*	
7	QIFEGVYYL	STK17B	L143F	A*02	KQILEGVYYL*	
8	LIKQIFEGV	STK17B	L143F	A*02	*	
9	RLIKQIFEGV	STK17B	L143F	A*02	*	
10	KLKAERQRGI	EEF1A1	E68Q	A*02	*	
11	ITIPDFDFDY	MLL5	A445P	A*01	*	*
12	GIAVSEEDTL	MPDZ	I149V	A*02	*	
13	IADVSEEDTL	MPDZ	I149V	B*51	*	
14	SITSELRAV	REQL	H19R	A*02		
15	ELPDEVVVPL	CTNS	P80L	A*02		
16	LPDEVVVPL	CTNS	P80L	B*51		
17	DIKSEAQEEV	SPECC1L	I771V	A*02	*	*
18	NIALSPTLL	YIPF2	P310L	A*02	*	
19	ALSPTLLQSL	YIPF2	P301L	A*02	*	
20	GRTLILSKV	PLXNB2	A1554T	A*02	*	

3. Ergebnisse

Tabelle 22: Synthetische Peptide für SIM-Versuche bei HCCC026. Es ist jeweils die Massen des zweifach positiv geladenen Ions vermerkt.

Peptid	Schwere Masse (Th)	RT in JY-Matrix	SIM#	Natürliche Masse (Th)
ILKSTVAV[I(¹³ C6; ¹⁵ N)]	475,8215	50	1	472,313
GTTLILSK[V(¹³ C5; ¹⁵ N)]	469,3016	51	1	466,2948
GIAVSEEDT[L(¹³ C6; ¹⁵ N)]	520,7646	56	1	517,256
WILKSTVA[V(¹³ C5; ¹⁵ N)]	511,8175	61	1	508,8106
LPDEVVVP[L(¹³ C6; ¹⁵ N)]	494,2954	80	1	490,7868
ELPDEVVVP[L(¹³ C6; ¹⁵ N)]	558,8167	84	1	555,3081
TVAVIIFP[V(¹³ C5; ¹⁵ N)]	482,8091	94	1	479,8022
SITSELRA[V(¹³ C5; ¹⁵ N)]	491,284	50	2	488,2771
IAVSEEDT[L(¹³ C6; ¹⁵ N)]	492,2539	52	2	488,7453
RLIKQIFEG[V(¹³ C5; ¹⁵ N)]	604,8733	57	2	601,8664
LIKQIFEG[V(¹³ C5; ¹⁵ N)]	526,8227	63	2	523,8159
NIALSPTL[L(¹³ C6; ¹⁵ N)]	474,7955	80	2	471,2869
QIFEGVYY[L(¹³ C6; ¹⁵ N)]	569,7983	85	2	566,2897
IT[I(¹³ C6; ¹⁵ N)]PFDFDY	569,2824	95	2	565,7739
NSKRKAET[L(¹³ C6; ¹⁵ N)]	527,3099	17	3	523,8013
KLKAERQRG[I(¹³ C6; ¹⁵ N)]	603,3812	20	3	599,8726
ALSPTLLQS[L(¹³ C6; ¹⁵ N)]	525,3194	26	3	521,8108
DIKSEAQEE[V(¹³ C5; ¹⁵ N)]	577,2844	41	3	574,2775
QSYLD SG[I(¹³ C6; ¹⁵ N)]HY	595,2835	53	3	591,7749
WILKSTVAV[I(¹³ C6; ¹⁵ N)]	568,8612	72	3	565,3526

Für HCC026 konnten ebenfalls für 5 der 20 gesuchten Peptide interessante Fragmentspektren in den Tumormessungen gefunden werden. Jedoch ergab sich dasselbe Ergebnis wie bei HCC025. Keines der Spektren passte exakt zu dem entsprechenden Peptid. Ebenfalls lieferte die vorher durchgeführte automatisierte Suche mit MASCOT zu keiner Identifikation eines mutierten Peptids. Die Abbildungen im Anhang unter 6.2 zeigen die aufgenommen Spektren im Vergleich mit denen ihrer synthetischen Gegenstücke.

3. Ergebnisse

3.1.2.3 HCC027

Für HCC027 wurde die 50 cm lange Säule verwendet. In der Theorie bietet diese eine bessere Auftrennung der Peptide untereinander, jedoch eine niedrigere Sensitivität durch Peakverbreiterung aufgrund des längeren Gradienten. Bis auf den Austausch der Säule ist die Vorgehensweise jedoch identisch. Es wurden 17 Peptide ausgewählt, welche auf 9 unterschiedlichen Mutationen beruhen. Die Tabellen 23 und 24 geben einen Überblick über die Peptide und deren entsprechenden synthetischen Versionen.

Tabelle 23: Peptidsequenzen der gezielt gesuchten vorhergesagten mutierten Neoantigene von HCC027. Ein * bei Ligand bedeutet, dass bereits Liganden desselben Proteins identifiziert worden sind. Ein * bei MS1 bedeutet, dass eine entsprechende Masse im 1. Replik der Tumorprobe gefunden wurde. Die Sequenz im Feld Ligand stellt ein bereits identifiziertes Peptid, welches die von der Mutation betroffene Stelle umfasst, dar.

#	Peptide	Gen	Mutation	HLA	Ligand	MS1
1	EEATAA W AV	TMEM57	R490W	B*18	*	
2	FFLSL H GHKL	WDR3	Y588H	A*24	*	
3	FLSL H GHK	WDR3	Y588H	A*03	*	*
4	QL Y EETGEF	NFE2L2	D77Y	A*03	*	*
5	L YEETGEFL	NFE2L2	D77Y	A*24	*	
6	Y EETGEFLPI	NFE2L2	D77Y	B*18	*	*
7	L YEETGEFLPI	NFE2L2	D77Y	A*24	*	*
8	TERI V AVSF	TNS3	I17V	B*18	TERIIAVSF*	
9	TYITERI V AV	TNS3	I17V	A*24	*	
10	S YIDYLLLTFF	GPAM	H233Y	A*24	*	
11	LFLPVHRS Y I	GPAM	H233Y	A*24	*	
12	HRS Y IDYLL	GPAM	H233Y	B*27	*	
13	LLFLPVHRS Y	GPAM	H233Y	A*03	*	
14	G EELDPPWL	ABCC6	Q715E	B*18	*	
15	DITEVPDF S K	TXNL4	N70S	A*03	*	
16	AVTSVKV S QF	ARL6	L146F	A*03	*	*
17	N YGTNVPVEF	ZNF407	D1779N	A*24	*	

3. Ergebnisse

Tabelle 24: Synthetische Peptide für SIM-Versuche bei HCCC027. Es ist jeweils die Massen des zweifach positiv geladenen Ions vermerkt.

Peptid	Schwere Masse (Th)	RT in JY-Matrix	SIM#	Natürliche Masse (Th)
FFLSLHGHK[L(¹³ C6; ¹⁵ N)]	603,3488	87	1	599,8402
LYEETGEF[L(¹³ C6; ¹⁵ N)]	554,2695	96	1	550,761
DITEVPDFS[K(¹³ C6; ¹⁵ N2)]	579,7921	99	1	575,785
Q[L(¹³ C6; ¹⁵ N)]YEETGEF	561,7568	101	1	558,2482
HRSYIDYL[L(¹³ C6; ¹⁵ N)]	593,8201	107	1	590,3115
SYIDYLL[L(¹³ C6; ¹⁵ N)]TF	627,8401	160	1	624,3315
FLSLHGH[K(¹³ C6; ¹⁵ N2)]	473,7711	42	2	469,764
AVTSVK[V(¹³ C5; ¹⁵ N)]SQF	536,3075	80	2	533,3006
LFLPVHRSY[I(¹³ C6; ¹⁵ N)]	626,3697	98	2	622,8611
TER[I(¹³ C6; ¹⁵ N)]VAVSF	514,7961	99	2	511,2875
TYITERIVA[V(¹³ C5; ¹⁵ N)]	585,8417	102	2	582,8348
NYGTNVP[V(¹³ C5; ¹⁵ N)]EF	573,2789	118	2	570,272
LLF[L(¹³ C6; ¹⁵ N)]PVHRSY	626,3697	98	3	622,8611
EEATAAWA[V(¹³ C5; ¹⁵ N)]	477,234	105	3	474,2271
LYEETGEFLP[I(¹³ C6; ¹⁵ N)]	659,338	124	3	655,8294
YEETGEFLP[I(¹³ C6; ¹⁵ N)]	602,7959	141	3	599,2873
GEELDPPW[L(¹³ C6; ¹⁵ N)]	531,7644	143	3	528,2558

Es konnten für 13 der 17 Peptide Fragmentspektren gefunden werden. Leider ergab der Vergleich mit den Spektren der synthetischen Peptide erneut keine Übereinstimmung. Die Abbildungen im Anhang unter 6.3 zeigen die Vergleiche.

3.2 HLA-Liganden aus Isocitrat-Dehydrogenase I

Die folgenden Experimente und Analysen wurden im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Michael Platten vom DKFZ Heidelberg durchgeführt. Die Mutation R132H im Gen IDH1 ist von Bedeutung für die Prognose und Behandlung von Gliompatienten (Siehe Kapitel 1.3). Es sollte untersucht werden, ob Peptide, die diese Mutation tragen als HLA-Liganden präsentiert und so dem Immunsystem zugänglich gemacht werden. Sollte das der Fall sein, wären immuntherapeutische Impfungen mit diesen Peptiden ein neuer Ansatzpunkt für die Behandlung von Patienten mit Gliom.

Um herauszufinden, ob die IDH1-R132H Mutation als Teil eines HLA-Liganden auf Gliomen präsentiert wird wurden mehrere unterschiedliche Proben untersucht. Zum einen wurden drei Tumorproben von drei unterschiedlichen Patienten untersucht. Zum anderen wurden verschiedene IDH1-R132H-Transfektanten der Zelllinie LN229 analysiert. Bei LN229 handelt es sich um eine Glioblastom-Zelllinie. Zusätzliche zu der gezielten Suche nach mutierten Peptiden aus IDH1 wurde ebenfalls das wildtypische Ligandom der LN229 Zellen bzw. der Patientenproben untersucht.

3. Ergebnisse

3.2.1 Ligandomanalysen

Tabelle 26 zeigt einen Überblick über die acht untersuchten Proben, sowie die Peptid- und Proteinausbeuten, die erzielt werden konnten. Die Probenmasse der drei Tumore betrug ca. 100 mg pro Tumor. Die verschiedenen LN229-Proben besaßen Volumina von mindestens 1 ml.

Tabelle 25: Übersicht über die Peptidausbeuten der IDH-Ligandenextraktionen. Bei den ersten drei Proben handelt es sich um die Tumorproben mit je ca. 100 mg Gewebemasse. Die restlichen Proben sind Zellpellets der Zelllinie LN229 transfiziert mit verschiedenen Varianten des IDH1-Gens.

Probe	#Peptide Klasse I	#Proteine Klasse I	#Peptide Klasse II	#Proteine Klasse II
43284	12	13	33	10
40290	23	20	33	10
432246	-	-	-	-
IDH1R132H	738	730	785	396
IDH1R132H IVC1	770	690	256	228
IDH1R132H VIID3	796	774	887	380
IDH1R132H WT	317	388	753	377
IDH1R132H*	1080	1095	962	400

Durch die automatisierte Annotation der aufgenommenen Spektren mit Mascot konnten zwei Peptide aus IDH1 identifiziert werden. Das Peptid VMPNLYGNIIDNL auf HLA-Klasse II auf der Probe IDH1R132H WT sowie das Peptid ITYTPSDGTQK auf HLA-Klasse I der Probe IDH1R132H VII3. Bei beiden Peptiden handelt es sich jedoch um unmutierte wildtypische Sequenzen. Ein mutiertes Peptid konnte mit Mascot nicht annotiert werden. Da in anderen Experimenten CD4 Immunantworten auf mutierte IDH1 Peptide in Patienten gefunden worden waren, wurde gezielt nach mutierten Klasse II-Liganden gesucht.

3. Ergebnisse

3.2.2 Gezielte Suche nach IDH1-R132H Peptiden auf HLA-Klasse II

Mit gezielten SIM-Experimenten wurden 16 HLA-Klasse II Peptide gesucht. HLA-Klasse II-Moleküle präsentieren bevorzugt Peptide einer Länge von 15 Aminosäuren. Deswegen wurden alle 15 möglichen 15-mere, die die IDH1-Mutation enthalten können, als Zielstrukturen ausgewählt. Zudem wurde ein 25-mer, das die Mutation in der Mitte trägt gesucht. Tabelle 27 zeigt die 16 synthetischen Peptide, die für die Erstellung der SIM-Methoden benutzt wurden. In Klammern ist die Isotopenmarkierung vermerkt.

Tabelle 26: Synthetische Peptide für die SIM-Experimente

#	Peptid Name	Sequenz	MW [g/Mol]
1	IDH1R132H p118-132	PRLVSGWVKPII[I(¹³ C6; ¹⁵ N)]GH	1679,07
2	IDH1R132H p119-133	RLVSGWVKPII[I(¹³ C6; ¹⁵ N)]GHH	1719,09
3	IDH1R132H p120-134	LVSGWVKPII[I(¹³ C6; ¹⁵ N)]GHHA	1633,98
4	IDH1R132H p121-135	VSGWVKPII[I(¹³ C6; ¹⁵ N)]GHHAY	1684,00
5	IDH1R132H p122-136	SGWVKPII[I(¹³ C6; ¹⁵ N)]GHHAYG	1641,92
6	IDH1R132H p123-137	GWVKPII[I(¹³ C6; ¹⁵ N)]GHHAYGD	1669,93
7	IDH1R132H p124-138	WVKPII[I(¹³ C6; ¹⁵ N)]GHHAYGDQ	1741,01
8	IDH1R132H p125-139	VKPII[I(¹³ C6; ¹⁵ N)]GHHAYGDQY	1717,97
9	IDH1R132H p126-140	KPIIIGHHAYGDQY[R(¹³ C6; ¹⁵ N4)]	1778,74
10	IDH1R132H p127-141	PII[I(¹³ C6; ¹⁵ N)]GHHAYGDQYRA	1717,93
11	IDH1R132H p128-142	II[I(¹³ C6; ¹⁵ N)]GHHAYGDQYRAT	1721,92
12	IDH1R132H p129-143	I[I(¹³ C6; ¹⁵ N)]GHHAYGDQYRATD	1723,85
13	IDH1R132H p131-144	[I(¹³ C6; ¹⁵ N)]GHHAYGDQYRATDF	1757,87
14	IDH1R132H p131-145	GHHAYGDQYRATDF[V(¹³ C5; ¹⁵ N)]	1742,85
15	IDH1R132H p132-146	HHAYGDQYRATDFV[V(¹³ C5; ¹⁵ N)]	1784,93
16	IDH1R132H p123-142	GWVKPII[I(¹³ C6; ¹⁵ N)]GHHAYGDQYRAT	2289,62

3. Ergebnisse

Nachdem die synthetischen Peptide zusammen mit dem Ligandenextrakt aus JY-Zellen gemessen wurden (Abbildung 28) ergab sich, der in Tabelle 28 dargestellte Messplan für die SIM-Experimente. Die 16 Peptide wurden auf Grund ihrer Retentionszeiten auf vier SIM-Messläufe aufgeteilt. Nach der Erstellung der SIM-Messmethoden wurden deren Funktionalität an dem mit den synthetischen Peptiden gespickten JY-Ligandenextrakt getestet. Abbildung 29 zeigt die TICs dieser Messungen. Nachdem alle synthetischen Peptide auch in den SIM-Messungen identifiziert wurden, wurden in der Methode die natürlichen Massen eingetragen und mit der Messung der LN-229 Probe begonnen. Abbildung 30 zeigt exemplarisch die manuelle Überprüfung der SIM-Methoden am Beispiel von Peptid 4 im ersten SIM-Lauf.

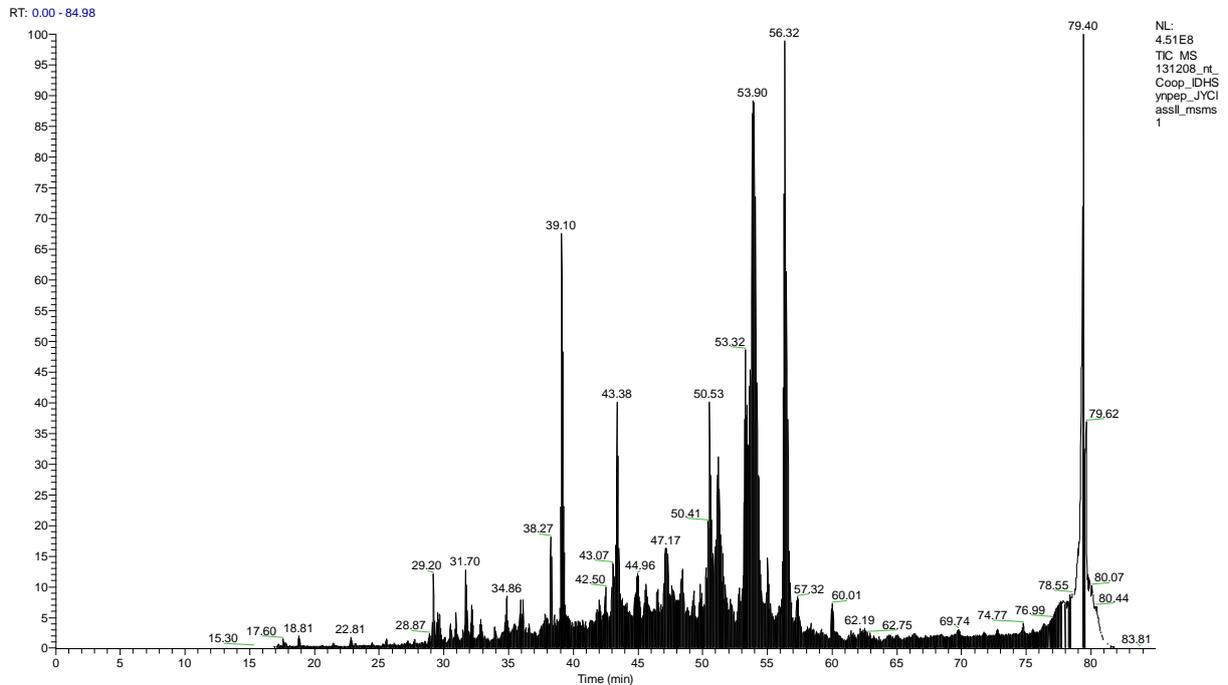


Abbildung 28: TIC der Messung der 16 synthetischen IDH1-Peptide in einer Matrix aus JY-Ligandenextrakt

3. Ergebnisse

Tabelle 27: Messplan für die SIM-Experimente. Es ist jeweils die Masse des dreifach positiv geladenen Ions vermerkt.

# SIM-Run	Peptid #	Masse (Th)	Retentionszeit
1	12	575,28082	34-36
	9	593,31696	36-54
	5	547,97064	54-57
	4	561,98669	57-59
	3	545,32678	59-64
	1	560,34607	64-67
2	13	586,60901	41-46
	14	581,60199	46-51
	15	595,61774	51-55
	6	557,30322	55-57
3	11	574,63342	41-44
	8	573,30139	44-52
	16	764,07202	52-56
4	7	581,60309	45-52
	10	573,30603	52-54
	2	573,68146	54-56

3. Ergebnisse

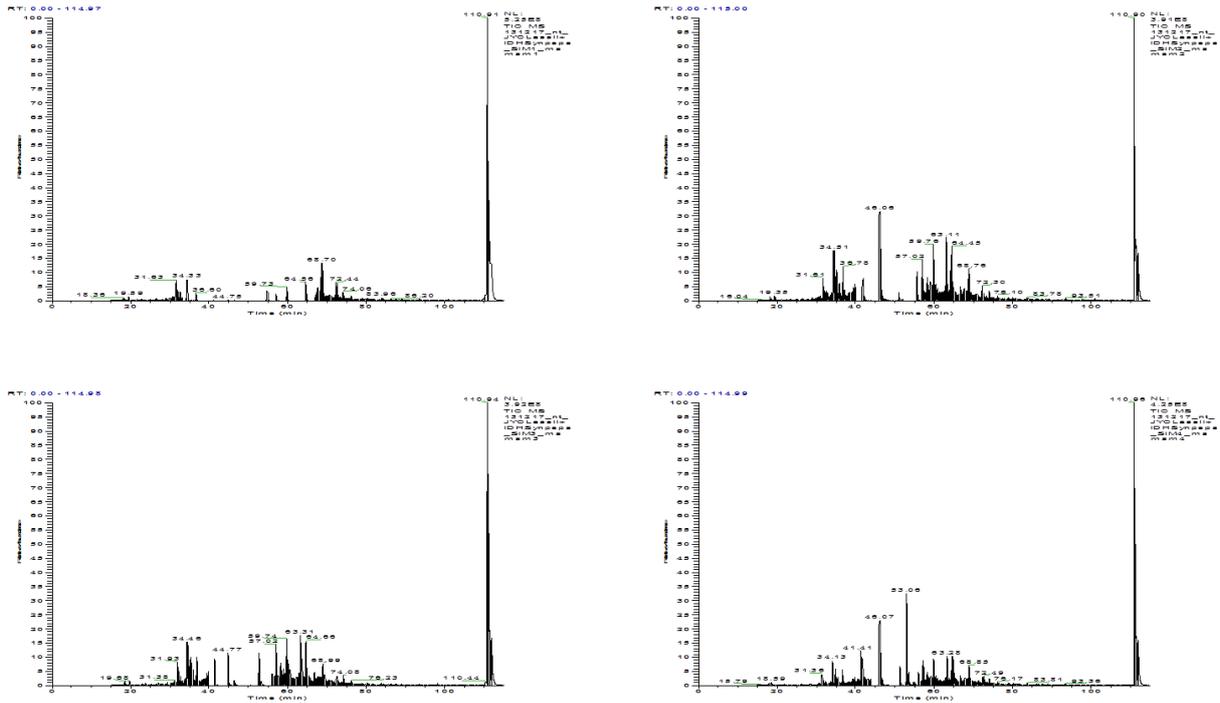


Abbildung 29: TICs der 4 SIM-Messungen zur Überprüfung der Funktionalität der individuellen Messmethoden. 1. SIM-Messlauf oben links; 2. SIM-Messlauf oben rechts; 3. SIM-Messlauf unten links; 4. SIM-Messlauf unten rechts.

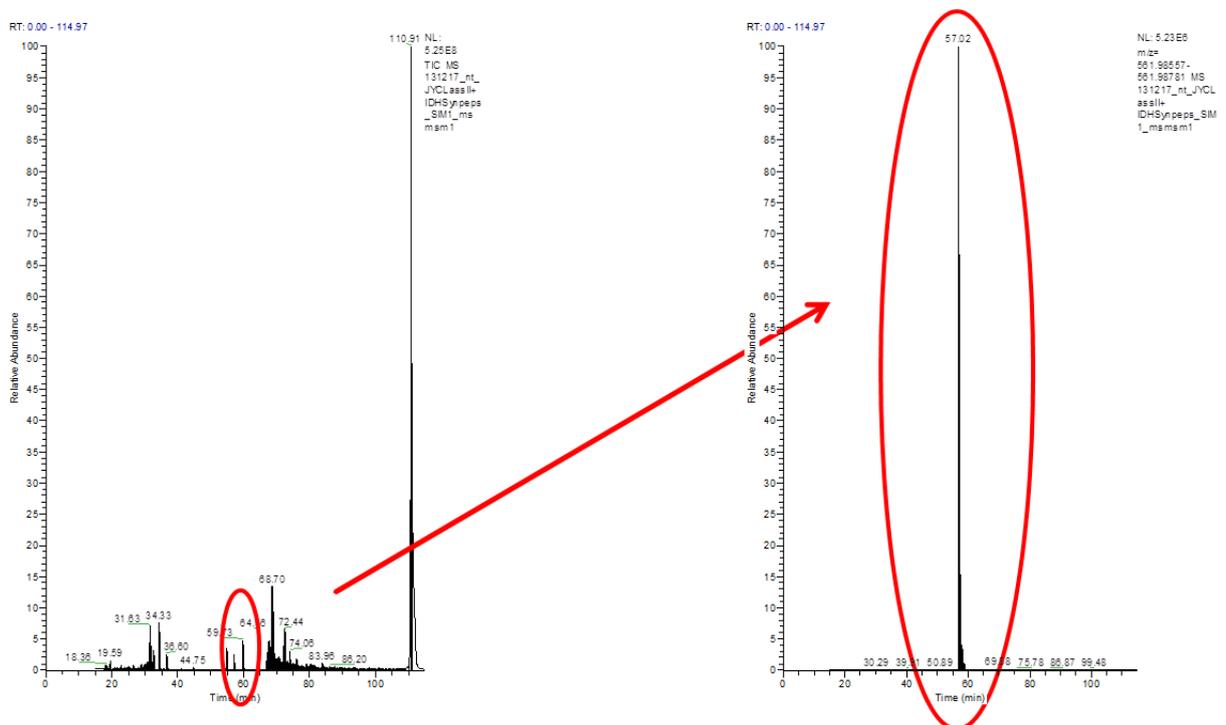


Abbildung 30: Das TIC des ersten SIM-Synpep-Testmesslaufes mit den ersten sechs synthetischen Peptiden in JY-HLA-Liganden-Marix ist links abgebildet. Rechts ist das XIC der Masse des synthetischen Peptids 4 abgebildet. Der Peak ist zur erwarteten Retentionszeit zwischen 57 Minuten und 59 Minuten zu beobachten.

3. Ergebnisse

Die SIM-Messungen der LN229IDH1R132H-Probe wurden an der in Tabelle 26 mit * markierten Probe durchgeführt. Ein erstes Replikat dieser Probe wurde mit der Standardmessmethode gemessen, um zu überprüfen, ob die Ligandenextraktion erfolgreich war und genug Probe für vier SIM-Replikate zur Verfügung stehen würde. Abbildung 31 zeigt das TIC dieses ersten Messlaufes.

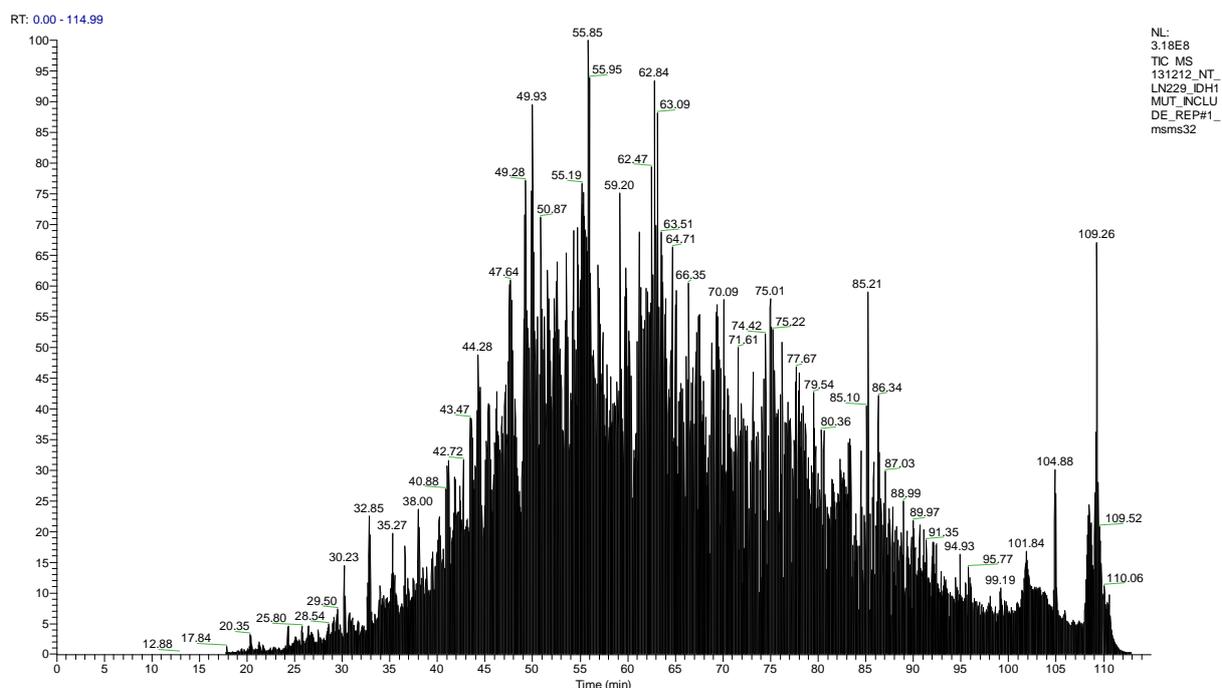


Abbildung 31: TIC des ersten Replikats der Messung des Ligandenextrakts des transfizierten LN229 Zellpelles. Es wurden die HLA-Klasse II-Liganden der Zellen gemessen.

Diese erste Messung der Probe lieferte mit knapp 1000 Liganden eine solide Grundlage für die weiteren Experimente. Abbildung 32 zeigt die TICs der vier Messungen. Es ist zu sehen, wie durch die Einschränkung auf ein 2 Th breites Massenfenster die Intensität in den SIM-Bereichen nahezu verschwindet. Oben links in Abbildung 32 ist jedoch ein Intensitätspeak bei Minute 43 zu erkennen. In diesem Bereich wurde nach Peptid #9 gesucht. Das XIC für die Masse von Peptid #9 ist in Abbildung 33 gezeigt. Nach Vergleich der Fragmentspektren (Abbildung 34) konnte jedoch ausgeschlossen werden, dass es sich hierbei um Peptid #9 handelt. Zusätzlich lieferte die automatisierte Annotation für dieses Spektrum die Sequenz VTIADA und passierte damit auch die Standardfilterkriterien. Abbildung 35 zeigt das mit Mascot annotierte Fragmentspektrum. Obwohl die Experimente technisch ausgezeichnet verliefen konnte sowohl nach manueller Suche der 16 SIM-Peptide in den SIM-Messläufen, als auch nach der automatisierten Suche mit Mascot gegen eine

3. Ergebnisse

Datenbank, die die IDH1-R132H-Mutation enthält, kein mutierter IDH1-R132H-Ligand identifiziert werden.

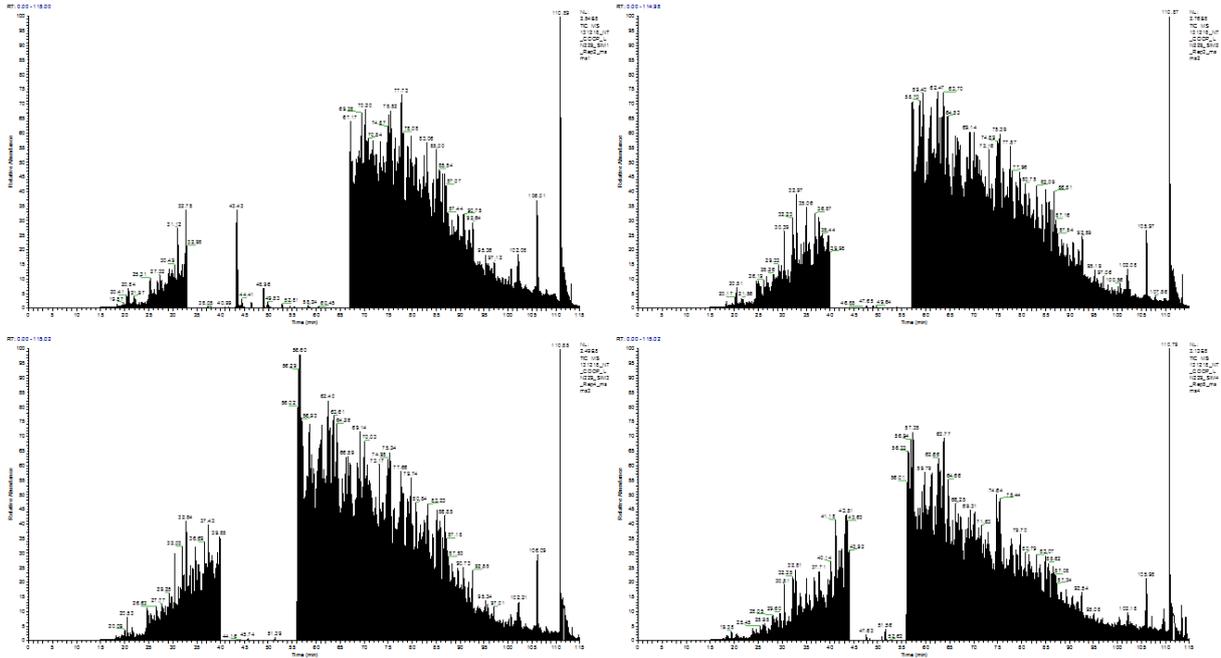


Abbildung 32: TICs der 4 SIM-Tumor-Messläufe. 1. SIM-Messlauf oben links; 2. SIM-Messlauf oben rechts; 3. SIM-Messlauf unten links; 4. SIM-Messlauf unten rechts. Nur im ersten SIM-Messlauf ist ein starker Intensitätspeak innerhalb des eingeschränkten Massenfensters zu beobachten.

3. Ergebnisse

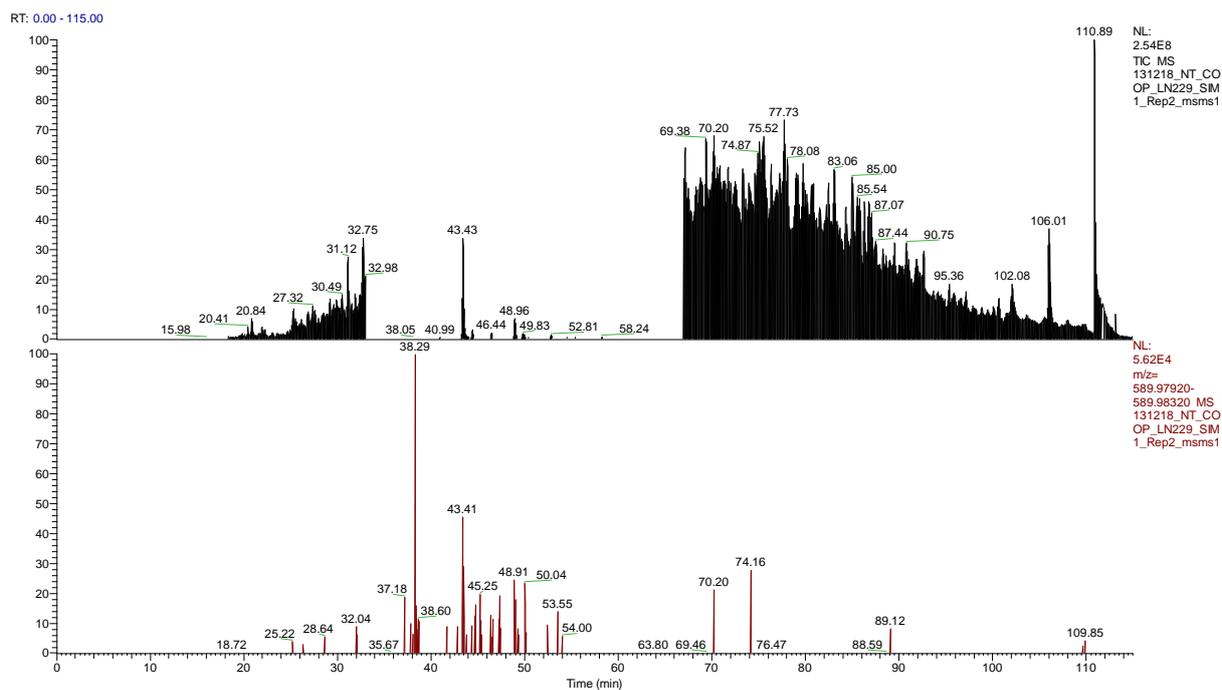


Abbildung 33: Oben: Dargestellt ist das vergrößerte TIC des ersten SIM-Messlaufes des HLA-Klasse II-Liganden-Extrakt der transfizierten Zelllinie LN229. Unten XIC der Masse von Peptid 9, welches zu dieser Retentionszeit eluieren sollte.

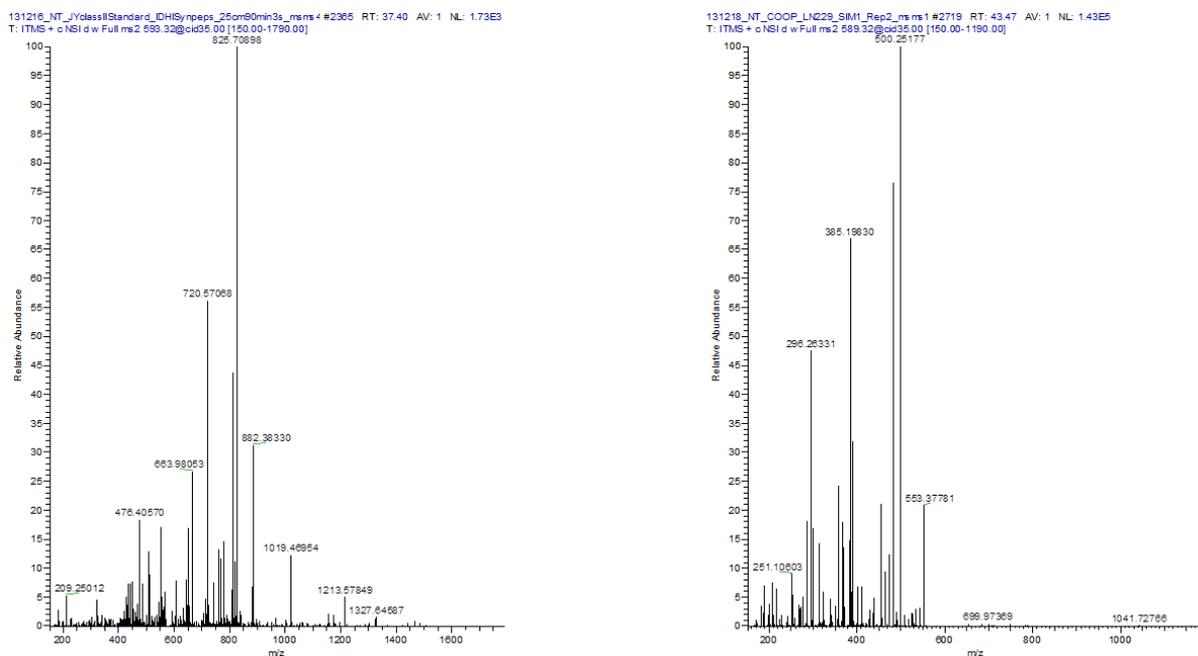


Abbildung 34: Vergleich der Spektren von Peptid 9: Links: das Spektrum des synthetischen Peptids. Rechts: Das Spektrum des Peptids aus dem SIM-Messlauf der LN229 Zellen. Keiner der Peaks mit hoher Intensität stimmt zwischen den beiden Spektren überein (die schwere Masse des isotonenmarkierten synthetischen Peptids wurde berücksichtigt). Somit handelt es sich um zwei unterschiedliche Peptide.

3. Ergebnisse

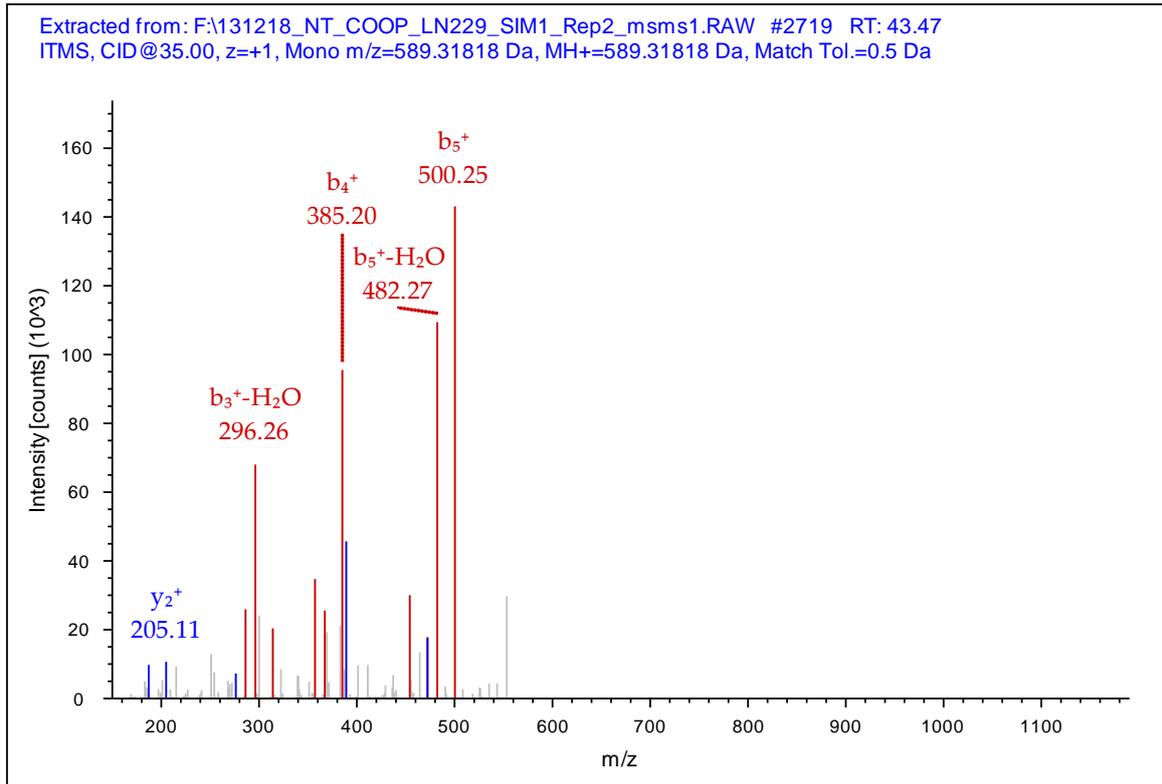


Abbildung 35: Mascot-Annotation des Kandidatenspektrums für Peptid 9 aus SIM-Messlauf der LN229-Zellen. Die automatische Annotation durch Mascot ordnet dem aufgenommen Spektrum die Sequenz VTIADA zu. Diese Sequenz stammt aus einem ribosomalen Protein.

3.3 Individuelle Heilversuche

Im Rahmen dieser Arbeit wurden auch HLA-Impfcocktails konkret für die Therapie von Patienten vorgeschlagen und zum Teil auch eingesetzt. Insgesamt wurde für vier unterschiedliche Patienten an solchen Impfcocktails gearbeitet. Dies geschah auf unterschiedliche Weise. Für die Patienten CCC09, einen B-ALL-Patienten und eine Patientin mit Ovarialkarzinom wurden Cocktails aus TUMAPs zusammengestellt. Für HCC021 wurden sowohl TUMAPs als auch TSAs vorgeschlagen. In allen Fällen stand Tumorgewebe zur Analyse zur Verfügung. Daher konnten Peptide für eine Impfung vorgeschlagen werden, welche tatsächlich auch als HLA-Liganden auf den entsprechenden Tumoren identifiziert wurden. Dies ist der nächst höhere Grad an Personalisierung nach einer Impfung mit Standardcocktails, welche z.B. nur auf Grund der HLA-Typisierung für die Patienten ausgewählt werden und bei denen nicht garantiert werden kann, dass die geimpften Peptide tatsächlich auf den Tumoren der jeweiligen Patienten präsentiert werden.

Ein großer Nachteil dieser individuellen, maßgeschneiderten Impfcocktails ist der Zeitraum der vergeht, bis ein Patient geimpft werden kann, insbesondere wenn TSAs verwendet werden sollen. In diesem Fall kommt zu der Analyse der HLA-Liganden, welche im Idealfall in unter zwei Wochen erfolgen kann und der Synthese der Peptide zusätzlich die Zeit für die Sequenzierung des Exoms und des Transkriptoms des Patienten, sowie deren Auswertung. Dies geschieht alles erst nach der chirurgischen Entfernung des Tumors der Patienten, da erst ab diesem Zeitpunkt entsprechendes Tumorgewebe zur Analyse zur Verfügung steht.

Da es sich bei individuellen Heilversuchen wie diesen um experimentelle Behandlungen handelt, können diese auch nur mit explizierter Zustimmung der Patienten nach ausführlicher Aufklärung und nur dann wenn alle anderen zugelassenen Behandlungsmethoden ausgeschöpft sind angewendet werden. Unter diesen engen rechtlichen und ethischen Rahmenbedingungen steht es daher in der Regel denkbar schlecht um die Patienten. Oft sind bereits Metastasen diagnostiziert, die im schlimmsten Fall nicht operabel sind. Oder die Leber befindet sich im Falle von HCC-Patienten in einem sehr schlechten Zustand. Die Prognose für solche Patienten ist folglich sehr schlecht und die erwartete Überlebenszeit ist selten länger als ein halbes Jahr. Da eine HLA-Peptid-Impfung auch in der Regel erst nach fünf bis zehn Wochen messbare Immunantworten in den Patienten hervorruft ist Zeit für eine solche Therapie ein entscheidender Faktor und in den meisten Fällen sehr begrenzt.

Ein weiterer Nachteil ist, dass oft Peptide speziell für einen Patienten verwendet werden, was bedeutet, dass keine Immunogenitätstests vor der Impfung durchgeführt werden können. Man kann

3. Ergebnisse

entsprechend häufig nur hoffen, dass diese Peptide auch eine Immunantwort im Patienten hervorrufen können. Eine Lösung für dieses Problem ist die Verwendung von bekannten und bereits positiv getesteten Peptiden, die im Idealfall sogar bereits synthetisiert vorliegen. Findet man diese Peptide nun zusätzlich auf den HLA-Molekülen des Patienten stellen sie neben identifizierten TSAs die erste Wahl für eine Impfung dar. Über die Zeit könnte so eine große Bibliothek solcher Peptide angelegt werden, aus der bei Bedarf spezielle individualisierte Impfcocktails zusammengestellt werden könnten. Eine solche Impfung könnte auch den Patienten etwas Zeit verschaffen und die Zeit bis zu einer Impfung mit TSAs überbrücken. Der logistische Aufwand ist jedoch beträchtlich.

3. Ergebnisse

3.3.1 Patient CCC009

Der Patient CCC009 wurde im Juni 2010 erstmals mit einem CCC diagnostiziert und wurde daraufhin direkt operiert. Nachdem im März 2011 und im April 2012 der Tumor erneut in der Leber nachgewiesen werden konnte, entschied sich der Patient für einen individuellen Heilversuch mit einem HLA-Peptidvakzin zur Verfügung zu stehen.

CCC009 war einer der ersten Patienten, für die ein umfassender Datensatz zur Verfügung stand. Neben HLA-Ligandom und Exom von Tumor, einer Lungenmetastase bzw. Normalgewebe wurde auch das Transcriptom des Primärtumors und der Metastase analysiert. Die Suche nach mutierten Peptidsequenzen lieferte zwei Kandidaten, welche jedoch beide nach Abgleich derer Fragmentspektren mit denen der entsprechenden synthetischen Peptide verworfen werden mussten. Abbildung 36 zeigt den Vergleich der beiden Spektren.

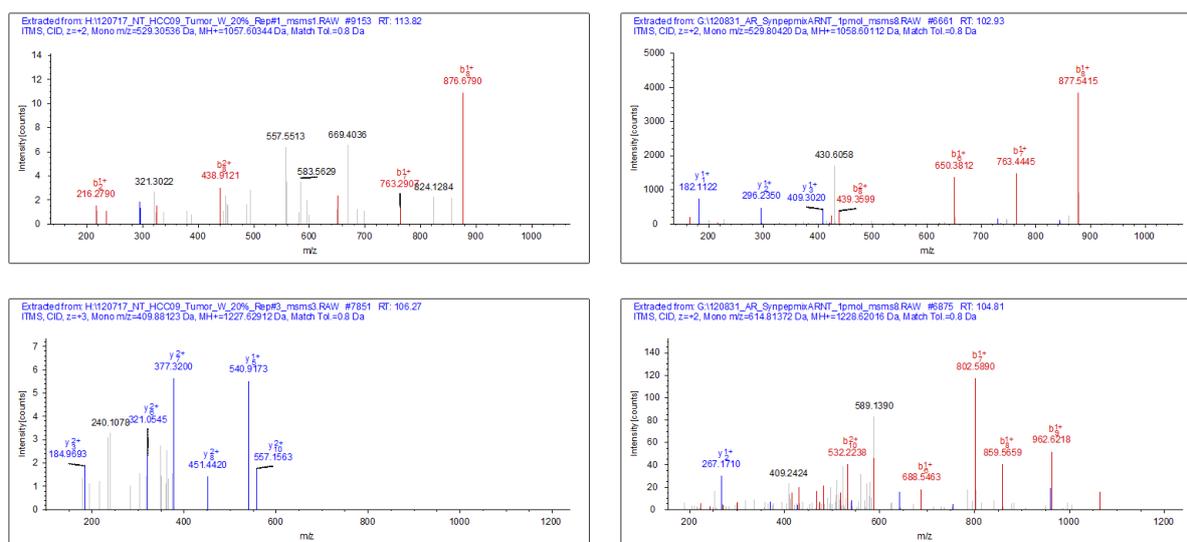


Abbildung 36: Spektrenvergleich von Kandidaten-TSAs aus CCC009. Links jeweils die Spektren aus dem Tumorlauf, rechts die Spektren der korrespondierenden synthetischen Peptide. Der Vergleich der Spektren zeigt keine Übereinstimmung der Fragmentmassen. Bei den Peptiden aus den Tumorproben handelt es sich also nicht um die gesuchten TSAs.

Da keine TSAs identifiziert werden konnten, wurde entschieden dem Patienten bereits bekannte HLA-A*03 Impfpeptide mit ebenfalls vorbekannter Immunogenität zu impfen. Vorher wurde jedoch überprüft, ob diese Peptide auch auf der Oberfläche der Krebszellen dieses Patienten auf HLA präsentiert werden. Des Weiteren wurde überprüft, ob die den Peptiden zugrundeliegenden Gene

3. Ergebnisse

transkribiert werden. Außerdem wurden drei immunogene HLA-Klasse II Peptide dem Cocktail hinzugefügt. Tabelle 29 zeigt die Zusammenstellung des Impfcocktails für den Patienten CCC009.

Tabelle 28: Impfpeptidcocktail für die Behandlung von CCC009. Bei den ersten vier Peptiden handelt es sich um HLA-Klasse I-Liganden. Bei den letzten drei Peptiden um HLA-Klasse II-Peptide. Die ersten drei Peptide konnten sowohl auf dem Primärtumor als auch auf der analysierten Metastase nachgewiesen werden.

Sequenz	Protein	MS (T/M)	RNA Tumor	RNA Metastase
GLASFKSFLK	RGS-1	T/M	32	81
SLLTSSKGQLQK	ADFP-2	T/M	525	53
TSALPIIQK	ADFP-3	T/M	252	53
SLFPNSPKWTSK	MMP7	-	141	1113
NPPSMVAAGSVVAAV	CCND1	-	70	30
HSKIIIIKKGHAKDSQ	IBP3	-	1	0
SQDDIKGIQKLYGKRS	MMP7	-	141	1113

Der Patient wurde mit diesen sieben Peptiden das erste Mal im September 2012 geimpft. Es wurden 300 µg je Peptid in Montanide s.c. gespritzt, die Einstichstelle wurde vor und nach der Impfung mit Aldara Creme behandelt. Anfänglich wurde wöchentlich zwei Monate lang geimpft, im Anschluss jede zweite Woche. Ab Januar 2013 wurden die Impfungen dann monatlich durchgeführt. Im März 2013 musste der Patient erneut operiert werden. Es traten Metastasen in der Lunge auf. Die Impfungen wurden trotzdem fortgesetzt. Ab diesem Zeitpunkt traten bis zum Juni 2016 keine neuen Metastasen auf, obwohl ab Juli 2014 nur noch alle drei Monate geimpft wurde. Die im Juni 2016 entdeckte Metastase tauchte an einer Stelle auf, an der 2012 noch mikroskopisch Tumor vorhanden war.

Um das Ansprechen des Patienten auf die Impfung zu kontrollieren wurde Immunmonitoring durchgeführt. Bei jeder Impfung wurde gleichzeitig Blut entnommen, welches für Elispot, *intracellular cytokine staining* (ICS) und *multimer stainings* verwendet wurde. Es konnten gegen insgesamt sechs der sieben Peptide Immunantworten nachgewiesen werden. Lediglich das Peptid SQDDIKGIQKLYGKRS aus MMP-7 konnte nicht positiv getestet werden. Die Immunmonitoringversuche wurden von Karolin Laske und Anoop Chandran aus der Arbeitsgruppe von Cécile Gouttefangeas durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.3.2 Patient HCC021

Das Ziel für HCC021 war einen individuellen Impfcocktail vorzuschlagen, der sowohl TUMAPs als auch TSAs beinhaltet. Nachdem die Exom- und Transcriptom-Daten vorlagen wurde eine individuelle Proteindatenbank, welche die tumorspezifischen Mutationen dieses Patienten enthält, erstellt. Die Mascot-Suche der aufgenommenen MS-Messläufe gegen diese Datenbank lieferte einen möglichen Treffer, das Peptid IATLSSCHRIW. Nachdem zur Überprüfung das entsprechende synthetische Peptid hergestellt und gemessen wurde, konnte die Identität des Peptids allerdings nicht bestätigt werden. Abbildung 37 zeigt den Vergleich der zwei Spektren.

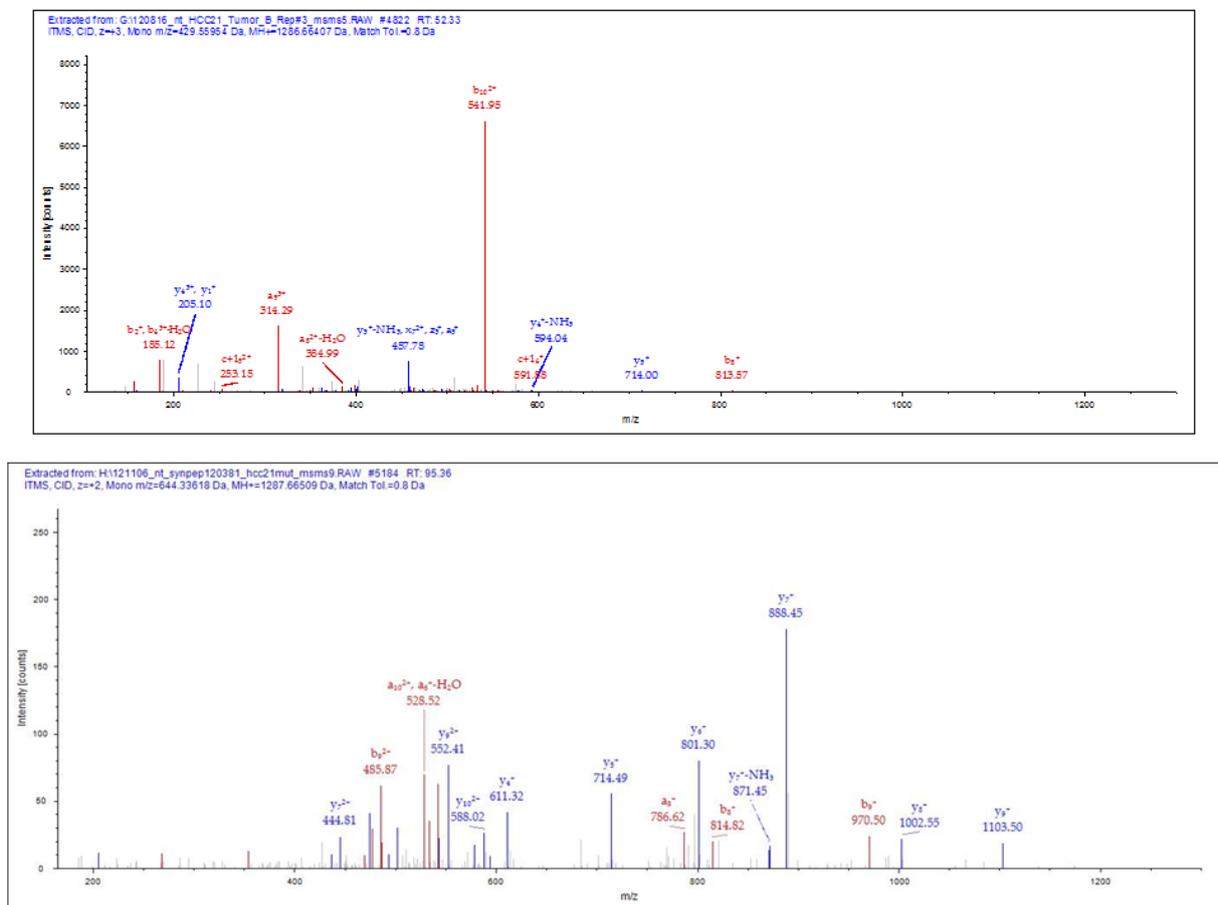


Abbildung 37: Spektrenvergleich von dem möglichen TSA aus einem Tumor-Messlauf von HCC021 (oben) und dem synthetischem Peptid IATLSSCHRIW (unten). Durch den Vergleich der Spektren erkennt man, dass die Fragmentmassen nicht übereinstimmen.

3. Ergebnisse

Da sich kein Hinweis auf die Präsentation eines mutierten Peptids auf den HLA-Molekülen des Tumors fand, wurden für jede tumorspezifische Mutation Peptide vorhergesagt. Hierzu wurden alle möglichen 9-mere, die die jeweilige Mutation enthalten auf ein HLA-Peptidmotiv überprüft. Dazu wurde das Programm SYFPEITHI verwendet. Nach diesem Abgleich wurden sechs Peptide ausgewählt (Tabelle 30), die für eine Impfung des Patienten HCC021 in Frage kommen. Diese enthalten alle eine tumorspezifische Mutation und besitzen ein Peptidmotiv, welches zu den HLA-Allelen des Patienten passt.

Tabelle 29: Vorhergesagte Neoantigene für eine individuelle Multi-Peptidvakzine für Patient HCC21.

Sequenz	Gen	Gen Name	HLA-Allel	SYFPEITHI Score	Mutation
QRGKFFGEK	UBE3B	Ubiquitin-protein ligase E3B	B*27	23	indel
YYKEPLGNI	LIPH	Lipase member H	A*24	21	indel
HSDTDALGY	LIPH	Lipase member H	A*01	32	indel
FRSTTEALK	PARP3	Poly [ADP-ribose] polymerase 3	B*27	21	A33T
LRNWLAATK	JUNB	Transcription Factor jun-B	B*27	24	R279W
RRNFDNSSK	ZP4	Zona pellucida sperm-binding protein	B*27	27	Q473K

Für die Auswahl der TUMAPs wurden nur Peptide in Betracht gezogen, welche auf dem Tumor von Patient HCC021, jedoch niemals auf Normalgewebe identifiziert werden konnten. Außerdem wurde auf eine erhöhte Transkription im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe geachtet. Für die endgültige Auswahl spielten das Vorhandensein eines HLA-Peptidmotivs, sowie eine Überprüfung des Expressionsmusters der entsprechenden Proteine auf anderen Geweben im menschlichen Körper eine Rolle. Die Expression auf den entsprechenden Organen wurde mit *GEO Profiles*, einer Expressionsdatenbank des NCBI überprüft. Tabelle 31 zeigt die 14 TUMAPs, die für eine Impfung am geeignetsten erscheinen. Für den Impfcocktail wurden die beiden mit * markierten Peptide vorgeschlagen.

Obwohl bei diesem Patienten erneut kein TSA mit Hilfe der Massenspektrometrie identifiziert wurde, wurde die grundsätzliche Funktionalität unserer Herangehensweise gezeigt. Es konnte nämlich die Präsentation eines patientenindividuellen Peptids nachgewiesen werden. Es handelte sich dabei um einen heterozygoten *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP), der ohne die Erstellung einer

3. Ergebnisse

personalisierten Datenbank nicht hätte identifiziert werden können. Leider wurde der Basenaustausch, welcher zu dem veränderten Peptid führt nicht nur auf dem Tumor, sondern auch im gesunden Gewebe des Patienten identifiziert. Damit handelt es sich nicht um eine geeignete Zielstruktur für eine Immuntherapie, da dieses Antigen nicht tumorspezifisch ist. Abbildung 38 zeigt die Spektren der Peptide, die jeweils ein Allel des von dem SNP betroffenen Gens abdecken. HCC021 galt als sehr vielversprechend für die Identifikation eines TSAs, da bei diesem Tumor bis zu diesem Zeitpunkt die höchste Peptidausbeute erreicht worden konnte und das trotz eines relativ geringen Gewichts der Tumorprobe. Dies deutet auf eine hohe HLA-Expression des Tumors hin.

3. Ergebnisse

Tabelle 30: Geeignete TUMAP-Impfpeptid-Kandidaten für Patient HCC021

Sequenz	Gen	Gen Name	HLA Allel	# PSM	Überexpression	Expression (GEO)
HVFISTPSF*	LCAT	Phosphatidylcholine-sterol acyltransferase	B*58	5	-700	geeignet
MRQKAVSLF*	IFI6	Interferon alpha-inducible protein 6	B*27	4	30	geeignet
KAVLLALLM	PSCA	Prostate stem cell antigen	B*58	2	6000	Luftröhre
TYTQDFNKF	CALCA	Calcitonin	A*24	73	8000	Schilddrüse
KYGDILHVI	DLG2	Disks large homolog 2	A*24	4	15	Schilddrüse, (Retina)
IRTNEKEQL	INA	Integrin alpha ina-1	B*27	2	-10	(Retina)
ISLAKDSSL	ODZ1	Teneurin-1	B*58	1	-400	(Thymus)
AVLSKEYGF	MGST3	Microsomal glutathione S-transferase 3	B*58	37	3	Alle Gewebe
KAVLLALL	PSCA	Prostate stem cell antigen	B*58	43	6000	Luftröhre
IGVPTKVFNL	PFKFB2	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 2	B*58	59	13	Alle Gewebe
VAEILPKY	NDUFS3	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mitochondrial	A*01	33	5	Alle Gewebe
MRKAGIFQSVK	SLC25A5	ADP/ATP translocase 2	B*27	49	3	Alle Gewebe
ATVPPAIRSY	SDHA	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	B*58	103	2	Alle Gewebe
YRQQAAYY	ABHD11	Abhydrolase domain-containing protein 11	B*27	32	7	Alle Gewebe

3. Ergebnisse

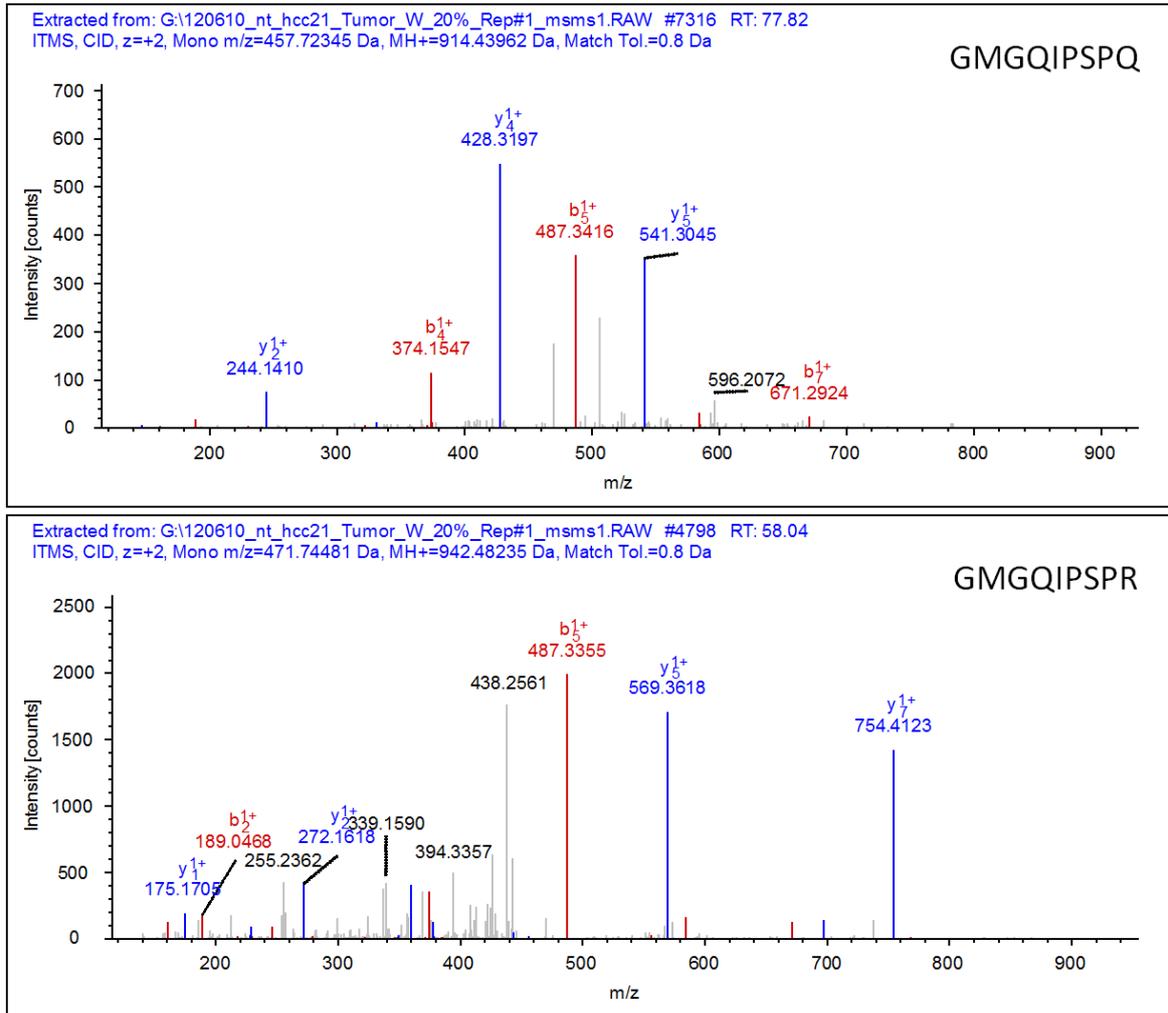


Abbildung 38: Durch Mascot annotierte Spektren eines heterozygoten SNPs präsentiert auf HLA. Jedes Spektrum zeigt die Fragmentmassen eines Peptids. Durch den SNP verändert sich die letzte Aminosäure des Peptids.

3. Ergebnisse

3.3.3 Patientin mit Ovarialcarcinom

Es wurde zusätzlich zu den Leberkrebspatienten auch an individuellen Vakzin-Cocktails für Patienten mit anderen Tumorerkrankungen gearbeitet. Für die Behandlung einer Patientin mit Ovarialcarcinom (OvCa) wurden ebenfalls Peptide für eine mögliche Impfung vorgeschlagen. Die Behandlung der Patientin fand allerdings nicht in Tübingen, sondern in Würzburg statt. Von einem Kooperationspartner wurde ca. 1 g Tumorgewebe zur Verfügung gestellt, aus welchem dann 1212 HLA-Liganden isoliert und identifiziert werden konnten. Diese Peptide bzw. ihre Quellproteine wurden dann wie bereits beschrieben mit allen bisher identifizierten Normalgewebspeptiden verglichen. Die Kollegen Janet Peper und Heiko Schuster arbeiten bereits lange Zeit in unserer Abteilung an möglichen Impfpeptiden für Ovarialcarcinom und haben eine große Menge an Daten gesammelt. Diese Daten und die Erfahrungen aus ihren zahlreichen Experimenten flossen zusätzlich in die PeptidAuswahl ein. Tabelle 32 zeigt die für eine mögliche Impfung vorgeschlagenen Impfpeptide.

3. Ergebnisse

Tabelle 31: Impfpeptidvorschläge für die Behandlung der OvCa-Patientin. Es wurde überprüft auf welchen anderen Geweben die jeweiligen HLA-Liganden noch präsentiert werden.

Protein	Peptid	PSM	HLA-Präsentation
Stathmin	SVPEFPLSPPK	88	stark auf Normalgewebe präsentiert
Mucin-16	SPRLNTQGNTAL	12	stark überrepräsentiert auf Ovarialkarzinomen
	SPSKAFASL	33	
	STSQEIHSATK	3	
	TPGGTRQSL	21	
	TPGNRAISL	24	
	STETSTVLY	17	
	SPQNLRNLT	5	
Prohibitin	ATAGDGLIELRK	46	auf PBMCs präsentiert
Perilipin-2	TSALPIIQK	73	auf PBMCs präsentiert
	IARNLTQQL	5	
PRAME	LSDIDSRVI	1	Überrepräsentiert auf Tumoren
Indoleamine 2,3-dioxygenase 1	RSYHLQIVTK	12	Überrepräsentiert auf Tumoren
Sperm-associated antigen 4 protein	ARPPTVIL	1	
Testis-specific Y-encoded-like protein 1	VVMAADRSLKK	2	auf PBMCs präsentiert, auf RCC Tumorassoziiert
Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial	KDGKSLTK	1	Überrepräsentiert auf Tumoren
Keratin, type II cytoskeletal 8	NMDNMFESY	21	Überrepräsentiert auf Tumoren

3. Ergebnisse

3.3.4 Patient mit B-ALL

Eines der Hauptziele dieser Arbeit war die Identifikation eines auf HLA präsentierten mutierten Neoantigens. Bis jetzt war vor allem von TSAs die Rede, welche aufgrund von tumorspezifischen Mutationen entstehen. Jedoch bestand noch eine weitere Möglichkeit für die Identifikation eines TSA. B-Zellen besitzen einen einzigartigen B-Zell-Rezeptor welcher durch somatische Rekombination entsteht. Entwickelt sich nun aus einer B-Zelle eine Leukämie trägt jede Leukämiezelle immer noch diesen spezifischen B-Zell-Rezeptor, der im Idealfall in seiner Aminosäuresequenz einzigartig ist (Ideotop). Sollten Peptide aus diesen Abschnitten auf den HLA-Molekülen der Leukämiezellen präsentiert werden, würden sie ebenfalls eine ideale Zielstruktur für den Einsatz einer personalisierten anti-idiotypischen Immuntherapie bieten.

Die Abteilung für Kinder- und Jugendmedizin der Universitätsklinik Tübingen stellte uns zwei Pellets leukämischer Zellen von je ca. 0,5 ml zur Verfügung. Daraus konnten insgesamt 824 HLA-Liganden isoliert und massenspektrometrisch identifiziert werden. Die Sequenzierung der variablen-Region des B-Zell-Rezeptors der Leukämiezellen ergab, nach Übersetzung in Aminosäuren, die spezifische Sequenz CAAWDYTNYYKKLF. Diese Sequenz wurde in eine personalisierte Datenbank für die MASCOT-Suche eingebaut und mit den aufgenommenen MS-Spektren verglichen. Die Datenbank enthielt außerdem die in einer Exom-Sequenzierung identifizierten tumorspezifischen Mutationen. In diesem Fall lieferte die Suche keine mögliche Identifikation eines TSAs.

Wie bei den vorhergehenden Patienten konnten durch den Vergleich der auf der Leukämie dieses Patienten präsentierten HLA-Liganden und den Liganden von bisher analysierten gesunden Geweben TUMAPs für eine mögliche Impfung vorgeschlagen werden. Tabelle 33 listet die möglichen Impfkandidaten auf.

3. Ergebnisse

Tabelle 32: Impfpeptidvorschläge für die Behandlung des B-ALL Patienten.

Protein	Protein Name	Protein Name	Peptide	PSM	HLA-Allel
P04053	DNTT	DNA nucleotidylexotransferase	LPSRKVDAL	4	B*08
P78396	CCNA1	Cyclin-A1	DPPQRTVL	12	B*08
Q16637	SMN1	Survival motor neuron protein	VASFKHAL	5	B*08
B4DS77	SHISA9	Protein shisa-9	KTNLIVYII	2	-
O00481	BTN3A1	Butyrophilin subfamily 3 member A1	ILRDGITAGK	1	A*03
O14508	SOCS2	Suppressor of cytokine signaling 2	DGKFRLLSI	1	B*08
O43325	LYRM1	LYR motif-containing protein 1	TIKEKQYIL	1	B*08
O75319	DUSP11	RNA/RNP complex-1-interacting phosphatase	MPGTRFIAF	1	B*08
O96028	WHSC1	Histone-lysine N-methyltransferase NSD2	RPKTSTTL	1	B*08
P08922	ROS1	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase ROS	SFRIEGNASSF	1	A*24, B*08
P54107	CRISP1	Cysteine-rich secretory protein 1	MEIKHLLFL	1	B*08
Q53T94	TAF1B	TATA box-binding protein-associated factor RNA polymerase I subunit B	VLKEKGQSL	1	B*08
Q6UY09	CEACAM20	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 20	TGLARSTSV	1	B*08
Q7Z6M3	MILR1	Allergin-1	DSKTKVVM	2	B*08
Q8IU60	DCP2	m7GpppN-mRNA hydrolase	TPKSKLGL	2	B*08
Q8IV38	ANKMY2	Ankyrin repeat and MYND domain-containing protein 2	DIYEKQQL	1	B*08
Q8IY33	MICALL2	MICAL-like protein 2	FSALKKENI	1	B*08
Q8WV28	BLNK	B-cell linker protein	KITVPASQK, KITVPASQKL	4	A*03, -
Q8WVK7	SKA2	Spindle and kinetochore-associated protein 2	VIKSRYQTL	1	B*08
Q92738	USP6NL	USP6 N-terminal-like protein	RIYKGIPL	1	-
Q969W3	FAM104A	Protein FAM104A	LYFHINQTL	1	A*24
Q96BR5	COA7	Cytochrome c oxidase assembly factor 7	VLKNRAQQK	1	B*08
Q96FF9	CDCA5	Sororin	AVRKPIVLK	2	A*03
Q96JZ2	HSH2D	Hematopoietic SH2 domain-containing protein	KLPLPLPPRL	4	-
Q96NA8	TSNARE1	t-SNARE domain-containing protein 1	EEDLEAIRLR	1	-
Q9BRD0	BUD13	BUD13 homolog	VTYSLPRTK	1	A*03
Q9BW11	MXD3	Max dimerization protein 3	RLRSKQQSL	1	B*08
Q9HA16	CXorf21	Uncharacterized protein CXorf21	TSIKEKSSL	1	-
Q9NRP2	CMC2	COX assembly mitochondrial protein 2 homolog	KLFNPPEESEK	1	A*03
Q9NXX8	FBXL12	F-box/LRR-repeat protein 12	MPKLRVLEL	1	B*08
Q9UGM1	CHRNA9	Neuronal acetylcholine receptor subunit alpha-9	MPAVKNVI	1	B*08
Q9ULT0	TTC7A	Tetratricopeptide repeat protein 7A	TLKSKQDEL	1	B*08
Q9Y272	RASD1	Dexamethasone-induced Ras-related protein 1	DVLHKKAL	1	B*08
Q9Y3C1	NOP16	Nucleolar protein 16	YYQDTPKQI	2	A*24

4. Diskussion

4.1 Peptidvakzine für Hepatozelluläre Karzinome

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Impfstoffe bestehend aus HLA-Liganden für die Behandlung von Patienten mit HCC entwickelt werden. Durch die in Kapitel 3.1 identifizierten HLA-Liganden konnte die Grundlage hierfür geschaffen werden. Insgesamt konnten 14209 unterschiedliche Peptidsequenzen auf den untersuchten Lebergewebsproben identifiziert werden. Dabei handelte es sich um Tumorgewebe von 15 HCC-Patienten und nicht-malignes Lebergewebe von 21 HCC- und CCC-Patienten. 5012 dieser Peptide wurden exklusiv auf Tumorgewebe, 4902 exklusiv auf nicht-malignem Gewebe identifiziert und 4295 Peptide traten auf beiden Gewebetypen auf. Die Tatsache, dass auf beiden Seiten ähnlich viele Peptide identifiziert werden konnten, macht einen direkten Vergleich möglich und sinnvoll. Die Peptidausbeute der einzelnen Proben variierte stark.

Die Abhängigkeit der Peptidausbeute von der Probenmenge macht Sinn, da mit der Anzahl an Zellen auch die Kopienzahl der einzelnen Peptide in der gesamten Probe ansteigt und somit mehr unterschiedliche Peptide oberhalb der Detektionsgrenze der verwendeten massenspektrometrischen Methode liegen. Schwankungen in der Ausbeute können verschiedenste Gründe haben, Beschaffenheit und Qualität der Proben spielen dabei mitunter eine große Rolle. Man könnte auch eine Herunterregulation der HLA-Moleküle auf der Zelloberfläche des Tumors im Zuge einer Immunevasion vermuten. Dies würde auch erklären, warum auch bei großen Tumormengen zum Teil eine sehr geringe Peptidausbeute beobachtet werden konnte und warum diese Tumore eine solche Größe erreichen konnten.

Bei HCC23 und HCC30 handelte es sich um die größten Tumorproben, jedoch lieferten diese zwei sehr wenige Peptide. Das gemeinsame Charakteristikum ist die enorme Größe der beiden Proben. Durch die experimentelle Beschränkung der Lysatmenge ist davon auszugehen, dass es sich bei den Lysaten dieser beiden Proben um die am höchsten konzentrierten handelte. Ein möglicher Grund für die schlechte Peptidausbeute könnte eine Absättigung der Affinitätsäulen durch unspezifische Bindungen sein, sodass weniger HLA-Moleküle an die Säulen gebunden werden konnten. Zusätzlich werden diese unspezifisch gebundenen Lysatbestandteile mit eluiert. Handelt es sich bei diesen Molekülen um Proteine kleiner als 10 kDa passieren diese die Ultrafiltration gemeinsam mit den HLA-Liganden und kompetieren mit diesen beim ZipTip-Schritt. Anzumerken ist jedoch, dass solche

4. Diskussion

Ausreißer nur bei Tumorproben auftraten und nicht bei Proben von nicht-malignem Gewebe, was auf die bereits erwähnte Herunterregulation der HLA-Moleküle auf den Tumorzellen hindeuten könnte. Eine weitere Möglichkeit könnte auch eine verminderte Qualität der Proben sein. Möglicherweise konnten die großen Proben nicht schnell genug pathologisch untersucht und eingefroren werden, wodurch bereits ein enzymatischer Abbau der Proteine in der Probe begonnen haben könnte.

Zukünftig wäre es sinnvoll große Tumorproben aufzuteilen und nur Teile der Probe auf einmal zu untersuchen. Eine Probenmenge zwischen ein und drei Gramm scheint die beste Peptidausbeute zu liefern (Abbildung 14). Teilt man eine große Probe in ein Gramm schwere Stücke und isoliert bzw. analysiert die HLA-Liganden in getrennten Experimenten und Messläufen kann oft eine deutlich erhöhte Peptidausbeute für den gesamten Tumor erwartet werden. Man muss jedoch beachten, dass von einigen Proben nur ein technisches Replikat in diese Analyse eingegangen ist. Diese ergaben allerdings abgesehen von den Ausreißern sehr gute Peptidausbeuten.

Wie die Ausbeute schwankt auch der Tumoranteil der Proben deutlich und konnte in manchen Fällen nicht genau von den Kollegen in der Pathologie bestimmt werden. Diese Problematik ist nur schwer zu beseitigen, da es sich um ein individuelles Charakteristikum der einzelnen Proben handelt. Für zukünftige Experimente könnte der Versuch unternommen werden die Daten aus der Pathologie mit Daten aus den NGS-Experimenten zu verbinden und zu ergänzen, da eine Bestimmung des Tumoranteils aus den NGS-Daten ebenfalls möglich ist.

Durch die untersuchten Proben sind die am häufigsten in Deutschland vorkommenden HLA-Allele abgedeckt (A*02, A*03, A*01, B*07, B*08 usw.). Die Ergebnisse aus diesem Patientenkollektiv sind also durchaus relevant für die gesamte deutsche Bevölkerung. Eine bessere Abdeckung kann nur durch die Analyse weiterer Proben gewährleistet werden.

4.1.1 Tumor-assoziierte Antigene

Die identifizierten HLA-Liganden decken sowohl in HCC-Gewebe als auch in nicht-malignem Lebergewebe nur ca. die Hälfte (HCC-Gewebe 42%; nicht-malignes Lebergewebe 52%) aller der mit den verwendeten Methoden identifizierbaren Liganden ab. Dieses Erkenntnis aus den Sättigungsanalysen (Abbildung 15 und 17) ist von großer Bedeutung für die weitere Betrachtung und Gegenüberstellung der beiden Gewebetypen. Ein direkter Vergleich auf Ligandenebene ist schwer zu rechtfertigen, da durch die geringe Abdeckung viele mögliche Impfpeptide nicht erfasst wurden. Außerdem fehlt durch die geringe Abdeckung auf nicht-malignem Gewebe ein großer Teil der Ausschlusskriterien für eventuelle Impfpeptide. Die in Kapitel 3.1 beschriebenen tumorexklusiven Peptide werden sich also mit der Analyse weiterer Proben mit hoher Wahrscheinlichkeit substantiell verändern.

Durch die Betrachtung der Proteine, aus welchen die identifizierten HLA-Liganden stammen, ist es trotzdem möglich die beiden Gewebetypen miteinander zu vergleichen und so Impfpeptide für die Behandlung von Patienten mit HCC vorzuschlagen. Dieses Vorgehen ermöglicht zudem die Sequenzrestriktionen der unterschiedlichen HLA-Allotypen zu umgehen. Über den Umweg der Quellproteine können die Ligandome der Gewebe mehrerer Patienten also miteinander verglichen werden.

Die 4.815 identifizierten Quellproteine auf HCC-Tumorgewebe sowie die 4.778 identifizierten Quellproteine auf nicht-malignem Lebergewebe repräsentieren mit einer Abdeckung von 79% bzw. 85% einen Großteil des messbaren Ligandoms und machen dadurch einen Vergleich möglich und sinnvoll. Zusätzliche Identifikationen in weiteren Experimenten beeinflussen die Ergebnisse der durchgeführten Analysen also vermutlich nur geringfügig.

Durch die Sättigungsanalysen konnten des Weiteren Grenzwerte für die maximale Anzahl an identifizierbaren HLA-Liganden und auch derer Quellproteine ermittelt werden. Man muss dabei aber beachten, dass diese Grenzwerte speziell nur für die verwendeten Methoden und Geräte gelten. Insbesondere ein leistungsstärkeres Massenspektrometer wäre in der Lage die „Tiefe“ der Analyse zu verbessern und die ermittelten Grenzwerte nach oben zu verschieben.

Die Plateauwerte sind sowohl auf Ligandenebene als auch auf Quellproteinebene auf der Seite des Tumorgewebes höher als auf der des nicht-malignen Lebergewebes. Die Grenzwerte von 21.946 Liganden auf HCC-Tumorgewebe stehen 17.777 Liganden auf nicht-malignem Lebergewebe gegenüber. 6.115 Quellproteine auf HCC-Tumorgewebe stehen 5.621 Quellproteinen auf

4. Diskussion

angrenzendem nicht-maligen Lebergewebe gegenüber. Dies liegt vermutlich an einer höheren Heterogenität auf Seiten des Tumorgewebes. Neben den gesunden Zellen, welche auch in dem nicht-maligen Lebergewebe existieren sind zusätzlich auch noch andere Zelltypen in Tumoren vorhanden. Neben verschiedenen infiltrierenden Immunzellen bilden die vorhandenen Tumorzellen, die selbst eine heterogene Zellpopulation bilden, einen Großteil der Tumormasse. Es ist zudem durchaus möglich, dass sich das untersuchte, dem Tumor angrenzende nicht-maligne Lebergewebe von dem Lebergewebe gesunder Menschen unterscheidet. Zum Beispiel könnte die Immunreaktion, welche mit der HCC-Erkrankung einhergeht, auch das angrenzende nicht-maligne Lebergewebe verändern und die Präsentation von HLA-Liganden beeinflussen.

Betrachtet man die Präsentationsfrequenz der identifizierten Quellproteine im Vergleich (Abbildung 19) zeigt sich, dass ein Großteil sowohl auf Tumorgewebe als auch nicht-maligen Gewebe vertreten ist. Dazu gehören vor allem die Quellproteine mit den höchsten Präsentationsfrequenzen. Da wie bereits erwähnt Tumorgewebe fast immer mit nicht-maligen Leberzellen durchsetzt ist, macht es Sinn, dass deutlich mehr Quellproteine exklusiv auf der Tumorseite identifiziert wurden. Die HLA-Peptide und damit auch deren Quellproteine, welche auf dem HCC-Gewebe identifiziert wurden, repräsentieren also das Ligandom einer gemischten Zellpopulation aus malignen und nicht-maligen Zellen.

Der Vergleich zwischen den Quellproteinen der auf HCC-Gewebe identifizierten HLA-Liganden und den Quellproteinen der HLA-Liganden identifiziert auf allen verfügbaren nicht-maligen Gewebeproben, zeigt ein etwas anderes Bild (Abbildung 20). Hier zeigen sich die allermeisten Proteine exklusiv auf der nicht-maligen Seite. Das ist durchaus nachvollziehbar, da hier Quellproteine aus all den anderen untersuchten Gewebetypen vertreten sind. Außerdem ist der nicht-maligne Datensatz hier viel größer als der von HCC. Trotzdem gibt es weiterhin viele Proteine, die auf beiden Seiten auftreten. Folglich werden diese Quellproteine durch HLA-Liganden auf einer Vielzahl verschiedener Gewebetypen präsentiert. Es könnte sich auch um Proteine handeln, die von Zellen stammen, die in den meisten Gewebetypen vorkommen. Bei denen im Blut vorkommenden Immunzellen könnte es sich um eine solche Zellpopulation handeln, da fast alle Organe und Gewebe durchblutet sind. Zusätzlich beinhaltet der Datensatz auch HLA-Liganden bzw. die entsprechenden Quellproteine aus genau diesen Zellen (PBMCs).

Die Tatsache, dass aus den knapp 5000 auf HCC vertretenen Quellproteinen in dieser Analyse nur 35 sowohl tumorexklusiv sind als auch auf mehr als einem Tumor identifiziert werden konnten und somit der LiTAA-Definition entsprechen, ist nicht überraschend. Zum einen steht den HCC-Quellproteinen eine viel größere Anzahl an auf nicht-maligen Geweben identifizierten

4. Diskussion

Quellproteinen gegenüber. Zum anderen dirigieren die patientenindividuellen HLA-Allele die zu identifizierenden HLA-Liganden und damit auch zu einem gewissen Grad die Verteilung und das Auftreten der repräsentierten Quellproteine. Da nur 10 HCC-Gewebeproben für diese Analyse verwendet wurden sind viele der HLA-Allele durch nur wenigen Patienten vertreten. Außerdem sind die Datensätze der Gewebeproben der einzelnen Patienten von sehr unterschiedlicher Qualität, was das wiederholte Auftreten von HLA-Liganden und somit auch der Quellproteine unwahrscheinlicher macht. Das bedeutet im Umkehrschluss jedoch, dass es sich bei den LiTAAs und LiTAPs die durch diese Analyse identifiziert wurden um sehr vielversprechende Impfpeptide für den Einsatz in einem HLA-Peptidvakzin zur Behandlung von Patienten mit HCC handelt.

Betrachtet man die Liste der identifizierten LiTAAs (Abbildung 17) so tauchen Proteine aus verschiedenen Kompartimenten der Zellen als auch aus verschiedenen Signal- bzw. Biosynthese- oder Abbauwegen auf. Dies zeigt, dass es sich bei den auf der Grundlage von HLA-Liganden identifizierten Antigenen nicht unbedingt um klassische Tumorantigene handeln muss. Ein Antigen kann also tumorassoziiert sein, ohne direkt etwas mit der Entstehung oder dem Wachstum des Tumors zu tun zu haben. Diese Antigene werden als HLA-Liganden auf den Tumorzellen präsentiert, weil sich die Expression und der Abbau von Proteinen sowie die Prozessierung und die Präsentation der HLA-Liganden zwischen den Tumorzellen und nicht-malignen Zellen unterscheiden. Die identifizierten LiTAAs sind als die Konsequenz des veränderten HLA-Ligandoms der untersuchten HCC-Tumorgewebe anzusehen.

39 der 62 identifizierten LiTAPs besitzen ein HLA-Peptid-Motiv für ein oder mehrere HLA-Allele des entsprechenden Patienten. Die restlichen 23 Peptide konnten keinem der HLA-Allele des entsprechenden Patienten zugeordnet werden. Das kann daran liegen, dass bei den Patienten nur die HLA-A- und HLA-B-Allele typisiert wurden. Es könnte sich also um Peptide handeln, welche auf HLA-C-Molekülen präsentiert werden. Desweiteren werden SYFPEITHI und NetMHC ständig verbessert und weiterentwickelt, sodass es sich bei den Peptiden, die hier keinem HLA-Allel zugeordnet werden konnten, trotzdem um HLA-Liganden handeln könnte. Einige Peptide zeigen jedoch sehr ungewöhnliche Sequenzeigenschaften und könnten fälschlicherweise als Kontamination oder Bruchstücke von längeren Peptiden abgetan werden. Sie wurden auf mindestens zwei Proben unabhängig voneinander identifiziert, was ein zufälliges Auftreten unwahrscheinlich macht.

Für jeden der Patienten, die für die LiTAA/LiTAP-Analyse verwendet wurde, wurden auch ein oder mehrere LiTAPs als mögliche Impfpeptide identifiziert. Des Weiteren konnten auf Patientenproben, die wegen zu kleiner Peptidausbeute aus der Analyse ausgeschlossen wurden, ebenfalls LiTAPs identifiziert werden.

4. Diskussion

Betrachtet man nun die Anzahl der identifizierten LiTAPs in Abhängigkeit der Peptidausbeute (Abbildung 20) wird klar, dass in der Regel bei einer höheren Peptidausbeute mehr LiTAPs für einen Patienten erwartet werden können. Dies spielt vor allem dann eine Rolle, wenn Impfpeptide gezielt für einen Patienten individuell zusammengestellt werden sollen. Je besser die Peptidausbeute der Tumorprobe des Patienten ist, desto höher ist die Chance auf mehrere geeignete Peptide für einen Impfcocktail, die auch tatsächlich auf dem Tumor des Patienten identifiziert werden können.

Diese Korrelation ist auch besser als die zwischen Tumorgewebsmenge und Peptidausbeute. Fokus sollte also nicht unbedingt darauf liegen, möglichst große Tumorproben zu untersuchen, sondern möglichst viele HLA-Liganden pro Patient zu identifizieren. Eine bessere Logistik bei der Probenbeschaffung sowie die bereits erwähnte stückweise Untersuchung von größeren Tumorproben könnte dies ermöglichen. Zusätzlich könnten Untersuchungen und Experimente zur HLA-Expression der Tumore Aufschluss über die zu erwartende Peptidausbeute und eine evtl. Immunevasion geben.

4.1.2 Tumor-spezifische Antigene

Bereits zu Beginn des Projekts zeigte sich, dass die Auswertungsstrategien und Filterkriterien bei der Betrachtung von NGS-Daten von gesundem Gewebe oder Zellkulturen sich nicht direkt auf die des Tumorgewebes übertragen lassen. Der fundamentale Unterschied besteht in der stark heterogenen Zellpopulation, die den Tumor ausmacht. Legt man z.B. die Filterkriterien an, welche bei der Suche nach vererbten Mutationen verwendet werden, so können nur äußerst selten Mutationen in Tumorgewebe identifiziert werden. Eine vererbte Mutation ist in nahezu allen Zellen des untersuchten Gewebes vorhanden, eine tumorspezifische Mutation tritt nicht einmal zwangsmäßig in allen malignen Zellen eines Tumors auf. Zusätzlich machen die malignen Zellen unter Umständen nicht einmal die Mehrzahl der Zellen in einem Tumor aus (vgl. Tabelle 15). Die in Kapitel 3.1.2 durchgeführten Vorversuche dienten dazu, geeignete Filterkriterien für die Auswertung der NGS-Daten von HCC-Tumorgewebe zu definieren.

Die bei HCC023 und HCC024 durchgeführten Experimente dienten zur Einschätzung der Reproduzierbarkeit der NGS-Daten. Die Tatsache, dass 116 der 193 Mutationen bei HCC023 bzw. 61 der 117 Mutationen bei HCC024 in nur einem der sechs technischen bzw. biologischen Replikate identifiziert werden konnten, zeigt die oben beschriebene Problematik auf. Es wurden jedoch auch Mutationen gefunden, welche in allen sechs Replikaten identifiziert wurden. Dies waren 62 (32%) bei HCC023 und 48 (41%) bei HCC024.

Das zweite Experiment sollte die Reproduzierbarkeit der Auswertung durch verschiedene Institutionen bzw. *Software* überprüfen. Auch hier zeigten sich nur ca. 30 bis 40% der Mutationen in der Schnittmenge der drei Auswertungsverfahren. Interessant ist, dass die zwei Datensätze, welche in unterschiedlichen Standorten gemessen, aber beide im Institut für Humangenetik in Tübingen ausgewertet wurden, eine ähnliche Schnittmenge untereinander aufweisen wie mit der Auswertung des externen Unternehmens. Die unterschiedlichen Ergebnisse kommen also sowohl durch die unterschiedlichen Standorte der Messung als durch die unterschiedliche Auswertung zustande.

Durch die Betrachtung der Charakteristika der Mutationen, welche in den verschiedenen Experimenten unter den verschiedenen Bedingungen gemeinsam auftraten, wurden die Filterkriterien auf eine Allelfrequenz von mindestens 20% und eine Sequenziertiefe von mindestens 10 *reads* festgelegt. Das bedeutet einerseits, dass jede Mutation in mindestens 20% der untersuchten DNA, die diese Mutation enthalten kann, auftreten muss. Andererseits muss eine Mutation mindestens 10-mal in einer Tumorprobe sequenziert worden sein. Geht man davon aus,

4. Diskussion

dass eine Mutation in nur einem Allel pro Zelle auftaucht müssen also 40% der Zellen einer Tumorprobe die fragliche Mutation tragen um die Filterkriterien zu passieren.

4.1.3 Suche nach tumorspezifischen Antigenen bei HCC025, HCC26 und HCC027

Obwohl die Experimente zur Identifikation von HLA-Liganden, denen eine tumorspezifische Mutation zugrunde liegt, technisch ohne Probleme durchgeführt werden konnten und all die Vorversuche mit den synthetischen Nachbildungen der Kandidatenpeptide erfolgreich waren, konnten keine TSAs identifiziert werden. Bereits die Suche nach den Massen der Tumorpeptide zur richtigen Retentionszeit lieferte nur im Fall von HCC027 mehr als die Hälfte an Treffern. Bei dieser Probe wurde die längere uHPLC-Säule verwendet. Da eine längere Säule aber nicht notwendigerweise die Sensitivität der Messmethode verbessert, sondern lediglich eine bessere Auftrennung der Probe möglich macht, ist weiterhin fraglich, welche Säule in zukünftigen Experimenten verwendet werden sollte.

Beim Vergleich der Spektren der synthetischen Peptide mit den Spektren, die in den Tumormessläufen zu den richtigen Retentionszeiten aufgenommen werden konnten, ließ sich leider kein potentiell TSA bestätigen. Hierfür gibt es eine Vielzahl an möglichen Erklärungen. Einerseits sind die bereits beschriebenen Probleme bei der Identifikation und Auswahl der den vorhergesagten TSA-Peptide zugrundeliegenden Mutationen zu nennen. Da nicht beliebig viele HLA-Liganden gezielt mit der SIM-Methode gesucht werden können, stellt auch die Vorhersage und Auswahl der 10 bis 20 Peptide pro Patientenprobe eine Herausforderung dar. Es fehlen klare Kriterien für diese Auswahl. Die einfachste Erklärung dafür, dass bisher kein TSA auf HCC identifiziert werden konnte, ist jedoch, dass diese Peptide gar nicht oder nicht in jedem Tumor präsentiert werden. Ein HCC-Tumor besitzt mit ca. 40 Mutationen im Vergleich zu Krebserkrankungen wie z.B. dem malignen Melanom mit ca. 140 Mutationen nur sehr wenige Mutationen [167]. Dementsprechend ist die Wahrscheinlichkeit, dass eine solche Mutation auf HLA-Ebene präsentiert wird deutlich geringer. Es ist also durchaus möglich, dass die Tumorzellen in den drei hier untersuchten Gewebeproben überhaupt keine Mutation in Form eines HLA-Liganden präsentiert haben. Tatsächlich wurden vor kurzem die ersten TSAs auf Tumoren mit hohen Mutationsraten beschrieben [35].

4.1.4 Ausblick

Durch die hohe Mortalität von HCC und CCC und den Mangel an effektiven Behandlungsmethoden ist die Entwicklung von neuen Therapieansätzen äußerst wichtig, um die Überlebens- bzw. Heilungschancen der Patienten zu verbessern. Die Impfung mit HLA-Peptiden ist eine Möglichkeit, dieses Ziel zu verfolgen. Jedoch stellen sich bei dem Gedanken an die konkrete Anwendung viele Fragen. Die Zusammensetzung eines möglichen Impfcocktails für Patienten oder eine Patientengruppe und die Auswahl der darin enthaltenen Peptide ist von großer Bedeutung. Dafür können verschiedene Strategien verfolgt werden. Es könnte beispielsweise ein Impfcocktail aus TUMAPs oder LiTAPs für bestimmte HLA-Allele zusammengestellt werden, nach Vorbild von IMA901. Eine weitere Möglichkeit besteht darin aufgrund der HLA-Allele des Patienten individuell bestimmte Peptide zu mischen oder Impfcocktails zu kombinieren. Dies wäre möglich, wenn für die häufigsten HLA-Allele bereits vorgefertigte Impfcocktails zu Verfügung stehen würden.

Steht Tumorgewebe für die Analyse und Identifikation von HLA-Liganden zur Verfügung, könnte wie in Kapitel 3.5 beschrieben vorgegangen werden. Auf diese Weise könnte man HLA-Liganden impfen, die tatsächlich auf dem Tumor des Patienten präsentiert werden. Es könnte des Weiteren nach bekannten und auf Vorrat synthetisierten LiTAAs/LiTAPs gesucht werden (*Warehouse*) oder nach Peptiden, welche einzigartig für den Tumor dieses Patienten sind. Letztere müssten dann speziell synthetisiert werden, was den Therapiebeginn verzögern würde. Ein gestaffeltes Impfprotokoll mit *Warehouse*-Peptiden zu Beginn, welche dann später mit individuellen TUMAPs ergänzt werden, wäre eine mögliche Vorgehensweise.

Die Verwendung von TSAs stellt eine weitere Option dar. Es konnten bisher keine TSAs auf Patientengewebe identifiziert werden, man müsste also auf vorhergesagte Peptidsequenzen zurückgreifen, welche möglicherweise nicht auf den Tumorzellen existent sind. Außerdem verzögert die Durchführung und Auswertung der Sequenzierungsexperimente eine mögliche Impfung.

Die Art der Applikation, das Impfprotokoll sowie die Wahl des Adjuvans spielen für den Erfolg einer Impfung mit HLA-Peptiden vermutlich auch eine entscheidende Rolle. Die Auswahl an zugelassenen Adjuvantien ist sehr begrenzt. Bisher können lediglich GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony stimulating factor*) und der TLR-Agonist Imiquimod verwendet werden [168].

Die Verabreichung von Impfpeptiden als Emulsion in Montanide, einer Emulsion aus Öl und Wasser, ist weit verbreitet, jedoch wurde im Mausmodell gezeigt, dass Montanide die durch die Impfung einwandernden T-Zellen an der Impfstelle gefangen hält und so die Impfwirkung abschwächt [169].

4. Diskussion

Die Auswirkung unterschiedlicher Protokolle auf die Wirksamkeit einer HLA-Peptidimpfung ist bislang kaum untersucht. Oft wird zu Beginn wöchentlich, später mit größeren Abständen geimpft [33, 134-136].

Besonderes Interesse weckt die Kombination von Peptidimpfungen mit immunmodulatorischen Substanzen, welche unter anderem das im Tumor herrschende immunsuppressive Mikromilieu aufheben bzw. abschwächen oder generell T-Zellen aktivieren sollen. Als mögliche Kandidaten stehen z.B. Cyclophosphamid oder Chemotherapeutika wie Paclitaxel oder Cisplatin zur Debatte [170-172]. Diese scheinen in der Lage zu sein MDSCs (*myeloid derived suppressor cells*) bzw. regulatorische T-Zellen zu hemmen oder zu töten, die Immunsuppression im Tumor aufzuheben und die Immunogenität des Tumors herzustellen. Auf der anderen Seite stellen die bereits erwähnten *Checkpoint*-Inhibitoren eine interessante Kombinationsmöglichkeit mit Peptidvakzinen dar. Diese könnten in geringen Dosen als Verstärker der Impfwirkung eingesetzt werden, wobei die geimpften Peptide die Spezifität der Behandlung sicherstellen. Durch den Einsatz von geringen Dosen könnten auch die zum Teil starken Nebenwirkungen vermieden werden. Für eine solche Kombinationstherapie ist jedoch die Auswahl an Peptiden sicherlich noch entscheidender. Sollte eine Immunantwort gegen Antigene angestoßen werden, welche auch auf gesunden Geweben vorhanden sind und wird diese durch den Einsatz solcher Antikörper noch verstärkt, könnten ungewollte Nebenwirkungen auftreten.

Um das Ansprechen des Immunsystems des Patienten verfolgen zu können kann dessen Immunantwort untersucht werden. Dazu wird in der Regel vor jeder Impfung Blut entnommen, welches dann für immunologische Tests wie Elispot oder HLA-Tetramer-Färbungen zur Verfügung steht. In der IMA901-Studie [33] wurde deutlich, dass sich die Prognose für einen Patienten mit der Anzahl an Immunantworten gegen die Impfpeptide verbessert. Es zeigte sich weiterhin, dass nur wenige der geimpften Patienten auf die Peptide ansprechen. Das Ziel sollte also sein, mehr Immunantworten pro Patient zu erzeugen. Eine einfache Lösung für dieses Problem könnte der Einsatz von mehr Peptiden sein. Damit steigen Kosten und Aufwand für den Herstellungsprozess. Ob eine Impfung zu viele Peptide enthalten kann ist schwer zu sagen, jedoch gibt es dafür bisher keine Hinweise [173]. Eine andere Möglichkeit wäre bessere Peptide zu impfen. Damit ist einerseits gemeint, dass die Peptide generell immunogener sein sollten, andererseits aber auch auf dem Tumor des Patienten präsentiert werden. Dies deutet wieder in Richtung einer individualisierten Behandlung, da patientenübergreifende Präsentation von HLA-Peptiden durch die Individualität des Patienten (z.B. HLA-Allele) als auch der Tumore unwahrscheinlich ist. Nimmt man eine Präsentationsfrequenz von 20% für ein Peptid an, was die Definition von LiTAA bzw. LiTAPs bereits

4. Diskussion

überschreitet, da nicht jeder Patient dieselben Peptide aus den LiTAA-Proteinen präsentiert, so würde man theoretisch einen Impfcocktail von 15 Peptiden benötigen, um im Schnitt mindestens drei Immunantworten pro Patient zu erhalten, aber auch nur dann wenn die Peptide, die präsentiert werden, immer immunogen sind. Das bedeutet ebenfalls, dass mindestens 80% der Peptide ohne Chance auf Effekt geimpft werden. Ein weiterer zu beachtender Aspekt ist, dass die geimpften Peptide eine Immunantwort im Patienten hervorrufen können, obwohl diese nicht auf dessen Tumor präsentiert werden. Dies ist insbesondere bei vorhergesagten TSA-Peptiden der Fall. Eine schnelle Methode um die Präsentation von möglichen Impfpeptiden zu testen wäre von großem Nutzen. Eine Möglichkeit wäre die von Theo Sturm in Tübingen sorgfältig etablierte mildsaure Elution von HLA-Liganden in Verbindung mit einem gezielten massenspektrometrischen Verfahren wie SIM oder SRM (*selected reaction monitoring*). Dies setzt jedoch ebenfalls das Vorhandensein von Tumorgewebe voraus.

Ein anderer wichtiger Aspekt ist der gesetzliche Rahmen, in welchem solche Vakzine eingesetzt werden können [159]. Insbesondere für aktiv personalisierte Arzneimittel gestaltet sich der Einsatz schwierig. Außerhalb individueller Heilversuche ist es nicht möglich Patienten mit solchen maßgeschneiderten Medikamenten zu behandeln. Für eine eventuelle Studie würden sich die Medikamente für jeden Patienten unterscheiden, es wäre also nur schwer möglich die Wirksamkeit und Sicherheit zwischen den Patienten zu vergleichen. Außerdem müsste jedes Peptid als Arzneimittel unter GMP-Bedingungen hergestellt werden, was zeitaufwendig und ab einer gewissen Zahl an Patienten auch logistisch nur schwer zu bewältigen ist. Generell sind die rechtlichen Grundlagen solcher Vorhaben nicht ausgearbeitet, was bedeutet, dass klinische Studien mit aktiv personalisierten Medikamenten derzeit in Deutschland nicht möglich sind. Es bleibt abzuwarten in wie fern sich die Gesetzgebung diesbezüglich entwickelt.

4.2 HLA-Liganden aus Isocitrat-Dehydrogenase I

4.2.1 Ligandom-Analysen

Die Isolation und Analyse der HLA-Liganden aus den verschiedenen Proben verlief erfolgreich. Bis auf die Analyse des Tumors 432246 konnten in allen Proben erfolgreich HLA-Liganden identifiziert werden. Die Tumore waren mit je ca. 100 mg sehr klein, was die niedrigen Zahlen der Peptidentifikationen erklärt. Trotzdem zeigen diese Experimente, dass auf Gliomen HLA-Liganden präsentiert werden und diese massenspektrometrisch analysiert werden können. Dies gilt sowohl für Liganden die auf HLA-Klasse I als auch für solche, die auf HLA-Klasse II präsentiert werden. In den Experimenten mit den verschiedenen Varianten der Zelllinie LN229 konnten deutlich mehr HLA-Liganden identifiziert werden. Die deutlich größeren Probenmengen von 1 ml Zellpellet und mehr machen diese Ergebnisse plausibel. Da in den folgenden Experimenten gezielt HLA-Klasse II-Liganden untersucht werden sollten, waren die hohen Ausbeuten an diesen Liganden in den Zelllinienproben vielversprechend. Die zwei identifizierten HLA-Liganden aus IDH-1, obwohl diese nicht die gesuchte Mutation enthalten, zeigen weiterhin, dass HLA-Liganden aus IDH1 in der Zelllinie LN229 erfolgreich prozessiert und präsentiert werden können, sowohl auf HLA-Klasse I-Molekülen als auch auf HLA-Klasse II-Molekülen.

4.2.2 Gezielte Suche nach IDH1-R132H Peptiden auf HLA-Klasse II

Die Vorexperimente, die die Retentionszeiten der ausgewählten mutierten IDH1-Peptide bestimmen sollten, konnten erfolgreich durchgeführt werden. Für jedes der 16 Peptide konnte die Retentionszeit bestimmt werden. Der Testlauf für die SIM-Messung mit den Massen der synthetischen Peptide verlief ebenfalls erfolgreich. Es konnten alle isotoopenmarkierten synthetischen Peptide mit der SIM-Methode an den vorher bestimmten Retentionszeiten identifiziert werden. Da in einer Probemessung des für die folgenden SIM-Messläufe verwendeten HLA-Ligandenextrakts knapp 1000 HLA-Klasse II-Liganden identifiziert wurden, konnte die gezielte Suche nach TSAs wie geplant durchgeführt werden. Nach manueller Überprüfung der gesuchten Massen zu den vorher bestimmten Retentionszeiten konnte keiner der gesuchten hypothetischen HLA-Liganden bestätigt werden.

4. Diskussion

Die gezielte Suche mit SIM nach HLA-Klasse II-Liganden stellt im Vergleich zu der Suche nach HLA-Klasse I-Liganden eine noch größere Herausforderung dar. Da HLA-Klasse II-Liganden in der Regel aus deutlich mehr Aminosäuren bestehen und sowohl die Sequenz- als auch die Längenrestriktion von HLA-Klasse II-Molekülen weniger streng sind, gibt es hier bei der Suche nach Liganden, die eine bestimmte Mutation tragen, viel mehr Möglichkeiten. Aufgrund der experimentellen Einschränkungen konnten hier nur 16 mögliche Liganden gezielt gesucht werden. Existiert ein TSA-Ligand der die gesuchte IDH-1 Mutation trägt, auf der untersuchten Zelllinie auf HLA-Molekülen präsentiert wird und aber nur um eine Aminosäure kürzer ist, würde er mit diesem SIM-Experiment nicht identifiziert werden können, da sich seine Masse von den gezielt gesuchten Peptiden unterscheidet. Eine andere Erklärung dafür, dass kein TSA identifiziert werden konnte ist eine zu geringe Sensitivität der verwendeten Messmethode. Obwohl mit SIM die Sensitivität gegenüber der Standard TOP5-Methode deutlich besser ist, könnten die gesuchten Liganden trotzdem in zu geringen Mengen in der Probe vorhanden sein. Die einfachste Erklärung bleibt jedoch, dass die gesuchten Liganden in der untersuchten Probe nicht existieren.

4.2.3 Ausblick

Die IDH1R132H-Mutation stellt ein vielversprechendes Ziel für die Therapie von Grad II bzw. III und anaplastischen Gliomen dar. Diese Tumore wachsen in der Regel sehr langsam über Jahre hinweg, entwickeln aber mit einer hohen Wahrscheinlichkeit irgendwann einen bösartigen Phänotyp [96]. Außerdem ist die IDH1R132H-Mutation sehr häufig in diesen Tumoren vertreten. Da es sich bei IDH1R132H-Mutation um ein sehr frühes und wichtiges Ereignis bei der Krebsentstehung handelt, sind die allermeisten Zellen davon betroffen [105, 174-176]. Eine Immunevasion durch das Auswachsen von Tumorzellen, die diese Mutation nicht tragen ist also unwahrscheinlich. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Peptide, die diese Mutation tragen auf HLA präsentiert und von T-Zellen erkannt werden [144]. Durch die Präsentation auf HLA-Klasse II Molekülen ist der Einsatz dieser Peptide als Immuntherapeutika nicht durch die HLA-Allele des Patienten eingeschränkt, da sie im Gegensatz zu Klasse I-Molekülen ein weniger striktes Bindemotiv besitzen [39, 177]. Eine Impfung mit diesen Peptiden würde also nicht den Einschränkungen einer personalisierten Behandlung mit HLA-Klasse I-Liganden unterliegen, trotzdem aber als Zielstruktur ein Neoepitop besitzen. Außerdem sind die betroffenen Patienten in der Regel noch jung und haben ein funktionierendes Immunsystem, was die nötige Zeit verschaffen würde erfolgreich zu therapieren.

4. Diskussion

Neben Impfungen mit IDH1R132H-Peptiden könnten auch adoptiv transfundierte T-Zellen, welche diese Peptide erkennen, bei der Behandlung von IDH1R132H-positiven Gliompatienten angewendet werden.

Da diese spezifische Mutation auch in anderen Krebsarten vorkommt, könnte dieses Konzept auf die Behandlung dieser Entitäten ausgeweitet werden [108-110]. Anderen Mutationen, welche häufig in manchen Krebserkrankungen bzw. Tumoren vorkommen, wie das BCR-ABL-Fusionsprotein bei Leukämien oder die V600E-Mutation im B-RAF Gen bei Darmkrebs oder malignen Melanomen, können mit derselben Strategie begegnet werden [178, 179]. Jedoch sind in beiden Fällen Resistenzentwicklungen bei der Behandlung mit Medikamenten, die auf diese Mutationen zielen bekannt [180, 181]. Außerdem ist noch nicht klar, ob Neoepitope dieser Mutationen präsentiert werden und vom Immunsystem erkannt werden.

Da Gliome auch Peptide auf HLA-Klasse I-Molekülen präsentieren wären Impfstrategien mit solchen Peptiden auch denkbar [137]. Sowohl Impfcocktails entsprechend der HLA-Allele des Patienten mit LiTAAs als auch individuell zusammengestellte TUMAP-Mischungen wären eine Option. Außerdem ist es möglich, dass die IDHR132H Mutation auch auf HLA-Klasse I-Molekülen präsentiert wird. Die Identifikation eines entsprechenden Klasse I Neoepitops bei Gliomen und dessen Einsatz als Impfpeptid würde solche Therapieansätze gut ergänzen.

Die Kombination von Peptidimpfungen mit den Standardbehandlungen für Gliome, also Chemotherapie und Bestrahlung, müssen jedoch genau untersucht werden, um zum einen für die Sicherheit der Patienten zu garantieren und zum anderen eventuelle synergistische Effekte zu entdecken [182, 183].

4.3 Individualisierte Heilversuche

Für alle vier Patienten konnten verschiedene Impfpeptide vorgeschlagen werden. Obwohl sich die genaue Vorgehensweise der Auswahl der Peptide in den einzelnen Fällen von einander unterschied, konnten für jeden Patienten Peptide identifiziert werden, welche auf dem jeweiligen Tumorgewebe präsentiert wurden. Für CCC009 und HCC021 standen zusätzlich zu den Gewebeproben auch NGS-Daten zu Verfügung. Diese Daten wurden ebenfalls für die Auswahl der Impfpeptide verwendet.

4.3.1 Patientin CCC009

Nachdem bei dieser Patientin mit Cholangiozellulärem Karzinom keine TSAs identifiziert werden konnten, wurde auf bereits bekannte und immunogene Impfpeptide zurückgegriffen. Die geimpften HLA-Klasse I Peptide konnten alle sowohl auf dem primären Tumor als auch auf einer der Metastasen identifiziert werden. Durch die Betrachtung der NGS-Daten konnte weiterhin festgestellt werden, dass die Gene, aus denen diese Peptide stammen zumindest translatiert wurden. Obwohl diese Vorgehensweise nicht alle Möglichkeiten einer aktiven Individualisierung ausgeschöpft hat, konnte durch die Impfung eine Immunreaktion gegen sechs der sieben Peptide erzeugt werden. Trotz des guten Ansprechens auf die Impfungen traten bei der Patientin bis heute mindestens zwei neue Metastasen auf. Die Behandlung und der Krankheitsverlauf dieser Patientin wurden im *Journal of Hepatology* im Juli 2016 publiziert [166].

4.3.2 Patient HCC021

In diesem individualisiertem Heilversuch konnte ein Impfcocktail, der sowohl TUMAPs als auch TSAs beinhaltet, für den Patienten HCC21 vorgeschlagen werden. Zwar wurde auch bei diesem Patient kein TSA als präsentierter HLA-Ligand identifiziert, es konnten aber aufgrund der NGS-Daten TSAs für die mögliche Behandlung vorhergesagt werden. Sechs solcher möglichen TSAs wurden für eine eventuelle Behandlung ausgewählt. Drei dieser Peptide entstammen Punktmutationen, die drei anderen entstammen aus Insertionen bzw. Deletionen in den entsprechenden Genen. Es konnte jedoch nicht bewiesen werden, dass diese Peptide auf dem Tumor des Patienten präsentiert wurden. Von den 14 vorgeschlagenen TUMAPs wurden nur zwei für den Impfcocktail ausgewählt. Dabei galt

4. Diskussion

als Ausschlusskriterium die Expression in Geweben außerhalb der Leber, um eventuellen Nebenwirkungen der Immuntherapie vorzubeugen. Die Tatsache, dass ein solcher Impfcocktail mit den zur Verfügung stehenden Daten zusammengestellt werden konnte, beweist die Durchführbarkeit eines solchen Ansatzes. Leider konnte der betroffene Patient nicht mit den beschriebenen Peptiden im Zuge einer Immuntherapie behandelt werden.

Des Weiteren zeigte die Arbeit mit dem Gewebe von Patient HCC021, dass der gewählte Ansatz zur Identifikation von TSAs grundsätzlich funktioniert. Mit Hilfe der gewonnenen Daten konnte ein heterozygoter *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) identifiziert und die resultierenden HLA-Liganden aus beiden Allelen nachgewiesen werden. Dieser SNP konnte also sowohl auf DNA-, als auch auf HLA-Ligandenebene gleichzeitig beschrieben werden. Das bedeutet, dass wenn eine Mutation auf DNA-Ebene identifiziert wurde, welche zu einem TSA präsentiert auf HLA-Molekülen führt, wir grundsätzlich mit den zur Verfügung stehenden technischen Möglichkeiten in der Lage sind dieses TSA auch auf HLA-Ligandenebene zu identifizieren.

4.3.3 Patientin mit Ovarialkarzinom

Die Auswahl der Impfpeptide für diese Patientin mit Ovarialkarzinom beruht zum Großteil auf der Arbeit von Janet Peper und Heiko Schuster [184]. Es wurde in dem Ligandom der Patientin nach HLA-Liganden gesucht, welche bereits bekannt und idealerweise auch immunogen sind. Die Liste mit den möglichen Impfpeptiden wurde dann an den Kooperationspartner weitergeleitet. Es ist von großem Vorteil, wenn bereits große Datensätze zum Ligandom einer Tumorentität zur Verfügung stehen, um einen individuellen Impfpeptidcocktail für einen Patienten herzustellen. Man kann durch das Zurückgreifen auf die bereits erhobenen Daten sehr schnell HLA-Liganden für eine mögliche Impfung auswählen. Die Tatsache, dass in diesem Fall bereits Immunogenitätstests durchgeführt wurden, stellt einen weiteren Vorteil dar. Ein langfristiges Ziel könnte sein, für alle Krebsarten Datenbanken mit geeigneten Impfpeptiden zusammenzustellen, welche im Idealfall bereits auf Immunogenität getestet wurden und synthetisiert vorliegen. Wäre dies der Fall könnten in kürzester Zeit Impfpeptide individuell für jeden Krebspatienten zusammengestellt und diese daraufhin den Patienten verabreicht werden.

4.3.4 Patient mit B-ALL

Die Experimente mit den B-ALL-Zellen dieses Patienten boten die seltene Gelegenheit nach einem TSA zu suchen, welches nicht auf einer tumorspezifischen Mutation beruht. In diesem Fall ist das Antigen tumorspezifisch, da es auf der individuellen variablen Region des B-Zellrezeptors der entarteten B-Zellen beruht. Bei diesem Patienten konnte der tumorspezifische Peptidabschnitt wieder nicht als präsentierter HLA-Ligand identifiziert werden. Da aus anderen Teilen des B-Zellrezeptors schon HLA-Liganden bekannt sind, sollte dieser Ansatz durchaus machbar sein. Er setzt aber wie bei anderen TSAs die genaue Kenntnis der betreffenden Aminosäuresequenz und damit Sequenzierungsexperimente voraus. Es wäre jedoch sehr interessant weitere B-ALL-Patienten auf diese Weise zu untersuchen, um ihnen eventuell eine immuntherapeutische Behandlung mit einem solchen TSA anbieten zu können.

Obwohl kein auf HLA-präsentiertes Peptid aus der variablen Region gefunden werden konnte, war es möglich auf Grund der Analyse des Ligandoms dieses Patienten 34 HLA-Liganden als TUMAPs für eine mögliche Impfung vorzuschlagen.

4.3.5 Ausblick

Peptide, die aus tumorspezifischen Mutationen hervorgehen, sind in den letzten Jahren immer mehr in den Fokus der Forschung gerückt. Die Gründe hierfür liegen auf der Hand. Zum einen werden solche Neoantigene spezifisch auf den Tumorzellen des Patienten präsentiert, zum anderen werden T-Zellen, welche diese Antigene erkennen, weder bei der T-Zellreifung im Thymus negativ selektiert, noch unterliegen sie peripherer Toleranz und sollten deshalb in der Lage sein starke Immunantworten hervorzurufen. Durch die stetige Entwicklung im Bereich des *next-generation-sequencing* ist es inzwischen möglich, Tumore einzelner Patienten relativ schnell zu sequenzieren. Damit ist die Grundlage geschaffen, die Existenz und die Rolle dieser Antigene zu erforschen. Durch den Einsatz von Epitop-Vorhersagen aufgrund von NGS-Daten und den anschließenden adoptiven T-Zell-Transfer von *tumor-infiltrating-lymphocytes* (TIL)-Zelllinien, welche diese Epitope erkennen, konnte in drei Melanompatienten ein Rückgang der Tumormasse beobachtet werden [185]. Auch andere Berichte deuten auf eine bedeutende Rolle von TSAs bei der Behandlung von Patienten mit malignem Melanom hin [186]. In diesem Fall wurde ein Patient mit Ipilimumab behandelt. Erneut wurden Epitope vorhergesagt und TILs auf Reaktivität gegen diese Epitope getestet. Auf diese Weise konnten zwei patientenspezifische Neoantigene identifiziert werden, welche durch T-Zellen erkannt wurden. Die genetischen Grundlagen, welche eine Erkennung des Tumors durch das Immunsystem ermöglichen, sind weitgehend unbekannt, jedoch konnte der Erfolg von anti-CTLA-4 Antikörpern bei der Therapie von Melanomen auf die Existenz bestimmter Mutationssignaturen zurückgeführt werden [187]. Es scheint eine entscheidende Rolle zu spielen, wie viele Mutationen ein spezifischer Tumor trägt. Zusätzlich sind die durch die Mutationen neu entstehenden Sequenzabschnitte entscheidend. Die Autoren vermuten, dass Kreuzreaktivitäten von T-Zellen, welche normalerweise Pathogene wie Viren oder Bakterien erkennen, eine Rolle bei der Erkennung von Neoepitopen spielen.

Gerade in Verbindung mit Checkpoint-Inhibitoren spielen Neoantigene in Patienten mit Melanomen eine große Rolle. Melanome gehören mit Lungenkrebs zu den Tumoren mit der höchsten Anzahl an Mutationen [167]. Trotz dieser Tatsache gibt es einige Berichte über Neoantigene in anderen Tumorentitäten z.B. CCC [188]. In diesem Fall wurden dem Patienten wieder TIL infundiert, was zu einer Stabilisierung der Tumorlast führte.

Trotz der zahlreichen Berichte über Neoantigene und den Erfolg in einzelnen Fallstudien im Menschen konnte deren tatsächliche Präsentation auf den Zellen eines Tumors lediglich in Mausmodellen gezeigt werden [143, 145]. Massenspektrometrie scheint hierbei das Mittel der Wahl

4. Diskussion

zu sein [35]. Die meisten soliden Tumore, welche sich aufgrund der zur Verfügung stehenden Tumormasse für solche Untersuchungen eignen, besitzen in der Regel deutlich weniger Mutationen als Melanome. Die Chancen auf die Präsentation eines Neoantigens sind also deutlich geringer. Außerdem spielt der Selektionsdruck, welcher das Immunsystem auf den Tumor ausübt eine entscheidende Rolle [189]. Neoantigene sind mit hoher Wahrscheinlichkeit in nur sehr geringer Menge vertreten. Diese Mengen können zwar von T-Zellen erkannt werden [34, 145, 186], reichen aber vermutlich nur in seltenen Fällen aus, um massenspektrometrisch nachgewiesen zu werden. Außerdem stellt sich die Frage, ob zur Erkennung durch T-Zellen weitere Maßnahmen wie z.B. die Behandlung mit Checkpoint-Inhibitoren notwendig sind.

Auf der anderen Seite sind Versuche Neoantigene auf humanen Tumoren zu identifizieren bisher noch von technischen Einschränkungen betroffen. Die Ansätze, die in dieser Arbeit verfolgt wurden, wurden bisher nur bei wenigen Tumoren angewendet. Durch die Auswahl von maximal 20 möglichen mutierten HLA-Liganden pro Patient, für eine gezielte Suche schränkt man die Erfolgsaussichten deutlich ein. Bei einer durchschnittlichen Mutationszahl von ca. 40 Peptiden bei HCC [167] verwirft man mindestens die Hälfte der möglichen Neoepitope. Die Entscheidung, welche Peptide gezielt gesucht werden sollen ist also äußerst wichtig und von zuverlässigen Exomdaten sowie präzisen Vorhersagealgorithmen abhängig. Verzichtet man auf die SIM-Methodik hat man zwar die Chance alle möglichen Peptidsequenzen zu identifizieren, verliert aber deutlich an Sensitivität.

Trotz der vielen Vorteile von Neoepitopen beim Einsatz als Immuntherapeutika gibt es auch einige Nachteile, wie z.B. die absolute Notwendigkeit einer personalisierten Herangehensweise. Das einzigartige Mutationsmuster jedes einzelnen Tumors sowie die unterschiedlichen HLA-Allele, welche die Patienten voneinander unterscheiden, spielen dabei die größten Rollen. Dies gilt insbesondere, wenn kurze Peptide verwendet werden sollen, welche auf HLA-Klasse I-Moleküle binden. Werden Klasse II bindende Peptide verwendet, welche häufig patientenübergreifende Mutationen repräsentieren, kann diese Problematik umgangen werden. Ein Beispiel hierfür wären die oben genannten IDH1R132H-Impfpeptide [144].

Weitere Nachteile für den Einsatz von TSA-Peptiden sind die bereits angesprochenen mangelnden rechtlichen Grundlagen für personalisierte Medikamente sowie die Schwierigkeiten beim Vergleich der Wirksamkeit der Behandlung zwischen mehreren Patienten.

Obwohl durch NGS in den letzten Jahren die Grundlagen für die patientenindividuelle Mutationsanalyse geschaffen wurden, scheint die Analyse von Tumorgewebe weiterhin Probleme zu bereiten. Der Zustand des Gewebes nach der Operation sowie das Zellmosaik der Tumore sind immer

4. Diskussion

noch Herausforderungen für die reproduzierbare und zuverlässige Identifikation von tumorspezifischen Mutationen. Neben den technischen Limitationen stellt auch die Auswertung der Rohdaten eine nicht zu unterschätzende Aufgabe dar. Da sich die Beschaffenheit von verschiedenen Tumoren stark unterscheiden kann, z.B. der Tumoranteil der Gewebeprobe, müssten die Daten eines jeden Tumors individuell ausgewertet werden. Des Weiteren sollte wäre es von Vorteil Filterkriterien speziell für jeden Tumor zu erarbeiten bzw. individuell anzupassen.

Da die Identifikation eines Neoepitops auf dem Tumor eines Patienten bisher sehr selten erfolgt ist [35] und vermutlich auch in Zukunft nicht zuverlässig und reproduzierbar möglich sein wird, ist man auf Epitopvorhersagen angewiesen [34]. Problematisch hierbei ist, dass eine Behandlung möglicherweise komplett wirkungslos ist, da die vorhergesagten TSAs möglicherweise gar nicht auf den HLA-Molekülen des Patienten präsentiert werden. Auch Immunmonitoring löst dieses Problem nicht, da diese Peptide selbst wenn sie Immunreaktionen in Patienten hervorrufen, nicht zwingend auf dessen Tumor präsentiert werden.

5. Zusammenfassung

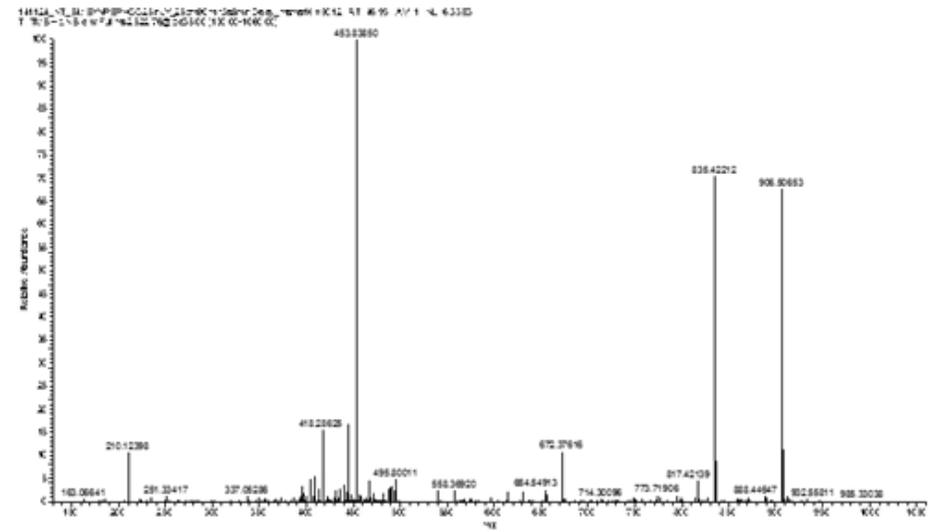
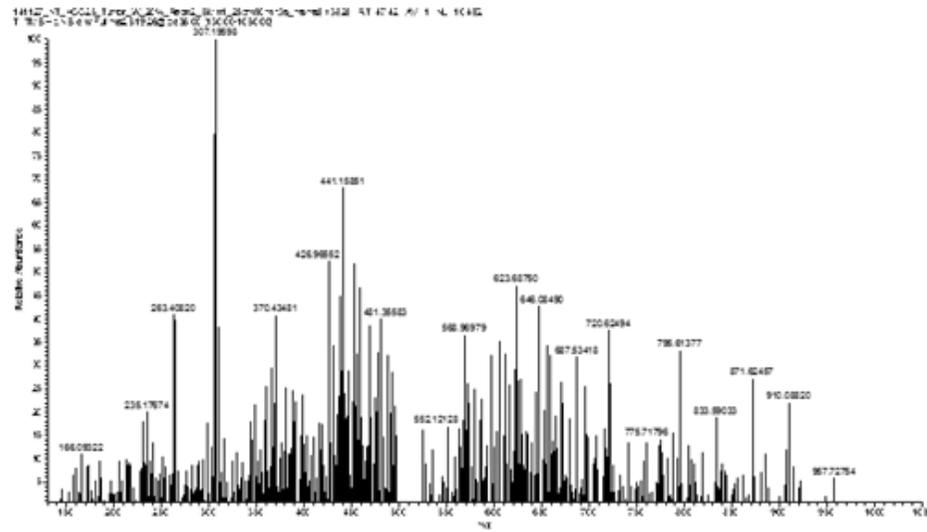
Primäre Lebertumore sind aufgrund ihrer hohen Mortalitätsraten und ihrer steigenden Inzidenzen ein ernstzunehmendes Problem. Mit übermäßigem Alkoholkonsum, Leberzirrhose und Infektionserkrankungen wie Hepatitis-B und -C als Hauptrisikofaktoren wird sich das in naher Zukunft nicht ändern. Durch das begrenzte Repertoire an Behandlungsmöglichkeiten stellt sich die Frage nach neuen Therapieansätzen. Durch die in den Fokus der Forschung gerückte Krebsimmuntherapie bietet sich eine Vielzahl an neuen Ansatzpunkten. Die Impfung mit tumorassoziierten und tumorspezifischen HLA-Liganden steht im Mittelpunkt dieser Arbeit. Um einen solchen Ansatz zu verfolgen, müssen zunächst Erkenntnisse über das Ligandom dieser Tumore gewonnen werden. Zu diesem Zweck wurde gesundes Gewebe sowie Tumorgewebe von insgesamt 21 Patienten untersucht. Die Isolation der HLA-Liganden von diesen Geweben und deren massenspektrometrische Analyse lieferte über 15.000 unterschiedliche Peptide. Mit diesen Daten konnten 31 patientenübergreifende Antigene identifiziert werden. Außerdem wurden Möglichkeiten demonstriert, wie eine solche Impfung individuell auf einen Patienten abgestimmt werden kann. Durch den Einsatz von *next-generation-sequencing* ist es möglich nach HLA-Liganden zu suchen, deren Aminosäuresequenz durch Mutationen in den zugrundeliegenden Genen verändert sind. Solche Peptide als Ziel einer Immuntherapie bieten Vorteile gegenüber tumorassoziierten Antigenen. Leider konnte im Rahmen dieser Arbeit kein solches Neoepitop nachgewiesen werden. Gliome stellen ähnlich wie Lebertumore eine schwer heilbare Tumorerkrankung dar. Auch hier besteht dringender Bedarf an neuen Möglichkeiten zur Behandlung der Patienten. Die Mutation R132H im Gen der IDH 1 stellt jedoch ein interessantes Ziel für eine Immuntherapie dar. Bis zu 70% der Grad II- und III- Gliome tragen diese Mutation. Da die Mutation sehr früh bei der Entstehung eines Glioms auftritt und vermutlich einen entscheidenden Schritt hierbei darstellt, sind die meisten Zellen eines solchen Tumors davon betroffen. Die Präsentation auf HLA-Molekülen und die Erkennung durch das Immunsystem im Patienten macht sie zu einem idealen Ziel einer Impfung. Es wurden mehrere Tumorproben von Gliompatienten sowie einige Gliom-Zelllinien untersucht. Zu diesem Zweck wurde eine gezielte massenspektrometrische Methode entwickelt und etabliert, um die Sensitivität des Massenspektrometers zu erhöhen. Es konnten jedoch nur wildtypische Peptide der Isocitratdehydrogenase 1 identifiziert werden. Des Weiteren wurden für insgesamt vier Patienten individuelle Cocktails für eine Impfung mit HLA-Liganden vorgeschlagen. Diese Vorschläge basierten auf der Analyse von Tumorgewebe dieser Patienten. Dabei wurden sowohl Ligandom-, als auch Exom- und Transcriptom Daten in Betracht gezogen.

6. Anhang

Um die potentiellen TSA-Identifikationen aus den Tumorgeweben der Patienten HCC025, HCC026 und HCC027 zu validieren, wurden ihre Fragmentmassenspektren mit denen der entsprechenden synthetischen Peptide verglichen. Es wurde auf die Übereinstimmung der einzelnen Fragmentmassen unter Berücksichtigung der Isotopenmarkierungen geprüft. Die Abbildungen der Vergleiche für jeden Patienten sind jeweils nach Retentionszeit geordnet.

6. Anhang

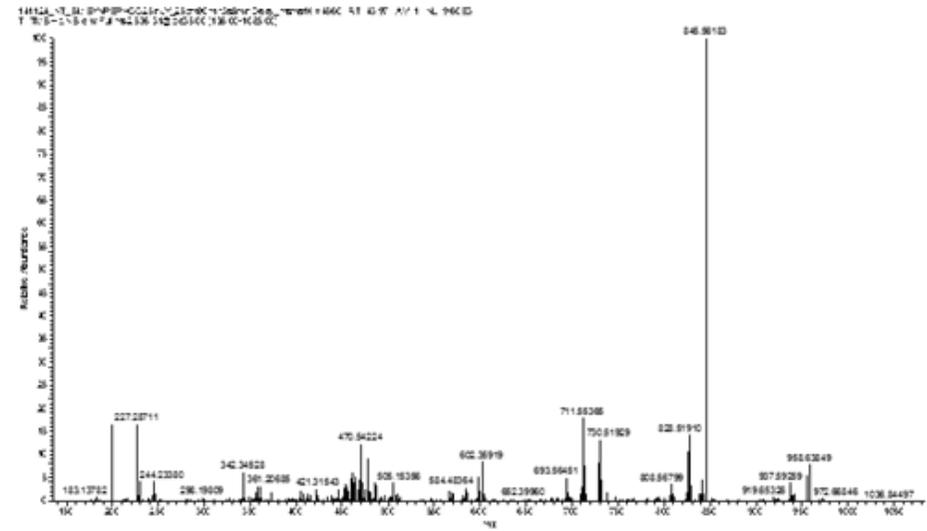
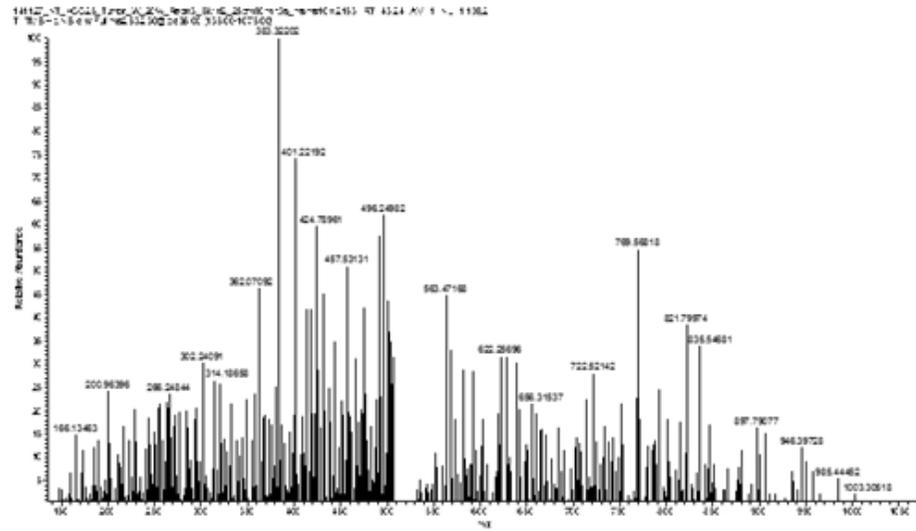
Peptid 14: HIYSGGYAL



Vergleich der Spektren des Tumorpeptid (links) mit dem des synthetischen Peptids 14 (rechts)

6. Anhang

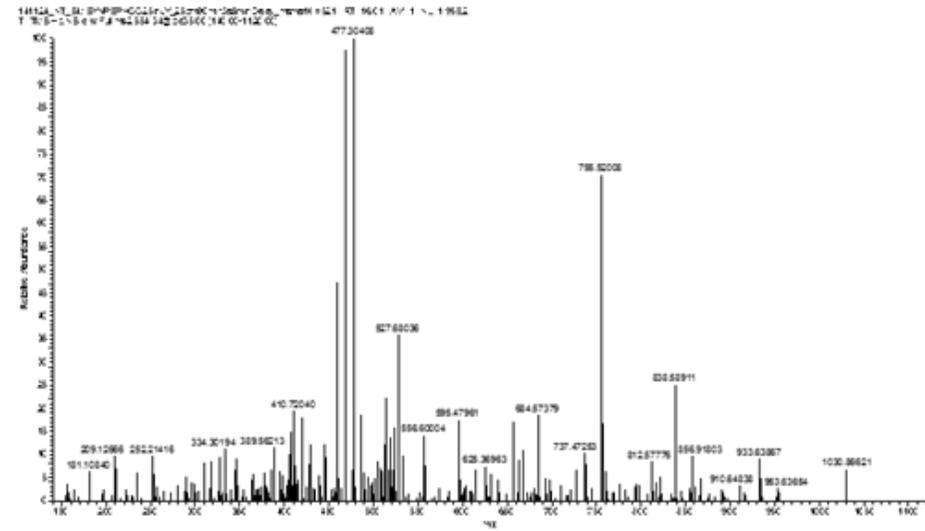
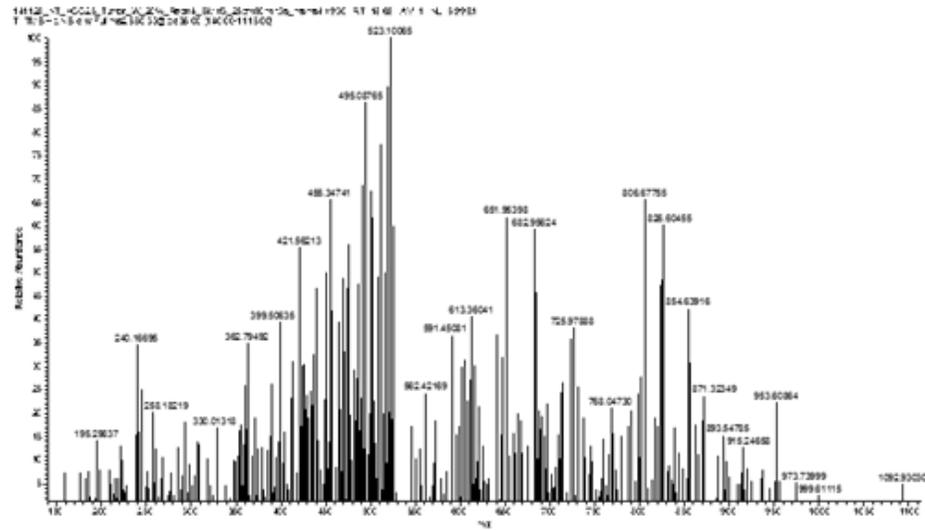
Peptid 5: NVKNGSFVAK



Vergleich der Spektren des Tumorpeptid (links) mit dem des synthetischen Peptids 5 (rechts)

6. Anhang

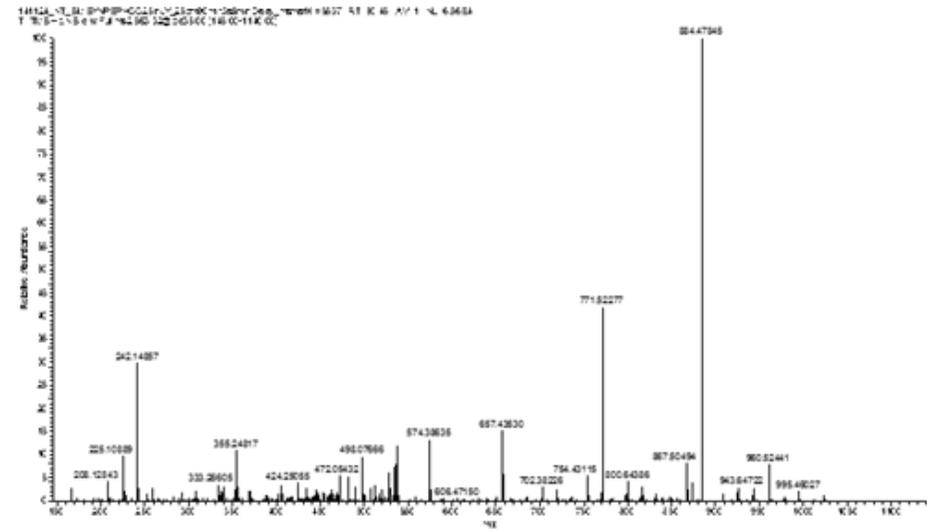
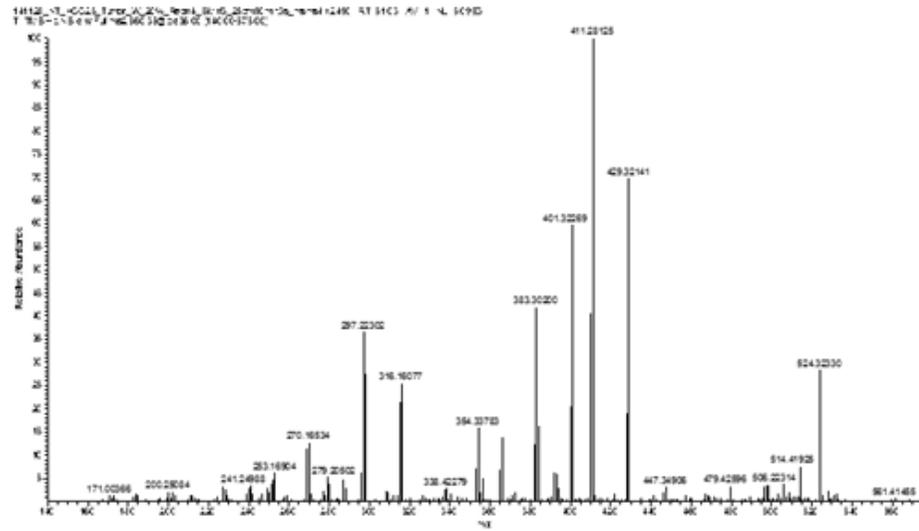
Peptid 8: RVATKGAATPK



Vergleich der Spektren des Tumorpeptid (links) mit dem des synthetischen Peptids 8 (rechts)

6. Anhang

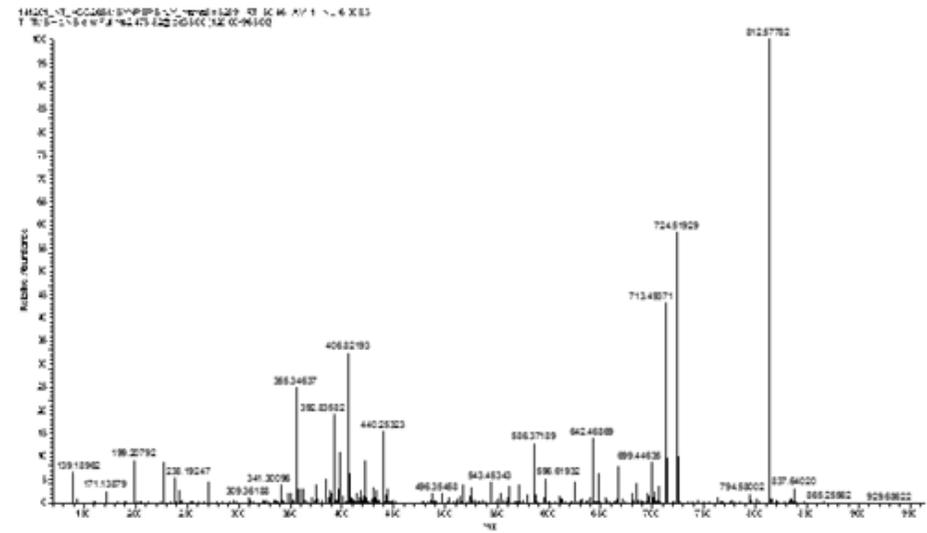
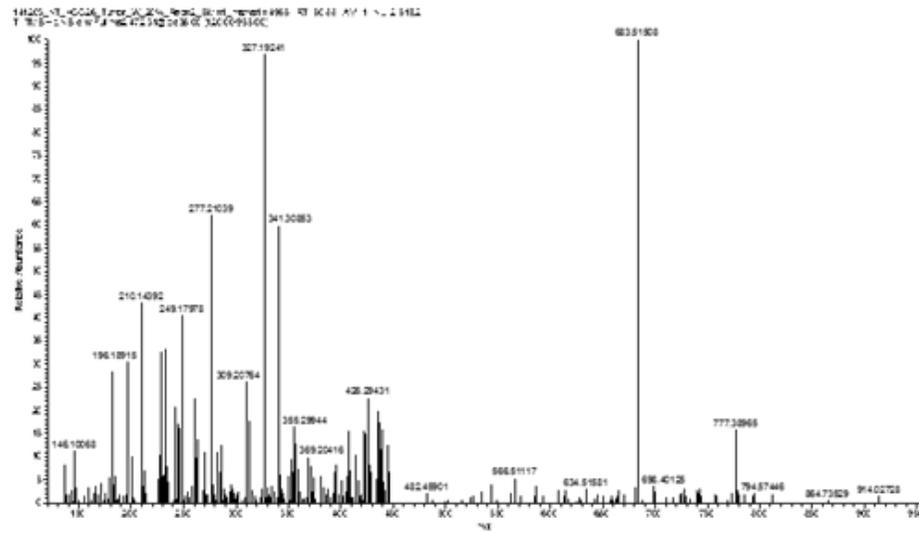
Peptid 6: LQLNVKNGSF



Vergleich der Spektren des Tumorpeptid (links) mit dem des synthetischen Peptids 6 (rechts)

6.2 Vergleich der Spektren von Patient HCC026

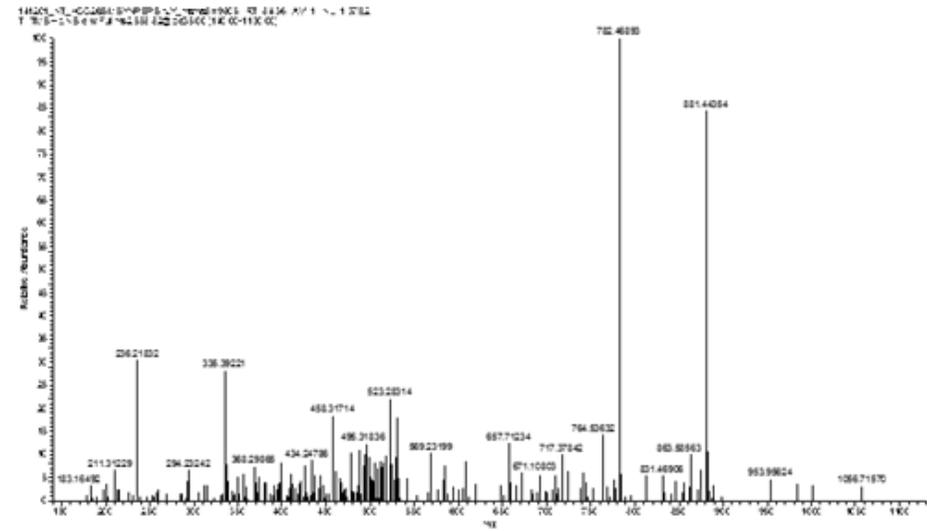
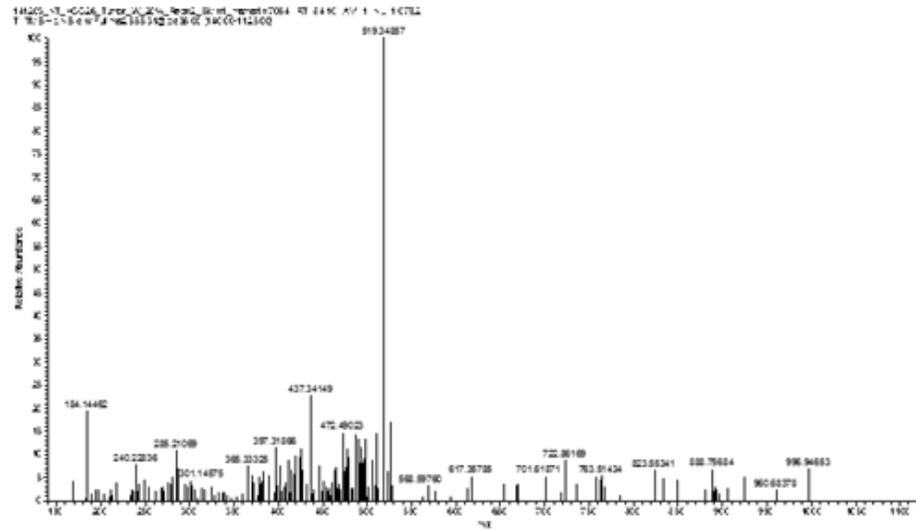
Peptid 3: ILKSTVAVI



Vergleich der Spektren des Tumorpeptid (links) mit dem des synthetischen Peptids 3 (rechts)

6. Anhang

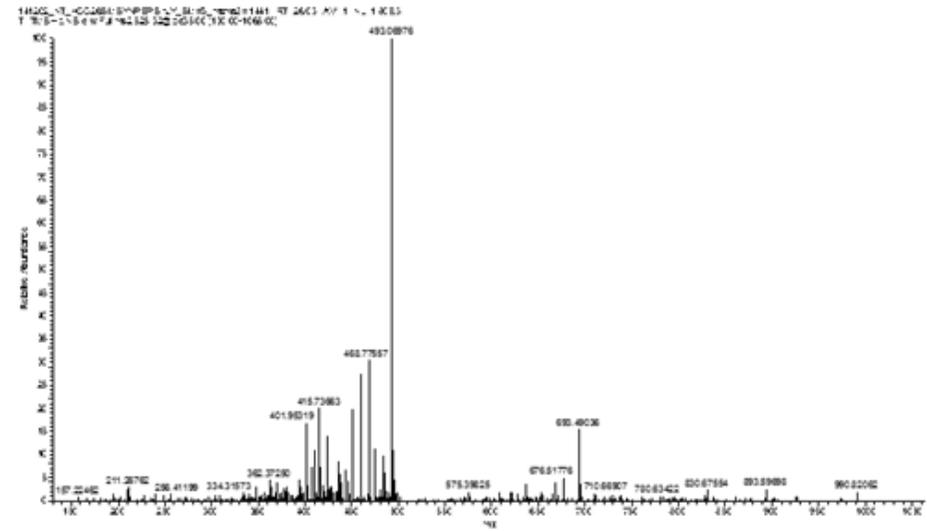
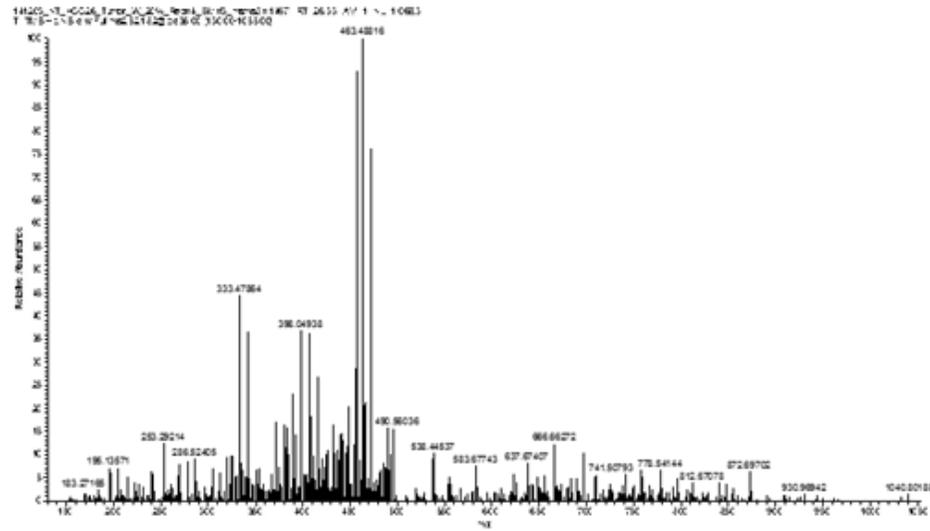
Peptid 15: ELPDEVVPL



Vergleich der Spektren des Tumorpeptid (links) mit dem des synthetischen Peptids 15 (rechts)

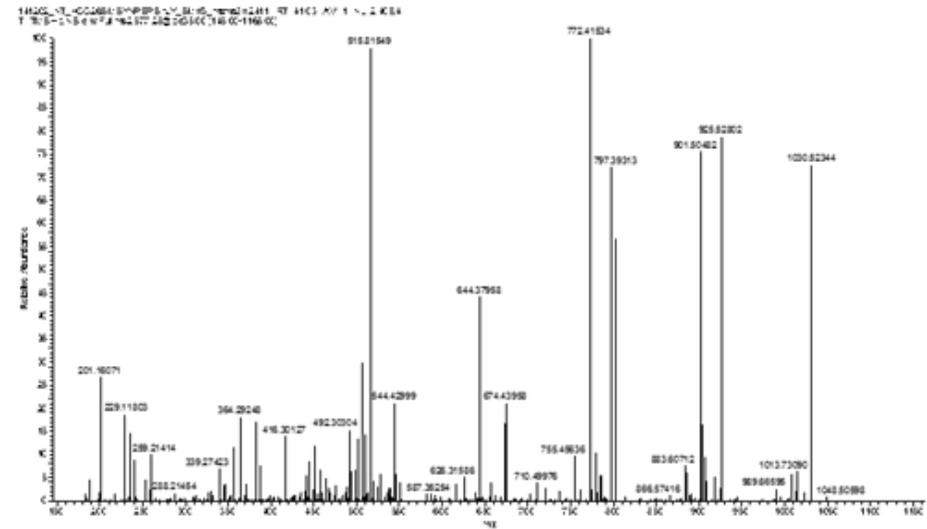
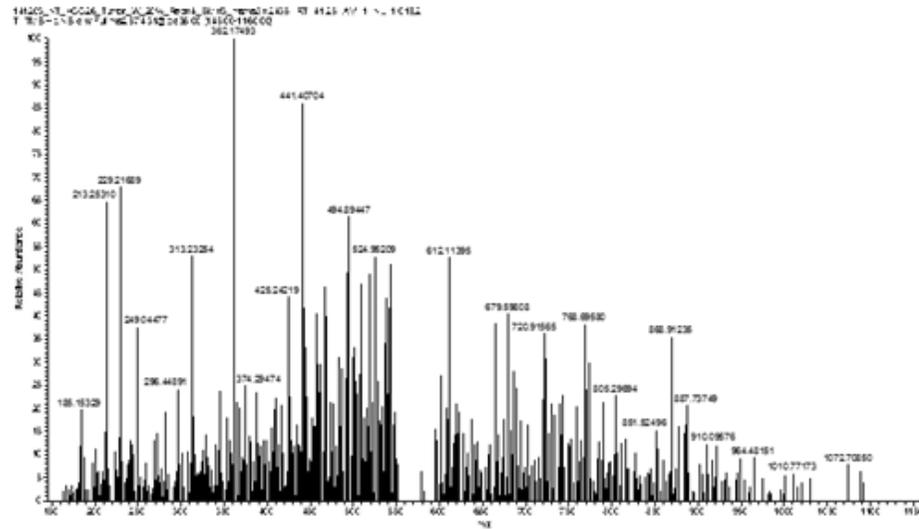
6. Anhang

Peptid 19: ALSPTLLQSL



Vergleich der Spektren des Tumorpeptid (links) mit dem des synthetischen Peptids 19 (rechts)

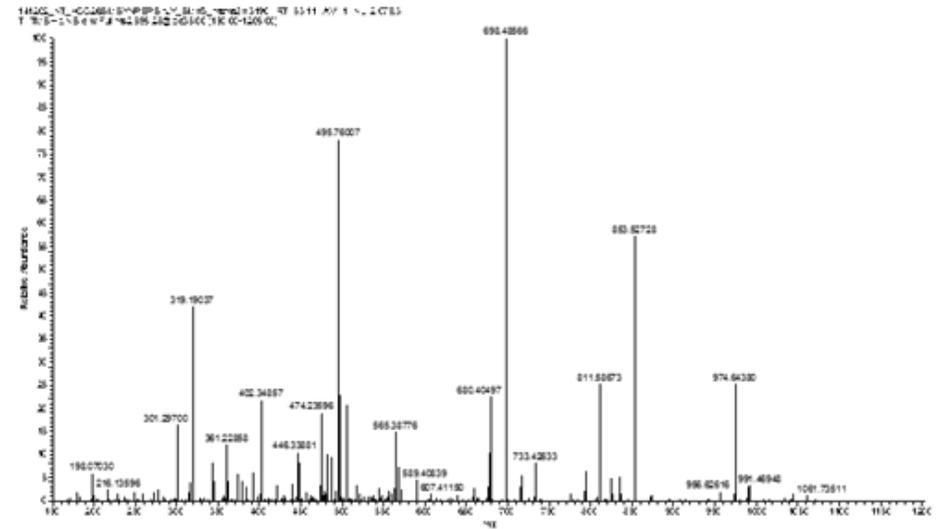
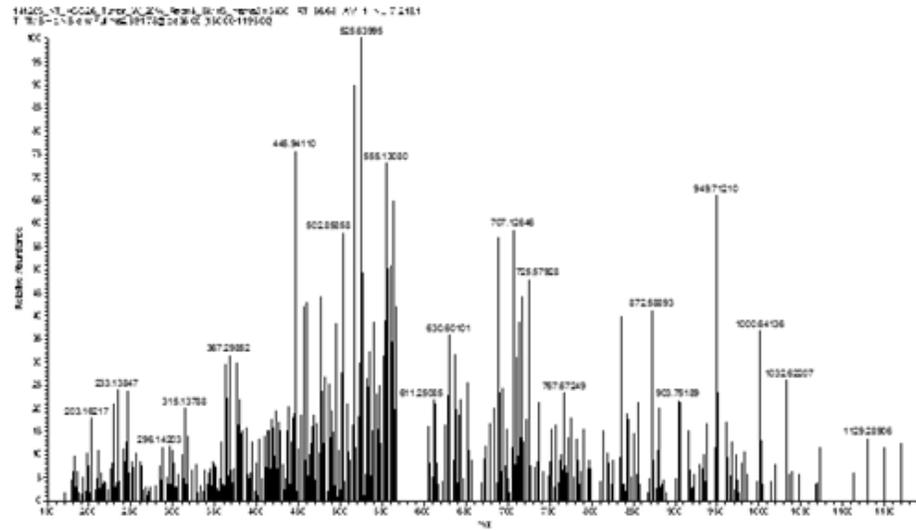
Peptid 17: DIKSEAQEEV



Vergleich der Spektren des Tumorpeptid (links) mit dem des synthetischen Peptids 17 (rechts)

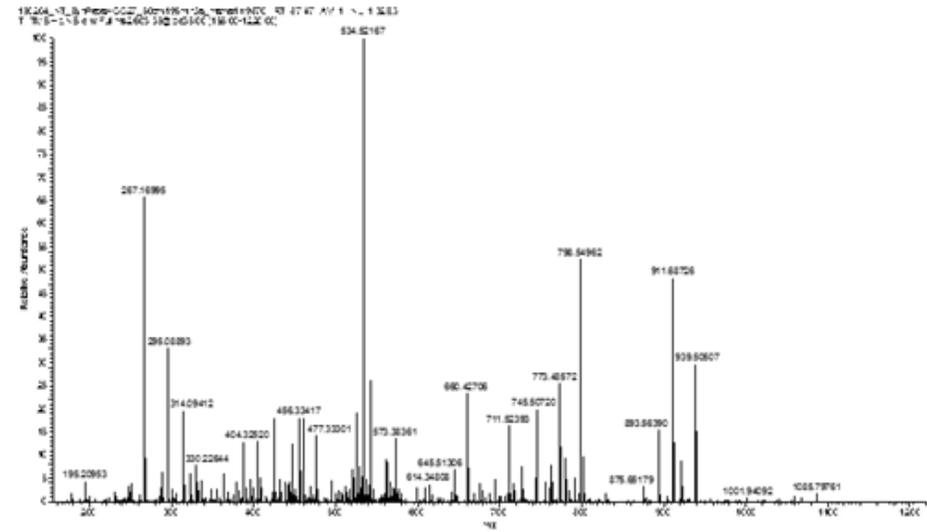
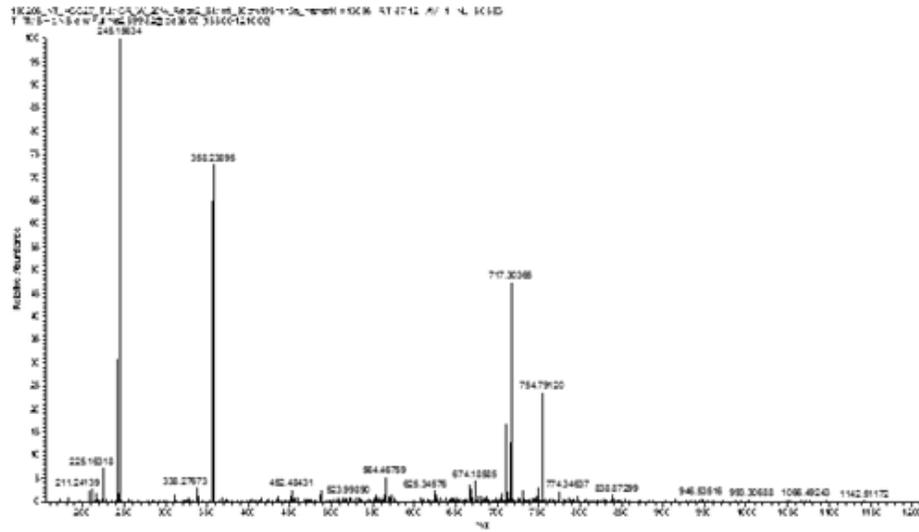
6. Anhang

Peptid 1: QSYLDSGIHY



Vergleich der Spektren des Tumorpeptid (links) mit dem des synthetischen Peptids 1 (rechts)

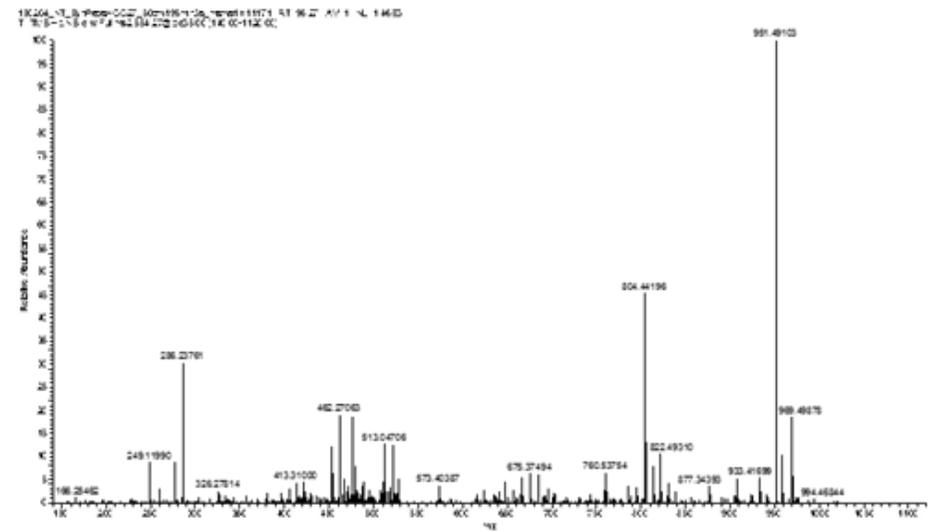
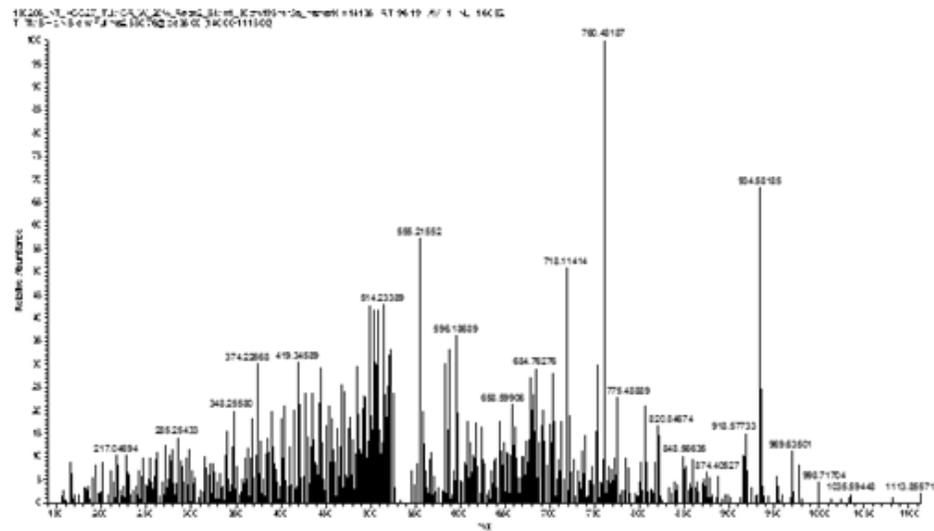
6.3 Vergleich der Spektren von Patient HCC027

Peptid 3: **FLSLHGHK**

Vergleich der Spektren des Tumorpeptid (links) mit dem des synthetischen Peptids 3 (rechts)

6. Anhang

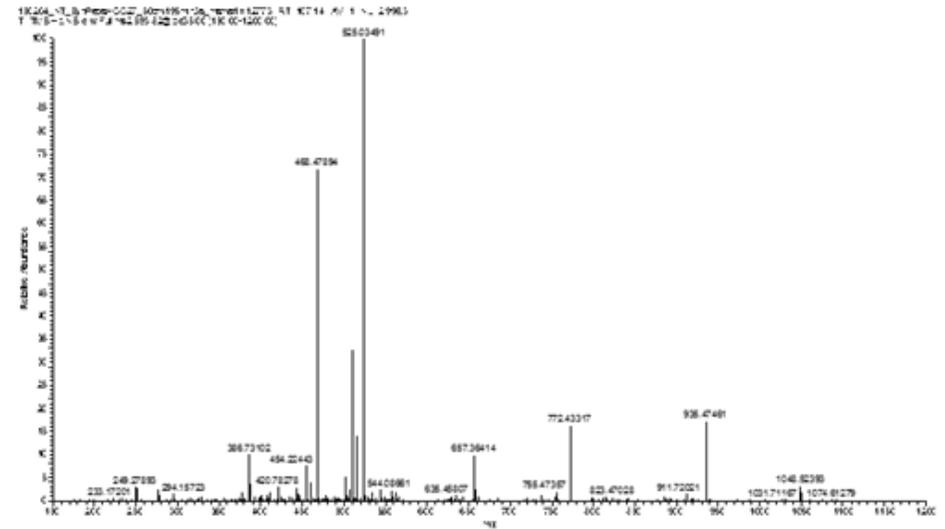
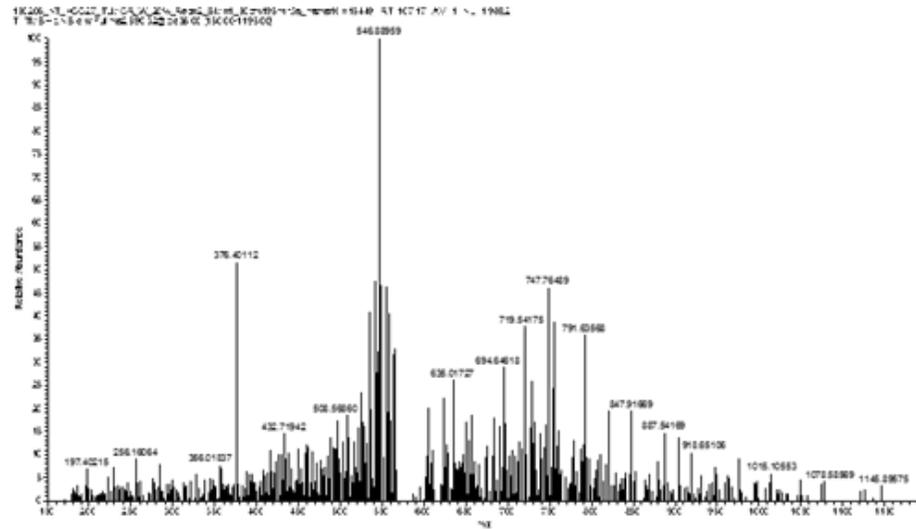
Peptid 15: DITEVPDFSK



Vergleich der Spektren des Tumorpeptid (links) mit dem des synthetischen Peptids 15 (rechts)

6. Anhang

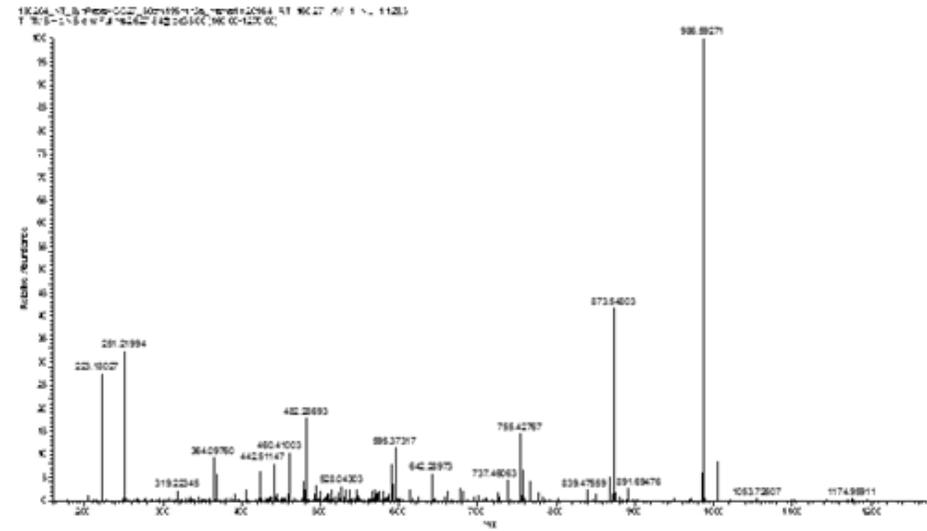
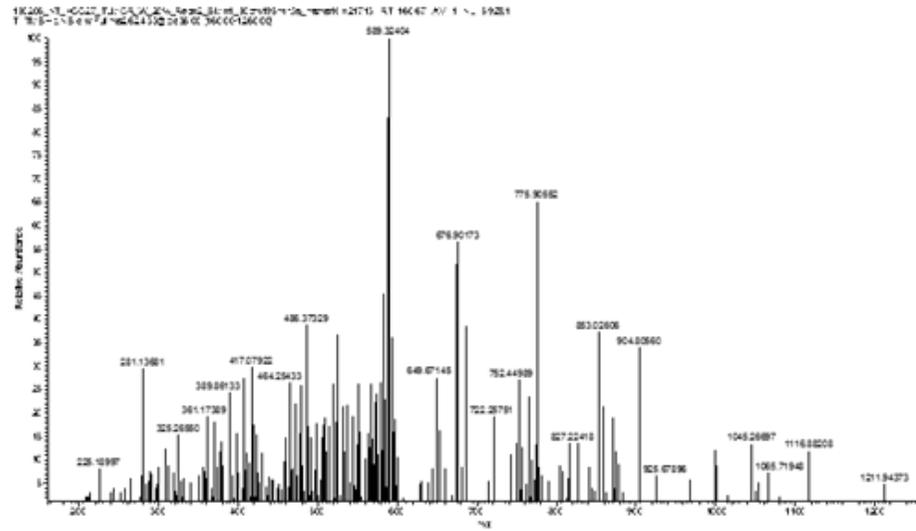
Peptid 5: LYEETGEFL



Vergleich der Spektren des Tumorpeptid (links) mit dem des synthetischen Peptids 5 (rechts)

6. Anhang

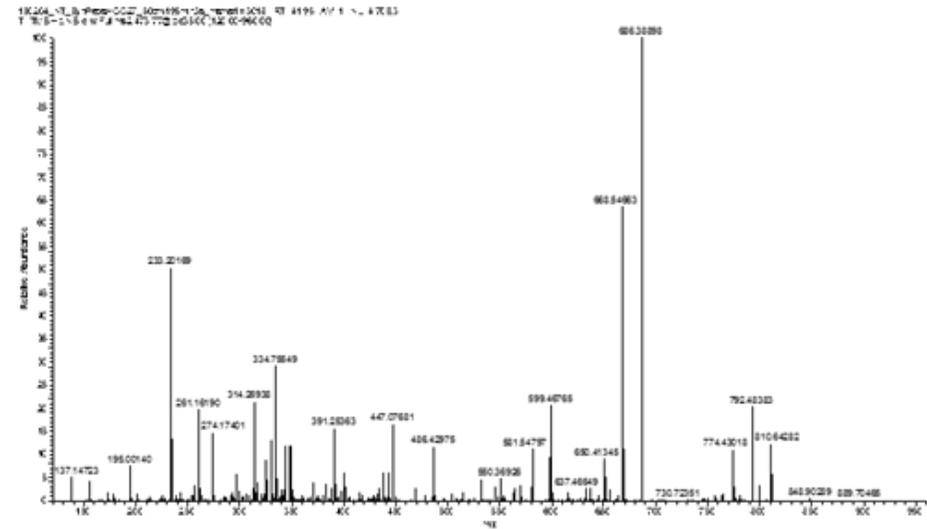
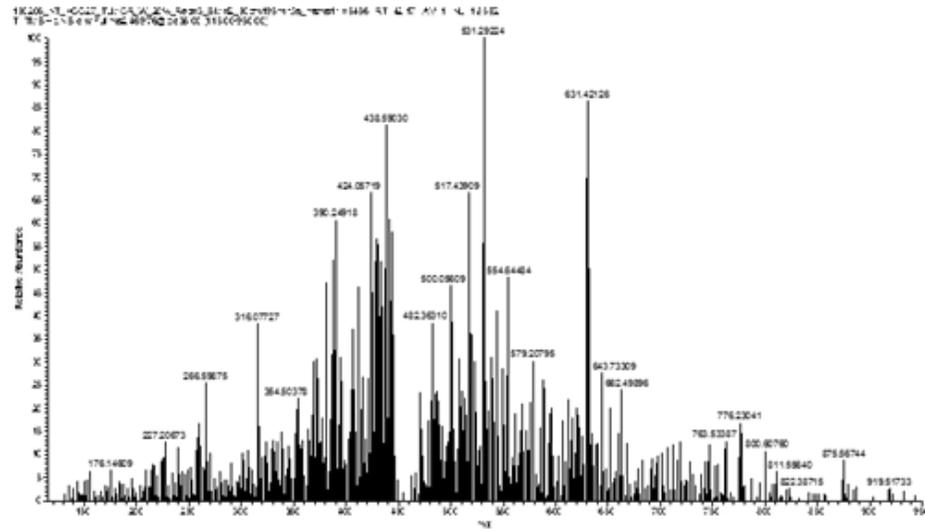
Peptid 7: LYERGEFLPI



Vergleich der Spektren des Tumorpeptid (links) mit dem des synthetischen Peptids 7 (rechts)

6. Anhang

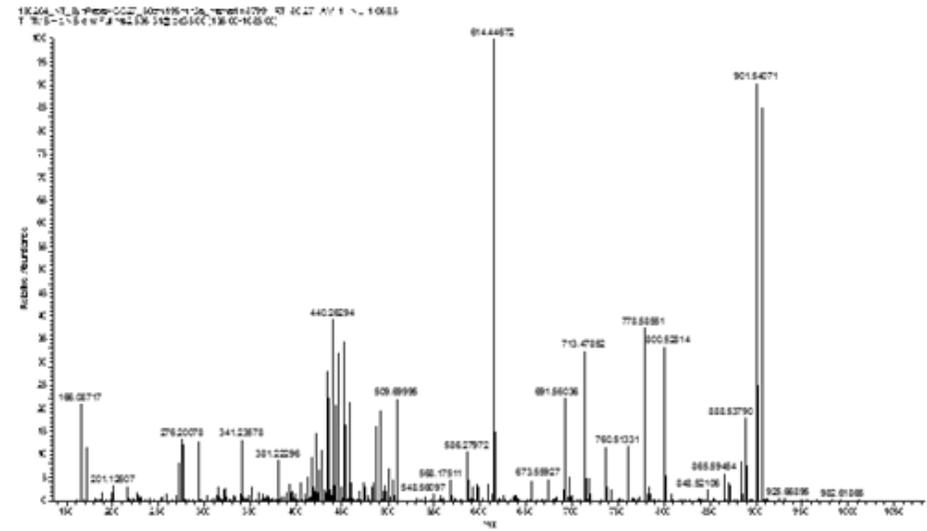
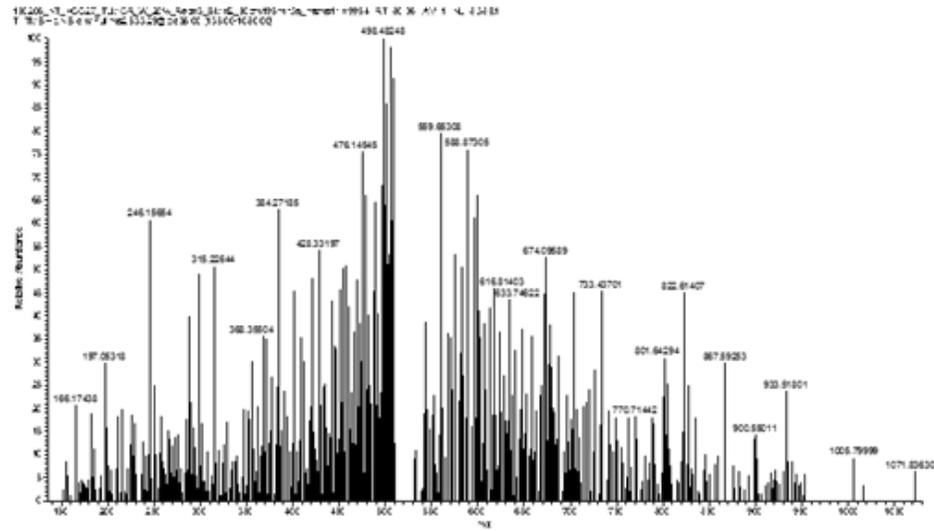
Peptid 16: AVTSVKVSQF



Vergleich der Spektren des Tumorpeptid (links) mit dem des synthetischen Peptids 16 (rechts)

6. Anhang

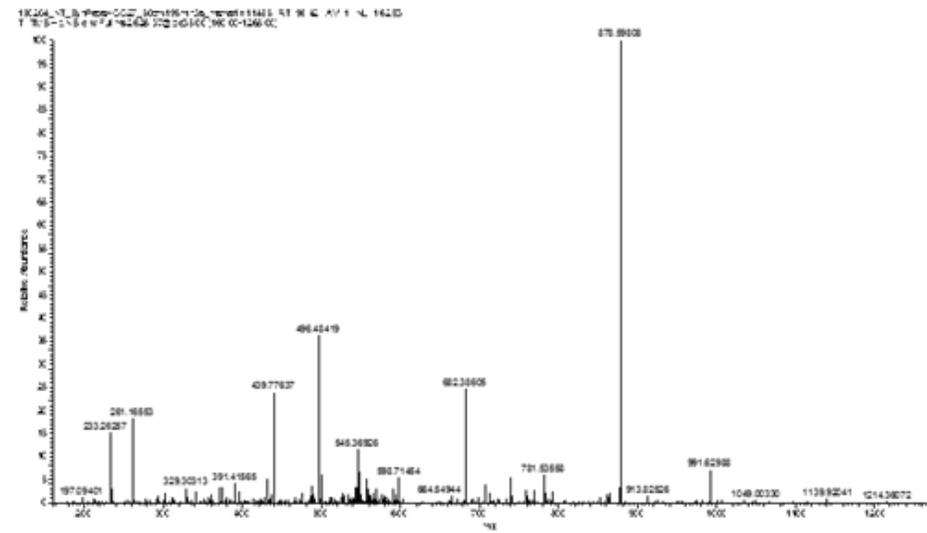
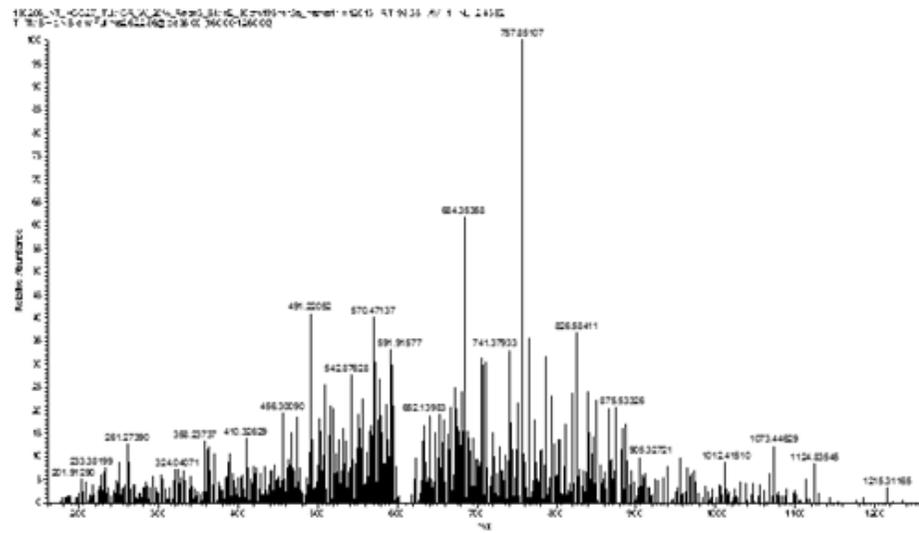
Peptid 4: QLYEETGEF



Vergleich der Spektren des Tumorpeptid (links) mit dem des synthetischen Peptids 4 (rechts)

6. Anhang

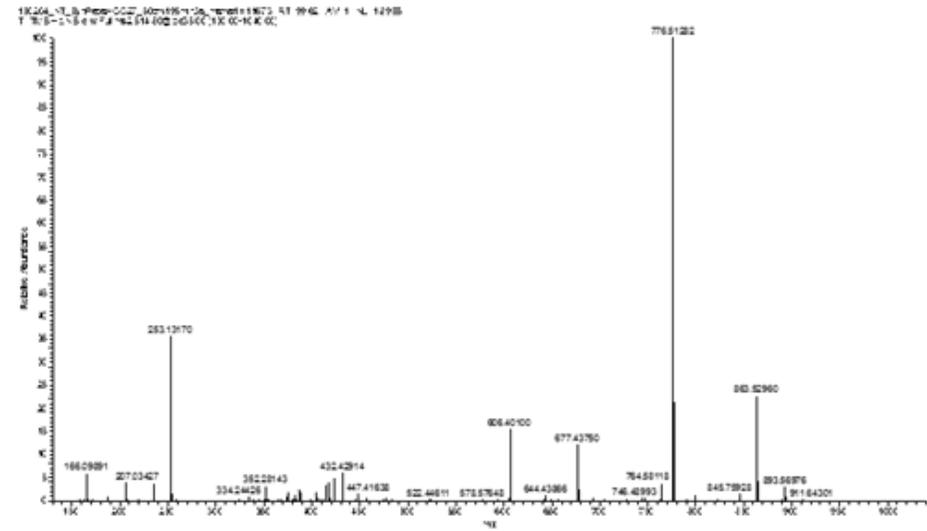
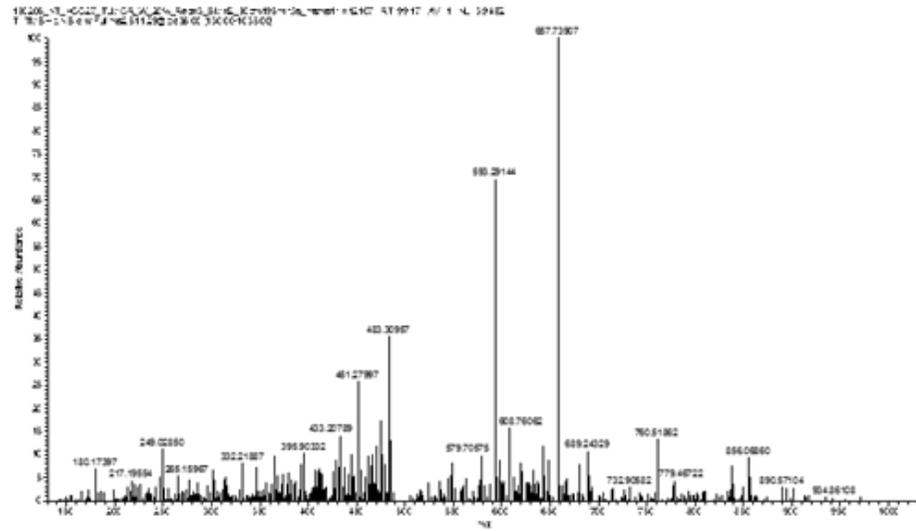
Peptid 2: **FFLSLHGHKL**



Vergleich der Spektren des Tumorpeptid (links) mit dem des synthetischen Peptids 2 (rechts)

6. Anhang

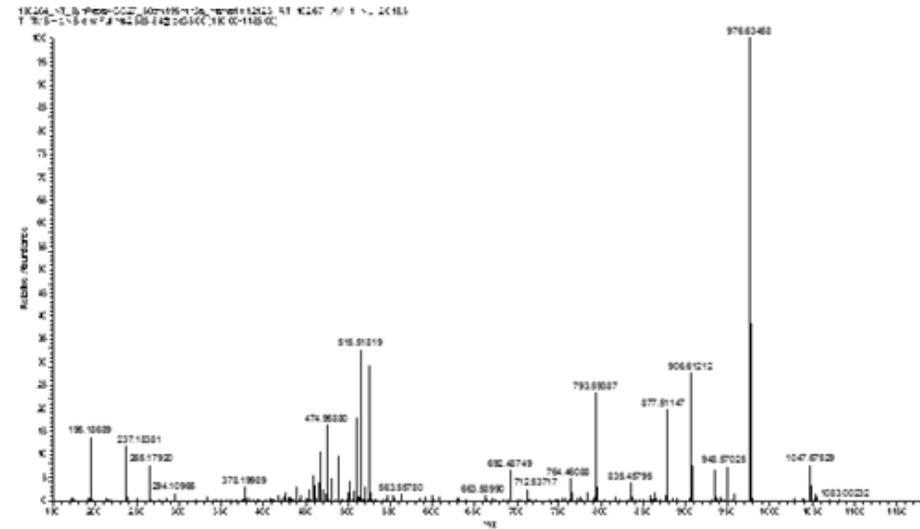
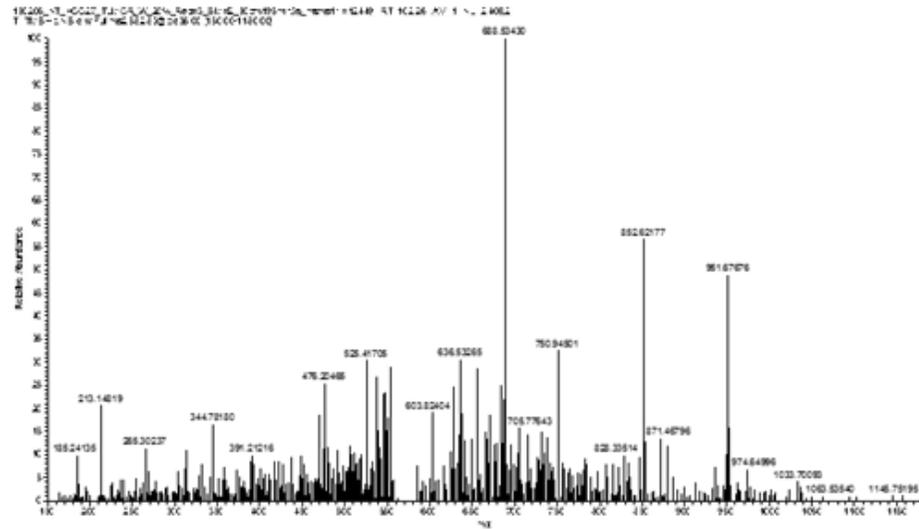
Peptid 12: HRSYIDYLL



Vergleich der Spektren des Tumorpeptid (links) mit dem des synthetischen Peptids 12 (rechts)

6. Anhang

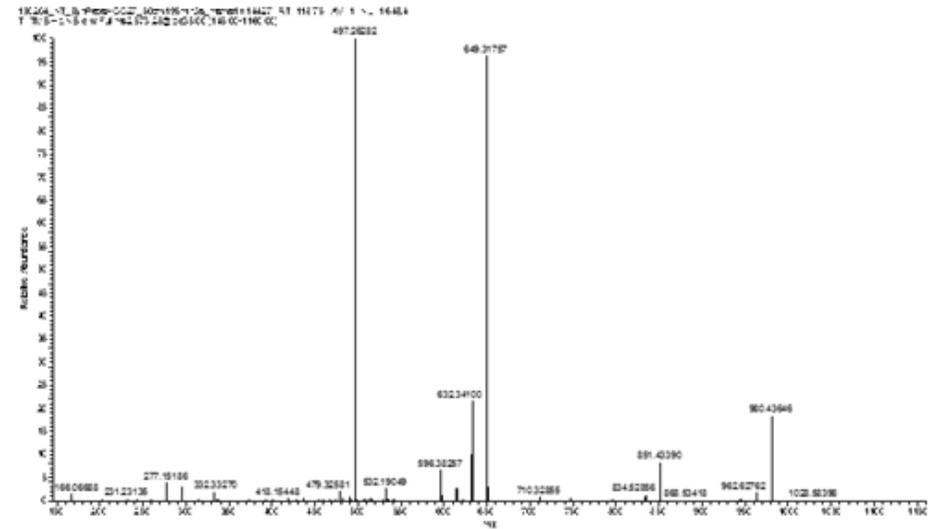
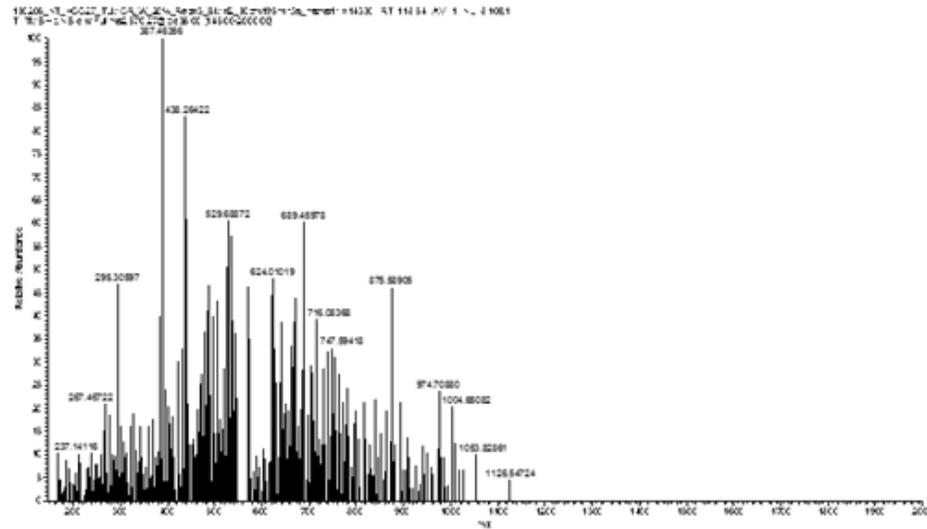
Peptid 14: GEELDPWL



Vergleich der Spektren des Tumorpeptid (links) mit dem des synthetischen Peptids 14 (rechts)

6. Anhang

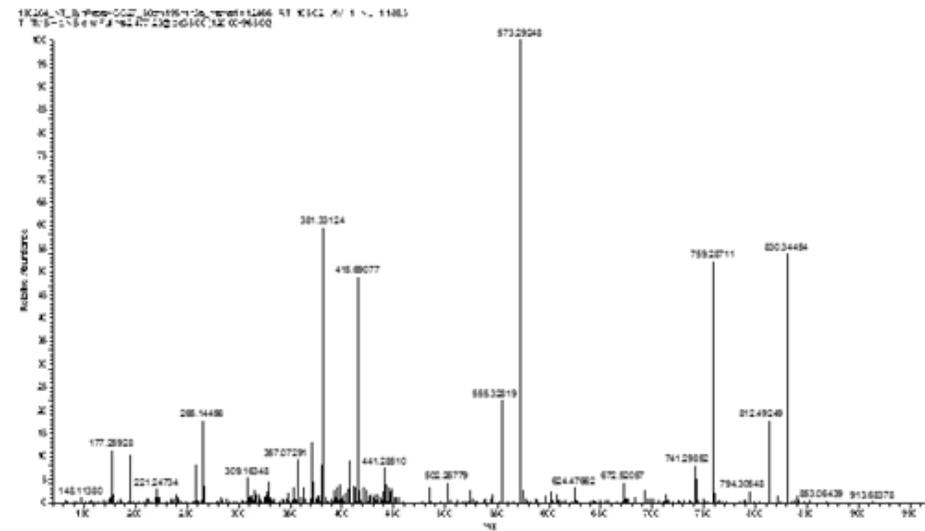
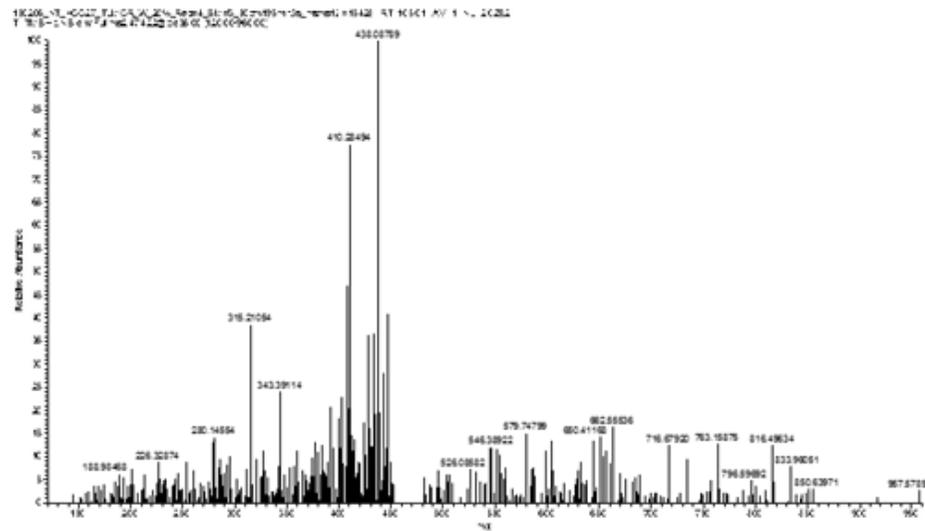
Peptid 10: SYIDYLLLTf



Vergleich der Spektren des Tumorpeptid (links) mit dem des synthetischen Peptids 10 (rechts)

6. Anhang

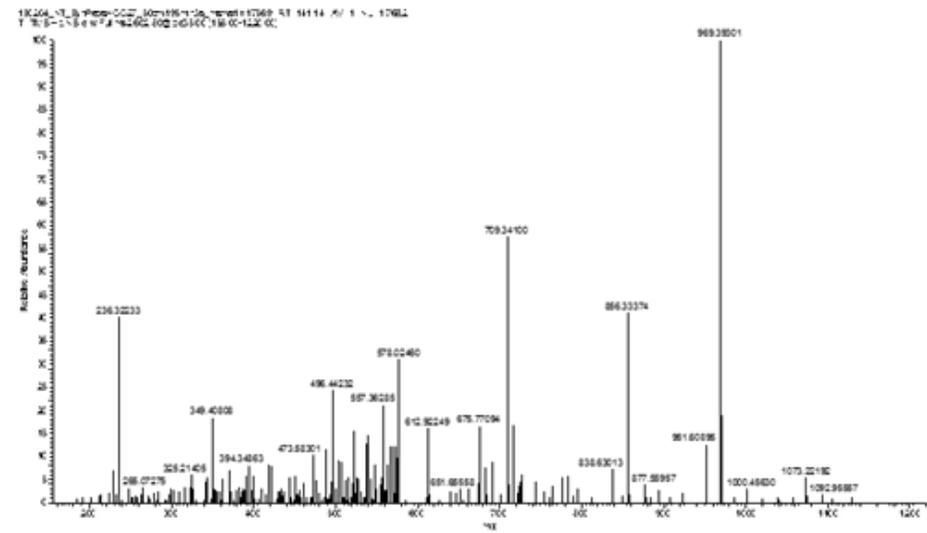
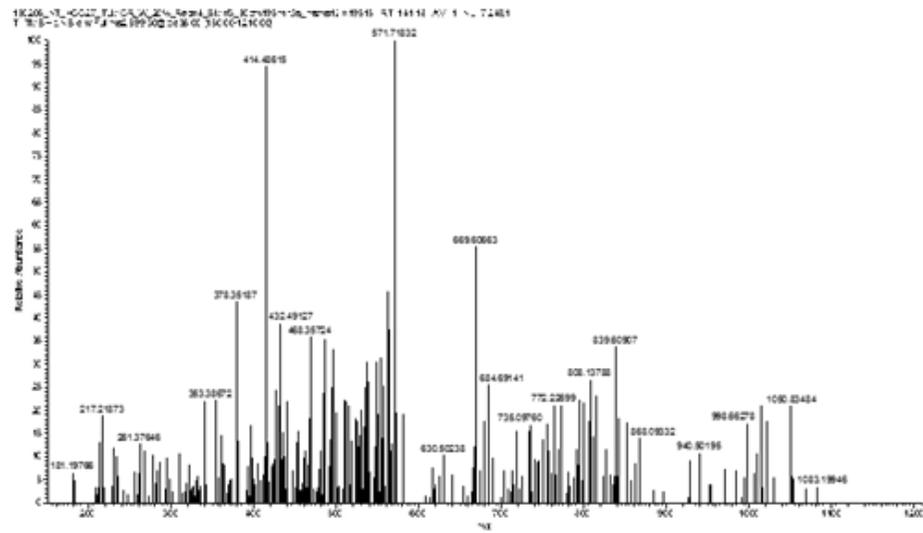
Peptid 1: **EEATAAWAV**



Vergleich der Spektren des Tumorpeptid (links) mit dem des synthetischen Peptids 1 (rechts)

6. Anhang

Peptid 17: NYGTNPVEF



Vergleich der Spektren des Tumorpeptid (links) mit dem des synthetischen Peptids 17 (rechts)

7. Abkürzungsverzeichnis

Bezeichnung	Abkürzung
Adenosintriphosphat	ATP
<i>American Association for the Study of Liver Diseases</i>	AASLD
<i>Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity</i>	ADCC
<i>Barcelona-Clinic Liver Cancer</i>	BCLC
<i>Bi-specific T-Cell Engagers</i>	BiTE
B-Zell akute lymphatische Leukämie	B-ALL
Calnexin	CNX
Calreticulin	CRT
<i>Chimeric Antigen Receptor</i>	CAR
Cholangiozelluläres Karzinom	CCC
<i>Class II Associated li Peptide</i>	CLIP
<i>Complement-Dependent Cytotoxicity</i>	CDC
Computertomographie	CT
<i>Cooperative Oncology Group Performance Status</i>	ECOG
<i>Defective Ribosomal Products</i>	DRiPs
Deutsches Krebsforschungszentrum	DKFZ
Endoplasmatisches Retikulum	ER
<i>ER Aminopeptidase 1/2</i>	ERAP1/2
<i>ER Aminopeptidase Associated with Antigen Processing</i>	ERAAP
<i>Extracted Ion Chromatogram</i>	XIC
<i>Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor</i>	GM-CSF
Hepatozelluläres Karzinom	HCC
<i>Human Leukocyte Antigen</i>	HLA
<i>Interferon - γ</i>	IFN- γ
<i>Invariant Chain</i>	Ii
Isocitratdehydrogenase 1/2	IDH1/2
Kontrastmittel	KM
Kontrastmittelverstärkte Computertomographie	KM-CT
Kontrastmittelverstärkte Magnetresonanztomographie	KM-MRT

7. Abkürzungsverzeichnis

Bezeichnung	Abkürzung
Kontrastmittelverstärkte Ultraschalluntersuchung	KM-US
<i>Ligand Derived Tumor Associated Antigen</i>	LiTAA
<i>Ligand Derived Tumor Associated Peptide</i>	LiTAP
Magnetresonanztomographie	MRT
<i>Major Histocompatibility Complex</i>	MHC
<i>MHC Class II Compartment</i>	MIIC
<i>Nano High Performance Liquid Chromatography</i>	nHPLC
natürliche Killerzellen	NK-Zellen
<i>Next Generation Sequencing</i>	NGS
Normalgewebe	NG
O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase	MGMT
<i>Parts per Million</i>	ppm
<i>Peptide Loading Complex</i>	PLC
<i>Peptide Spectrum Match</i>	PSM
<i>Performance Status</i>	PS
<i>Phosphate Buffered Saline</i>	PBS
<i>Platelet-Derived Growth Factor Receptor</i>	PDGFR
Positronen-Emissions-Tomographie	PET
<i>Prostate Specific Antigen</i>	PSA
<i>Prostatic Acid Phosphatase</i>	PAP
<i>Radiofrequency Ablation</i>	RFA
<i>Renal Cell Carcinoma</i>	RCC
Robert Koch Institut	RKI
<i>Single Ion Monitoring</i>	SIM
<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>	SNP
<i>Total Ion Chromatogram</i>	TIC
transarterielle Chemoembolisation	TACE
<i>Transporter Associated with Antigen Processing</i>	TAP
Trifluoressigsäure	TFA
<i>Tumor Associated Antigen</i>	TAA
<i>Tumor Associated Peptide</i>	TUMAP
<i>Tumor Necrosis Factor - α</i>	TNF- α
Tumorgewebe	TG

7. Abkürzungsverzeichnis

Bezeichnung	Abkürzung
tumorspezifische Antigene	TSA
<i>US Food and Drug Administration</i>	FDA
<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i>	VEGFR
<i>World Health Organisation</i>	WHO
α -Fetoprotein	AFP

8. Publikationen

1: Schuster H, Peper JK, Bösmüller HC, Röhle K, Backert L, Bilich T, Ney B, Löffler MW, Kowalewski DJ, Trautwein N, Rabsteyn A, Engler T, Braun S, Haen SP, Walz JS, Schmid-Horch B, Brucker SY, Wallwiener D, Kohlbacher O, Fend F, Rammensee HG, Stevanović S, Staebler A, Wagner P. The immunopeptidomic landscape of ovarian carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 Nov 14;114(46):E9942-E9951. doi: 10.1073/pnas.1707658114. Epub 2017 Nov 1. PubMed PMID: 29093164; PubMed Central PMCID: PMC5699044.

2: Neerincx A, Hermann C, Antrobus R, van Hateren A, Cao H, Trautwein N, Stevanović S, Elliott T, Deane JE, Boyle LH. TAPBPR bridges UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase 1 onto MHC class I to provide quality control in the antigen presentation pathway. *Elife*. 2017 Apr 20;6. pii: e23049. doi: 10.7554/eLife.23049. PubMed PMID: 28425917; PubMed Central PMCID: PMC5441866.

3: Löffler MW, Chandran PA, Laske K, Schroeder C, Bonzheim I, Walzer M, Hilke FJ, Trautwein N, Kowalewski DJ, Schuster H, Günder M, Carcamo Yañez VA, Mohr C, Sturm M, Nguyen HP, Riess O, Bauer P, Nahnsen S, Nadalin S, Zieker D, Glatzle J, Thiel K, Schneiderhan-Marra N, Clasen S, Bösmüller H, Fend F, Kohlbacher O, Gouttefangeas C, Stevanović S, Königsrainer A, Rammensee HG. Personalized peptide vaccine-induced immune response associated with long-term survival of a metastatic cholangiocarcinoma patient. *J Hepatol*. 2016 Oct;65(4):849-855. doi: 10.1016/j.jhep.2016.06.027. Epub 2016 Jul 7. PubMed PMID: 27397612; PubMed Central PMCID: PMC5756536.

4: Hermann C, van Hateren A, Trautwein N, Neerincx A, Duriez PJ, Stevanović S, Trowsdale J, Deane JE, Elliott T, Boyle LH. TAPBPR alters MHC class I peptide presentation by functioning as a peptide exchange catalyst. *Elife*. 2015 Oct 6;4. pii: e09617. doi: 10.7554/eLife.09617. PubMed PMID: 26439010; PubMed Central PMCID: PMC4718805.

5: Buerger S, Herrmann VL, Mundt S, Trautwein N, Groettrup M, Basler M. The Ubiquitin-like Modifier FAT10 Is Selectively Expressed in Medullary Thymic Epithelial Cells and Modifies T Cell Selection. *J Immunol*. 2015 Nov 1;195(9):4106-16. doi: 10.4049/jimmunol.1500592. Epub 2015 Sep 23. PubMed PMID: 26401002.

8. Publikationen

6: Schumacher T, Bunse L, Pusch S, Sahm F, Wiestler B, Quandt J, Menn O, Osswald M, Oezen I, Ott M, Keil M, Balß J, Rauschenbach K, Grabowska AK, Vogler I, Diekmann J, Trautwein N, Eichmüller SB, Okun J, Stevanović S, Riemer AB, Sahin U, Friese MA, Beckhove P, von Deimling A, Wick W, Platten M. A vaccine targeting mutant IDH1 induces antitumour immunity. *Nature*. 2014 Aug 21;512(7514):324-7. doi: 10.1038/nature13387. Epub 2014 Jun 25. PubMed PMID: 25043048.

7: Trautwein N, Stevanović S. Establishing MHC class I peptide motifs. *Methods Mol Biol*. 2013;960:159-168. doi: 10.1007/978-1-62703-218-6_13. PubMed PMID: 23329486.

8: Neidert MC, Schoor O, Trautwein C, Trautwein N, Christ L, Melms A, Honegger J, Rammensee HG, Herold-Mende C, Dietrich PY, Stevanović S. Natural HLA class I ligands from glioblastoma: extending the options for immunotherapy. *J Neurooncol*. 2013 Feb;111(3):285-94. doi: 10.1007/s11060-012-1028-8. Epub 2012 Dec 23. PubMed PMID: 23263746.

9. Literaturverzeichnis

1. Snell, G.D., *Antigenic Differences between the Sperm of Different Inbred Strains of Mice*. Science, 1944. **100**(2595): p. 272-3.
2. Horton, R., L. Wilming, V. Rand, R.C. Lovering, E.A. Bruford, V.K. Khodiyar, M.J. Lush, S. Povey, C.C. Talbot, Jr., M.W. Wright, H.M. Wain, J. Trowsdale, A. Ziegler, and S. Beck, *Gene map of the extended human MHC*. Nat Rev Genet, 2004. **5**(12): p. 889-99.
3. Gruen, J.R. and S.M. Weissman, *Evolving views of the major histocompatibility complex*. Blood, 1997. **90**(11): p. 4252-65.
4. Stephens, R., R. Horton, S. Humphray, L. Rowen, J. Trowsdale, and S. Beck, *Gene organisation, sequence variation and isochore structure at the centromeric boundary of the human MHC*. J Mol Biol, 1999. **291**(4): p. 789-99.
5. Bjorkman, P.J. and P. Parham, *Structure, function, and diversity of class I major histocompatibility complex molecules*. Annu Rev Biochem, 1990. **59**: p. 253-88.
6. Beck, S. and J. Trowsdale, *Sequence organisation of the class II region of the human MHC*. Immunol Rev, 1999. **167**: p. 201-10.
7. Beck, S., M. Belich, U. Gruneberg, A. Jackson, A. Kelly, P. Sanseau, F. Sanderson, J. Trowsdale, and M. Van Ham, *Organisation and functions of class II genes and molecules*. DNA Seq, 1996. **7**(1): p. 21-3.
8. Carrington, M., M. Colonna, T. Spies, J.C. Stephens, and D.L. Mann, *Haplotypic variation of the transporter associated with antigen processing (TAP) genes and their extension of HLA class II region haplotypes*. Immunogenetics, 1993. **37**(4): p. 266-73.
9. Balkwill, F., *TNF-alpha in promotion and progression of cancer*. Cancer Metastasis Rev, 2006. **25**(3): p. 409-16.
10. Parham, P. and T. Ohta, *Population biology of antigen presentation by MHC class I molecules*. Science, 1996. **272**(5258): p. 67-74.
11. Robinson, J., J.A. Halliwell, H. McWilliam, R. Lopez, P. Parham, and S.G. Marsh, *The IMGT/HLA database*. Nucleic Acids Res, 2013. **41**(Database issue): p. D1222-7.
12. Rock, K.L., I.A. York, T. Saric, and A.L. Goldberg, *Protein degradation and the generation of MHC class I-presented peptides*. Adv Immunol, 2002. **80**: p. 1-70.

9. Literaturverzeichnis

13. Neefjes, J., M.L. Jongsma, P. Paul, and O. Bakke, *Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(12): p. 823-36.
14. Borghans, J.A., J.B. Beltman, and R.J. De Boer, *MHC polymorphism under host-pathogen coevolution*. Immunogenetics, 2004. **55**(11): p. 732-9.
15. Rene, C., C. Lozano, and J.F. Eliaou, *Expression of classical HLA class I molecules: regulation and clinical impacts: Julia Bodmer Award Review 2015*. HLA, 2016. **87**(5): p. 338-49.
16. Touraine, J.L., H. Betuel, C. Pouteil-Noble, and C. Royo, *HLA class II antigens: structure, function, and expression in immunodeficiencies, autoimmune diseases, and allograft rejection*. Adv Nephrol Necker Hosp, 1989. **18**: p. 325-34.
17. den Haan, J.M., R. Arens, and M.C. van Zelm, *The activation of the adaptive immune system: cross-talk between antigen-presenting cells, T cells and B cells*. Immunol Lett, 2014. **162**(2 Pt B): p. 103-12.
18. Kambayashi, T. and T.M. Laufer, *Atypical MHC class II-expressing antigen-presenting cells: can anything replace a dendritic cell?* Nat Rev Immunol, 2014. **14**(11): p. 719-30.
19. Bjorkman, P.J., M.A. Saper, B. Samraoui, W.S. Bennett, J.L. Strominger, and D.C. Wiley, *Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2*. Nature, 1987. **329**(6139): p. 506-12.
20. Bernier, G.M., *beta 2-Microglobulin: structure, function and significance*. Vox Sang, 1980. **38**(6): p. 323-7.
21. Salter, R.D., R.J. Benjamin, P.K. Wesley, S.E. Buxton, T.P. Garrett, C. Clayberger, A.M. Krensky, A.M. Norment, D.R. Littman, and P. Parham, *A binding site for the T-cell co-receptor CD8 on the alpha 3 domain of HLA-A2*. Nature, 1990. **345**(6270): p. 41-6.
22. Bouvier, M. and D.C. Wiley, *Importance of peptide amino and carboxyl termini to the stability of MHC class I molecules*. Science, 1994. **265**(5170): p. 398-402.
23. Rammensee, H.G., K. Falk, and O. Rotzschke, *MHC molecules as peptide receptors*. Curr Opin Immunol, 1993. **5**(1): p. 35-44.
24. Ruppert, J., R.T. Kubo, J. Sidney, H.M. Grey, and A. Sette, *Class I MHC-peptide interaction: structural and functional aspects*. Behring Inst Mitt, 1994(94): p. 48-60.

9. Literaturverzeichnis

25. Falk, K., O. Rotzschke, S. Stevanović, G. Jung, and H.G. Rammensee, *Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules*. *Nature*, 1991. **351**(6324): p. 290-6.
26. Rammensee, H.G., T. Friede, and S. Stevanović, *MHC ligands and peptide motifs: first listing*. *Immunogenetics*, 1995. **41**(4): p. 178-228.
27. Ruppert, J., J. Sidney, E. Celis, R.T. Kubo, H.M. Grey, and A. Sette, *Prominent role of secondary anchor residues in peptide binding to HLA-A2.1 molecules*. *Cell*, 1993. **74**(5): p. 929-37.
28. Rammensee, H., J. Bachmann, N.P. Emmerich, O.A. Bachor, and S. Stevanović, *SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs*. *Immunogenetics*, 1999. **50**(3-4): p. 213-9.
29. Boniface, J.J. and M.M. Davis, *T-cell recognition of antigen. A process controlled by transient intermolecular interactions*. *Ann N Y Acad Sci*, 1995. **766**: p. 62-9.
30. Wolfel, T., J. Schneider, K.H. Meyer Zum Buschenfelde, H.G. Rammensee, O. Rotzschke, and K. Falk, *Isolation of naturally processed peptides recognized by cytolytic T lymphocytes (CTL) on human melanoma cells in association with HLA-A2.1*. *Int J Cancer*, 1994. **57**(3): p. 413-8.
31. Kagi, D., B. Ledermann, K. Burki, R.M. Zinkernagel, and H. Hengartner, *Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity and their role in immunological protection and pathogenesis in vivo*. *Annu Rev Immunol*, 1996. **14**: p. 207-32.
32. Smyth, M.J., J.M. Kelly, V.R. Sutton, J.E. Davis, K.A. Browne, T.J. Sayers, and J.A. Trapani, *Unlocking the secrets of cytotoxic granule proteins*. *J Leukoc Biol*, 2001. **70**(1): p. 18-29.
33. Walter, S., T. Weinschenk, A. Stenzl, R. Zdrojowy, A. Pluzanska, C. Szczylik, M. Staehler, W. Brugger, P.Y. Dietrich, R. Mendrzyk, N. Hilf, O. Schoor, J. Fritsche, A. Mahr, D. Maurer, V. Vass, C. Trautwein, P. Lewandrowski, C. Flohr, H. Pohla, J.J. Stanczak, V. Bronte, S. Mandruzzato, T. Biedermann, G. Pawelec, E. Derhovanessian, H. Yamagishi, T. Miki, F. Hongo, N. Takaha, K. Hirakawa, H. Tanaka, S. Stevanović, J. Frisch, A. Mayer-Mokler, A. Kirner, H.G. Rammensee, C. Reinhardt, and H. Singh-Jasuja, *Multipeptide immune response to cancer vaccine IMA901 after single-dose cyclophosphamide associates with longer patient survival*. *Nat Med*, 2012. **18**(8): p. 1254-61.
34. Ott, P.A., Z. Hu, D.B. Keskin, S.A. Shukla, J. Sun, D.J. Bozym, W. Zhang, A. Luoma, A. Giobbie-Hurder, L. Peter, C. Chen, O. Olive, T.A. Carter, S. Li, D.J. Lieb, T. Eisenhaure, E. Gjini, J. Stevens, W.J. Lane, I. Javeri, K. Nellaippan, A.M. Salazar, H. Daley, M. Seaman, E.I. Buchbinder, C.H. Yoon, M. Harden, N. Lennon, S. Gabriel, S.J. Rodig, D.H. Barouch, J.C. Aster, G. Getz, K. Wucherpennig, D. Neuberg, J. Ritz, E.S. Lander, E.F. Fritsch, N. Hacohen, and C.J. Wu, *An immunogenic personal neoantigen vaccine for patients with melanoma*. *Nature*, 2017. **547**(7662): p. 217-221.

9. Literaturverzeichnis

35. Bassani-Sternberg, M., E. Braunlein, R. Klar, T. Engleitner, P. Sinitcyn, S. Audehm, M. Straub, J. Weber, J. Slotta-Huspenina, K. Specht, M.E. Martignoni, A. Werner, R. Hein, H.B. D, C. Peschel, R. Rad, J. Cox, M. Mann, and A.M. Krackhardt, *Direct identification of clinically relevant neoepitopes presented on native human melanoma tissue by mass spectrometry*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 13404.
36. Blum, J.S., P.A. Wearsch, and P. Cresswell, *Pathways of antigen processing*. Annu Rev Immunol, 2013. **31**: p. 443-73.
37. Bjorkman, P.J., *Not second class: the first class II MHC crystal structure*. J Immunol, 2015. **194**(1): p. 3-4.
38. Stern, L.J., J.H. Brown, T.S. Jardetzky, J.C. Gorga, R.G. Urban, J.L. Strominger, and D.C. Wiley, *Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide*. Nature, 1994. **368**(6468): p. 215-21.
39. Rammensee, H.G., *Chemistry of peptides associated with MHC class I and class II molecules*. Curr Opin Immunol, 1995. **7**(1): p. 85-96.
40. Chicz, R.M., R.G. Urban, J.C. Gorga, D.A. Vignali, W.S. Lane, and J.L. Strominger, *Specificity and promiscuity among naturally processed peptides bound to HLA-DR alleles*. J Exp Med, 1993. **178**(1): p. 27-47.
41. Hammer, J., P. Valsasini, K. Tolba, D. Bolin, J. Higelin, B. Takacs, and F. Sinigaglia, *Promiscuous and allele-specific anchors in HLA-DR-binding peptides*. Cell, 1993. **74**(1): p. 197-203.
42. ten Broeke, T., R. Wubbolts, and W. Stoorvogel, *MHC class II antigen presentation by dendritic cells regulated through endosomal sorting*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013. **5**(12): p. a016873.
43. Unanue, E.R., V. Turk, and J. Neefjes, *Variations in MHC Class II Antigen Processing and Presentation in Health and Disease*. Annu Rev Immunol, 2016. **34**: p. 265-97.
44. Curotto de Lafaille, M.A. and J.J. Lafaille, *CD4(+) regulatory T cells in autoimmunity and allergy*. Curr Opin Immunol, 2002. **14**(6): p. 771-8.
45. York, I.A. and K.L. Rock, *Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex*. Annu Rev Immunol, 1996. **14**: p. 369-96.
46. Krensky, A.M., *The HLA system, antigen processing and presentation*. Kidney Int Suppl, 1997. **58**: p. S2-7.

9. Literaturverzeichnis

47. Monaco, J.J., *Pathways for the processing and presentation of antigens to T cells*. J Leukoc Biol, 1995. **57**(4): p. 543-7.
48. Finley, D., *Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome*. Annu Rev Biochem, 2009. **78**: p. 477-513.
49. Belich, M.P. and J. Trowsdale, *Proteasome and class I antigen processing and presentation*. Mol Biol Rep, 1995. **21**(1): p. 53-6.
50. Inobe, T. and A. Matouschek, *Paradigms of protein degradation by the proteasome*. Curr Opin Struct Biol, 2014. **24**: p. 156-64.
51. Groll, M., W. Heinemeyer, S. Jager, T. Ullrich, M. Bochtler, D.H. Wolf, and R. Huber, *The catalytic sites of 20S proteasomes and their role in subunit maturation: a mutational and crystallographic study*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(20): p. 10976-83.
52. Van den Eynde, B.J. and S. Morel, *Differential processing of class-I-restricted epitopes by the standard proteasome and the immunoproteasome*. Curr Opin Immunol, 2001. **13**(2): p. 147-53.
53. Hammer, G.E., T. Kanaseki, and N. Shastri, *The final touches make perfect the peptide-MHC class I repertoire*. Immunity, 2007. **26**(4): p. 397-406.
54. Stoltze, L., M. Schirle, G. Schwarz, C. Schroter, M.W. Thompson, L.B. Hersh, H. Kalbacher, S. Stevanović, H.G. Rammensee, and H. Schild, *Two new proteases in the MHC class I processing pathway*. Nat Immunol, 2000. **1**(5): p. 413-8.
55. Reits, E., J. Neijssen, C. Herberts, W. Benckhuijsen, L. Janssen, J.W. Drijfhout, and J. Neefjes, *A major role for TPP1 in trimming proteasomal degradation products for MHC class I antigen presentation*. Immunity, 2004. **20**(4): p. 495-506.
56. Mester, G., V. Hoffmann, and S. Stevanović, *Insights into MHC class I antigen processing gained from large-scale analysis of class I ligands*. Cell Mol Life Sci, 2011. **68**(9): p. 1521-32.
57. Koopmann, J.O., M. Post, J.J. Neefjes, G.J. Hammerling, and F. Momburg, *Translocation of long peptides by transporters associated with antigen processing (TAP)*. Eur J Immunol, 1996. **26**(8): p. 1720-8.
58. van Endert, P.M., D. Riganelli, G. Greco, K. Fleischhauer, J. Sidney, A. Sette, and J.F. Bach, *The peptide-binding motif for the human transporter associated with antigen processing*. J Exp Med, 1995. **182**(6): p. 1883-95.

9. Literaturverzeichnis

59. Dick, T.P., N. Bangia, D.R. Peaper, and P. Cresswell, *Disulfide bond isomerization and the assembly of MHC class I-peptide complexes*. *Immunity*, 2002. **16**(1): p. 87-98.
60. Cresswell, P., M.J. Androlewicz, and B. Ortman, *Assembly and transport of class I MHC-peptide complexes*. *Ciba Found Symp*, 1994. **187**: p. 150-62; discussion 162-9.
61. Qian, S.B., E. Reits, J. Neefjes, J.M. Deslich, J.R. Bennink, and J.W. Yewdell, *Tight linkage between translation and MHC class I peptide ligand generation implies specialized antigen processing for defective ribosomal products*. *J Immunol*, 2006. **177**(1): p. 227-33.
62. Joffre, O.P., E. Segura, A. Savina, and S. Amigorena, *Cross-presentation by dendritic cells*. *Nat Rev Immunol*, 2012. **12**(8): p. 557-69.
63. Ramirez, M.C. and L.J. Sigal, *The multiple routes of MHC-I cross-presentation*. *Trends Microbiol*, 2004. **12**(5): p. 204-7.
64. Rock, K.L. and L. Shen, *Cross-presentation: underlying mechanisms and role in immune surveillance*. *Immunol Rev*, 2005. **207**: p. 166-83.
65. Wolf, P.R. and H.L. Ploegh, *How MHC class II molecules acquire peptide cargo: biosynthesis and trafficking through the endocytic pathway*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1995. **11**: p. 267-306.
66. Cresswell, P., *Assembly, transport, and function of MHC class II molecules*. *Annu Rev Immunol*, 1994. **12**: p. 259-93.
67. Guce, A.I., S.E. Mortimer, T. Yoon, C.A. Painter, W. Jiang, E.D. Mellins, and L.J. Stern, *HLA-DO acts as a substrate mimic to inhibit HLA-DM by a competitive mechanism*. *Nat Struct Mol Biol*, 2013. **20**(1): p. 90-8.
68. Dengjel, J., O. Schoor, R. Fischer, M. Reich, M. Kraus, M. Muller, K. Kreymborg, F. Altenberend, J. Brandenburg, H. Kalbacher, R. Brock, C. Driessen, H.G. Rammensee, and S. Stevanović, *Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(22): p. 7922-7.
69. Roche, P.A. and K. Furuta, *The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation*. *Nat Rev Immunol*, 2015. **15**(4): p. 203-16.
70. Chen, X. and P.E. Jensen, *The role of B lymphocytes as antigen-presenting cells*. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2008. **56**(2): p. 77-83.
71. Nutt, S.L., P.D. Hodgkin, D.M. Tarlinton, and L.M. Corcoran, *The generation of antibody-secreting plasma cells*. *Nat Rev Immunol*, 2015. **15**(3): p. 160-71.

9. Literaturverzeichnis

72. Corti, D., J. Voss, S.J. Gamblin, G. Codoni, A. Macagno, D. Jarrossay, S.G. Vachieri, D. Pinna, A. Minola, F. Vanzetta, C. Silacci, B.M. Fernandez-Rodriguez, G. Agatic, S. Bianchi, I. Giacchetto-Sasselli, L. Calder, F. Sallusto, P. Collins, L.F. Haire, N. Temperton, J.P. Langedijk, J.J. Skehel, and A. Lanzavecchia, *A neutralizing antibody selected from plasma cells that binds to group 1 and group 2 influenza A hemagglutinins*. *Science*, 2011. **333**(6044): p. 850-6.
73. *Robert Koch Institut Krebs in Deutschland 2011/2012, in 10. Ausgabe, 2015. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg)*. 2015, Robert Koch-Institut: Berlin.
74. Jemal, A., F. Bray, M.M. Center, J. Ferlay, E. Ward, and D. Forman, *Global cancer statistics*. *CA Cancer J Clin*, 2011. **61**(2): p. 69-90.
75. Bruix, J., M. Sherman, and D. American Association for the Study of Liver, *Management of hepatocellular carcinoma: an update*. *Hepatology*, 2011. **53**(3): p. 1020-2.
76. *Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Diagnostik und Therapie des hepatozellulären Karzinoms, Langversion 1.0, AWMF Registrierungsnummer: 032-053OL, https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/HCC/S3-HCC-OL-Langversion-V1.0.pdf*. 2013.
77. Khalili, K., T.K. Kim, H.J. Jang, M.A. Haider, L. Khan, M. Guindi, and M. Sherman, *Optimization of imaging diagnosis of 1-2 cm hepatocellular carcinoma: an analysis of diagnostic performance and resource utilization*. *J Hepatol*, 2011. **54**(4): p. 723-8.
78. Di Bisceglie, A.M., R.K. Sterling, R.T. Chung, J.E. Everhart, J.L. Dienstag, H.L. Bonkovsky, E.C. Wright, G.T. Everson, K.L. Lindsay, A.S. Lok, W.M. Lee, T.R. Morgan, M.G. Ghany, D.R. Gretch, and H.-C.T. Group, *Serum alpha-fetoprotein levels in patients with advanced hepatitis C: results from the HALT-C Trial*. *J Hepatol*, 2005. **43**(3): p. 434-41.
79. Marrero, J.A., G.L. Su, W. Wei, D. Emick, H.S. Conjeevaram, R.J. Fontana, and A.S. Lok, *Des-gamma carboxyprothrombin can differentiate hepatocellular carcinoma from nonmalignant chronic liver disease in american patients*. *Hepatology*, 2003. **37**(5): p. 1114-21.
80. Llovet, J.M., J. Bruix, J. Fuster, A. Castells, J.C. Garcia-Valdecasas, L. Grande, A. Franca, C. Bru, M. Navasa, M.C. Ayuso, M. Sole, M.I. Real, R. Vilana, A. Rimola, J. Visa, and J. Rodes, *Liver transplantation for small hepatocellular carcinoma: the tumor-node-metastasis classification does not have prognostic power*. *Hepatology*, 1998. **27**(6): p. 1572-7.
81. Llovet, J.M., C. Bru, and J. Bruix, *Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification*. *Semin Liver Dis*, 1999. **19**(3): p. 329-38.

9. Literaturverzeichnis

82. Hollebecque, A., S. Cattan, O. Romano, G. Sergent, A. Mourad, A. Louvet, S. Dharancy, E. Boleslawski, S. Truant, F.R. Pruvot, M. Hebbar, O. Ernst, and P. Mathurin, *Safety and efficacy of sorafenib in hepatocellular carcinoma: the impact of the Child-Pugh score*. *Aliment Pharmacol Ther*, 2011. **34**(10): p. 1193-201.
83. Oken, M.M., R.H. Creech, D.C. Tormey, J. Horton, T.E. Davis, E.T. McFadden, and P.P. Carbone, *Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group*. *Am J Clin Oncol*, 1982. **5**(6): p. 649-55.
84. Cholongitas, E., G.V. Papatheodoridis, M. Vangeli, N. Terreni, D. Patch, and A.K. Burroughs, *Systematic review: The model for end-stage liver disease--should it replace Child-Pugh's classification for assessing prognosis in cirrhosis?* *Aliment Pharmacol Ther*, 2005. **22**(11-12): p. 1079-89.
85. Ferrari, F.S., A. Megliola, A. Scorzelli, A. Stella, F. Vigni, F.M. Drudi, and D. Venezia, *Treatment of small HCC through radiofrequency ablation and laser ablation. Comparison of techniques and long-term results*. *Radiol Med*, 2007. **112**(3): p. 377-93.
86. Lo, C.M., H. Ngan, W.K. Tso, C.L. Liu, C.M. Lam, R.T. Poon, S.T. Fan, and J. Wong, *Randomized controlled trial of transarterial lipiodol chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma*. *Hepatology*, 2002. **35**(5): p. 1164-71.
87. Llovet, J.M., S. Ricci, V. Mazzaferro, P. Hilgard, E. Gane, J.F. Blanc, A.C. de Oliveira, A. Santoro, J.L. Raoul, A. Forner, M. Schwartz, C. Porta, S. Zeuzem, L. Bolondi, T.F. Greten, P.R. Galle, J.F. Seitz, I. Borbath, D. Haussinger, T. Giannaris, M. Shan, M. Moscovici, D. Voliotis, J. Bruix, and S.I.S. Group, *Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma*. *N Engl J Med*, 2008. **359**(4): p. 378-90.
88. Schutte, K., L. Zimmermann, J. Bornschein, A. Csepregi, R. Ruhl, J. Ricke, and P. Malfertheiner, *Sorafenib therapy in patients with advanced hepatocellular carcinoma in advanced liver cirrhosis*. *Digestion*, 2011. **83**(4): p. 275-82.
89. Worns, M.A., A. Weinmann, K. Pfungst, C. Schulte-Sasse, C.M. Messow, H. Schulze-Bergkamen, A. Teufel, M. Schuchmann, S. Kanzler, C. Duber, G. Otto, and P.R. Galle, *Safety and efficacy of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma in consideration of concomitant stage of liver cirrhosis*. *J Clin Gastroenterol*, 2009. **43**(5): p. 489-95.
90. Chang, S.M., I.F. Parney, W. Huang, F.A. Anderson, Jr., A.L. Asher, M. Bernstein, K.O. Lillehei, H. Brem, M.S. Berger, E.R. Laws, and I. Glioma Outcomes Project, *Patterns of care for adults with newly diagnosed malignant glioma*. *JAMA*, 2005. **293**(5): p. 557-64.

9. Literaturverzeichnis

91. Patel, N. and D. Sandeman, *A simple trajectory guidance device that assists freehand and interactive image guided biopsy of small deep intracranial targets*. *Comput Aided Surg*, 1997. **2**(3-4): p. 186-92.
92. Pirotte, B., S. Goldman, N. Massager, P. David, D. Wikler, A. Vandesteene, I. Salmon, J. Brotchi, and M. Levivier, *Comparison of 18F-FDG and 11C-methionine for PET-guided stereotactic brain biopsy of gliomas*. *J Nucl Med*, 2004. **45**(8): p. 1293-8.
93. Wen, P.Y. and S. Kesari, *Malignant gliomas in adults*. *N Engl J Med*, 2008. **359**(5): p. 492-507.
94. Biernat, W., *2000 World Health Organization classification of tumors of the nervous system*. *Pol J Pathol*, 2000. **51**(3): p. 107-14.
95. Louis, D.N., A. Perry, G. Reifenberger, A. von Deimling, D. Figarella-Branger, W.K. Cavenee, H. Ohgaki, O.D. Wiestler, P. Kleihues, and D.W. Ellison, *The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary*. *Acta Neuropathol*, 2016. **131**(6): p. 803-20.
96. Wick, W., C. Hartmann, C. Engel, M. Stoffels, J. Felsberg, F. Stockhammer, M.C. Sabel, S. Koepfen, R. Ketter, R. Meyermann, M. Rapp, C. Meisner, R.D. Kortmann, T. Pietsch, O.D. Wiestler, U. Ernemann, M. Bamberg, G. Reifenberger, A. von Deimling, and M. Weller, *NOA-04 randomized phase III trial of sequential radiochemotherapy of anaplastic glioma with procarbazine, lomustine, and vincristine or temozolomide*. *J Clin Oncol*, 2009. **27**(35): p. 5874-80.
97. van den Bent, M.J., L.A. Gravendeel, T. Gorlia, J.M. Kros, L. Lapre, P. Wesseling, J.L. Teepen, A. Idbaih, M. Sanson, P.A. Smitt, and P.J. French, *A hypermethylated phenotype is a better predictor of survival than MGMT methylation in anaplastic oligodendroglial brain tumors: a report from EORTC study 26951*. *Clin Cancer Res*, 2011. **17**(22): p. 7148-55.
98. van den Bent, M.J., H.J. Dubbink, M. Sanson, C.R. van der Lee-Haarloo, M. Hegi, J.W. Jeuken, A. Idbaih, A.A. Brandes, M.J. Taphoorn, M. Frenay, D. Lacombe, T. Gorlia, W.N. Dinjens, and J.M. Kros, *MGMT promoter methylation is prognostic but not predictive for outcome to adjuvant PCV chemotherapy in anaplastic oligodendroglial tumors: a report from EORTC Brain Tumor Group Study 26951*. *J Clin Oncol*, 2009. **27**(35): p. 5881-6.
99. Zhang, W., J. Zhang, K. Hoadley, D. Kushwaha, V. Ramakrishnan, S. Li, C. Kang, Y. You, C. Jiang, S.W. Song, T. Jiang, and C.C. Chen, *miR-181d: a predictive glioblastoma biomarker that downregulates MGMT expression*. *Neuro Oncol*, 2012. **14**(6): p. 712-9.
100. Spiegl-Kreinecker, S., C. Pirker, M. Filipits, D. Lotsch, J. Buchroithner, J. Pichler, R. Silye, S. Weis, M. Micksche, J. Fischer, and W. Berger, *O6-Methylguanine DNA methyltransferase protein expression in tumor cells predicts outcome of temozolomide therapy in glioblastoma patients*. *Neuro Oncol*, 2010. **12**(1): p. 28-36.

9. Literaturverzeichnis

101. Wick, W., C. Meisner, B. Hentschel, M. Platten, A. Schilling, B. Wiestler, M.C. Sabel, S. Koeppen, R. Ketter, M. Weiler, G. Tabatabai, A. von Deimling, D. Gramatzki, M. Westphal, G. Schackert, M. Loeffler, M. Simon, G. Reifenberger, and M. Weller, *Prognostic or predictive value of MGMT promoter methylation in gliomas depends on IDH1 mutation*. *Neurology*, 2013. **81**(17): p. 1515-22.
102. Dang, L., D.W. White, S. Gross, B.D. Bennett, M.A. Bittinger, E.M. Driggers, V.R. Fantin, H.G. Jang, S. Jin, M.C. Keenan, K.M. Marks, R.M. Prins, P.S. Ward, K.E. Yen, L.M. Liau, J.D. Rabinowitz, L.C. Cantley, C.B. Thompson, M.G. Vander Heiden, and S.M. Su, *Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate*. *Nature*, 2009. **462**(7274): p. 739-44.
103. Ward, P.S., J. Patel, D.R. Wise, O. Abdel-Wahab, B.D. Bennett, H.A. Collier, J.R. Cross, V.R. Fantin, C.V. Hedvat, A.E. Perl, J.D. Rabinowitz, M. Carroll, S.M. Su, K.A. Sharp, R.L. Levine, and C.B. Thompson, *The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate*. *Cancer Cell*, 2010. **17**(3): p. 225-34.
104. Cairns, R.A. and T.W. Mak, *Oncogenic isocitrate dehydrogenase mutations: mechanisms, models, and clinical opportunities*. *Cancer Discov*, 2013. **3**(7): p. 730-41.
105. Yan, H., D.W. Parsons, G. Jin, R. McLendon, B.A. Rasheed, W. Yuan, I. Kos, I. Batinic-Haberle, S. Jones, G.J. Riggins, H. Friedman, A. Friedman, D. Reardon, J. Herndon, K.W. Kinzler, V.E. Velculescu, B. Vogelstein, and D.D. Bigner, *IDH1 and IDH2 mutations in gliomas*. *N Engl J Med*, 2009. **360**(8): p. 765-73.
106. Sanson, M., Y. Marie, S. Paris, A. Idhah, J. Laffaire, F. Ducray, S. El Hallani, B. Boisselier, K. Mokhtari, K. Hoang-Xuan, and J.Y. Delattre, *Isocitrate dehydrogenase 1 codon 132 mutation is an important prognostic biomarker in gliomas*. *J Clin Oncol*, 2009. **27**(25): p. 4150-4.
107. Hartmann, C., B. Hentschel, M. Simon, M. Westphal, G. Schackert, J.C. Tonn, M. Loeffler, G. Reifenberger, T. Pietsch, A. von Deimling, M. Weller, and N. German Glioma, *Long-term survival in primary glioblastoma with versus without isocitrate dehydrogenase mutations*. *Clin Cancer Res*, 2013. **19**(18): p. 5146-57.
108. Marcucci, G., K. Maharry, Y.Z. Wu, M.D. Radmacher, K. Mrozek, D. Margeson, K.B. Holland, S.P. Whitman, H. Becker, S. Schwind, K.H. Metzeler, B.L. Powell, T.H. Carter, J.E. Kolitz, M. Wetzler, A.J. Carroll, M.R. Baer, M.A. Caligiuri, R.A. Larson, and C.D. Bloomfield, *IDH1 and IDH2 gene mutations identify novel molecular subsets within de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study*. *J Clin Oncol*, 2010. **28**(14): p. 2348-55.
109. Mardis, E.R., L. Ding, D.J. Dooling, D.E. Larson, M.D. McLellan, K. Chen, D.C. Koboldt, R.S. Fulton, K.D. Delehaunty, S.D. McGrath, L.A. Fulton, D.P. Locke, V.J. Magrini, R.M. Abbott, T.L.

9. Literaturverzeichnis

- Vickery, J.S. Reed, J.S. Robinson, T. Wylie, S.M. Smith, L. Carmichael, J.M. Eldred, C.C. Harris, J. Walker, J.B. Peck, F. Du, A.F. Dukes, G.E. Sanderson, A.M. Brummett, E. Clark, J.F. McMichael, R.J. Meyer, J.K. Schindler, C.S. Pohl, J.W. Wallis, X. Shi, L. Lin, H. Schmidt, Y. Tang, C. Haipek, M.E. Wiechert, J.V. Ivy, J. Kalicki, G. Elliott, R.E. Ries, J.E. Payton, P. Westervelt, M.H. Tomasson, M.A. Watson, J. Baty, S. Heath, W.D. Shannon, R. Nagarajan, D.C. Link, M.J. Walter, T.A. Graubert, J.F. DiPersio, R.K. Wilson, and T.J. Ley, *Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome*. *N Engl J Med*, 2009. **361**(11): p. 1058-66.
110. Amary, M.F., K. Bacsi, F. Maggiani, S. Damato, D. Halai, F. Berisha, R. Pollock, P. O'Donnell, A. Grigoriadis, T. Diss, M. Eskandarpour, N. Presneau, P.C. Hogendoorn, A. Futreal, R. Tirabosco, and A.M. Flanagan, *IDH1 and IDH2 mutations are frequent events in central chondrosarcoma and central and periosteal chondromas but not in other mesenchymal tumours*. *J Pathol*, 2011. **224**(3): p. 334-43.
111. Hammarsten, J.F., W. Tattersall, and J.E. Hammarsten, *Who discovered smallpox vaccination? Edward Jenner or Benjamin Jesty?* *Trans Am Clin Climatol Assoc*, 1979. **90**: p. 44-55.
112. Theves, C., P. Biagini, and E. Crubezy, *The rediscovery of smallpox*. *Clin Microbiol Infect*, 2014. **20**(3): p. 210-8.
113. Paavonen, J., D. Jenkins, F.X. Bosch, P. Naud, J. Salmeron, C.M. Wheeler, S.N. Chow, D.L. Apter, H.C. Kitchener, X. Castellsague, N.S. de Carvalho, S.R. Skinner, D.M. Harper, J.A. Hedrick, U. Jaisamrarn, G.A. Limson, M. Dionne, W. Quint, B. Spiessens, P. Peeters, F. Struyf, S.L. Wieting, M.O. Lehtinen, G. Dubin, and H.P.s. group, *Efficacy of a prophylactic adjuvanted bivalent L1 virus-like-particle vaccine against infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: an interim analysis of a phase III double-blind, randomised controlled trial*. *Lancet*, 2007. **369**(9580): p. 2161-70.
114. Makkouk, A. and G.J. Weiner, *Cancer immunotherapy and breaking immune tolerance: new approaches to an old challenge*. *Cancer Res*, 2015. **75**(1): p. 5-10.
115. Couzin-Frankel, J., *Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy*. *Science*, 2013. **342**(6165): p. 1432-3.
116. Yang, Y., *Cancer immunotherapy: harnessing the immune system to battle cancer*. *J Clin Invest*, 2015. **125**(9): p. 3335-7.
117. Wang, M., B. Yin, H.Y. Wang, and R.F. Wang, *Current advances in T-cell-based cancer immunotherapy*. *Immunotherapy*, 2014. **6**(12): p. 1265-78.
118. Przepiorka, D., C.W. Ko, A. Deisseroth, C.L. Yancey, R. Candau-Chacon, H.J. Chiu, B.J. Gehrke, C. Gomez-Broughton, R.C. Kane, S. Kirshner, N. Mehrotra, T.K. Ricks, D. Schmiel, P. Song, P. Zhao, Q. Zhou, A.T. Farrell, and R. Pazdur, *FDA Approval: Blinatumomab*. *Clin Cancer Res*, 2015. **21**(18): p. 4035-9.

9. Literaturverzeichnis

119. Hodi, F.S., S.J. O'Day, D.F. McDermott, R.W. Weber, J.A. Sosman, J.B. Haanen, R. Gonzalez, C. Robert, D. Schadendorf, J.C. Hassel, W. Akerley, A.J. van den Eertwegh, J. Lutzky, P. Lorigan, J.M. Vaubel, G.P. Linette, D. Hogg, C.H. Ottensmeier, C. Lebbe, C. Peschel, I. Quirt, J.I. Clark, J.D. Wolchok, J.S. Weber, J. Tian, M.J. Yellin, G.M. Nichol, A. Hoos, and W.J. Urba, *Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma*. N Engl J Med, 2010. **363**(8): p. 711-23.
120. Wolchok, J.D., H. Kluger, M.K. Callahan, M.A. Postow, N.A. Rizvi, A.M. Lesokhin, N.H. Segal, C.E. Ariyan, R.A. Gordon, K. Reed, M.M. Burke, A. Caldwell, S.A. Kronenberg, B.U. Agunwamba, X. Zhang, I. Lowy, H.D. Inzunza, W. Feely, C.E. Horak, Q. Hong, A.J. Korman, J.M. Wigginton, A. Gupta, and M. Sznol, *Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma*. N Engl J Med, 2013. **369**(2): p. 122-33.
121. Weiner, L.M., J.C. Murray, and C.W. Shuptrine, *Antibody-based immunotherapy of cancer*. Cell, 2012. **148**(6): p. 1081-4.
122. Maloney, D.G., A.J. Grillo-Lopez, C.A. White, D. Bodkin, R.J. Schilder, J.A. Neidhart, N. Janakiraman, K.A. Foon, T.M. Liles, B.K. Dallaire, K. Wey, I. Royston, T. Davis, and R. Levy, *IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma*. Blood, 1997. **90**(6): p. 2188-95.
123. Stieglmaier, J., J. Benjamin, and D. Nagorsen, *Utilizing the BiTE (bispecific T-cell engager) platform for immunotherapy of cancer*. Expert Opin Biol Ther, 2015. **15**(8): p. 1093-9.
124. Bargou, R., E. Leo, G. Zugmaier, M. Klinger, M. Goebeler, S. Knop, R. Noppeney, A. Viardot, G. Hess, M. Schuler, H. Einsele, C. Brandl, A. Wolf, P. Kirchinger, P. Klappers, M. Schmidt, G. Riethmuller, C. Reinhardt, P.A. Baeuerle, and P. Kufer, *Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell-engaging antibody*. Science, 2008. **321**(5891): p. 974-7.
125. Carter, R.H. and D.T. Fearon, *CD19: lowering the threshold for antigen receptor stimulation of B lymphocytes*. Science, 1992. **256**(5053): p. 105-7.
126. Sanford, M., *Blinatumomab: first global approval*. Drugs, 2015. **75**(3): p. 321-7.
127. Ruella, M. and M. Kalos, *Adoptive immunotherapy for cancer*. Immunol Rev, 2014. **257**(1): p. 14-38.
128. Lipowska-Bhalla, G., D.E. Gilham, R.E. Hawkins, and D.G. Rothwell, *Targeted immunotherapy of cancer with CAR T cells: achievements and challenges*. Cancer Immunol Immunother, 2012. **61**(7): p. 953-62.

9. Literaturverzeichnis

129. Magee, M.S. and A.E. Snook, *Challenges to chimeric antigen receptor (CAR)-T cell therapy for cancer*. Discov Med, 2014. **18**(100): p. 265-71.
130. Priceman, S.J., S.J. Forman, and C.E. Brown, *Smart CARs engineered for cancer immunotherapy*. Curr Opin Oncol, 2015. **27**(6): p. 466-74.
131. Wang, W. and Y. Wang, *Equipping CAR-modified T cells with a brake to prevent chronic adverse effects*. Curr Gene Ther, 2012. **12**(6): p. 493-5.
132. Amin, A. and R.L. White, Jr., *High-dose interleukin-2: is it still indicated for melanoma and RCC in an era of targeted therapies?* Oncology (Williston Park), 2013. **27**(7): p. 680-91.
133. Gibney, G.T., L.M. Weiner, and M.B. Atkins, *Predictive biomarkers for checkpoint inhibitor-based immunotherapy*. Lancet Oncol, 2016. **17**(12): p. e542-e551.
134. Feyerabend, S., S. Stevanović, C. Gouttefangeas, D. Wernet, J. Hennenlotter, J. Bedke, K. Dietz, S. Pascolo, M. Kuczyk, H.G. Rammensee, and A. Stenzl, *Novel multi-peptide vaccination in Hla-A2+ hormone sensitive patients with biochemical relapse of prostate cancer*. Prostate, 2009. **69**(9): p. 917-27.
135. Brayer, J., J.E. Lancet, J. Powers, A. List, L. Balducci, R. Komrokji, and J. Pinilla-Ibarz, *WT1 vaccination in AML and MDS: A pilot trial with synthetic analog peptides*. Am J Hematol, 2015. **90**(7): p. 602-7.
136. Legat, A., H. Maby-El Hajjami, P. Baumgaertner, L. Cagnon, S. Abed Maillard, C. Geldhof, E.M. Iancu, L. Lebon, P. Guillaume, D. Dojcinovic, O. Michielin, E. Romano, G. Berthod, D. Rimoldi, F. Triebel, I. Luescher, N. Rufer, and D.E. Speiser, *Vaccination with LAG-3Ig (IMP321) and Peptides Induces Specific CD4 and CD8 T-Cell Responses in Metastatic Melanoma Patients--Report of a Phase I/IIa Clinical Trial*. Clin Cancer Res, 2016. **22**(6): p. 1330-40.
137. Neidert, M.C., O. Schoor, C. Trautwein, N. Trautwein, L. Christ, A. Melms, J. Honegger, H.G. Rammensee, C. Herold-Mende, P.Y. Dietrich, and S. Stevanović, *Natural HLA class I ligands from glioblastoma: extending the options for immunotherapy*. J Neurooncol, 2013. **111**(3): p. 285-94.
138. Berlin, C., D.J. Kowalewski, H. Schuster, N. Mirza, S. Walz, M. Handel, B. Schmid-Horch, H.R. Salih, L. Kanz, H.G. Rammensee, S. Stevanović, and J.S. Stickel, *Mapping the HLA ligandome landscape of acute myeloid leukemia: a targeted approach toward peptide-based immunotherapy*. Leukemia, 2015. **29**(3): p. 647-59.
139. Peper, J.K. and S. Stevanović, *A combined approach of human leukocyte antigen ligandomics and immunogenicity analysis to improve peptide-based cancer immunotherapy*. Cancer Immunol Immunother, 2015. **64**(10): p. 1295-303.

9. Literaturverzeichnis

140. Neumann, A., H. Horzer, N. Hillen, K. Klingel, B. Schmid-Horch, H.J. Buhring, H.G. Rammensee, H. Aebert, and S. Stevanović, *Identification of HLA ligands and T-cell epitopes for immunotherapy of lung cancer*. *Cancer Immunol Immunother*, 2013. **62**(9): p. 1485-97.
141. Khazaie, K., A. Bonertz, and P. Beckhove, *Current developments with peptide-based human tumor vaccines*. *Curr Opin Oncol*, 2009. **21**(6): p. 524-30.
142. Melief, C.J., *Synthetic vaccine for the treatment of lesions caused by high risk human papilloma virus*. *Cancer J*, 2011. **17**(5): p. 300-1.
143. Yadav, M., S. Jhunjunwala, Q.T. Phung, P. Lupardus, J. Tanguay, S. Bumbaca, C. Franci, T.K. Cheung, J. Fritsche, T. Weinschenk, Z. Modrusan, I. Mellman, J.R. Lill, and L. Delamarre, *Predicting immunogenic tumour mutations by combining mass spectrometry and exome sequencing*. *Nature*, 2014. **515**(7528): p. 572-6.
144. Schumacher, T., L. Bunse, S. Pusch, F. Sahm, B. Wiestler, J. Quandt, O. Menn, M. Osswald, I. Oezen, M. Ott, M. Keil, J. Balss, K. Rauschenbach, A.K. Grabowska, I. Vogler, J. Diekmann, N. Trautwein, S.B. Eichmuller, J. Okun, S. Stevanović, A.B. Riemer, U. Sahin, M.A. Friese, P. Beckhove, A. von Deimling, W. Wick, and M. Platten, *A vaccine targeting mutant IDH1 induces antitumour immunity*. *Nature*, 2014. **512**(7514): p. 324-7.
145. Gubin, M.M., X. Zhang, H. Schuster, E. Caron, J.P. Ward, T. Noguchi, Y. Ivanova, J. Hundal, C.D. Arthur, W.J. Krebber, G.E. Mulder, M. Toebes, M.D. Vesely, S.S. Lam, A.J. Korman, J.P. Allison, G.J. Freeman, A.H. Sharpe, E.L. Pearce, T.N. Schumacher, R. Aebersold, H.G. Rammensee, C.J. Melief, E.R. Mardis, W.E. Gillanders, M.N. Artyomov, and R.D. Schreiber, *Checkpoint blockade cancer immunotherapy targets tumour-specific mutant antigens*. *Nature*, 2014. **515**(7528): p. 577-81.
146. Linnemann, C., M.M. van Buuren, L. Bies, E.M. Verdegaal, R. Schotte, J.J. Calis, S. Behjati, A. Velds, H. Hilkmann, D.E. Atmioui, M. Visser, M.R. Stratton, J.B. Haanen, H. Spits, S.H. van der Burg, and T.N. Schumacher, *High-throughput epitope discovery reveals frequent recognition of neo-antigens by CD4+ T cells in human melanoma*. *Nat Med*, 2015. **21**(1): p. 81-5.
147. Tran, E., M. Ahmadzadeh, Y.C. Lu, A. Gros, S. Turcotte, P.F. Robbins, J.J. Gartner, Z. Zheng, Y.F. Li, S. Ray, J.R. Wunderlich, R.P. Somerville, and S.A. Rosenberg, *Immunogenicity of somatic mutations in human gastrointestinal cancers*. *Science*, 2015. **350**(6266): p. 1387-90.
148. Lennerz, V., M. Fatho, C. Gentilini, R.A. Frye, A. Lifke, D. Ferel, C. Wolfel, C. Huber, and T. Wolfel, *The response of autologous T cells to a human melanoma is dominated by mutated neoantigens*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(44): p. 16013-8.

9. Literaturverzeichnis

149. McGranahan, N., A.J. Furness, R. Rosenthal, S. Ramskov, R. Lyngaa, S.K. Saini, M. Jamal-Hanjani, G.A. Wilson, N.J. Birkbak, C.T. Hiley, T.B. Watkins, S. Shafi, N. Murugaesu, R. Mitter, A.U. Akarca, J. Linares, T. Marafioti, J.Y. Henry, E.M. Van Allen, D. Miao, B. Schilling, D. Schadendorf, L.A. Garraway, V. Makarov, N.A. Rizvi, A. Snyder, M.D. Hellmann, T. Merghoub, J.D. Wolchok, S.A. Shukla, C.J. Wu, K.S. Peggs, T.A. Chan, S.R. Hadrup, S.A. Quezada, and C. Swanton, *Clonal neoantigens elicit T cell immunoreactivity and sensitivity to immune checkpoint blockade*. *Science*, 2016. **351**(6280): p. 1463-9.
150. Cohen, C.J., J.J. Gartner, M. Horovitz-Fried, K. Shamalov, K. Trebska-McGowan, V.V. Bliskovsky, M.R. Parkhurst, C. Ankri, T.D. Prickett, J.S. Crystal, Y.F. Li, M. El-Gamil, S.A. Rosenberg, and P.F. Robbins, *Isolation of neoantigen-specific T cells from tumor and peripheral lymphocytes*. *J Clin Invest*, 2015. **125**(10): p. 3981-91.
151. Lu, Y.C., X. Yao, J.S. Crystal, Y.F. Li, M. El-Gamil, C. Gross, L. Davis, M.E. Dudley, J.C. Yang, Y. Samuels, S.A. Rosenberg, and P.F. Robbins, *Efficient identification of mutated cancer antigens recognized by T cells associated with durable tumor regressions*. *Clin Cancer Res*, 2014. **20**(13): p. 3401-10.
152. Schumacher, T.N. and R.D. Schreiber, *Neoantigens in cancer immunotherapy*. *Science*, 2015. **348**(6230): p. 69-74.
153. Vazquez-Ulloa, E., M. Lizano, M. Sjoqvist, L. Olmedo-Nieva, and A. Contreras-Paredes, *Deregulation of the Notch pathway as a common road in viral carcinogenesis*. *Rev Med Virol*, 2018: p. e1988.
154. Vrzalikova, K., T. Sunmonu, G. Reynolds, and P. Murray, *Contribution of Epstein(-)Barr Virus Latent Proteins to the Pathogenesis of Classical Hodgkin Lymphoma*. *Pathogens*, 2018. **7**(3).
155. Kalaora, S., E. Barnea, E. Merhavi-Shoham, N. Qutob, J.K. Teer, N. Shimony, J. Schachter, S.A. Rosenberg, M.J. Besser, A. Admon, and Y. Samuels, *Use of HLA peptidomics and whole exome sequencing to identify human immunogenic neo-antigens*. *Oncotarget*, 2016. **7**(5): p. 5110-7.
156. Rammensee, H.G. and H. Singh-Jasuja, *HLA ligandome tumor antigen discovery for personalized vaccine approach*. *Expert Rev Vaccines*, 2013. **12**(10): p. 1211-7.
157. Vormehr, M., M. Diken, S. Boegel, S. Kreiter, O. Tureci, and U. Sahin, *Mutanome directed cancer immunotherapy*. *Curr Opin Immunol*, 2016. **39**: p. 14-22.
158. Srivastava, P.K. and F. Duan, *Harnessing the antigenic fingerprint of each individual cancer for immunotherapy of human cancer: genomics shows a new way and its challenges*. *Cancer Immunol Immunother*, 2013. **62**(5): p. 967-74.

9. Literaturverzeichnis

159. Britten, C.M., H. Singh-Jasuja, B. Flamion, A. Hoos, C. Huber, K.J. Kallen, S.N. Khleif, S. Kreiter, M. Nielsen, H.G. Rammensee, U. Sahin, T. Hinz, and U. Kalinke, *The regulatory landscape for actively personalized cancer immunotherapies*. Nat Biotechnol, 2013. **31**(10): p. 880-2.
160. Mabert, K., M. Cojoc, C. Peitzsch, I. Kurth, S. Souchelnytskyi, and A. Dubrovskaya, *Cancer biomarker discovery: current status and future perspectives*. Int J Radiat Biol, 2014. **90**(8): p. 659-77.
161. Jackisch, C., S.B. Kim, V. Semiglazov, B. Melichar, X. Pivot, C. Hillenbach, D. Stroyakovskiy, B.L. Lum, R. Elliott, H.A. Weber, and G. Ismael, *Subcutaneous versus intravenous formulation of trastuzumab for HER2-positive early breast cancer: updated results from the phase III HannaH study*. Ann Oncol, 2015. **26**(2): p. 320-5.
162. Blanke, C.D., C. Rankin, C. Corless, J.F. Eary, K. Mulder, S.H. Okuno, S. George, and M. Heinrich, *S0502: A SWOG Phase III Randomized Study of Imatinib, With or Without Bevacizumab, in Patients With Untreated Metastatic or Unresectable Gastrointestinal Stromal Tumors*. Oncologist, 2015. **20**(12): p. 1353-4.
163. Walter, S., T. Weinschenk, C. Reinhardt, and H. Singh-Jasuja, *Single-dose cyclophosphamide synergizes with immune responses to the renal cell cancer vaccine IMA901*. Oncoimmunology, 2013. **2**(1): p. e22246.
164. Graff, J.N. and E.D. Chamberlain, *Sipuleucel-T in the treatment of prostate cancer: an evidence-based review of its place in therapy*. Core Evid, 2015. **10**: p. 1-10.
165. Kreiter, S., M. Vormehr, N. van de Roemer, M. Diken, M. Lower, J. Diekmann, S. Boegel, B. Schrors, F. Vascotto, J.C. Castle, A.D. Tadmor, S.P. Schoenberger, C. Huber, O. Tureci, and U. Sahin, *Mutant MHC class II epitopes drive therapeutic immune responses to cancer*. Nature, 2015. **520**(7549): p. 692-6.
166. Loffler, M.W., P.A. Chandran, K. Laske, C. Schroeder, I. Bonzheim, M. Walzer, F.J. Hilke, N. Trautwein, D.J. Kowalewski, H. Schuster, M. Gunder, V.A. Carcamo Yanez, C. Mohr, M. Sturm, H.P. Nguyen, O. Riess, P. Bauer, S. Nahnsen, S. Nadalin, D. Zieker, J. Glatzle, K. Thiel, N. Schneiderhan-Marra, S. Clasen, H. Bosmuller, F. Fend, O. Kohlbacher, C. Gouttefangeas, S. Stevanović, A. Konigsrainer, and H.G. Rammensee, *Personalized peptide vaccine-induced immune response associated with long-term survival of a metastatic cholangiocarcinoma patient*. J Hepatol, 2016. **65**(4): p. 849-855.
167. Vogelstein, B., N. Papadopoulos, V.E. Velculescu, S. Zhou, L.A. Diaz, Jr., and K.W. Kinzler, *Cancer genome landscapes*. Science, 2013. **339**(6127): p. 1546-58.
168. Galluzzi, L., E. Vacchelli, A. Eggermont, W.H. Fridman, J. Galon, C. Sautès-Fridman, E. Tartour, L. Zitvogel, and G. Kroemer, *Trial Watch: Experimental Toll-like receptor agonists for cancer therapy*. Oncoimmunology, 2012. **1**(5): p. 699-716.

9. Literaturverzeichnis

169. Hailemichael, Y., Z. Dai, N. Jaffarzad, Y. Ye, M.A. Medina, X.F. Huang, S.M. Dorta-Estremera, N.R. Greeley, G. Nitti, W. Peng, C. Liu, Y. Lou, Z. Wang, W. Ma, B. Rabinovich, R.T. Sowell, K.S. Schluns, R.E. Davis, P. Hwu, and W.W. Overwijk, *Persistent antigen at vaccination sites induces tumor-specific CD8(+) T cell sequestration, dysfunction and deletion*. Nat Med, 2013. **19**(4): p. 465-72.
170. Shurin, M.R., H. Naiditch, D.W. Gutkin, V. Umansky, and G.V. Shurin, *ChemolmmunoModulation: immune regulation by the antineoplastic chemotherapeutic agents*. Curr Med Chem, 2012. **19**(12): p. 1792-803.
171. Landreneau, J.P., M.R. Shurin, M.V. Agassandian, A.A. Keskinov, Y. Ma, and G.V. Shurin, *Immunological Mechanisms of Low and Ultra-Low Dose Cancer Chemotherapy*. Cancer Microenviron, 2013.
172. Ghiringhelli, F., N. Larmonier, E. Schmitt, A. Parcellier, D. Cathelin, C. Garrido, B. Chauffert, E. Solary, B. Bonnotte, and F. Martin, *CD4+CD25+ regulatory T cells suppress tumor immunity but are sensitive to cyclophosphamide which allows immunotherapy of established tumors to be curative*. Eur J Immunol, 2004. **34**(2): p. 336-44.
173. Slingluff, C.L., Jr., G.R. Petroni, K.A. Chianese-Bullock, M.E. Smolkin, S. Hibbitts, C. Murphy, N. Johansen, W.W. Grosh, G.V. Yamshchikov, P.Y. Neese, J.W. Patterson, R. Fink, and P.K. Rehm, *Immunologic and clinical outcomes of a randomized phase II trial of two multipeptide vaccines for melanoma in the adjuvant setting*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(21): p. 6386-95.
174. Balss, J., J. Meyer, W. Mueller, A. Korshunov, C. Hartmann, and A. von Deimling, *Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors*. Acta Neuropathol, 2008. **116**(6): p. 597-602.
175. Parsons, D.W., S. Jones, X. Zhang, J.C. Lin, R.J. Leary, P. Angenendt, P. Mankoo, H. Carter, I.M. Siu, G.L. Gallia, A. Olivi, R. McLendon, B.A. Rasheed, S. Keir, T. Nikolskaya, Y. Nikolsky, D.A. Busam, H. Tekleab, L.A. Diaz, Jr., J. Hartigan, D.R. Smith, R.L. Strausberg, S.K. Marie, S.M. Shinjo, H. Yan, G.J. Riggins, D.D. Bigner, R. Karchin, N. Papadopoulos, G. Parmigiani, B. Vogelstein, V.E. Velculescu, and K.W. Kinzler, *An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme*. Science, 2008. **321**(5897): p. 1807-12.
176. Watanabe, T., S. Nobusawa, P. Kleihues, and H. Ohgaki, *IDH1 mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas*. Am J Pathol, 2009. **174**(4): p. 1149-53.
177. Falk, K., O. Rotzschke, S. Stevanović, G. Jung, and H.G. Rammensee, *Pool sequencing of natural HLA-DR, DQ, and DP ligands reveals detailed peptide motifs, constraints of processing, and general rules*. Immunogenetics, 1994. **39**(4): p. 230-42.

9. Literaturverzeichnis

178. ten Bosch, G.J., J.H. Kessler, A.M. Joosten, A.A. Bres-Vloemans, A. Geluk, B.C. Godthelp, J. van Bergen, C.J. Melief, and O.C. Leeksa, *A BCR-ABL oncoprotein p210b2a2 fusion region sequence is recognized by HLA-DR2a restricted cytotoxic T lymphocytes and presented by HLA-DR matched cells transfected with an li(b2a2) construct*. *Blood*, 1999. **94**(3): p. 1038-45.
179. Cai, A., D.B. Keskin, D.S. DeLuca, A. Alonso, W. Zhang, G.L. Zhang, N.N. Hammond, V. Nardi, R.M. Stone, D. Neuberg, J. Sidney, V. Brusic, and C.J. Wu, *Mutated BCR-ABL generates immunogenic T-cell epitopes in CML patients*. *Clin Cancer Res*, 2012. **18**(20): p. 5761-72.
180. Soverini, S., C. De Benedittis, C. Papayannidis, S. Paolini, C. Venturi, I. Iacobucci, M. Luppi, P. Bresciani, M. Salvucci, D. Russo, S. Sica, E. Orlandi, T. Intermesoli, A. Gozzini, M. Bonifacio, G.M. Rigolin, F. Pane, M. Baccarani, M. Cavo, and G. Martinelli, *Drug resistance and BCR-ABL kinase domain mutations in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia from the imatinib to the second-generation tyrosine kinase inhibitor era: The main changes are in the type of mutations, but not in the frequency of mutation involvement*. *Cancer*, 2014. **120**(7): p. 1002-9.
181. Kugel, C.H., 3rd and A.E. Aplin, *Adaptive resistance to RAF inhibitors in melanoma*. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2014. **27**(6): p. 1032-8.
182. Hashimoto, N., A. Tsuboi, N. Kagawa, Y. Chiba, S. Izumoto, M. Kinoshita, N. Kijima, Y. Oka, S. Morimoto, H. Nakajima, S. Morita, J. Sakamoto, S. Nishida, N. Hosen, Y. Oji, N. Arita, T. Yoshimine, and H. Sugiyama, *Wilms tumor 1 peptide vaccination combined with temozolomide against newly diagnosed glioblastoma: safety and impact on immunological response*. *Cancer Immunol Immunother*, 2015.
183. Butterfield, L.H., *Cancer vaccines*. *BMJ*, 2015. **350**: p. h988.
184. Schuster, H., J.K. Peper, H.C. Bosmuller, K. Rohle, L. Backert, T. Bilich, B. Ney, M.W. Loffler, D.J. Kowalewski, N. Trautwein, A. Rabsteyn, T. Engler, S. Braun, S.P. Haen, J.S. Walz, B. Schmid-Horch, S.Y. Brucker, D. Wallwiener, O. Kohlbacher, F. Fend, H.G. Rammensee, S. Stevanović, A. Staebler, and P. Wagner, *The immunopeptidomic landscape of ovarian carcinomas*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017. **114**(46): p. E9942-E9951.
185. Robbins, P.F., Y.C. Lu, M. El-Gamil, Y.F. Li, C. Gross, J. Gartner, J.C. Lin, J.K. Teer, P. Cliften, E. Tycksen, Y. Samuels, and S.A. Rosenberg, *Mining exomic sequencing data to identify mutated antigens recognized by adoptively transferred tumor-reactive T cells*. *Nat Med*, 2013. **19**(6): p. 747-52.
186. van Rooij, N., M.M. van Buuren, D. Philips, A. Velds, M. Toebes, B. Heemskerk, L.J. van Dijk, S. Behjati, H. Hilkmann, D. El Atmioui, M. Nieuwland, M.R. Stratton, R.M. Kerkhoven, C. Kesmir, J.B. Haanen, P. Kvistborg, and T.N. Schumacher, *Tumor exome analysis reveals neoantigen-specific T-cell reactivity in an ipilimumab-responsive melanoma*. *J Clin Oncol*, 2013. **31**(32): p. e439-42.

9. Literaturverzeichnis

187. Snyder, A., V. Makarov, T. Merghoub, J. Yuan, J.M. Zaretsky, A. Desrichard, L.A. Walsh, M.A. Postow, P. Wong, T.S. Ho, T.J. Hollmann, C. Bruggeman, K. Kannan, Y. Li, C. Elipenahli, C. Liu, C.T. Harbison, L. Wang, A. Ribas, J.D. Wolchok, and T.A. Chan, *Genetic basis for clinical response to CTLA-4 blockade in melanoma*. N Engl J Med, 2014. **371**(23): p. 2189-99.
188. Tran, E., S. Turcotte, A. Gros, P.F. Robbins, Y.C. Lu, M.E. Dudley, J.R. Wunderlich, R.P. Somerville, K. Hogan, C.S. Hinrichs, M.R. Parkhurst, J.C. Yang, and S.A. Rosenberg, *Cancer immunotherapy based on mutation-specific CD4+ T cells in a patient with epithelial cancer*. Science, 2014. **344**(6184): p. 641-5.
189. Mittal, D., M.M. Gubin, R.D. Schreiber, and M.J. Smyth, *New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape*. Curr Opin Immunol, 2014. **27**: p. 16-25.