

DISSERTATION

submitted to the

Combined Faculties for the Natural Sciences and for Mathematics

of the

Ruperto-Carola University of Heidelberg, Germany

for the degree of

Doctor of Natural Sciences

presented by

Jasmin Quandt, M.Sc. Biochemistry

born in Villingen, Germany

Oral examination:

**Common mutations in
the tumor suppressor p53 &
the oncogene Kras
as targets for
long peptide anti-cancer vaccination**

Referees: Prof. Dr. Philipp Beckhove

Prof. Dr. Rainer Zawatzky

This work was performed in the
Department of Translational Immunology
(Head of Department: Prof. Dr. Philipp Beckhove)
at the
National Center for Tumor Diseases
(Nationales Centrum für Tumorerkrankungen - NCT)
of the
German Cancer Research Center
(Deutsches Krebsforschungszentrum - DKFZ)
in Heidelberg, Germany

Parts of this work have been published:

1. **Quandt J.**, Cid-Arregui A., Schmitz-Winnenthal H., Bleiler R., Lemonnier F., Lone Y.C., Bucur M., Schlude C., Beckhove P. and Momburg F. (2010): Induction of T cell responses against cancer-specific mutation in oncogenes/tumor suppressor genes. Poster and Presentation at the 40th Annual Meeting DGfI German Society for Immunology, Leipzig, Germany
2. **Quandt J.**, Cid-Arregui A., Schmitz-Winnenthal H., Bleiler R., Lemonnier F., Lone Y.C., Bucur M., Schlude C., Beckhove P. and Momburg F. (2010): Induction of T cell responses against cancer-specific mutation in oncogenes/tumor suppressor genes. Poster at the PhD Poster Presentation of the Helmholtz International Graduate School for Cancer Research at the DKFZ, Heidelberg, Germany
3. **Quandt J.**, Schlude C., Bucur M., Bleiler R., Lemonnier F., Lone Y.C., Cid-Arregui A., Beckhove P. and Momburg F. (2011): Induction of T cell responses against cancer-specific mutation in oncogenes/tumor suppressor genes by long peptide vaccination. Poster and Presentation at the Cancer Immunotherapy (CIMT) 9th Annual Meeting, Mainz, Germany
4. **Quandt J.**, Schlude C., Bucur M., Bleiler R., Lemonnier F., Lone Y.C., Cid-Arregui A., Beckhove P. and Momburg F. (2011): Induction of T cell responses against cancer-specific mutation in oncogenes/tumor suppressor genes by long peptide vaccination. Poster at the DKFZ PhD Retreat, Weil der Stadt, Germany
5. **Quandt J.**, Schlude C., Bartoschek M., Cid-Arregui A., Beckhove P. and Momburg F. (2013): T cell responses against mutation in oncoproteins/tumor suppressor proteins and their induction by vaccination with long peptides. Poster at the Annual Meeting of the American Association for Cancer Research (AACR), Washington DC, USA
6. **Quandt J.**, Schlude C., Bartoschek M., Cid-Arregui A., Beckhove P. and Momburg F. (2013): Relevance of cancer mutation specific T cell responses against oncogenes/tumor suppressor genes and their induction by long peptide vaccination. Poster at the Cancer Immunotherapy (CIMT) 11th Annual Meeting, Mainz, Germany
7. **Quandt J.**, Schlude C., Bartoschek M., Cid-Arregui A., Beckhove P. and Momburg F. (2014): Common mutations in oncogenes/tumor suppressor genes as targets for long peptide anti-cancer vaccination. Poster at the Cancer Immunotherapy (CIMT) 12th Annual Meeting, Mainz, Germany
8. 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. (2014): A vaccine targeting mutant IDH1 induced antitumor immunity. *Nature*, p. 324-327, Volume 512, Issue 7514; 21 August 2014

Hope is not the conviction that something will turn out well
but the certainty that something makes sense,
regardless of how it turns out.

Václav Havel

Zusammenfassung

Tumor-assoziierte Antigene (TAAs) sind vielversprechende Zielstrukturen für immuntherapeutische Ansätze der Krebstherapie. Hierfür eignen sich insbesondere mutierte Proteine, die Tumor-spezifische Antigene (TSAs) enthalten können, da diese ausschließlich im Tumor und nicht im normalen Gewebe exprimiert werden. TSAs sollten darüber hinaus, im Gegensatz zu Wildtyp-Sequenzen, weder eine Autoimmunreaktion hervorrufen noch der zentralen Toleranz unterliegen. In dieser Arbeit sollte erstmals gezeigt werden, dass eine mutationsspezifische Multipeptid-Vakzine, die simultan mehrere häufig auftretende Mutationen gastrointestinaler Tumore in einem humanen HLA-Kontext erfasst, in der Lage ist mutationsspezifische, multifunktionale und polyvalente CD4⁺ und CD8⁺ Effektor-T-Zell-Antworten zu induzieren, die darüber hinaus eine Tumor-protective Kapazität besitzen. In diesem Kontext wurden auch immunsuppressive Gegenreaktionen, wie die Induktion regulatorischer T-Zellen, untersucht.

Als Zielantigene wurden die im Kolorektal- und Pankreaskarzinom am häufigsten auftretenden, mutierten Varianten des Tumorsuppressor-Proteins p53 und der Onkogene Kras und Braf ausgewählt. Des Weiteren wurde eine Reihe von Peptiden basierend auf den Wildtyp- und mutierten Sequenzen der genannten Onkoproteine konzipiert. Die Präsentation von MHC Klasse I und II-Epitopen, wurde durch Peptidlängen von 28-35 Aminosäuren realisiert. Ziel der Arbeit war, das Potential dieser langen Peptide für eine aktive Immunisierung zu analysieren und ihre Tumor-Protectivität in einem murinen Krebsmodell-System zu testen. Dazu wurden zunächst C57BL/6 und HLA Klasse I und II humanisierte Mäuse (HLA.A2/HLA.DR1-transgen) in einem Multipeptid-Ansatz vakziniert. T-Zell-Antworten der immunisierten Tiere wurden mit Hilfe eines Durchflusszytometrie-basierten Zytokin-Sekretionsassays nach Antigen-spezifischer *in vitro* Restimulierung erfasst. Dabei konnten simultane, polyvalente CD8⁺ zytotoxische und CD4⁺ Helfer-T-Zell-Antworten gegen einen Großteil der zur Vakzinierung verwendeten Peptide detektiert werden. Die Peptid-spezifischen T-Zellen zeigten des Weiteren ein multifunktionales Zytokin-Sekretionsprofil, wobei die CD4⁺ T-Zellen einen T_H1 Phänotyp aufwiesen. Zwei der langen mutierten Peptide, Kras G12V und p53 R248W, riefen signifikant höhere T-Zellantworten als entsprechende Wildtyp-Peptide hervor, was eine Mutationsspezifität der Immunantwort impliziert. Für diese beiden mutierten Peptide wurden des weiteren HLA.A2 und HLA.DR1 restringierte, die Mutationen enthaltende Epitope revalidiert (Kras G12V) bzw. neu bestimmt (p53 R248W).

Um die Tumorprotectivität der mutationsspezifischen Multipeptid-Vakzine zu erfassen, wurden in dem HLA transgenen Mausmodell durch Karzinogen-induzierte Tumorgenese syngene, tumorigene Fibrosarkom-Zelllinien generiert. Tumor-Wachstumsexperimente wurden mit zwei Zelllinien durchgeführt. Eine Zelllinie beinhaltete dabei Tumor-intrinsische *Tp53/Kras*-Mutationen und in die zweite Zelllinie wurde ein Transgen eingebracht, durch das die Tumorzellen die immunogensten Mutationen exprimierten. Im erstgenannten System verlangsamte eine Impfung mit mutierten Peptiden das Auswachsen der Tumore im Vergleich zu einer Impfung mit Wildtyp-Peptiden. Dagegen verursachte eine Impfung mit den immunogensten Wildtyp- und mutierten Peptid-Sequenzen jedoch eine starke Vermehrung

regulatorischer, immunsupprimierender T-Zellen, die mit einer Beschleunigung des Wachstums Transgen-exprimierender Tumore korrelierte.

Zusammenfassend konnte erstmals in einem humanisierten System gezeigt werden, dass ein mutationsspezifisches Muropeptid-Vakzin effizient polyvalente, multifunktionale und für die mutierten Antigene spezifische T-Zellen induzieren kann, die darüber hinaus das Potential haben Tumorzellen zu eliminieren. Es muss jedoch auch in Betracht gezogen werden, dass immunsuppressive, möglicherweise mutationsspezifische regulatorische T-Zellen hervorgerufen werden könnten, die den Erfolg dieses therapeutischen Ansatzes schmälern.

Abstract

Tumor-associated antigens (TAAs) are promising targets for immunological therapeutic intervention in cancer therapy. Particularly, mutated proteins are a source for true tumor-specific antigens (TSAs) because they are exclusively expressed in the tumor and are not shared with normal tissue. Moreover, TSAs reduce the risk of autoimmunity and increase the chance to overcome tolerance compared to non-mutated protein sequences. In this study we sought to show for the first time, that a mutation-specific multi-peptide vaccine, which targets simultaneously common mutations in gastrointestinal tumors in a human HLA context, is capable to induce multifunctional and polyvalent CD4⁺ and CD8⁺ effector T cell responses with a tumor-protective capacity. Furthermore, we aimed to investigate whether this strategy results in immune-suppressive counter-reactions, like the induction of regulatory T cells (T_{reg}).

As target-antigens, we created a panel of peptides with sequences derived from the most frequently mutated variants of the tumor suppressor p53 and the oncogenes Kras and Braf described for colorectal (CRC) and pancreatic carcinomas. More precisely, the peptides represent wild-type (wt) or mutated sequences and have a length of 28-35 amino acids to facilitate a presentation of MHC I and II epitopes. In the presented study we analyzed the potency of the long peptide panel for active vaccination and its tumor-protective capacity in a murine cancer model system. For this purpose we utilized C57BL/6J mice, as well as an HLA-class I/II humanized mouse strain (HLA.A2/HLADR1 transgenic), in a multi-peptide vaccination setting. T cell responses of immunized mice were monitored by flow cytometry measuring cytokine secretion after antigen-specific *in vitro* re-stimulation. Thereby, we observed simultaneous, polyvalent CD8⁺ cytotoxic and CD4⁺ helper T cell responses against the majority of the peptides. Moreover, the peptide-specific T cells possessed a multifunctional cytokine-secretion profile and CD4⁺ T cells displayed a T_H1 like phenotype. Notably, two of the mutation-comprising long peptides (Kras G12V and p53 R248W) induced a significantly higher secretion of cytokines than the corresponding wt sequences in both CD4⁺ as well as CD8⁺ T cells, which implied mutation-specificity. For these two peptides we were able to revalidate (Kras G12V) and identify (p53 R248W) HLA.A2 and HLA.DR1 restricted mutation-comprising epitopes.

To investigate the tumor-protective capacity of the vaccination approach syngenic fibrosarcoma cell lines were generated in the HLA-class I/II transgenic mouse model by carcinogen-induced tumorigenesis. In tumor challenge experiments we employed cell lines carrying intrinsic *Kras/Tp53* mutations and cell lines which were engineered to express the most immunogenic mutations found in our vaccination studies. Vaccination with mutated long peptides resulted in delayed tumor outgrowth compared to vaccination with wt counterparts regarding tumors with intrinsic mutations. However, animals vaccinated with highly immunogenic wt and mutated peptides showed a strong increase of immunosuppressive, peripheral T_{reg} numbers correlating with an accelerated outgrowth of transgene-expressing tumors.

In conclusion, we showed that long peptide vaccination targeting multiple mutated oncogenes and tumor suppressor genes is capable of eliciting polyvalent, multifunctional, and mutated antigen-specific effector T cells responses, which have the potential to eradicate tumor cells. Furthermore, we suggest the induction of immune-suppressive, possibly mutation-specific regulatory T cells as a critical issue for the success of this therapeutic approach.

Table of content

1. Introduction	1
1.1. The immune system	1
1.1.1. The processing and presentation of antigens are crucial requirements for the recognition of pathogens and tumors	2
1.1.1.1. MHC molecules – versatile tools for antigen presentation	2
1.1.1.2. Murine MHC molecules and HLA transgenic mice – a model system to identify epitopes presented in a human MHC context	4
1.1.1.3. Antigen processing	6
1.1.2. Dendritic cells – masterminds of vaccination success	8
1.1.3. T cell development in the thymus works hand-in-hand with the establishment of central tolerance	10
1.1.4. Activation of naïve T cells leads to differentiation into effector T cells	14
1.1.5. CD8 ⁺ T cells – accurate and efficient serial killers	16
1.1.6. CD4 ⁺ T cells – indispensable helpers	17
1.1.7. Regulatory T cell – Janus faced helpers	18
1.1.8. T cell memory – versatility for long-lasting protection	20
1.2. Cancer	23
1.2.1. Mutations in oncogenes and tumor suppressor genes	25
1.2.2. <i>Kras</i> and <i>Braf</i> – two prototypical oncogenes	27
1.2.3. <i>Tp53</i> – the ultimate tumor suppressor gene and guardian of the genome	29
1.2.4. Pancreatic Cancer	31
1.2.5. Colorectal Cancer	33
1.3. Interactions between cancer and the immune system	34
1.3.1. The cancer immunoediting hypothesis	34
1.3.2. Cancer immune escape mechanisms	37
1.3.3. Tumor antigens – cornerstones of cancer immunotherapy	38
1.4. Cancer Immunotherapy	40
1.4.1. Critical aspects for the design of a peptide vaccine	42
1.4.2. Anti-cancer T cell responses and their induction by vaccination	44
1.4.3. Recent improvements in peptide vaccine therapy and clinical trials	45
1.4.4. Clinical studies employing mutated <i>Kras</i> and <i>p53</i> peptides	48
1.4.5. T cell responses against mutation in <i>Tp53</i> , <i>Kras</i> and <i>Braf</i> in colorectal cancer patients	50
1.6. Objective of the thesis	51
2. Material and Methods	53
2.1. Materials	53
2.1.1. Antibodies	53
2.1.1.1. Antibodies for Flow Cytometry	53
2.1.1.2. Antibodies for Western Blot	54
2.1.2. Kits, Columns and Beads	55

2.1.3. Media, Supplements and Cytokines	55
2.1.3.1. Cytokines	55
2.1.3.2. Stimuli and Inhibitors	55
2.1.3.3. Cell Culture Media and Supplements	55
2.1.3.4. Antibiotics	56
2.1.3.5. Recipes Culture Media	56
2.1.4. Recipes for Buffers	57
2.1.5. Peptides	57
2.1.6. Chemicals	60
2.1.7. Consumables	60
2.1.8. Technical Equipment	61
2.1.9. Software	62
2.2. Methods	63
2.2.1. Work with laboratory mice	63
2.2.1.1. Mouse strains	63
2.2.1.1.1. C57BL/6J mice	63
2.2.1.1.2. NOD/SCOD mice	63
2.2.1.1.3. OT-II TCR-tg mice	63
2.2.1.1.4. A2.DR1 dtg mice	64
2.2.1.2. Genotyping of A2.DR1 dtg mice	64
2.2.1.3. Sterile preparation of organs from mice	67
2.2.1.3.1. <i>Preparation of peripheral lymph nodes and spleen</i>	67
2.2.1.3.2. <i>Preparation of T cells from peripheral lymphoid organs</i>	67
2.2.1.3.3. <i>Preparation of bone marrow</i>	67
2.2.1.3.4. <i>Generation of dendritic cells from bone marrow derived monocyte progenitors</i>	68
2.2.1.3.5. <i>Purification of dendritic cells from bone marrow cultures</i>	68
2.2.1.4. Vaccination of mice	68
2.2.1.4.1. <i>Adjuvants</i>	68
2.2.1.4.1.1. <i>Toll-like receptor 9 ligand CpG ODN 1668</i>	68
2.2.1.4.1.2. <i>Toll-like receptor 3 ligand poly(I:C)</i>	69
2.2.1.4.1.3. <i>Incomplete Freund's Adjuvants (IFA) Montanide ISA 720 and ISA 51</i>	69
2.2.1.4.2. <i>Vaccination schedules</i>	70
2.2.1.5. Tumor Challenges	72
2.2.1.6. Generation of carcinogen-induced syngeneic A2.DR1 dtg sarcoma cell lines	73
2.2.1.6.1. <i>Carcinogen-induced tumorigenesis with MCA (3-Methylcholanthrene)</i>	73
2.2.1.6.2. <i>In vitro an in vivo passaging of MCA-induced sarcomas for tumor cell line generation</i>	73
2.2.1.6.3. <i>Establishment of MCA-induced sarcoma lines in vitro</i>	74
2.2.1.6.4. <i>In vivo passaging of MCA-induced sarcomas</i>	74

2.2.2. Cell culture techniques	75
2.2.2.1 Cell lines	75
2.2.2.1.1. Murine cell lines	75
2.2.2.1.1.1. B16-F1	75
2.2.2.1.1.2. TC1	75
2.2.2.1.2. Human cell lines	75
2.2.2.1.2.1. SW480	75
2.2.2.1.2.2. HEK 293T cells	76
2.2.2.2. Thawing and freezing of cell lines	76
2.2.2.3. Culturing and passaging of cells	76
2.2.2.4. Harvest of cultured cells	77
2.2.2.5. Determination of cell number and cell viability	77
2.2.2.6. IFN- γ treatment of cells for up-regulation of MHC expression	77
2.2.2.7. Transient transfection of HEK 293T cells – Calcium phosphate precipitation method	77
2.2.2.7.1. Preparation of 2 X HBS buffer for calcium phosphate transfection	78
2.2.2.8. Transient transfection of A2.DR1 dtg fibrosarcoma line 2277-NS	78
2.2.2.9. Generation of stable mutant <i>Tp53/Kras</i> transgene expressing 2277-NS clones	79
2.2.2.9.1. Generation of the 2277-NS acceptor cell lines	79
2.2.2.9.2. Generation of 2277-NS transgenic clones expressing chimeric mutant <i>Tp53/Kras</i> transgenes	79
2.2.3. Flow cytometric experiments	80
2.2.3.1. Two color cytokine secretion assays	80
2.2.3.1.1. <i>In vitro re-stimulation of T cells on peptide pulsed dendritic cells</i>	80
2.2.3.1.2. <i>Cytokine secretion period</i>	81
2.2.3.1.3. <i>Cytokine Secretion Assay – FACS staining</i>	81
2.2.3.1.4. <i>Staining of beads for compensation</i>	83
2.2.3.2. Combined IFN- γ secretion assay and intracellular cytokine staining	84
2.2.3.2.1. <i>Stopping secretion of cytokines by inhibitors of the Golgi apparatus</i>	84
2.2.3.2.2. <i>Combined IFNγ-Cytokine Secretion Assay/ICCS – FACS staining</i>	84
2.2.3.3. CD107a Degranulation Assay	87
2.2.3.4. Staining of regulatory T cells	89
2.2.3.4.1. <i>Preparation of samples for T_{reg} cell staining</i>	89
2.2.3.4.2. <i>FACS staining of regulatory T cells</i>	89
2.2.3.5. Combined Memory and regulatory T cell staining	90
2.2.3.6. Staining for MHC molecules	91
2.2.4. Analysis of T cell effector functions	92
2.2.4.1. <i>In vitro</i> cytotoxicity assay – Chromium Release Method	92
2.2.4.1.1. <i>Target cells</i>	92
2.2.4.1.2. <i>Effector cells</i>	92
2.2.4.1.3. <i>Loading of target cells with chromium (^{51}Cr)</i>	94
2.2.4.1.4. <i>Co-culture of target cells with effector cells</i>	94
2.2.4.2. Regulatory T cell specificity assay	95

2.2.4.2.1.	<i>Immunization of C57BL/6 mice for the T_{reg} cell specificity assay</i>	96
2.2.4.2.2.	<i>Preparation and pulsing of dendritic cell</i>	96
2.2.4.2.3.	<i>Purification and activation of OT-II CD4⁺ effector T cells</i>	96
2.2.4.2.4.	<i>Purification of T_{reg} cells from vaccinated mice</i>	97
2.2.4.2.5.	<i>Co-culture of regulatory T cells and effector T cells</i>	98
2.2.4.2.6.	<i>Quantification of proliferation via ³H-thymidine uptake</i>	99
2.2.5.	Molecular Biology	100
2.2.5.1	Screening for mutations in A2.DR1 dtg fibrosarcoma cell lines	100
2.2.5.1.1.	<i>Preparation of genomic DNA from culture cells</i>	100
2.2.5.1.2.	<i>Extraction of RNA from cultured cells</i>	100
2.2.5.1.3.	<i>Elimination of DNA contaminations from RNA samples</i>	101
2.2.5.1.4.	<i>Complementary DNA synthesis from total RNA samples</i>	101
2.2.5.1.5.	<i>Amplification of Tp53 and Kras sequences from cDNA and genomic DNA samples</i>	101
2.2.5.1.6.	<i>Sequencing of amplified of Tp53 and Kras sequences</i>	103
2.2.5.2.	Design and Cloning of chimeric (mutated) <i>Tp53/Kras</i> transgenes	103
2.2.5.3.	Gateway Cloning of chimeric <i>Tp53/Kras</i> transgenes into an expression vector for functional analysis	104
2.2.6.	Work with Proteins: Western Blot	106
2.2.6.1.	Preparation of whole protein lysates form cultured cells	106
2.2.6.1.1.	<i>Preparation of Protein Extraction Buffer</i>	106
2.2.6.2.	Preparation of whole protein lysates from mouse tumor tissue	106
2.2.6.3.	SDS-PAGE and Western Blotting	107
2.2.6.3.1.	Sample preparation for PAGE	107
2.2.6.3.2.	SDS-PAGE	107
2.2.6.3.2.	Western Blot	108
2.2.6.4.	Immunoblotting	108

3. Results

3.1.	T cell responses against mutations in p53 and Kras after multi-peptides vaccination	110
3.2.	Detailed analysis of vaccination-induced T cell responses towards oncogene-derived long peptides	118
3.2.1.	No spontaneous responses towards oncogene-derived wt and mutated peptides in untreated animals	118
3.2.2.	Sequence alterations in peptide backbones between mouse and human do not influence the mutation-specificity induced by vaccination	120
3.2.3.	The presence of CD4 ⁺ T cells influences CD8 ⁺ T cell <i>in vitro</i> responsiveness	123
3.2.4.	No evidence of epitope competition between different mutated oncogene-derived peptides	125
3.2.5.	T _{reg} cell specificity assays indicate the induction of antigen-specific regulatory T cells against distinct oncogene-derived sequences	

	after long peptide vaccination	131
3.3.	Identification of epitopes within most immunogenic peptides	137
3.3.1.	Identification and validation of the two mutated peptides with the strongest immunogenicity	137
3.3.2.	Identification of potential epitopes within the most immunogenic peptides Kras G12V and p53 R248W in the human MHC context	139
3.4.	Improvement of the vaccination formulation	147
3.5.	Establishment of a tumor model for the A2.DR1 dtg mouse system	151
3.5.1.	Generation of A2.DR1 dtg syngenic tumor cell lines by carcinogen-induced tumorigenesis	151
3.5.2.	Characterization of syngenic A2.DR1 dtg tumor cell lines generated by carcinogen-induced tumorigenesis	153
3.5.3.	Engineering of the A2.DR1 dtg sarcoma cell line 2277-NS for the expression of the most immunogenic <i>Tp53</i> and <i>Kras</i> mutations	163
3.6.	<i>In vitro</i> cytotoxicity assays and tumor challenge experiments provide evidence for the natural processing of epitopes comprising the mutations p53 R248W and Kras G12V	171
3.7.	The influence of mutated p53 and Kras long peptide vaccination on <i>in vivo</i> growth of tumors expressing targeted mutations	180
3.7.1.	Influence of long peptides vaccination on <i>in vivo</i> growth of tumors expressing the most immunogenic mutations	180
3.7.2.	Influence of long peptide vaccination on <i>in vivo</i> growth of tumors expressing intrinsic <i>Tp53</i> and <i>Kras</i> mutations	184
4.	Discussion	191
4.1.	Induction of polyvalent T cell responses against mutations in <i>Tp53</i> and <i>Kras</i> by long peptide vaccination	192
4.2.	Mutated Kras and p53 targeting long peptide vaccination induced CD4 ⁺ and CD8 ⁺ T cells displaying multifunctional phenotypes	195
4.3.	Detailed analysis of mutation specific responses revalidated a Kras G12V mutant epitope and suggested novel mutated p53 R248W epitopes	200
4.4.	Vaccination with mutated p53 and Kras long peptides has an impact on <i>in vivo</i> tumor growth of tumors expressing the targeted mutations	204
4.5.	Conclusions and future perspectives	207
5.	Literature	211
6.	Abbreviations and Definitions	227
7.	Appendix	
7.1.	Chimeric (mutated) <i>Tp53</i> / <i>Kras</i> transgene sequences	230
7.2.	Vector charts	233

Acknowledgements

Acknowledgement/Danksagung

Mein aufrichtigster und herzlichster Dank gilt:

Prof. Dr. **Philipp Beckhove** für die fortlaufend gute Betreuung und die Möglichkeit meine Doktorarbeit in seinem Labor anfertigen zu können. Besonders möchte ich mich für das Vertrauen und den großen wissenschaftlichen Freiraum bedanken, den ich während meiner Promotion beanspruchen durfte. Durch ihn wurde diese Arbeit erst möglich.

PD Dr. **Frank Momburg** für die Bereitstellung des Themas. Vielen Dank auch an Herrn Dr. **Angel Cid-Arregui** für die tatkräftige Unterstützung bei den Mausexperimenten und vielen nützlichen Ratschlägen.

Meinen TAC-Mitgliedern Prof. Dr. **Rainer Zawatzky**, Prof. Dr. **Michael Kirschfink** und Prof. Dr. **Karsten Watzl** für guten Rat und Zuspruch über die Jahre. Vielen Dank auch an Herrn Prof Dr. **Ralf Bartschlag**, der sofort den Prüfungsvorsitz für meine Disputation übernahm.

Allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der AG Beckhove für die freundliche Aufnahme in ihre Gruppe, eine tolle Arbeitsatmosphäre und dafür, dass sie meine Doktorandenzeit zu einem großartigen und einmaligen Erlebnis gemacht haben. Auch möchte ich mich bei allen Mitgliedern der ehemaligen **AG Moldenhauer** und des **Bayer-Joint-Labs** für die ‚gute Nachbarschaft‘ bedanken.

Michael Bartoscheck, der sich mit Witz, Charme und Pipette in seiner Master-Arbeit der kniffligen Aufgabe stellte den T_{reg} Assay in das Maussystem zu übertragen und sich dafür so manche Freizeit rauben ließ.

Florian Heigwer, der sich als fleißiger Praktikant für einige, zugegeben etwas ausufernde, Riesen-Catch-Assays die Nächte um die Ohren schlug.

Dem Spitzbuben-Trio **Felix Klug**, **Hans-Henning Schmidt** und **Chris Schlude**, von denen ich viel für das Leben und auch einiges für die Wissenschaft gelernt habe.

Natürlich meinen unvergleichlichen ‚Denk-Zellen-Mitinsassen‘ **Anna-Lena Krause**, **Noemi Bender** und **Till(i) Michels**, die von Maus-Assistenz-Ärzten, über Unisport bis hin zu diversen Festivitäten einfach für alles zu haben waren.

Adriane Gardyan, für gute Gespräche und das große Abenteuer AACR 2013.

Lilli Podola und **Diane Egger-Adam** für viele witzige Unterhaltungen und dafür, dass sie immer ein offenes Ohr hatten.

Dem TA-Team, allen voran **Ludmila Umansky**, **Mariana Bucur** und **Simone Jünger**, die egal wie viel sie gerade selbst um die Ohren hatten, immer lustig und freundlich bereit waren zu helfen.

My deep thank-you goes to **Maria Xydia**, for good advice, support, compassion, and above all for this special connection between big sisters.

Thank you, **Nisit Khandelwal** for your mean tongue and your warm heart.

Thanks to our PhD greenhorns **Antonio Sorrentino**, **Valentina Volpin**, and **Chih-Yeh Chen**, it was a short but very nice time with you around.

I do have to thank **Slava Stamova** and **Mudita Pincha**, for good scientific discussions, help and advice. I also want to say thank you to **Anchana Rathinasamy** and **Yingzi Ge**.

Meinen zwei Schwestern **Sara** und **Lisa-Ann Quandt**, die mich Laborratte immer mit viel Humor zu verstehen wussten.

Meinen Eltern **Siegfried Quandt** und **Petra Quandt**, die immer für mich da waren.

Dominik Knabe, der sogar gelernt hat das FACS zu bedienen, um mir zu helfen, und der mit seinem unerschütterlichen Glauben an mich auf besondere Weise zu der Entstehung dieser Arbeit beigetragen hat.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Dissertation selbstständig verfasst und mich dabei keiner anderen, als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe.

Heidelberg, 11.09.2014

Jasmin Quandt