

Aus der Klinik für Innere Medizin I

Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

Onkologie, Hämatologie, klinische Immunologie und Rheumatologie

Arbeitsgruppe: Prof. Dr. med. Christoph Renner

Immunantwort von Patientenseren auf hefeexprimierte CT-Antigene

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin**

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2017

vorgelegt von:

Jürgen Janka

geb. am: 20.12.1977 in Mainz

Tag der Promotion:

Dekan:

Berichterstatte:

Meinen lieben Eltern

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	VII
Zusammenfassung	X
Abstract	XII
1 Einleitung	1
1.1 Tumorentstehung	1
1.2 Immunologische Grundlagen	3
1.2.1 Antigenpräsentation	3
1.2.2 MHC-I-Moleküle	4
1.2.3 MHC-II-Moleküle	4
1.2.4 CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen	6
1.2.5 Immunglobuline	8
1.2.6 Antikörpervielfalt	12
1.2.7 B-Lymphozyten	12
1.3 Immuntherapeutische Strategien	14
1.3.1 Grundlagen	14
1.3.2 Passive Immuntherapie	14
1.3.3 Aktive Immuntherapie	17
1.3.4 Immun-Escape	18
1.4 Die Entdeckung tumorassoziierter Antigene	18
1.5 Einteilung tumorassoziierter Antigene	22
1.6 Charakterisierung der getesteten CT-Antigene	24
1.6.1 SSX-2 und SSX-4	24
1.6.2 NY-ESO-1	25
1.6.3 LAGE-1a und LAGE-1b (LAGE-1S bzw. LAGE-1L)	25
1.6.4 CT7 (MAGE-C1)	25
1.6.5 CT10 (MAGE-C2)	26
1.7 Ziel der Arbeit	26
2 Material und Methoden	27
2.1 Chemikalien und Geräte	27
2.2 Nährmedien	27
2.2.1 Nährmedien für Hefen	27

Inhalt

2.3	Protein- Molekulargewichtsmarker	28
2.4	Antikörper	28
2.5	Patientenseren	29
2.6	Hefestämme	29
2.7	Puffer	29
2.8	Vektoren.....	30
2.9	Computersoftware.....	32
2.10	Hefe-Techniken.....	32
2.10.1	Herstellung kompetenter Hefen und Transformation.....	32
2.10.2	Hefekultivierung und Induktion der Oberflächenexpression	33
2.10.3	Nachweis der Oberflächenexpression	33
2.10.4	Präabsorption von Patientenseren.....	34
2.10.5	Immunfluoreszenzfärbung der Hefezellen	34
2.10.6	IgG-Subklassenfärbung	35
2.10.7	FACS-Messung und Auswertung durch WinMDI	35
2.10.8	FACSscan.....	36
2.11	Protein-Techniken	37
2.11.1	Abspaltung und Fällung von Hefeoberflächenproteinen.....	37
2.11.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	38
2.11.3	Herstellung eines SDS-Polyacrylamidgels	39
2.11.4	Elektrophorese	39
2.11.5	Immunblot (Western-Blot)	39
2.11.6	Proteintransfer	39
2.11.7	Immunologischer Nachweis von Proteinen.....	40
2.11.8	Färbung von Proteinen mit Coomassie-Farbstoff.....	40
2.11.9	Nachweisreaktion mit ECL+ (Enhanced chemiluminescence)	41
3	Ergebnisse	42
3.1	Nachweis der Antigenexpression.....	42
3.2	Färbung der Seren auf die CT-Antigene.....	46
3.2.1	IgG- Subklassen.....	51
4	Diskussion.....	55
4.1	NY-ESO-1	56
4.2	LAGE-1a und LAGE-1b.....	59

4.3	SSX-2 und SSX-4	59
4.4	CT7 und CT10	61
4.5	Gleichzeitige Erkennung mehrerer CT-Antigene	62
4.6	Subklassen	63
4.7	Fazit und Ausblick	64
5	Literaturverzeichnis	68
6	Danksagung.....	91
7	Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celcius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
ADCC	Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity
APC	Antigenpräsentierende Zelle (antigen presenting cell)
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
CaCl ₂	Calciumchlorid
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	Komplementäre DNS (complementary DNS)
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CT-Antigen	Cancer/Testis-Antigen
CTL	Zytoxische T-Lymphozyten
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
E.coli	Escherichia coli
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (Ethylendiamintetraacetat)
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
g	Gramm
H ₂ O	Wasser
HBV	Hepatitis B-Virus
HCl	Salzsäure
HER2/neu	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
HHV-8	Humanes Herpesvirus 8
HLA	Human Leukocyte Antigen
HPV	Humanes Papilloma-Virus

Abkürzungsverzeichnis

Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
K	Kalium
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
mg	Milligramm
MG	Molekulargewicht
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol
Na	Natrium
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
OH-Gruppe	Hydroxyl-Gruppe
Page	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS-Puffer	Phosphate buffered saline-Puffer
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
pH	potentia Hydrogenii
pmol	Pikomol
RAG2-Gen	Rekombination-aktivierendes Gen
RAYS	Recombinant Antigen expression on Yeast Surface
RE	Restriktionsendonukleasen
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Laurylsulfat
SEREX	Serologische Analyse einer rekombinanten cDNS-Expressionsbibliothek
STAT1	Signal transducer and activator of transcription1
TAA	Tumorassoziierte Antigene

Abkürzungsverzeichnis

TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TENS	Tris-EDTA-NaOH-SDS
TGF	Transforming Growth Factor
U	Unit
V	Volt
v/v	Volumenprozent
W	Watt
w/v	Gewichtsprozent
YNB	Yeast nitrogen base without aminoacids
YPD	Yeast Extract Peptone Dextrose

Zusammenfassung

Jährlich erkranken in Deutschland etwa 477 000 Menschen an Krebs. Während sich bei einigen Krebserkrankungen die Überlebensrate deutlich verbessert hat, ist bei anderen keine Verbesserung eingetreten. Die Suche nach neuen Behandlungsstrategien ist daher Gegenstand der heutigen Tumorforschung. Um eine gezielte Therapie zu entwickeln, bedarf es jedoch an Wissen um die Tumorentstehung und um die Rolle des Immunsystems den Krebs zu bekämpfen. Bei der aktiven Immuntherapie sucht man nach Wegen das Immunsystem gegen tumorspezifische Antigene zu aktivieren und dadurch maligne Zellen zu zerstören. Eine erfolgreiche Therapie kann jedoch nur funktionieren, wenn es mittels immunogener Peptide gelänge, eine Vakzinierung durchzuführen, welche eine rasche und adäquate T-Zellantwort auslöst bzw. eine Potenzierung der natürlich vorkommenden Immunantwort auslöst. Voraussetzung für eine gezielte Therapie sind Antigene, die nur in Tumorzellen exprimiert werden. Serologische Untersuchungen von Krebspatienten haben in den letzten Jahren die Entdeckung einer Vielzahl von sogenannten Cancer/Testis (CT-)Antigenen ermöglicht. Der Name dieser Antigene leitet sich von den Geweben ab, auf denen sie nachweisbar sind. Diese Antigene, welche von einer großen Anzahl von Tumoren gebildet werden, bieten vielversprechende Möglichkeiten für neue Therapieansätze, da sie in der Lage sind eine humorale und zelluläre Immunantwort auszulösen. Mit dem Verfahren des „autologous typing“ und später durch das von Pfreundschuh entwickelte Verfahren des SEREX war es möglich Tumorantigene aufgrund ihrer, durch ihre Immunogenität hervorgerufene, Antikörperbildung zu identifizieren. Eine Weiterentwicklung dieses Verfahrens stellt das von Renner entwickelte RAYS dar, was den Vorteil bietet, Proteine an der Zelloberfläche in ihrer nativen Faltung und Glykosylierung exprimieren zu können. Dieses Verfahren wurde von uns verwendet, um die Antikörperantwort von Patienten mit verschiedenen Tumorentitäten auf vordefinierte Antigene zu testen. Antigene, die serologisch erkannt werden, können als Tumormarker dienen, sofern Antikörper nur in Patienten, nicht aber in gesunden Kontrollpersonen nachgewiesen werden. Zumeist steht die Höhe der serologischen Reaktivität in direktem Zusammenhang mit der Eignung des Antigens, als Marker zur Diagnostik und Früherkennung sowie zur Evaluation eines Therapieerfolges zu dienen. Die von uns untersuchten CT-Antigene zeigten sich hierbei als besonders geeignet. In den meisten

von uns untersuchten Seren konnten Antikörper gegen CT-Antigene, unabhängig von dem zugrunde liegenden Tumor, detektiert werden. Häufig wurden bei einem Tumorpatienten mehrere CT-Antigene gefunden. In unserer Arbeit exprimierten 44% der Patienten mehr als ein Antigen. Bei einigen konnte eine Antikörperantwort gegen mehr als vier der getesteten CT-Antigene gefunden werden. Dies deckt sich mit zahlreichen Studien, bei denen eine Co-Expression von CT-Antigenen nachgewiesen wurde. Des Weiteren führten wir Subklassenanalysen durch. Studien ergaben, dass bei Protein-Antigenen häufig eine IgG1- und IgG3-Antwort ausgelöst wird. In den von uns getesteten Seren zeigte sich häufig eine IgG1-Antwort. Eine IgG3-Antwort blieb jedoch in den meisten Fällen aus.

Grundsätzlich erscheinen CT-Antigene aufgrund ihrer immunaktivierenden Eigenschaften für eine Immuntherapie und als Parameter zur Tumorsuche als geeignete Kandidaten.

Abstract

In Germany there are some 477 000 reported new cases of cancer every year. While there has been seen an improvement in the survival rates of certain types of cancer, there is none for others. Therefore contemporary tumor research concentrates on new treatment strategies. The prerequisite however for developing a targeted therapy is the knowledge of tumor development and the role played by the immune system in interacting with cancer. Active immunotherapy looks into ways for activating the immune system against tumor-specific antigens and hence destroying malignant cells. However such a therapy could only be successful if it was able to perform a vaccination capable of triggering a rapid and adequate T-cell response or potentize the natural immune response against immunogenic peptides. The precondition for a targeted therapy are tumorspecific antigens exclusively expressed in the targeted tumor cells. During the last years, serological testing of cancer patients has made it possible to detect a plurality of so-called Cancer/Testis (CT-) antigens. Their precise denomination is derived from the tissues they can be found on. These tumorspecific antigens expressed by a large number of tumors are rather promising for the development of new therapeutic approaches as they are able to induce humoral and cellular immune responses. Antigen Identification procedures like autologous typing or the SEREX method developed by Pfreundshuh years later have allowed the identification of tumoral antigens through the detection of their correspondent antibodies induced by their immunogenicity. A further development of the latter is to be found in Renner's RAYS identification method allowing to look for a protein expression on the cell surface including their native folding and glycosylation. We have used this method for testing antibody responses to predetermined antigens in patients with various tumor entities. Serologically detected antigens may serve as tumor markers only if they are to be detected in patients exclusively and not in healthy control subjects. In most cases the magnitude of the serological response correlates directly with the antigen's ability to serve as a marker for diagnostics and early detection purposes as well as for therapy success evaluation. CT-antigens we tested proved particularly suited for these purposes. In most sera analysed by our team we were able to detect antibodies produced against CT-antigens irrespective of the underlying tumor. Frequently, more than one CT-antigens could be found within one tumor patient. In our sampling material more than

44% of all patients tested had expressed more than one antigen. In some cases antibody response against more than four CT-antigens could be found. This tends to confirm findings of numerous studies where co-expression of CT-antigens were found. Furthermore, we realised immunoglobulin subclass analysis. Studies showed that protein antigens often trigger an IgG1- and IgG3-response. In our own study, while we often found an IgG1-response, there was however no IgG3-response in most cases. Basically, due to their immunoactivating capacities, CT-antigens appear suitable candidates for an immunotherapy as well as a parameter for tumor search.

1 Einleitung

An Krebs erkranken in Deutschland jährlich etwa 477 000 Menschen und ist nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen der zweithäufigste Grund zu versterben. Bei Männern steht das Bronchialkarzinom an erster Stelle der Krebserkrankungen, bei Frauen das Mammakarzinom. An zweiter Stelle stehen bei beiden Geschlechtern Darmkrebs-erkrankungen.

Bei den meisten Krebserkrankungen haben sich die Überlebensaussichten im Verlauf der letzten 25 Jahre verbessert und der Anteil der als geheilt anzusehenden Patienten erhöhte sich für die Krebskrankheiten insgesamt von 25% auf 37% bei Männern und von 44% auf 49% bei Frauen (www.rki.de). Während sich bei einigen Krebserkrankungen (z.B. Hodenkrebs) die Überlebensrate deutlich verbessert hat, ist bei anderen (z.B. Pankreaskarzinom mit einer 5-Jahres Überlebensrate von 5%) keine Verbesserung eingetreten. Über ein Drittel der Krebspatienten können immer noch nicht geheilt werden. Um die Prognose zu verbessern ist daher, neben der chirurgischen Behandlung, Chemo- und Strahlentherapie, die Weiterentwicklung der Immuntherapie notwendig, bei der tumorspezifische Antigene eine zielgerichtete onkologische Therapie ermöglichen. Um diese gezielte Therapie (sog. "targeted cancer therapy") zu entwickeln, bedarf es jedoch an Wissen um die Tumorentstehung und um die Rolle des Immunsystems den Krebs zu bekämpfen.

1.1 Tumorentstehung

*Unter einem „Tumor“ im engeren Sinne versteht man eine abnorme Gewebsmasse, die auf eine autonome, progressive und überschießende Proliferation körpereigener Zellen zurückgeht, sich weder strukturell noch funktionell in das Normalgewebe eingliedert und auch dann noch weiterwächst, wenn der auslösende Reiz nicht mehr wirksam ist...[1]. Tumoren sind also Zellen des Körpers, die sich aus dem normalen Ablauf von Zellteilung, Differenzierung und Apoptose losgelöst haben [2] und nach D. Hanahan und R. Weinberg insgesamt 10 charakteristische Eigenschaften (sog. *Hallmarks of Cancer*) besitzen. Hierzu zählen u.a. Resistenzmechanismen gegen den Zelltod, Umgehung von wachstumshemmenden Vorgängen in der Zelle, Aktivierung und*

Metastasierung von Zellen, vermehrte Angiogenese und Mechanismen zur Verhinderung von Apoptose [3].

Bereits 1914 hat der in Würzburg lebende Zoologe T. Boveri festgestellt, dass in Tumorzellen Chromosomenveränderungen vorlagen. Obwohl die molekulare Natur des genetischen Materials noch nicht bekannt war, vermutete K.H. Bauer 1928 den Zusammenhang zwischen Mutationen einzelner Gene und der Entstehung von Krebs. Dabei reicht zur Transformation einer normalen in eine maligne Zelle nicht nur eine Mutation aus, sondern es müssen mehrere genetische Veränderungen zusammen kommen. Man geht hierbei von einem Mehrschrittmodell aus, bei dem es durch Akkumulation genetischer Läsionen in einer Zelle zur malignen Entartung kommt [4;5;6]. Das Genom der Tumorzelle wird durch eine Anhäufung von Mutationen verändert. Diese Veränderungen werden dann von einer Generation auf die nächste übertragen. Die genaue Anzahl der Ereignisse, die zur Bildung eines malignen Tumors erforderlich sind, ist noch nicht geklärt. Die Sequenzierung von DNA aus soliden Tumoren ergab, dass etwa 60-100 Mutationen in tumorassoziierten Genen vorliegen. Die genetischen Läsionen können in Keimbahnzellen oder somatischen Zellen sowohl die Aktivierung (Gain-of-Function Mutation) von Proto-Onkogenen zu Onkogenen (z.B. KRAS, BRAF und EGFR) auslösen [7;8], als auch Tumorsuppressorgene (z.B. p53 und APC) inaktivieren (Loss-of-Function-Mutation) [9;10;11]. Die Mutationen resultieren jedoch in ähnlichen Ergebnissen: es entsteht ein Tumor, der von einer einzigen Körperzelle abstammt. Erst im weiteren Verlauf entstehen Nebenzelllinien mit verschiedenen genetischen Veränderungen, so dass ein Tumor mit einer heterogenen Zellpopulation entsteht [1].

Für wissenschaftliche Fragestellungen dient das Kolonkarzinom häufig als Modelltumor, weil die Kaskade der zur Neoplasie führenden Gendefekte seit den 1990er Jahren bekannt ist. Untersuchungen von Fearon und Vogelstein haben gezeigt, dass die Progression des Tumors von normalem über hyperplastischem Epithel, dem Adenom zu einem malignen Tumor (auch als Adenom-Karzinom-Sequenz bekannt) [12;13] mit der Akkumulation von genetischen Läsionen einhergeht [4]. Betroffen sind mit jeweils 80% sowohl das Tumorsuppressorgen p53 als auch das APC-Gen. Hierbei spricht man auch von Gatekeeper- oder Caretaker-Genen, welche inaktiviert werden wodurch es zum Funktionsverlust kommt. Die inhibierende Funktion geht dabei verloren und es kommt zu einem unkontrollierten Wachstum der Zelle. Das Onkogen

K-ras (ein Akronym für Kirsten rat sarcoma viral oncogene) hingegen wird aktiviert. So wird die Aktivität des Proteins nicht beendet und wachstumsstimulierende Signale wirken auf die Zelle ein. Es kommt zur Induktion eines Tumors. Zeitweise kann das Tumorwachstum kontrolliert werden. Da im weiteren Verlauf jedoch auch die Gene der Rettungsmechanismen geschädigt oder überlastet werden, kann die Entstehung des Tumors nicht immer unterdrückt werden [14;15;16].

1.2 Immunologische Grundlagen

Die Rolle des Immunsystems in der Tumorbekämpfung wurde erstmals von Paul Ehrlich in seiner Theorie der „immune surveillance“ beschrieben. Heutzutage weiß man, dass das Tumorwachstum der Kontrolle des Immunsystems unterliegt. Dass bestimmte Malignome bei Patienten unter Immunsuppression nach Organtransplantationen (3- bis 5-fach erhöhte Wahrscheinlichkeit) und bei solchen, die unter angeborenen oder erworbenen Defekten des Immunsystems litten (z.B. HIV) häufiger auftraten, schien die Theorie der Immunüberwachung zu untermauern [17]. Der endgültige Beweis wurde jedoch erst 2001 erbracht. Shankaran et al. berichteten über eine erhöhte Inzidenz von gastrointestinalen Karzinomen und Mammakarzinomen bei Mäusen mit Verlust des RAG2-Gen (‘Rekombination-aktivierendes Gen’ im Rahmen von Reifungsvorgängen der Lymphozyten) und STAT1-Gen (‘Signal transducer and activator of transcription1’ kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der eine Rolle von Interferon-vermittelten Abwehrmechanismen spielt). Bei den immunkompetenten Kontrollmäusen konnte hingegen kein Tumorwachstum festgestellt werden [18].

1.2.1 Antigenpräsentation

Damit nun die Tumorzelle als „fremd“ und damit von den T-Lymphozyten erkannt wird, muss sie auf ihrer Oberfläche in Verbindung mit genetisch determinierten MHC-Molekülen Peptidfragmente der Tumorantigene präsentieren [19]. Peptidrezeptoren des MHC-Komplexes werden dabei in zwei Klassen unterteilt: Klasse I und Klasse II. Da diese Proteine vor allem auf Lymphozyten vorkommen, werden sie auch als humane Lymphozytenantigene (HLA) bezeichnet. Die MHC-Moleküle unterscheiden sich nicht nur in ihrem Aufbau, sondern auch in ihrer Funktion.

1.2.2 MHC-I-Moleküle

MHC-I-Moleküle befinden sich, mit Ausnahme testikulärer Keimzellen, auf allen kernhaltigen Zellen und werden durch die HLA-Gene HLA-A, HLA-B und HLA-C codiert. Es handelt sich hierbei um monomere, integrale Membranproteine mit drei extrazellulären Domänen (α_1 , α_2 , α_3), welche eine nicht-kovalente Bindung mit einem β_2 -Mikroglobulin eingeht. MHC-I-Moleküle präsentieren Peptide, die sich von zytoplasmatischen Proteinen ableiten (intrazelluläre Viren und Bakterien oder mutierte Proteine). Die dann durch das Protein Ubiquitin markierten Proteine werden durch das Proteasom erkannt und dort in einzelne Aminosäuren abgebaut. Einige Peptide werden durch spezialisierte Transportmoleküle (TAP: transporter associated with antigen presentation) in das endoplasmatische Retikulum befördert und binden dort mit Hilfe verschiedener Chaperone (Tapasin, ERp57 und Calretikulin) in einer Spalte zwischen der α_1 - und α_2 -Domäne eines entsprechenden MHC-I-Moleküls. Von dort werden sie nun mit Hilfe von Vesikeln an die Zelloberfläche transportiert und dort präsentiert. Man spricht hierbei von einer MHC-Restriktion.

1.2.3 MHC-II-Moleküle

MHC-II-Moleküle werden fast ausschließlich an der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen (APC), z.B. dendritischer Zellen, B-Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen, Endothelzellen, exprimiert und durch HLA-DP, HLA-DQ und HLA-DR kodiert [20]. Bei den MHC-II-Molekülen handelt es sich um ein symmetrisches Heterodimer bestehend aus einer α - und β -Kette mit jeweils zwei extrazellulären Domänen. Die antigenpräsentierenden Zellen nehmen extrazelluläre Proteine (z.B. durch Tumorzelllyse freigesetztes Material) durch Bindung an spezifische Fc-Rezeptoren über Endozytose in Endosomen auf, welche dann mit Lysosomen fusionieren. Die sich dort befindlichen Proteasen (zum Beispiel Cathepsin B, D, S und L) bauen die Proteine zu Peptiden ab. Das sich zunächst im Endoplasmatischen Retikulum befindliche MHC-II-Molekül fusioniert schließlich, nach Abspaltung der CLIP (class-II-associated invariant chain peptide), mit einem Endosom und wird an die Zelloberfläche transportiert.

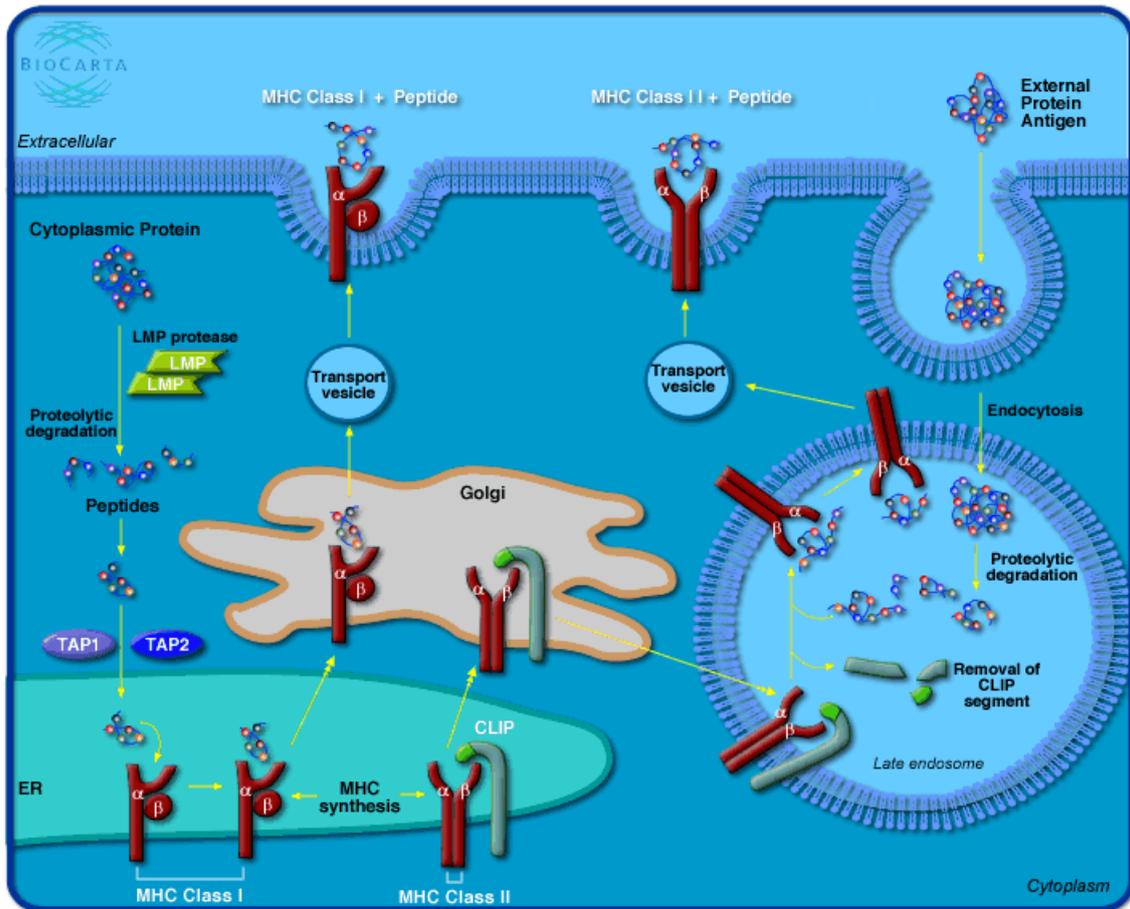


Abbildung 1¹: MHC-Restriktion: Intrazelluläre Proteine werden vom Proteasom und intrazellulären Proteasen in Peptide gespalten und über den Peptidtransporter TAP in das Endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert. Dort werden die Peptide auf HLA-Klasse-I-Komplexe geladen und über den Golgi-Apparat in Vesikeln zur Zelloberfläche transportiert. Proteine aus dem extrazellulären Raum werden mittels Endozytose aufgenommen und anschließend durch Proteasen in Peptide abgebaut. Diese werden dann auf HLA-Klasse-II-Moleküle geladen. Das sich zunächst im Endoplasmatischen Retikulum befindliche MHC-II-Molekül fusioniert schließlich, nach Abspaltung der CLIP (class-II-associated invariant chain peptide), mit einem Endosom. Die Peptid-HLA-Klasse-II Komplexe verlassen schließlich das endosomal-lysosomale Kompartiment und werden an die Oberfläche der Zelle transportiert.

Durch die Präsentation der Antigene erlangt das Immunsystem nun z.B. Kenntnis über Virusinfekte der Zelle (Präsentation von viralen Antigenen) oder maligne Entartung (Präsentation von Tumorantigenen). Die Präsentation für die Effektorzellen findet in den lymphatischen Organen, wie zum Beispiel der Milz oder den Lymphknoten, statt [21;22;23;24;25;26]. Eine besondere Rolle der Präsentation von Antigenen scheinen dendritische Zellen zu haben. Über die Kreuzpräsentation kombiniert es Eigenschaften

¹ Entnommen aus http://www.biocarta.com/pathfiles/h_mhcPathway.asp

der oben genannten Präsentationswege. Dadurch kann es das fremde Antigen in MHC-I- und MHC-II-Moleküle präsentieren [27].

1.2.4 CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen

Leukozyten erfüllen spezielle Aufgaben in der Abwehr von körperfremden Strukturen. Die Bildung erfolgt im roten Knochenmark aus pluripotenten Stammzellen, die sich in die unterschiedlichen Leukozyten-Subpopulationen weiter ausdifferenzieren. Dabei werden zwei große Gruppen unterschieden. Die Phagozyten (Zellen der angeborenen Immunabwehr u.a. dendritische Zellen und Makrophagen) und die Lymphozyten. Hauptbestandteil der Lymphozyten sind CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, welche ca. 70% der Lymphozyten des gesamten Körpers ausmachen. Zusammen mit den B-Lymphozyten stellen sie die erworbene oder auch adaptive Immunantwort dar.

Ab der 13. Entwicklungswoche wandern einige Stammzellen in den Thymus ein. Dort vermehren und differenzieren sie sich weiter zu den T-Lymphozyten. Während der Entwicklung finden Umlagerungen in den Keimbahngenen statt, wobei eine beliebige Rekombination der Genabschnitten als Grundlage für die Diversität der T-Zell-Rezeptoren (T-Cell-Receptor, TCR) dient. Analog den Immunglobulinen sind durch unterschiedliche V x D x J-Verbindungen und andere Mechanismen eine Kombination von 10¹⁵ T-Zell-Rezeptoren möglich.

Von den MHC-Molekülen I und II wird ein antigenes Peptid nun der spezifischen T-Zelle präsentiert. Hierbei bindet ICAM auf der antigengenpräsentierenden Zelle an LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen-1) auf der T-Zell-Membran. Die T-Zelle wird nun durch ein Doppelsignal aktiviert. Zum einen durch die Erkennung des Antigens durch den T-Zell-Rezeptor und zum anderen durch die Bindung des B7-1(CD80) und B7-2(CD86)-Proteins auf der antigenpräsentierenden Zelle an das CD28-Protein der T-Zelle [28;29;30;31]. Dieses Doppelsignal führt zur Sekretion von Interleukin-2 und zum Einbau des dazugehörigen Interleukin-2-Rezeptors [32]. Des Weiteren erfolgt zusätzlich eine Vielzahl von Rezeptor-Liganden-Interaktionen über verschiedene Membranproteine wie z.B. CD28/CTLA-4 und CD40/CD40L, LFA-1/ICAM-1. Diese Membranproteine werden auch als kostimulatorische Signalmoleküle zusammengefasst [28;33;34;35;36]. Bei einer Antigenbindung ohne Kostimulation wird der Lymphozyt inaktiviert. Der Komplex von MHC-Molekül und Peptid wird dann von CD8⁺ T-Zellen beziehungsweise CD4⁺ T-Zellen erkannt und führt zur T-Zellaktivierung

[37], Proliferation und Differenzierung in T-Killerzellen, TH1- und TH2-Zellen. Zytotoxische T-Lymphozyten ($CD8^+$) sind in der Lage, mit ihrem $CD8^+$ -assoziierten T-Zell-Rezeptor das MHC-I gebundene zugehörige Antigen zu erkennen und es mittels Perforinen oder Proteasen (z.B. Granzym B) abzutöten. Des Weiteren kann Apoptose auch durch die Ankopplung des Fas-Liganden (T-Zelle) an das Fas-Protein (=CD95) ausgelöst werden. Die über MHC-II gebundenen Antigene werden durch $CD4^+$ T-Helferzellen erkannt und führen durch Zytokinausschüttung zur B-Zell-Aktivierung mit Produktion von Antikörpern gegen das entsprechende Antigen [38;24;25;39;40]. Neben der Fähigkeit zur Immunglobulinproduktion können B-Zellen aber auch als antigenpräsentierende Zellen fungieren und den T-Zellen antigene Peptide präsentieren, wodurch diese aktiviert werden. Zum anderen erfüllen sie eine Helferfunktion, in dem sie zur Initiierung und Verstärkung der $CD8^+$ T-Zell Antwort beitragen [41]. Welche Richtung das Immunsystem einschlägt, hängt von dem durch die T-Helfer-Zellen exprimierten Zytokinmuster beziehungsweise dem vorherrschenden Zytokinmilieu ab. Dieser Vorgang ist unter anderem von der Antigenart und der Erstkontakt-Zelle abhängig. Häufig besteht keine strikte Trennung zwischen den Subpopulationen, sondern es finden sich vielmehr fließende Übergänge. Aber auch dendritische Zellen scheinen eine wichtige Rolle zu spielen. Durch Übermitteln von polarisierenden Signalen können sie das Th1/Th2 Muster verändern. Hierbei spielt Interleukin-12 sowie die Aktivierung von STAT4 eine wichtige Rolle. Wie es dazu kommt ist jedoch unklar [42]. Weiterhin hemmen sich TH1- und TH2-Zellen gegenseitig, so dass schließlich nur einer der beiden Typen vorherrscht. Zum Beispiel fördert die Sekretion von IL-4 durch Th2-Zellen die Entwicklung der Th2-Immunantwort [43]. Th2-Zellen bilden vor allem IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13 und aktivieren B-Zellen zur Produktion von Antikörpern. Eine Th1-Immunantwort hingegen wird geprägt durch die Anwesenheit der Zytokine IL-12 und $IFN-\gamma$. Bei einer Th1-Reaktion kommt es zur Aktivierung von Makrophagen und zu einer Steigerung der CTL-Aktivität (durch die Sekretion von $IFN-\gamma$ und IL-2). Im Rahmen der Tumorummunologie konnte gezeigt werden, dass $CD8^+$ T-Zellen den größten Anteil der Immunantwort gegen Tumore ausmachen, jedoch mehren sich die Beweise, dass auch $CD4^+$ T-Zellen eine wichtige Rolle in dieser Antwort spielen [44;45;46;47;48].

Die Aufgaben der $CD4^+$ T-Zellen beinhalten bei der Immunantwort gegen Tumore vielseitige Funktionen. Dazu gehört unter anderem die Helferfunktion für $CD8^+$ T-

Zellen während der primären und sekundären Immunantwort [49;50;51], die direkte Zytolyse und die Aktivierung der B-Zellen zur Produktion von tumorantigenspezifischen Antikörpern. Es konnte bewiesen werden, dass die Anwesenheit von tumorinfiltrierenden T-Lymphozyten bei einer Vielzahl von Tumoren die Prognose verbessert [52].

Eine weitere Bedeutung haben $CD4^+$ T-Zellen bei der Aktivierung und Erhaltung der antigenspezifischen Gedächtnis $CD8^+$ T-Zellen [53]. Vermutlich induzieren $CD4^+$ T-Zellen eine entsprechende Programmierung der antigenspezifischen $CD8^+$ T-Gedächtniszellen nach Antigen-Erstkontakt der $CD8^+$ T-Zellen. In den 1970er Jahren wurde erstmals eine Subpopulation von $CD4^+$ T-Zellen beschrieben, welche eine negativ regulatorische Rolle in der Initiierung und Erhaltung der $CD8^+$ T-Gedächtniszellen haben und eine überschießende Immunreaktion verhindert. Diese als regulatorische T-Zellen (T_{reg}) bezeichneten Abwehrzellen spielen eine Rolle in der Differenzierung sowie Aktivierung von T_H1 - und T_H2 -Zellen. Die aus der Krebstherapie bekannten Medikamente Cyclophosphamid und Paclitaxel greifen genau an dieser Stelle des Immunsystems an, in dem sie die T_{reg} -Zellen reduzieren und eine effektivere Immunantwort erlauben [54;55;56;57].

1.2.5 Immunglobuline

Bei dem humoralen Immunsystem handelt es sich vor allem um Antikörper und das Komplementsystem. Antikörper (Immunglobuline) sind ein Produkt der B-Lymphozyten, welche im Blut zirkulieren oder sich auf der Oberfläche von B-Lymphozyten befinden. Da sie in der Elektrophorese die Eigenschaft besitzen in der γ -Fraktion zu wandern, werden sie auch als γ -Globuline bezeichnet. Bei der Grundstruktur der Immunglobuline (siehe Abbildung 2) handelt es sich um antigenspezifische Proteine, welche aus vier Proteinketten bestehen, die wiederum aus jeweils zwei identischen schweren (heavy) H-Ketten (50 kDa) und zwei leichten (light) L-Ketten (25 kDa) aufgebaut sind. Die beiden schweren Ketten sind durch Disulfidbrücken und nicht-kovalente Bindungen miteinander verbunden und bilden eine Y-förmige Struktur [58]. Am offenen N-terminalen Ende bilden sie zusammen mit der leichten Kette das antigenbindende Fragment (Fab = fragment antigen binding) [59;60]. Diese sind frei schwenkbar und tragen an beiden Enden Bindungsstellen für das Antigen. Die Bindungsstellen sind hochvariabel und interagieren spezifisch mit dem

Epitop eines Antigens [61;62]. Für die H-Ketten spricht man von einem V_H -Bereich, für die L-Ketten von einem V_L -Bereich. Der C-terminale Teil (F_c = fragment crystallizable) des Y wird nur aus den beiden schweren Ketten gebildet und ist relativ konstant. Dieser Teil ist für die biologische Aktivität, also Bindung und Aktivierung von Komplement [63], Erkennung durch Makrophagen und Bindung an Protein A und G wichtig. Man kann fünf, in ihrer Sequenz verschiedene, schwere Ketten unterscheiden (α , γ , δ , ϵ , μ), welche die fünf Isotypen (IgG, IgM, IgE, IgA, IgD) ausmachen [64].

Die durch die B-Lymphozyten sezernierten Antikörper können nun durch verschiedene Mechanismen wirken. Dazu gehört unter anderem die Aktivierung des Komplementsystems und die Opsonierung. Obwohl die unspezifischen Abwehrzellen Antigene direkt erkennen können, wird ihnen das durch Opsonierung um einiges erleichtert.

Eine Übersicht der verschiedenen Antikörper zeigt Tabelle 1.

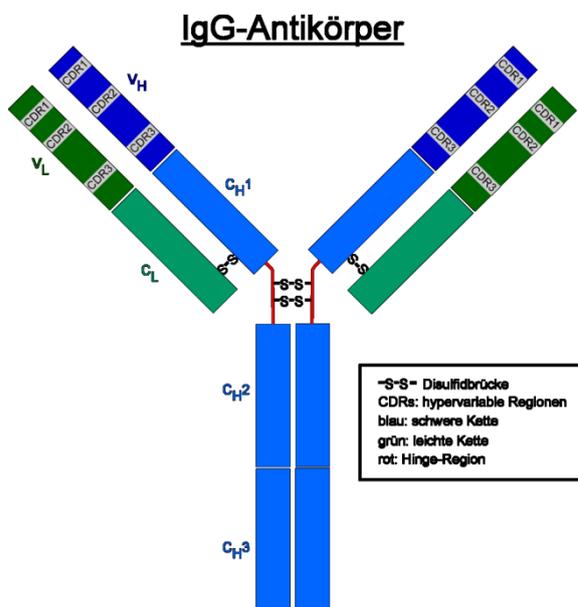


Abbildung 2²: Struktur eines IgG-Antikörpers – Jeder Antikörper besteht aus zwei identischen schweren Ketten (engl. heavy chains, H) und zwei identischen leichten Ketten (engl. light chains, L), die durch kovalente Disulfidbrücken zu einer Ypsilon-förmigen Struktur miteinander verknüpft sind. Die leichten Ketten bestehen aus jeweils einer variablen und einer konstanten Domäne. Die schweren Ketten hingegen haben jeweils eine variable und 3 (IgG, IgA) bzw. 4 (IgM, IgE) konstante Domänen.

² Entnommen aus <http://de.wikipedia.org/wiki/Antikörper>

Einleitung

Tabelle 1: Übersicht der Immunglobuline

	IgM	IgG	IgA	IgE	IgD
Molekulargewicht (MG)	900.000	150.000	160.000	200.000	180.000
Serumkonzentration[mg/ml]	1	12	1,8	0,00025	2,7
Halbwertszeit [Tage]	5	23	5,5	2	2,7
Plazentagängigkeit	-	+	-	-	
Komplementaktivierung	+++	+	-	+	-
Agglutinationsfähigkeit	+++	+	-	-	-
antibakterielle Aktivität	+++	+++	++	-	-
antivirale Aktivität	-	+++	+++	-	-
Vorkommen	ABO-Iso- agglutinine, Kälte- agglutinine, Rheuma- faktor, M. Walden- ström, Nachweis frischer Virusinfekte	Rhesus-Iso- agglutinine, Wärmeauto- antikörper, Spätreaktion der Immun- antwort	Körper- sekrete	Urtikaria, Quincke-Ödem, Allergisches Asthma, parasitäre Infektionen	Immunglobulin auf der Oberfläche der B- Lymphozyten

Die weitaus höchste Konzentration im Serum (75%) weisen die Immunglobuline vom IgG-Typ auf. An ihnen wurden auch die ersten Strukturuntersuchungen durchgeführt. Es existieren vier Subklassen, die sich in ihren biologischen Eigenschaften unterscheiden. Die Bezeichnung erfolgte entsprechend ihrer Menge im Serum. IgG1 ist mit 70% das häufigste [64]. Die Subklassen besitzen verschieden Fc-Regionen, was zu unterschiedlichen Effekten in der Immunantwort führt [65;66]. Zum Beispiel kann IgG2 weniger effektiv Komplement aktivieren wie IgG1 oder IgG3 (am stärksten). IgG4 hingegen kann das Komplementsystem gar nicht aktivieren [67;68]. Die Fc-Regionen

von IgG1 und IgG3 werden hingegen von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten sehr gut erkannt [66]. Welche Subklasse gebildet wird, ist von dem jeweiligen Antigen und der Dauer der Antigenexposition abhängig. Das Fehlen einer oder mehrerer Subklassen kann zu verschiedenen Krankheiten führen. Ist IgG1 erniedrigt, zeigen sich rezidivierende virale und bakterielle Infekte. Bei einem Mangel von IgG2 kommt es aufgrund einer erhöhten Infektanfälligkeit gegenüber *Streptococcus pneumoniae* und *Haemophilus influenzae* zu infektbedingten Atemwegserkrankungen. IgG3 spielt bei der Abwehr von Viren eine große Rolle. Bei einem Mangel treten häufig Atemwegsinfekte, Diarrhoen, Sinusitiden und Otitiden auf. Ein isolierter IgG4-Mangel bleibt häufig asymptomatisch. Erst in Kombination mit einem anderen Subklassenmangel sind Störungen der Infektabwehr zu erwarten. Meist ist ein IgG4-Mangel mit einem IgG2-Mangel kombiniert. Die Ursache eines IgG-Subklassenmangels ist meist ein Regulationsdefekt.

Tabelle 2³: Dargestellt ist die Erhöhung von IgG-Subklassen bei verschiedenen Antigenen.

	Erhöhung von			
	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
Allergien	+			+
Virusinfekte	+		+	
Bakterientoxine	+		+	
abgekapselte Bakterien		+		
Parasitosen				+
Autoimmunerkrankung			+	
Komplementaktivierung	++	+	+++	-

³ Modifiziert nach <http://laborlexikon.de/Lexikon/Infoframe/i/IgG-Subklassen.htm> und Herold Innere Medizin 2011

1.2.6 Antikörpervielfalt

Der menschliche Organismus produziert täglich Millionen verschiedener Lymphozyten, damit die Wahrscheinlichkeit steigt, gegen alle Antigene einen entsprechenden Antikörper aufzuweisen. Für die Antikörpervielfalt sind verschiedene Mechanismen verantwortlich, unter anderem die Genkombination. Hierbei werden die variablen Regionen der H-Kette durch die Kombination von V_H (*variable*)-, J_H (*joining*)- sowie D_H (*diversity*)-Gensegmente kodiert. Die variablen Regionen der L-Kette nur durch V_L und J_L -Gensegmente. Die Kombination je einer leichten mit einer schweren Kette führt zu insgesamt 2,6 Millionen verschiedenen Antikörpern. Ungenauigkeit bei der Verknüpfung von V- und J-Genen, ungenaue Rekombination und Splicing führen zu einer weiteren Antikörpervielfalt. Zuletzt sorgen noch nach der Aktivierung eines B-Lymphozyten somatische Mutationen in den bereits kombinierten Genen zu zusätzlichen Variationen. Die Anzahl der Antikörper steigt hierbei nochmal um den Faktor 100 [69].

1.2.7 B-Lymphozyten

B-Lymphozyten entstehen überwiegend aus pluripotenten Zellen des Knochenmarks über verschiedene Vorläuferzellen zu unreifen B-Zellen [70;71;72]. Die B-Lymphozyten (B: bone marrow oder bursa) verbleiben während ihrer gesamten Entwicklung bis zur reifen Zelle im Knochenmark und wandern dann in die T-Zellreichen Zonen der peripheren lymphatischen Organe aus. Gesteuert wird diese Wanderung durch Chemokin-Rezeptoren wie CCR7, CXCR4 und CXCR5. Auf dem Weg dorthin findet eine negative Selektion statt. Erkennt und bindet eine B-Zelle ein körpereigenes Antigen, wird diese durch Apoptose eliminiert oder inaktiviert [73]. In den lymphatischen Organen können die B-Lymphozyten dann von Antigenen zur Antikörperproduktion stimuliert werden. T-Zell-unabhängige Antigene, wie z.B. bakterielle Polysaccharide, können alleine durch ihre Bindung an das Oberflächen-Immunglobulin die B-Zelle aktivieren, jedoch generieren diese dann nur IgM-Antikörper niedriger Affinität [74]. T-Zell-abhängige Antigene, wie z.B. Proteine, benötigen dagegen die Hilfe von T-Zellen, da ihre Antigen-Rezeptorbindung alleine nicht ausreicht, um eine B-Zelle zu aktivieren [75].

Durch die Bindung des Antigens erhält die B-Zelle ein erstes Signal zur Aktivierung. Das Antigen wird mit dem an seiner Oberfläche befindlichen Antikörper in die Zelle

eingeschleust. Hier wird es zu Peptidfragmenten abgebaut, welche dann an MHC II-Proteine gebunden und an die Zelloberfläche transportiert werden (Prozessierung). Dieser MHC II-Antigen-Komplex wird von T-Helferzellen ($CD4^+$ T-Zellen) erkannt. Es kommt zum Andocken und zur Aktivierung der B-Lymphozyten. Hierbei exprimiert die Th2-Zelle auf seiner Oberfläche CD40-Liganden (der an das CD40 Protein der B-Zelle bindet) [76] und sezerniert zusätzlich IL-4. Nun kommt es zur Differenzierung in eine Plasmazelle und Sekretion von Immunglobulinen. Dabei bindet jede B-Zelle nur ein einziges Epitop und sezerniert nur Antikörper gegen dieses gebundene Antigen [77]. Wie oben erwähnt, produzieren B-Lymphozyten verschiedene Isotypen von Immunglobulinen. Am Anfang der Antikörperproduktion hauptsächlich IgM und wenige IgD-Antikörper. Später kommt es zu einem Klassensprung (Switch) und es wird überwiegend IgG und IgA gebildet. Des Weiteren erfolgt eine Differenzierung der B-Zellen zu B-Gedächtniszellen. Aus diesen entstehen erst nach einem zweiten Antigenkontakt in kurzer Zeit Antikörper-produzierende Plasmazellen. Plasmazellen sind in der Lage etwa 2500 Antikörper in der Sekunde zu sezernieren. Inzwischen zeigen jedoch neue Studien, dass Plasmazellen auch ohne die Anwesenheit von Antigen oder Gedächtniszellen Antikörper produzieren können [78]. Hieraus könnten sich Konsequenzen für die Vakzinierungstherapien entwickeln. Die schützende Immunität nach Vakzinierung kann auch dann noch vorhanden sein, wenn keine antigenspezifischen Antikörper im Serum mehr nachweisbar sind [79;80].

Das Verständnis des Immunsystems im Kampf gegen Tumore ist letztendlich noch nicht vollständig aufgeklärt. Jedoch konnte anhand von Untersuchungen gezeigt werden, dass bei Patienten mit großen und nekrotischen Tumoren eine gleichzeitige hoch-titrig humorale und zelluläre Immunantwort ausgelöst wird. Vermutlich weil bei dem zerfallenden Tumor intrazelluläre Antigene freigesetzt werden, welche vorher durch das Immunsystem nicht erreicht werden konnten [81].

1.3 Immuntherapeutische Strategien

1.3.1 Grundlagen

Mit dem Nachweis von Immunantworten gegen Tumore wuchs das Interesse, das Immunsystem auch gezielt therapeutisch zu nutzen, um gegen maligne Erkrankungen vorzugehen. Hierbei stehen verschiedene Methoden zur Verfügung, welche im Folgenden kurz erläutert werden.

1.3.2 Passive Immuntherapie

Mit der Erforschung des Immunsystems und dem besseren Verständnis seiner Rolle bei Tumorerkrankungen begann die Entwicklung von therapeutischen Impfstoffen, die gezielt auf Tumore wirken sollen. Das Prinzip der passiven Immuntherapie beruht hierbei auf dem Transfer geeigneter, z.B. ex vivo vermehrter und konditionierter Immunzellen oder der Gabe von Immunglobulinen/Antikörpern.

Die ersten monoklonalen Antikörper wurden von Köhler und Milstein [82] im Jahre 1975 hergestellt und erhielten dafür 1984 den Nobelpreis für Medizin. Sie sollten im Rahmen einer passiven Immuntherapie spezifische Zellen auffinden und zerstören. Die Technik zur Herstellung der Antikörper beruht hierbei auf der Fusion von reifen, antikörperproduzierenden B-Lymphozyten mit Zellen einer unsterblichen Myelom-Zelllinie. Hierbei entstehen Zellen, die unbegrenzt monoklonale Antikörper mit maßgeschneiderter Spezifität produzieren. Die Zelllinien stammten von Mäusen und die entsprechenden Antikörper wurden daher als murine Antikörper bezeichnet. Die Wirksamkeit der Mausantikörper war jedoch limitiert, da sich bei den Patienten humane Antimausantikörper (HAMA) entwickelten. Durch gentechnologische Fortschritte wurde es möglich das Problem zu umgehen und chimäre, humanisierte sowie humane Antikörper herzustellen. Durch diese „Humansierung“ der monoklonalen Antikörper lässt sich die Bildung von HAMA verhindern. Viele monoklonale Antikörper binden an der Oberfläche der Tumorzelle und entfalten danach ihre Wirkung. Zum Beispiel indem sie durch ihren Fc-Teil in der Lage sind, natürliche Killerzellen zu den Tumorzellen zu leiten und somit eine Immunantwort zu induzieren oder eine Immunmodulation durch Hemmung inhibitorischer Rezeptoren hervorrufen. Inzwischen sind viele weitere Antikörper mit jeweils unterschiedlichen Angriffspunkten entwickelt worden. Unter

anderem sind hier Rituximab (Rituxan®), Cetuximab (Erbix®), Bevacizumab (Avastin®), Sorafenib (Nexavar®) zu nennen. In neuerer Zeit wurden auch Antikörper zur Therapie von Tumoren zugelassen, welche auf T-Zellen (z.B. CTLA-4 und PD-1) ausgerichtet sind und als Checkpoint-Inhibitoren bezeichnet werden (z.B. Ipilimumab (Yervoy®)) [83]. Die Entwicklung der bispezifischen Antikörper (BsAbs) stellt ein weiteres interessantes Therapiekonzept dar, bei welchem zwei oder mehr Antigene gleichzeitig erkannt werden. Exemplarisch sei hier Catumaxomab (Removab®) genannt. Meist handelt es sich um sogenannten BiTEs (bispecific T cell engagers), welche ein Tumorantigen am einen Ende und eine T-Zelle am anderen Ende bindet. Dabei wird ein enger Kontakt zwischen beiden hergestellt und somit der T-Zelle ermöglicht die Tumorzelle zu zerstören. Dieses Prinzip resultiert in einer nicht-T-Zell-Rezeptor-abhängigen Tumorzelllyse. Auf der Seite der Tumorzellen wurden hierbei bekannte tumorassoziierte Antigene wie zum Beispiel EpCAM, CEA oder HER2/neu eingesetzt. Der klinisch am weitesten entwickelte BiTE ist Blinatumomab (Blinicyto®) mit der Spezifität CD19 x CD3 bei Patienten mit rezidivierendem B-Zell-Non-Hodgkin Lymphom [84]. Die Langzeitergebnisse zeigten allerdings bisher eher ernüchternde Daten [85].

Andere Einsatzmöglichkeiten monoklonaler Antikörper wäre das Verwenden als Antikörperkonjugate. Hierbei könnte man die monoklonalen Antikörper mit Chemotherapeutika, Toxinen oder Radionukliden koppeln und diese dann als Transportmittel zur spezifischen Anreicherung im Tumor verwenden [86;87;88]. Bei ⁹⁰Yttrium-Ibritumomab-Tiuxetan (Zevalin®) handelt es sich um einen konjugierten murinen Antikörper, bei dem an den Chelator Tiuxetan gebundenes Yttrium (ein β -Strahler), über den Antikörper an die Zielzelle gebracht wird. Dieses sogenannte Immunkonjugat ist spezifisch gegen CD20 gerichtet und findet Verwendung bei der Behandlung eines nach Rituximabtherapie rezidivierenden oder refraktären CD20-positiven folliculären B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphoms sowie als Konsolidierungstherapie nach Remissionsinduktion bei zuvor nicht therapierten Patienten mit folliculärem Lymphom [89].

Im Gegensatz dazu wird bei der adoptiven Zelltherapie auf passive Weise versucht durch Reinfusion von *ex vivo* konditionierter Lymphozyten eine gegen den Tumor gerichtete Immunabwehr zu erzielen. Bei dieser hochgradig personalisierten Therapieform werden Leukozyten im Rahmen einer Zytapherese isoliert und unter dem

Einfluss von Zytokinen aktiviert und vermehrt. Nach Reinfusion dieser Leukozyten lässt sich dann die Immunkompetenz eines Individuums auf das andere übertragen, um so die Immunabwehr des Patienten zu unterstützen. Sehr erfolgreich wird diese Therapie bereits bei der Behandlung von virusassoziierten Tumoren im Rahmen der Transplantationsmedizin eingesetzt [90;91]. Ein Problem ist jedoch die zeitaufwendige *ex vivo* Generierung antigenspezifischer T-Zellen und die Schwierigkeit T-Zellen in einer großen Anzahl (etwa 100 Millionen bis 10 Milliarden je Patient) herzustellen. Des Weiteren stellt die zum Teil begrenzte Persistenz und Antitumoraktivität nach dem Zelltransfer einen limitierenden Faktor dar [92]. Aufgrund dieser Schwierigkeiten wurde das Konzept eines Rezeptor-Gentransfers entwickelt. Im Labor ist es möglich T-Zellen mit spezifischen T-Zell-Rezeptoren (TCR) auszustatten, welche spezifisch auf bekannte Tumorantigene (z.B. NY-ESO-1) ausgerichtet sind, um danach dem Patienten zu verabreichen [93]. Der Nachteil dieser Verfahren liegt darin, dass diese von einer MHC-restringierten Antigenpräsentation abhängig sind. Diesen Nachteil versuchte man mit der Entwicklung von CAR-T-Zellen zu umgehen. Hierbei wird eine T-Zelle mit einem neuen Rezeptor ausgestattet, bestehend aus drei Teilen: dem extrazellulärem antigenbindenden Teil eines Antikörpers (beispielsweise gegen CD19), einem Transmembranteil und einem intrazytoplasmatischen Teil (in der 3. Generation aus drei Signaldomänen bestehend), der die Antigenbindung als aktivierendes Signal in das Innere der Zelle weiterleitet [94]. Dieser Hybridrezeptor wird als "Chimeric antigen receptor" (CAR) bezeichnet und ist in der Lage ein nicht-prozessiertes Epitop auf der Zelloberfläche zu erkennen. Dies kann dann zur Tumorzelllyse und zur Ausbildung eines antigenspezifischen Immungedächtnisses führen [95]. Mehrere Studien haben bereits den adoptiven Transfer von CAR-modifizierten T-Zellen untersucht. Mit CD19-spezifischen CAR-T-Zellen wurde bei einem großen Teil der Patienten mit refraktärer akuter lymphatischer Leukämie eine Vollremission erzielt [96]. In einer weiteren Studie mit Neuroblastompatienten wurden CAR-T-Zellen mit Spezifität für das Gangliosid GD2 ausgestattet und adoptiv reinfundiert. Hier konnten die T-Zellen teilweise bis zu vier Jahre danach nachgewiesen werden, was mit einer anhaltenden Tumorkontrolle korrelierte [97].

1.3.3 Aktive Immuntherapie

Hier ist zwischen einer präventiven (z.B. Impfung gegen Hepatitis B oder HPV) und therapeutischen Immuntherapie zu unterscheiden. Das Ziel ist jedoch in beiden Fällen Wege zu finden das Immunsystem gegen tumorspezifische Antigene zu aktivieren und dadurch maligne Zellen zu zerstören [98]. Die aktive Immuntherapie benötigt -im Vergleich zur passiven- die Beteiligung und Unterstützung des Immunsystems. Durch eine Impfung soll die Präsentation von Tumorantigenen durch antigenpräsentierende Zellen verstärkt werden, um eine antitumorale Immunantwort zu induzieren oder zu steigern. Der Vorteil dieser Tumorvakzination liegt unter anderem in der Möglichkeit polyvalente und nicht genau bekannte Antigengemische oder aber auch gut definierte Antigene als Impfstoff zu verabreichen. Bei den Antigenen handelt es sich hierbei um körperfremde Proteine, Oberflächenstrukturen von Bakterien, Viren oder molekulare Strukturen (z.B. tumorassoziierte Antigene), die bei krankhaften Veränderungen entstehen. Bei der aktiven Immuntherapie stehen inzwischen verschiedene Behandlungsverfahren zur Verfügung. Zum Beispiel Vakzine auf Grundlage von APC/dendritischen Zellen, TAA-spezifischen Peptiden, DNA (genetische Vakzine), modifizierten Tumorzellen oder virusbasierten Vakzinen [99].

Bei der Vakzination mit Peptiden/Proteine von Tumorantigenen werden diese mit unterschiedlichen Adjuvanzen (IL-2 oder GM-CSF) den Patienten verabreicht. Diese Peptide/Proteine können direkt von MHC-Molekülen (meistens Klasse I) auf antigenpräsentierenden Zellen gebunden werden, um dann T-Zellen zu aktivieren. Sehr gute Resultate wurden in einer Studie beobachtet, in der man die Wirkung eines kurzen Peptides von Glycoprotein 100 (gp100) - im Kontext mit HLA*A0201- in Kombination mit IL-2 bei fortgeschrittenem Melanom untersucht hat. In einer Phase III Studie war die Ansprechrate höher und das progressionsfreie Überleben länger mit der Vakzine und IL-2 als mit IL-2 alleine. Eine weitere vielversprechende Peptidvakzine ist Rindopepimut (CDX-110). Es wurde bei EGFRvIII⁺-Glioblastom eingesetzt und löste eine Immunantwort gegen EGFRvIII, eine mutierte Form des EGFR, aus. Man beobachte in mehreren Studien ein signifikant längeres progressionsfreies Überleben der Patienten mit Glioblastom [100]. Leider lieferten bisher die meisten anderen peptidbasierten Vakzine eher enttäuschende Ergebnisse und wurden nicht bis zur klinischen Testung weiterentwickelt.

1.3.4 Immun-Escape

Mit dem Wissen über die Tumorimmunologie können weitere effektive Therapien und neue Strategien bei der Behandlung von Tumoren erarbeitet werden. Gerade im Hinblick auf die Tatsache, dass ein Tumor sich der Immunantwort mit sogenannten "Escape"-Mechanismen entziehen kann, ist ein besseres Verständnis der Tumorimmunologie unabdingbar. Das Immunsystem kann häufig maligne veränderte Zellen nur schwer von gesunden unterscheiden und eliminieren, da die Tumorzellen nicht nur so genannte Neoantigene (tumorspezifische Antigene) exprimieren, sondern oft Antigene, welche physiologisch auf den normalen Zellen vorkommen [101]. Das menschliche Immunsystem reagiert in der Regel nicht auf körpereigene Epitope, da Lymphozyten mit Rezeptoren gegen körpereigenes Gewebe frühzeitig im Thymus bzw. Knochenmark durch den sogenannten "programmierten Zelltod" eliminiert werden [102]. So ist es möglich, dass sie statt einer T-Zell-Immunität eine T-Zell-Toleranz induzieren [24;25;103;104;105;106]. Fehlen zum Beispiel kostimulatorische Faktoren, können die T-Zellen zwar ihre Liganden binden, produzieren aber kein IL-2 und proliferieren nicht. Sie werden stattdessen anergisch [22;23]. Ein weiterer Mechanismus, weshalb sich der Tumor dem Immunsystem entziehen kann, ist die Einstellung der Synthese bzw. Herabregulierung von Tumorantigen- und der MHC-Expression und der fehlenden Fähigkeit Antigene zu präsentieren, da ihnen wichtige kostimulatorische Moleküle wie CD80 und CD86 fehlen [24;25]. Des Weiteren können Tumore eine immunsupprimierende Wirkung durch Produktion von immunsuppressiven Substanzen wie z.B. IL-10 oder TGF- β besitzen oder sie können durch Überexpression von CTLA-4 und PD-1 der Immunantwort entgehen [107;108;109]. Über diese Mechanismen des "immunoediting" und der "immune evasion" induzieren manche Tumorzellen eine Immuntoleranz und können so der Immunüberwachung entkommen.

1.4 Die Entdeckung tumorassoziierter Antigene

Eine erfolgreiche Therapie gegen Tumore könnte funktionieren, wenn es mittels immunogener Peptide gelänge, eine Vakzinierung durchzuführen, welche eine rasche und adäquate T-Zellantwort bzw. die Potenzierung der natürlich vorkommenden Immunantwort auslöst. Voraussetzung für eine gezielte Therapie sind Antigene, die nur

in Tumorzellen exprimiert werden. Die gezielte Suche nach solchen tumorspezifischen bzw. tumorassoziierten Antigenen (TAA) begann mit der Brüsseler Arbeitsgruppe um T. Boon in den 1990er Jahren [110;111]. Obwohl ihre Existenz schon seit 1968 bekannt ist (Masuda, 1968), wurde erst Anfang der 1990er Jahre das erste T-Zellepitop eines Tumorantigens von van der Bruggen et al. beim malignen Melanom mit Hilfe des „T lymphocyte epitope cloning“, auch „autologous typing“ genannt, identifiziert. Es erhielt die Bezeichnung: melanoma antigen-1 bzw. MAGE-1 [112]. Mit diesem Verfahren, das das Klonieren von T-Zellen durch Stimulieren mit autologen Tumorzellen („direct immunology“) beinhaltet, wurden die meisten Tumorantigene charakterisiert [113]. Darunter gehören noch Antigene wie BAGE [114] und GAGE [115]. Der Nachteil des „autologous typing“ besteht jedoch darin, dass es von der Verfügbarkeit etablierter Tumorzelllinien und vorcharakterisierter tumorspezifischer T-Zell-Klone abhängt. Dies ist bei vielen Malignomen jedoch sehr problematisch [116]. Mitte der 1990er Jahre kam es dann zur Weiterentwicklung des „autologous typing“. Das von Pfreundschuh und Mitarbeitern entwickelte Verfahren des SEREX (Serological identification of antigens by Recombinant Expression cloning) [117] stützt sich auf die Beobachtung, dass Tumorpatienten Antikörper gegen Tumorantigene entwickeln und erlaubt diese dann molekular zu identifizieren. Dazu wird aus Tumorproben eine cDNA-Bank aufgebaut, diese in einen λ -Phagen-Expressionsvektor kloniert. Mit diesen werden dann *E. coli* infiziert (siehe Abbildung 3). Rekombinante Proteine, die während der lytischen Infektion der Bakterien exprimiert werden, können dann auf eine Nitrozellulosemembran geblottet und anschließend mit autologem Patientenserum inkubiert werden. Rekombinante Proteine, die mit Serum-IgG-Antikörpern reagieren, können daraufhin mit einem enzymgebundenen, gegen humanes IgG gerichteten, Sekundärantikörper detektiert werden. Positive Phagenklone werden subkloniert bis ein einzelner Plaque isoliert und die Sequenz der enthaltenen cDNA identifiziert werden kann. Zur Identifikation von Tumorantigenen benötigt man eine hochtitrige IgG- bzw. IgA-Antikörperantwort, diese wiederum wird durch die Hilfe von CD4⁺ T-Lymphozyten induziert. SEREX bietet daher den Vorteil, ein Bindeglied zwischen der humoralen und zellulären Immunantwort zu schaffen [81;118] und es wird möglich, Tumorsysteme, die nicht oder nur selten in Zellkulturen wachsen (wie die meisten epithelialen Tumore), zu untersuchen [41]. Des Weiteren hilft die Analyse des B-Zell-Repertoires bei der Identifizierung von Tumorantigenen, die möglicherweise Ziele bei

einer Immuntherapie mit Tumorvakzinen werden könnten, um dann eine zytotoxische T-Zell-Antwort auszulösen [119;120]. Das erste mit SEREX entdeckte Antigen war das HOM-MEL-40, ein Gen, welches identisch mit SSX-2 ist. Durch das SEREX konnte eine Vielzahl von neuen Tumorantigenen in verschiedenen Tumor-Entitäten identifiziert werden. Die SEREX Datenbank (www2.licr.org/CancerImmunomeDB) beinhaltet mittlerweile mehr als 2 000 verschiedene tumorassoziierte Antigene.

Erstellung cDNA-Bibliothek

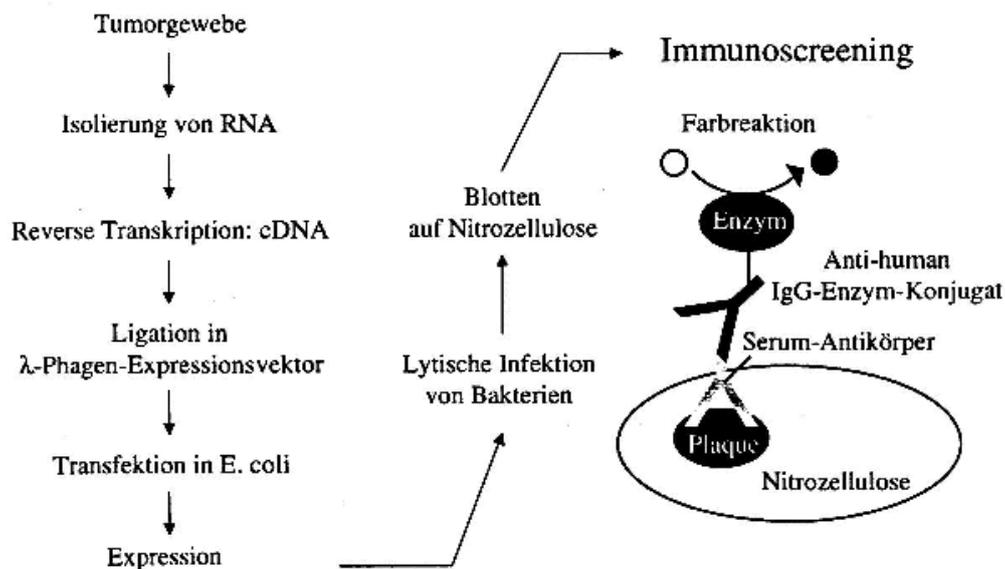


Abbildung 3⁴: Definition von Tumor-Antigenen mittels SEREX. Eine cDNA- Bibliothek wird etabliert und in *E.coli* mittels eines Phagen-Expressionsvektors exprimiert. Die auf dem Bakterienrasen sichtbaren lytischen Plaques werden mittels Blotting auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Diese Filter werden mit verdünntem, autologem Patientenserum inkubiert. Gebundene Antikörper werden mit einem enzymgekoppelten, Anti-human Antikörper (IgG) nachgewiesen. Positive Phagenklone werden subkloniert, bis ein vereinzelter Plaque isoliert und die Sequenz der enthaltenen cDNA ermittelt werden kann.

Es zeigte sich, dass das Antigen-Repertoire, welche durch das SEREX identifiziert werden kann, begrenzt ist [121]. Dies könnte daran liegen, dass potentielle Antigene in einem bakteriellen Expressionssystem unentdeckt bleiben, da dieses nicht fähig ist, posttranslationale Modifikationen an dem Protein vorzunehmen. Diese spielt eine wichtige Rolle in der eigentlichen Funktion vieler Proteine und deren Immunogenität

⁴ Quelle: Türeci et al., 1997

und ob das Protein als fremd erkannt wird oder nicht. Das Spektrum der Modifikationen reicht von Glykosylierung (dies hat entscheidende Bedeutung für physikalische und biologische Eigenschaften der Proteine, wie Löslichkeit, Immunogenität, Allergenität, sowie Hitze- und Proteaseresistenz), Phosphorylierung, Acetylierung, Ubiquitinylierung bis zur Myritisierung [122;123] und wird bei 50-90% aller Proteine beobachtet. Um dies zu ermöglichen, entwickelte Renner et al. das RAYS (Recombinant Antigen expression on Yeast Surface)-Verfahren. Es ist ein aus dem SEREX entwickeltes Verfahren, das ein Hefe (eukaryontisches)-Expressionssystem darstellt. Hefe hat den Vorteil, dass die Proteine an der Zelloberfläche in ihrer nativen Faltung und Glykosylierung exprimiert werden können. Dadurch ist das Expressions- und Transportsystem auf posttranslationaler Ebene dem menschlichen System sehr ähnlich und die Ergebnisse durchaus übertragbar [124;125]. Ursprünglich wurde das Hefeoberflächen-expressionssystem entwickelt, um die Affinität und Stabilität von Proteinen zu erhöhen, aber noch nie zur Identifizierung von Tumorantigenen [126;127;128]. Auch hier werden die inklonierten cDNA-Bibliotheken bzw. die einzelnen Gene über eine davor geschaltete Signalsequenz des Aga2p-Paarungs-Adhäsionsrezeptors über den ER-Golgi-Apparat auf der Hefeoberfläche exprimiert und können direkt analysiert werden. Nach Inkubation mit Patientenseren werden diese mit einem Sekundärantikörper (Anti-IgG-Antikörper) behandelt, um Bindungen der IgG-Antikörper des Patienten mit den Proteinen nachzuweisen. Das hierbei verwendete FACScan erlaubt das schnelle Screenen vieler Hefen mit den auf ihnen exprimierten Proteinen. Weitere Versuche zeigten, dass selbst Zellen mit einer Frequenz von unter 10^{-6} und mit nur feinen Unterschieden der exprimierten Proteine noch detektiert und von anderen Zellpopulationen getrennt werden können [129;130;131]. Die reaktiven Antigene können dann in einem nächsten Schritt durch Sequenzierung identifiziert werden. Neben den bereits oben genannten Vorteilen umfasst die Verwendung von *Saccharomyces cerevisiae*, dass sie sich, im Gegensatz zu Säugerzellen (z.B. Chinese Hamster Ovar-Zelllinien oder Maus- Myelomzellen), leicht kultivieren lassen.

1.5 Einteilung tumorassoziierter Antigene

Tumorassoziierte Antigene sind intrazellulär prozessierte und an der Zellmembran präsentierte Moleküle, die je nach Gewebsexpression, Genfunktion oder Entstehung in mehrere Untergruppen eingeteilt werden:

– ***Cancer/Testis-Antigene (MAGE-3, BAGE, GAGE, NY-ESO-1)***

Die erste Gruppe der TAA beinhaltet die tumorspezifischen Aktivierungs-Antigene, die auch als "tumorspecific shared antigens" bezeichnet werden [132;133]. Diese werden von Genen kodiert, die in normalem Gewebe lediglich ruhen, aber bei verschiedenen Tumor-Typen in aktivierter Form vorliegen [113]. Ihre Expression auf Tumoren wird als eine Aktivierung des stillgelegten Keimzellprogramms in somatischen Zellen verstanden. Tatsächlich zeigen Keim- und Tumorzellen überlappende Merkmale der Zelldifferenzierung, wie Immortalisierung, Invasion, Induktion der Meiose und Migration [41]. Als Prototyp dieser Gruppe sei die Familie der Cancer/Testis-Antigene (CT-AG) genannt [104;134]. Hierzu zählen: MAGE, BAGE, GAGE sowie NY-ESO-1 und OY-TES-1 [113;133;135;136]. Mehr als 40 unterschiedliche CT-Antigen-Familien sind inzwischen identifiziert worden [41]. Die Expression von Cancer/Testis-Antigenen beschränkt sich in gesundem Gewebe auf den Hoden und die Plazenta, da diese jedoch keine MHC-Klasse I- und II-Moleküle exprimieren, werden die Antigene nicht auf der Zelloberfläche präsentiert und sind daher für die T-Zellen nicht zugänglich. Die CT-Antigene sind deswegen relativ tumorspezifisch und kommen bei einer großen Bandbreite verschiedener Tumoren mit unterschiedlichen histologischen Ursprüngen vor; wie zum Beispiel bei Melanom, Blasen-, Bronchial- und hepatozellulärem Karzinom sowie Kopf-Hals-Tumoren. Häufig werden mehrere Antigene gleichzeitig exprimiert [113;115;135]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Expression vieler CT-Antigene mit dem Tumorstadium und dem Grad der Differenzierung korrelieren [137] und dass fast alle bisher identifizierten TAA in der Tasche der MHC-I-Moleküle präsentiert werden und somit potentiell der zytotoxischen Antwort der CD8⁺ T-Zellen ausgesetzt sind [138].

– **Differenzierungsantigene (Melan-A/MART-1, Tyrosinase, gp100)**

Differenzierungsantigene sind gewebespezifisch und für eine bestimmte Differenzierungsstufe charakteristisch [104]. Sie werden nur in bestimmten Gewebetypen wie auch in den aus ihnen entstandenen Tumorgeweben exprimiert. Im Falle einer Antikörpertherapie besteht hierbei die Gefahr einer Autoimmunreaktion. Bei der melanozyten- und melanomspezifischen Tyrosinase werden zum Beispiel auch gesunde Melanozyten angegriffen und zerstört [139]. Dies kann zum Krankheitsbild der Vitiligo führen. Für die Immuntherapie ist es ein jedoch sehr bedeutendes Antigen, da es in 75-100% der Primärtumore und Metastasen gebildet wird [140].

– **Mutierte Antigene/Neoantigene (β -Catenin, MUM-1, CDK-4, ras)**

Diese Gruppe bilden Peptid-Antigene, welche sich von ubiquitären Proteinen ableiten und im Tumorgewebe in mutierter Form vorhanden sind. Sie bilden sich in den meisten Fällen durch Punktmutationen in den entsprechenden Genen. Diese Mutations-Antigene sind, mit einigen Ausnahmen, für jeden einzelnen Tumor spezifisch [113] und werden daher auch „tumorspecific unique antigens" genannt [132;133;134]. Aufgrund ihrer Auswirkung auf die Aktivität des kodierten Proteins nehmen diese Mutationen Einfluss auf die onkogene Transformierung und sind für zahlreiche Tumorentitäten beschrieben. HLA-A2, β -Catenin, CASP-8, CDK4, MUM-1 und viele mehr stellen Beispiele dieser Gruppe dar [104;113;134]. Jedoch sind mutierte Antigene aufgrund ihres seltenen, individuellen Vorkommens für die klinische Praxis weniger attraktive Kandidaten.

– **Überexprimierte Antigene (HER2/neu, AFP, Telomerase, CEA, AFP)**

Manche Antigene werden auch in gesundem Gewebe exprimiert und fallen im Tumorgewebe durch eine Überexpression auf. Dies kann durch Überschreitung der immunologischen Toleranzschwelle zu einer Immunantwort führen. Wichtige Vertreter hier sind: HER2/neu, welches in 30% der Brust- und Ovarialkarzinome überexprimiert wird [141;142]; das Tumorsuppressorprotein p53 [143;144], welches in mehr als 50% aller neu auftretenden Krebsfällen eine Rolle spielt [145] und die KOC-Gen Familie, welche vorzugsweise beim Melanom und Pankreaskarzinom vorkommt [104;146;147].

– **Virale Antigene (HPV, HBV, HCV, EBV)**

Einige Viren sind in der Lage, eine maligne Transformation von Zellen zu verursachen [104]. Hierbei wird virales Genom in die Zelle integriert und dadurch zur Tumorzelle transformiert. Ein bekanntes Beispiel ist das Onkoprotein E7 des humanen Papilloma Virus Typ 16, das in den meisten uterinen Zervixtumoren zu finden ist [104;148;149;150;151]. HTLV-1 bei Leukämien und Lymphomen [152], EBV beim Burkitt-Lymphom und HHV-8 beim Kaposi-Sarkom [104;148;150;151;152].

1.6 Charakterisierung der getesteten CT-Antigene

Die in unseren Untersuchungen getesteten CT-Antigene werden nun im Folgenden kurz erläutert.

1.6.1 SSX-2 und SSX-4

Die zuerst entdeckte SSX-Familie, bestehend aus SSX-1 bis SSX-5, zeigt eine starke Sequenzhomologie, mit einer Nukleotidhomologie zwischen 88% und 95% sowie einer Aminosäurehomologie zwischen 77% und 91%. [153]. Mittlerweile wurden neun SSX Gene und 10 sogenannte Pseudogene oder Gen-Fragmente identifiziert. Mit der Ausnahme von einem Pseudogen, welches auf Chromosom 6 lokalisiert ist, befinden sich alle SSX relevanten Sequenzen auf dem X Chromosom [154] in einer zentromernahen Position auf dem p-Arm zwischen p11.2-11.4. In normalem Testisgewebe wird SSX-1, SSX-2, SSX-3, SSX-4, SSX-5 und SSX-7 aber nicht SSX-6, SSX-8 oder SSX-9 exprimiert. In Tumoren werden SSX-1, SSX-2, SSX-4 und SSX-5 in einer unterschiedlichen Frequenz exprimiert. SSX-3 und SSX-6 werden eher selten gefunden [7;44;152;155]. Eine Expression von SSX-7, SSX-8 oder SSX-9 wurde in Tumorgewebe bisher nicht nachgewiesen [116;156;157;158;159]. Das SSX-2 (Synovial Sarcoma, X Breakpoint 2, HOM-MEL-40) Protein wird, außer in den männlichen Keimzellen, nur noch in Malignomen und schwach in der Schilddrüse exprimiert. Funktionell ist es in die beim Synovialsarkom beschriebene Chromosomentranslokation t(X;18) involviert [160;161], was zur Entstehung eines zelltransformierenden Fusionsproteins führt. Später wurde durch die Analyse mit SEREX gezeigt, dass es identisch mit dem Gen ist, welches HOM-MEL-40 kodiert. Seine Expression ist für

Melanome, Kolonkarzinome, Leberkarzinome und Mammakarzinome beschrieben [159].

1.6.2 NY-ESO-1

Auch NY-ESO-1 (New York esophageal squamous cell carcinoma 1) zählt zu den Cancer/Testis-Antigenen. Es wurde bei der SEREX-Analyse von Ösophaguskarzinomen entdeckt [119] und ist mit einer schlechten Prognose und einem erhöhten Risiko für Metastasen vergesellschaftet [162]. Sein Expressionsmuster gleicht dem der anderen Cancer/Testis-Antigene mit der Ausnahme, dass es auch in uterinem Myometrium detektiert wurde. Über seine Funktion ist noch nicht viel bekannt. Die NY-ESO-1-Expression in Tumorgewebe ist für Melanom, Mamma-, Blasen-, Prostata-, Leber- und Lungentumoren beschrieben [119]. NY-ESO-1 gehört zu der Familie mit zuletzt drei Genen (NY-ESO-1, LAGE-1 und ESO3), welche alle auf dem Chromosom Xq28 liegen [163]. Die NY-ESO-1 kodierende Sequenz liegt am Telomerende des q Arms zwischen q24-28 [116].

1.6.3 LAGE-1a und LAGE-1b (LAGE-1S bzw. LAGE-1L)

LAGE-1 besitzt starke Sequenzhomologie zu NY-ESO-1. Seine Funktion ist unbekannt. Das Expressionsmuster in Normalgeweben gleicht dem von NY-ESO-1. In Tumorgeweben ist seine Expression für Melanome, Sarkome, B-Zell-Lymphome, Kopf- und Hals-Tumoren und Tumoren der Blase, Prostata, Mamma und Lunge beschrieben [164].

1.6.4 CT7 (MAGE-C1)

Mit Hilfe von SEREX konnte dieses Mitglied der CT-Familie durch die Arbeitsgruppe um Jungbluth entdeckt werden [165]. Das gleiche Gen wurde unabhängig durch Lucas et al. mit Hilfe der RDA (representational difference analysis) isoliert und MAGE-C1 genannt. Es kodiert ein Protein mit 1142 Aminosäuren [166]. Die CT7 kodierende Sequenz liegt auf Chromosom X am Telomerende des q Arms zwischen q24-28 [116]. Nachforschungen zeigten, dass CT7 in normalem Hodengewebe, sowie einer Vielzahl unterschiedlicher Tumoren exprimiert wird. Dazu gehören Tumore der Harnwege, der Brust (15%), der Lunge und das Maligne Melanom (46%) [166;167].

1.6.5 CT10 (MAGE-C2)

CT10 wurde in Melanom-Zelllinien SK-MEL-37, einer Zelllinie mit einer hohen CT-Antigenexpression, mit RDA identifiziert. CT10 zeigt eine signifikante Homologie zu CT7 (87%) [147] und das typische CT-Antigen mRNA Expressionsmuster. Die CT10 kodierende Sequenz liegt auf Chromosom X am Telomerende des q Arms zwischen q24-28 [116] und damit in der Nähe der CT7 und MAGE-A Gene [147].

1.7 Ziel der Arbeit

Mit Einführung der molekularbiologischen Methoden in die Medizin standen neue Möglichkeiten, sowohl was die Diagnostik als auch die Therapie von Malignomen angeht, zur Verfügung. So ist es heute möglich, den Therapieverlauf anhand serologischer Marker zu kontrollieren. In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir 50 Seren von Patienten mit unterschiedlichen Malignomen nach dem Vorhandensein von IgG-Immunglobulinen, die gegen bestimmte CT-Antigene gerichtet sind. Des Weiteren analysierten wir die Subklassen der IgG-Immunglobuline, um mögliche Ziel-Antigene weiter einzuschränken. Zur Untersuchung der Immunantwort benutzten wir hierbei das oben beschriebene RAYS-Verfahren. Perspektivisch wäre hiermit ein Instrument zur Früherkennung als auch zur Verlaufsbeurteilung von Tumorthérapien gegeben.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Geräte

Chemikalien (Reinheitsgrad p.A.):	Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Steinheim), Roth (Karlsruhe)
Fotochemikalien:	Röntgenfilm (Fuji™ Medical X-Ray Films 03E260, Düsseldorf) ECL-Western™ Blotting Detection Reagents (Amersham, Braunschweig)
Membranen:	Immobilion (Millipore, Bedford, USA)
FACS-Analyser:	Becton Dickinson FACScan

2.2 Nährmedien

2.2.1 Nährmedien für Hefen

- Minimal Dextrose-Platten: 0,67% (w/v) YNB (mit Ammoniumsulfat, ohne Aminosäuren), 2% (w/v) Glucose, 0,01% (w/v) Leucin, 1,5% (w/v) Agar, YNB und Agar mit H₂O_{dest.} autoklavieren. Glucose sowie gelöstes Leucin steril filtrieren, dann in Platten gießen
- YNB-CAA Medium: 0,67% (w/v) YNB (Ammoniumsulfat, ohne Aminosäuren), 2% (w/v) Glucose bzw. 2% (w/v) Galactose, 0,5% (w/v) Casaminosäuren (beim Autoklavieren werden Spuren von Tryptophan zerstört, was den Selektionsdruck für die Hefen aufrecht erhält das entsprechende Plasmid zu behalten)

- YPD-Medium: 1% (w/v) Hefe-Extrakt, 2% (w/v) Pepton, 2% (w/v) Glucose
- YPD-Platten: zu YPD-Medium Zugabe von 2% (w/v) Agar

2.3 Protein- Molekulargewichtsmarker

Zur Größenbestimmung der Molekülmasse von Proteinen wurde die BenchMark™ Protein Ladder (Invitrogen) benutzt. Diese reicht von 10 bis 220 kDa und besteht aus 15 künstlich synthetisierten Proteinen mit:

10 | 15 | 20 | 25 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 | 100 | 120 | 160 | 220 kDa

Pro Spur wurden 5 µl der fertigen Lösung eingesetzt, wobei jedes Protein etwa in einer Konzentration von 0,1 µg/µl enthalten ist.

2.4 Antikörper

- Biotin-SP-conjugated AffiniPure Mouse
Anti-Human IgG Fcγ Fragment specific,
(Jackson Immuno Research, West Grove,
PA, USA) 1:100
- R-Phycoerythrin-conjugated Streptavidin
(Jackson Immuno Research, West Grove,
PA, USA) 1:200
- Sheep Anti-Human IgG1
Sheep Anti-Human IgG2
Sheep Anti-Human IgG3
Sheep Anti-Human IgG4 1:100
} (The Binding Site Limited,
Birmingham, United Kingdom)
- Biotin-SP-conjugated AffiniPure Rabbit
Anti-Sheep IgG 1:200

(Jackson Immuno Research, West Grove,
PA, USA)

- Anti-penta-His, (Qiagen, Hilden) 1:3000 (Western-Blot)
1:200 (Immunfluoreszenz)

2.5 Patientenseren

Es wurden 50 Seren, die uns von dem Krankenhaus Nordwest in Frankfurt zur Verfügung gestellt wurden, verwendet. Hierbei handelte sich um Patienten mit verschiedenen Tumorentitäten (Prostatakarzinom, Ovarialkarzinom, Malignes Melanom, NSCLC, Hypopharynxkarzinom, Sarkom, Magenkarzinom).

2.6 Hefestämme

Für die Retransformation der aus Bakterienstämmen gewonnenen Klone wurden *Saccharomyces cerevisiae* *EBY-100* verwendet. Die *Saccharomycetaceae* sind die eigentlichen Hefen. Die zu dieser Familie gehörigen *Saccharomyces cerevisiae*, deren physiologische Rassen die Bäcker- und die Bierhefe sind, werden aufgrund ihres kleinen haploiden Genoms (ca. das dreifache von *E.coli*), der geringen Zahl von Chromosomen (16 lineare von 200 bis 2200 kb), sowie der damit zusammenhängenden geringen Verdopplungszeit von 90 min bevorzugt in der molekulargenetischen Forschung an eukaryontischen Mikroorganismen als Modellmikroorganismus eingesetzt.

2.7 Puffer

- PBS-Puffer (phosphate-buffered saline): 140 mM NaCl
25 mM KCl
5 mM MgCl₂
1 mM CaCl₂

- 10 mM Na/K-Phosphat, pH=7
- SDS-Gel-Laufpuffer: 0,025 M Tris/HCl
0,1% (w/v) SDS
0,2 M Glycin
 - 2x Probenpuffer für SDS-Gele: 6% (w/v) SDS
25% (v/v) Trenngelstock
10% (v/v) β -Mercapto-ethanol
10% (v/v) Glycerol

Western-Blot:

- Transferpuffer: 25 mM Tris/HCl
0,19 M Glycin
20% (v/v) Methanol
0,05% (w/v) SDS
- Blockingpuffer: 10%(w/v) Magermilchpulver
in PBS-Puffer
- Sekundärantikörperlösung: Peroxidase-gekoppelter Antikörper;
je nach Firmenvorschrift in 5%iger
PBS-Milch oder 3%igem BSA-PBS
verdünnt

2.8 Vektoren

Ursprung des hier benutzten Vektors ist der pYD1 des Yeast Display Vector Kit von Invitrogen, der speziell zur Expression und Präsentation von Proteinen auf der Oberfläche von Zellen der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* entwickelt wurde. Er enthält

die Elemente AGA2, GAL1, XpressTM-epitope, V5-epitope, Polyhistidine tag (6xHis), TRP1, CEN6/ARS4, ampicillin-resistance-gene und pUC-origin, wobei hier das XpressTM-epitope im Rahmen der Modifikationen herausgeschnitten wurde. Die Rekombinationssite wurde durch das entsprechende CT-Antigen bzw. Fragment ersetzt. Zur besseren Anfärbarkeit wurden zusätzlich ein c-myc tag und ein weiterer Polyhistidine tag (10xHis) eingefügt. Die genauen Änderungen sind Abbildung 4 zu entnehmen. Das Kopplungsstück ist das AGA2-Gen der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, das für eine Untereinheit des a-Agglutininrezeptors kodiert. Dieser Rezeptor besteht aus 2 Untereinheiten, Aga1p (membranständig) und Aga2p, die durch 2 Disulfidbrücken kovalent miteinander verbunden sind. Durch Fusion des AGA2-Gens mit dem einzuklonierendem Gen erreicht man somit die Sekretion bzw. Oberflächenexpression des entsprechenden Proteins. Die Regulation dieses Gens unterliegt dem GAL1-Promoter, d.h. erst beim Vorhandensein von Galactose im Nährmedium findet die Expression statt. Die Elemente XpressTM-Epitop, V5- Epitop und Polyhistidine (6xHis) tag dienen zur Detektion, letzteres auch zur Aufreinigung des Proteins über Metall-Chelat-Harze. Das TRP1-Gen ist ein Tryptophan-Synthese-Gen, das die Herstellung der essentiellen Aminosäure Tryptophan aus Leucin ermöglicht und somit zur Selektion des Stamms *EBY100* aus anderen *Saccharomyces cerevisiae*-Stämmen genutzt werden kann. Die CEN6/ARS4-Sequenz bewirkt eine stabile episomale Replikation in Hefen; das Ampicillinresistenzgen und pUC origin erlauben die Selektion und Replikation in *Escherichia coli*.

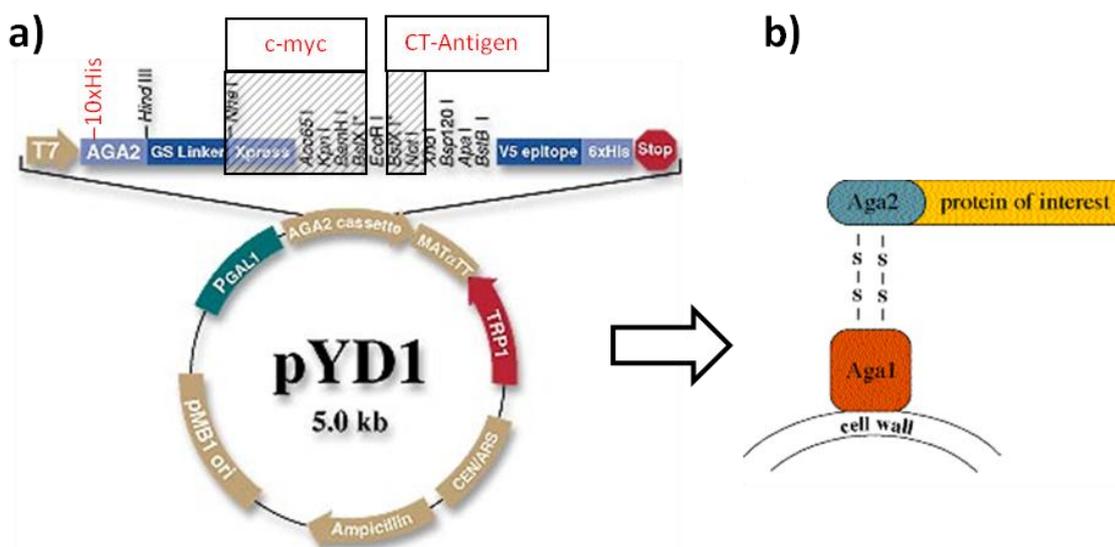


Abbildung 4: pYD1 Yeast display vector kit modifiziert a) Vektorkarte: In die AGA2-Sequenz wurde ein 10xHis-Tag eingefügt; die Basen 859 (Beginn Nhe-Site) bis 969 (Ende Not I-Site) wurden bis auf die

EcoR I-Sequenz herausgeschnitten und stattdessen ein c-myc-Tag und die CT-Antigene bzw. Fragmente inkloniert. **b)** Expression auf der Hefeoberfläche über Agglutinin-Rezeptor.

pYD1 rec c-myc 10 His (5AS)Vektor

T7 - AGA2(AS1-5)- 10 His- AGA2(AS4-70) – GS Linker – c-myc tag - recombination site (Eco RI)
Stop-(XhoI) 6 His - Stop

2.9 Computersoftware

Die Datenerfassung der FACS-Messungen erfolgte mittels BD CELLQuest[®] (für Apple[™] PowerMac[®]).

Für die Analyse der FACS-Daten und die graphische Darlegung der Ergebnisse wurden die Programme WinMDI[®], Version 2.8 und SigmaPlot2001[®], Version 7.0 (Sigma Software[™]) verwendet.

Tabellen wurden mit Microsoft Excel erstellt. Für die schriftliche Ausarbeitung der Arbeit kam Microsoft Word zur Anwendung. Für die Darstellung von Schaubildern und Graphiken wurden Microsoft Powerpoint und Micrografx Picture Publisher herangezogen.

2.10 Hefe-Techniken

2.10.1 Herstellung kompetenter Hefen und Transformation

Diese Techniken wurden mit dem S.c EasyComp[™] Transformation Kit von Invitrogen durchgeführt. Diese kombinierten Methoden eignen sich für die schnelle und einfache Retransformation zuvor gewonnener, meist bakterieller Plasmide in *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme. Dabei wurde zunächst eine Hefeübernachtskultur in YPD bis zu einer OD₆₀₀ von 3-5 angezogen. Die Zellen befanden sich dann in der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase und waren sehr vital. Anschließend wurde die Kultur auf eine OD₆₀₀ zwischen 0,2 und 0,4 verdünnt und erneut einige Stunden bis zu einer OD₆₀₀ zwischen 0,6 und 1 angezogen. Danach wurde die Suspension bei 500 x g zentrifugiert (der Überstand verworfen) und zum Waschen in 10 ml Lösung I aufgenommen, erneut zentrifugiert und in 1 ml Lösung II resuspendiert. Diese Lösung

enthielt Lithium-Kationen und machte die Hefen ähnlich dem analogen Vorgehen bei Bakterien kompetent. Die Hefen konnten dann zur Transformation verwendet oder bei -70 °C aufbewahrt werden. Die Ansätze für die Hefetransformation wurden mittels Lösung III nach Firmenvorschriften durchgeführt.

2.10.2 Hefekultivierung und Induktion der Oberflächenexpression

Diese Technik wurde nach dem pyD1 Yeast Display Vector Kit Protokoll von Invitrogen durchgeführt. Aus Glycerinkultur entnommene Hefezellen wurden im YNB-CAA+Glucose-Medium bei 30 °C 24-48 Stunden im Schüttler inkubiert. Die Kultur wurde daraufhin mit 3000 U/min bei Raumtemperatur 5 min zentrifugiert (ZK 380, HERMLE, Gosheim) und das Pellet mit YNB-CAA+Galaktose-Medium resuspendiert. Danach erfolgte die Messung der optischen Dichte (OD) bei 600 nm. Lag diese zwischen 0,5 und 1 war sichergestellt, dass sich das Zellwachstum in der exponentiellen Phase befand. Lag der Wert oberhalb dieses Bereiches, wurde die Flüssigkultur mit dem YNB-CAA+Galaktose-Medium weiter verdünnt. Die Induktion erfolgte bei 20 °C für 24-48 Stunden unter schütteln (Ceromat BST-T, B.BRAUN BIOTECH INTERNATIONAL). Danach wurde die Expressierung der Proteine auf der Oberfläche mit einer Immunfluoreszenzfärbung überprüft.

2.10.3 Nachweis der Oberflächenexpression

Die Überprüfung der Proteinexpression auf der Hefeoberfläche erfolgte antigenunabhängig über eine Immunfluoreszenzfärbung mit einem Primärantikörper, der an das c-myc gebunden hat. Die Hefekultur wurde bei Raumtemperatur mit 3000 U/min für 4 min zentrifugiert (ZK 380, HERMLE, Gosheim), danach zweimal mit PBS-Puffer gewaschen. Jeweils 150 µl der Hefekultur wurde in ein Well (96-Well-Platte) pipettiert. Diese wurde dann bei 5 °C mit 2000 U/min für 4min zentrifugiert; der Mediumüberstand wurde abgossen. Die Färbung erfolgte mit 50 µl anti-c-myc-Antikörper (Verdünnung 1:100), 50 µl anti-maus-biotinylierter-Antikörper (Verdünnung 1:100) jeweils 20 min bei Raumtemperatur und R-Phycoerythrin konjugiertes Streptavidin (Verdünnung 1:200) 10 min bei Raumtemperatur. Zwischen den Färbeschritten erfolgte ein Waschschriff mit PBS-Puffer. Danach wurde die durchflusszytometrische oder mikroskopische Überprüfung durchgeführt.

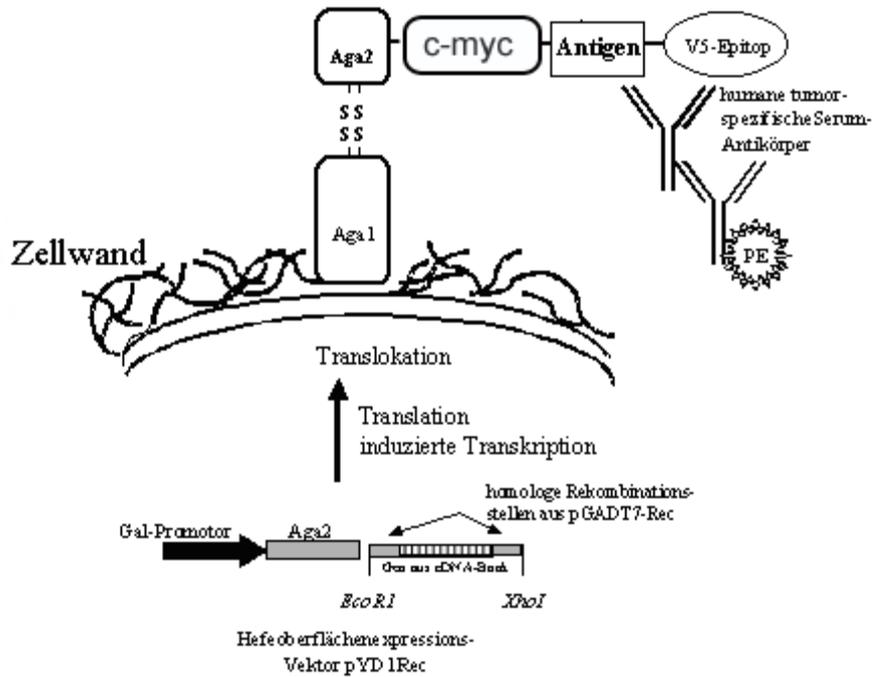


Abbildung 6: Darstellung des Hefeexpressionssystems mit Antikörperbindung wie es in unseren Untersuchungen verwendet wurde.

2.10.4 Präabsorption von Patientenserum

Menschliche Seren enthalten eine Vielzahl an löslichen Immunglobulinen. Je nach vorheriger Exposition des Patienten enthalten diese auch Antikörper, die gegen unspezifische Hefeoberflächenantigene gerichtet sind. Um ein dadurch verursachtes unerwünschtes Hintergrundleuchten in der FACS-Analyse zu vermeiden, wurden die Patientenserum mit pYD1-Leervektorhefen über Nacht inkubiert und zweimal mit PBS-Puffer gewaschen. Die Patientenserum wurden mit den Leervektorhefen (Verhältnis 1:50) im Überkopfschüttler bei 3 °C für 24 Stunden inkubiert. Danach wurden die Seren mit 0,1% PBS-Azid-Puffer im Verhältnis 1:100 konserviert.

2.10.5 Immunfluoreszenzfärbung der Hefezellen

Um die humorale Immunität der Tumorpatienten mit dem FACScan Gerät quantifizieren zu können, ist eine Immunfluoreszenzfärbung erforderlich. Da bei der Präabsorption die unspezifischen Antikörper gegen die Hefeoberflächenproteine zum größten Teil entfernt wurden, sollten durch die Färbung die Immunglobuline erfasst werden, die sich spezifisch gegen die jeweiligen CT-Antigene gerichtet haben. Die

Hefen mit reinkloniertem CT-Antigen wurden hierbei zweimal mit PBS-Puffer gewaschen und in eine 96-Well-Platte (150 µl/Well) gegeben; dann 4 min bei 2000 U/min und 5 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. In jedes Well wurde 50 µl Patientenserum (Verdünnung 1:100) hinzugefügt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Vor dem nächsten Schritt wurde zweimal mit PBS-Puffer gewaschen. Danach wurden die Hefen mit 50 µl anti-human-Fc-biotinyliert (Verdünnung 1:100), 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und zweimal mit PBS-Puffer gewaschen. Im letzten Schritt wurden die Hefen mit 50 µl R-Phycoerythrin konjugiertem Streptavidin (Verdünnung 1:200) 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und einmal mit PBS-Puffer gewaschen.

2.10.6 IgG-Subklassenfärbung

Die Hefen mit reinkloniertem CT-Antigen wurden hierbei zweimal mit PBS-Puffer gewaschen und in eine 96-Well-Platte (150 µl/Well) gegeben; dann 4 min bei 2000 U/min und 5 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. In jedes Well wurde 50 µl Patientenserum (Verdünnung 1:100) hinzugefügt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Färbung erfolgte mit 50 µl anti-IgG1-, bzw. IgG2-, bzw. IgG3-, bzw. IgG4 (Verdünnung 1:50), 50 µl anti-sheep biotinyliert (Verdünnung 1: 100) und 50 µl R-Phycoerythrin konjugiertem Streptavidin (Verdünnung 1:200). Die Waschvorgänge und Inkubationszeiten erfolgten analog der Immunfluoreszenzfärbung der Hefezellen (wie oben beschrieben).

2.10.7 FACS-Messung und Auswertung durch WinMDI

Die in die Falcons überführten Proben wurden direkt oder am folgenden Tag (Aufbewahrung der Proben bei 4 °C) durchflusszytometrisch (FACScan, Beckman-Coulter) analysiert und auf die Stärke ihrer Fluoreszenz untersucht. Die Datenerfassung erfolgt mittels des Programms BD CELLQuest® für Apple™ PowerMac® nach Herstellerangabe. Zur Auswertung benutzen wir das Programm WinMDI® (Version 2.8). Die Messung im Forward-Scatter wurde in Dotplots und Histogrammen dargestellt. Damit die Reaktion eines Serums auf einen bestimmten Klon als positiv gewertet wird, müssen objektive Richtlinien definiert werden. Zunächst ist die Auswahl einer definierten Hefepopulation durch eine entsprechende Einschränkung zu treffen. Hierbei wird zur Minimierung von Hintergrundleuchten durch Zelldetritus oder andere

störende Einflüsse ein Gate gesetzt. Als zusätzliches (neben dem Vorkommen im gewählten Gate) Kriterium, bei der ein Serum als „positiv“ angesehen wird, wurden von uns der Quotient der gMean-Werte von untersuchtem Klon und Leervektor eines bestimmten Serums gewählt. Der gMean-Wert stellt eine absolute Zahl dar und gibt den durchschnittlichen Leuchtwert einer Zelle der Gesamtpopulation der „gegateten“ Region wieder. Bei einem Zahlenwert des Quotienten von größer zwei gilt eine Serumreaktion auf einen Klon als positiv. Kleinere Werte entsprechen somit dem Hintergrundleuchten.

2.10.8 FACScan

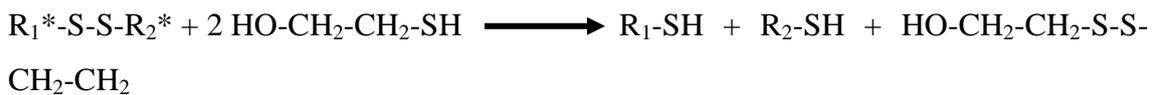
Die fluoreszenzbasierte Durchflußzytometrie oder FACS (= Fluorescence Activated Cell Sorting) ermöglicht das schnelle Zählen und die Analyse von physikalischen und molekularen Eigenschaften von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen in einem Flüssigkeitsstrom. Zur Untersuchung verschiedener Zellpopulationen werden Zellen mit monoklonalen Antikörpern, die gegen bestimmte Oberflächenantigene gerichtet sind, markiert. Durch Fluoreszenzfarbstoffe, die an den Antikörper gekoppelt sind, können die gebundenen Antikörper durch Anregung der Fluoreszenz mit einem Laser sichtbar gemacht werden. Zur Analyse werden die Zellen einer Einzelzellsuspension durch hydrodynamische Fokussierung wie an einer Perlenkette an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge einzeln nacheinander vorbeigeleitet. Bei exakter Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes durch den monochromatischen Laserstrahl werden diese auf ein höheres Energieniveau gehoben. Nach dem Laserpuls fallen die Elektronen unter Abgabe von Energie (in Form von Photonen) auf ihr Ursprungsniveau zurück. Die emittierte Photonenkonzentration, die durch einen Photodetektor registriert wird, verhält sich proportional zur Menge gebundener Antikörper/Zelle. Zusätzlich werden durch die Lichtbeugung und -streuung Informationen über die Zellgröße und die Binnenstruktur (Granularität des Zytoplasmas, Größe des Zellkerns usw.) der Zellen gewonnen. Man unterscheidet zwischen einer Streuung in der Vorwärtsrichtung (Aufwärtsstreulicht = Forward Scatter) und einer Streuung im rechten Winkel zum einfallenden Lichtstrahl (Seitwärtsstreulicht = Side Scatter). Die Lichtstreuung einer Zelle ist abhängig von der Größe sowie der Oberflächen- und Zytoplasmabeschaffenheit. Das Aufwärtsstreulicht gibt Auskunft über die Größe der gemessenen Zellen, während das Seitwärtsstreulicht

die Granularität der Zellen mißt. Die Fluoreszenz der bei den Experimenten verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe Phycoerythrin (PE) wird mit einem Argonlaser angeregt, der Licht mit einer Wellenlänge von 488 nm ausstrahlt. Phycoerythrin emittiert nach einer Anregung maximal bei 560 nm (rotes Licht).

2.11 Protein-Techniken

2.11.1 Abspaltung und Fällung von Hefeoberflächenproteinen

Da Aga2p mit dem membranständigen Aga1p kovalent über Disulfidbrücken verknüpft ist, eignet sich das Reduktionsmittel β -Mercaptoethanol zum Abspalten der gewünschten Oberflächenproteine und zur Überprüfung der Vektormodifikation. Dabei werden die Disulfide (Cystine) nach der Reaktionsgleichung:



(β -Mercaptoethanol)

*R₁, R₂ = Proteinreste

zu Sulfhydrylen (Cysteine) umgewandelt. Dies führt zu einer Freigabe der Proteine ins Medium, von wo aus sie nach der Chloroform-Methanol-Methode gefällt werden können. Es wird folgendermaßen vorgegangen: Nach zweimaligem Waschen der Hefepellets in PBS-Puffer werden diese in dem gleichen Volumen 100 mM β -Mercaptoethanol resuspendiert und eine Stunde unter Schwenken bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird die Hefesuspension zentrifugiert (5 min bei 2500 U/min), der Überstand in ein neues Gefäß überführt und mit dem 4-fachen Volumen Methanol (der Anfangsmenge β -Mercaptoethanol), sowie einem Volumen Chloroform versetzt und kräftig geschüttelt. Danach wird das 3-fache Volumen Wasser zugegeben und erneut geschüttelt. Chloroform und Methanol sind ineinander unlöslich und bilden zwei Phasen, Proteine dagegen sind amphiphil und haben das Bestreben, sich in beiden Phasen zu lösen. Durch das Schütteln kommen sie mit beiden Lösungsmitteln in Kontakt und lagern sich an die Phasengrenzen, die zunächst fein verteilt sind, an. Durch Zentrifugieren bilden sich zwei geschlossene Phasen, eine obere

organische und eine untere wässrige, an deren Grenzfläche die Proteine eine Interphase ausbilden. Nach vorsichtigem Abheben der organischen Phase und Zugabe des 3-fachen Anfangsvolumens Methanol und Schütteln fallen die Proteine aus und können abzentrifugiert werden. Die Proteine sind nach Trocknen und Lösen in 2x Probenpuffer bereit für weitere Analysen.

2.11.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Beweglichkeit eines Proteins im Acrylamidgel ist abhängig von seiner Gesamtladung, sowie seiner Größe. Proteine können sich daher trotz unterschiedlicher Molekülgröße mit derselben Geschwindigkeit im elektrischen Feld bewegen, wenn ihre Größenunterschiede durch die Ladungen wieder ausgeglichen werden. Bei der SDS-Gelelektrophorese werden die Proteine in Gegenwart eines Überschusses an SDS elektrophoretisch aufgetrennt. Das negativ geladene SDS lagert sich durch Bindung an die hydrophoben Regionen in konstantem Gewichtsverhältnis an die Proteine an. Dadurch kompensiert es die positiven Ladungen, so dass alle Proteine nur zur Anode wandern können. Gleichzeitig werden alle Proteine vollständig denaturiert und wandern daher in einem Gel geeigneter Porosität entsprechend ihrer Molmasse, wobei die elektrophoretische Beweglichkeit der Proteine eine lineare Funktion des Logarithmus ihres Molekulargewichts darstellt. Durch Erhitzen mit SDS und β -Mercaptoethanol, welches die Disulfidbrücken reduziert, werden die Proteine in ihre Untereinheiten aufgespalten. Die Gelmatrix besteht aus Ketten von polymerisiertem Acrylamid, die durch N,N'-Methylenbisacrylamid quervernetzt werden. Die Polymerisierungsreaktion wird mit Ammoniumpersulfat (APS) in Gang gesetzt und durch TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyldiamin katalysiert. Die Auftrennungseigenschaften sowie die Porengröße des jeweiligen Gels hängen von den eingesetzten Acrylamid (AA)- und Bisacrylamidkonzentrationen (BisAA) ab. Um eine hohe Auflösung bei der Trennung zu erreichen, wurde eine diskontinuierliche Gelelektrophorese durchgeführt. Dabei wird das zu analysierende Proteingemisch in einem Gel aufgetrennt, das aus zwei Gelsystemen mit unterschiedlicher Porosität und unterschiedlichem pH-Wert des Puffers besteht. Die Proteine wandern von einem grobporigen Sammelgel, in dem sie konzentriert werden, in ein feinporiges Trenngel, in dem die Auftrennung erfolgt. Mit Hilfe von mitlaufenden Markerproteinen bekannter Molekulargewichte konnte das relative Molekulargewicht ermittelt werden.

2.11.3 Herstellung eines SDS-Polyacrylamidgels

Zur Analyse der exprimierten Proteine wurden 12%-ige Trenngele eingesetzt. Zwischen zwei mit Ethanol (70%) gereinigten Glasplatten (14,5 x 16,5 cm²) mit zwei integrierten Spacern, eingespannt in einem Gießrahmen, an dessen Boden sich eine Schaumstoffdichtung befindet, wurde das zuvor angesetzte Trenngel der entsprechenden Konzentration eingegossen (bis ca. 3 cm unter den Rand) und mit H₂O_{dest.} überschichtet. Dieses wurde nach abgeschlossener Polymerisation abgeschüttet und das Sammelgel darauf gegossen. Durch Einsetzen eines Teflonkammes wurden im Sammelgel Taschen ausgespart.

2.11.4 Elektrophorese

Nach der Polymerisation des Sammelgels wurde der Kamm herausgezogen und das Gel senkrecht in die Elektrophoresekammer (von BioRad, Trans-Blot® SB Semi-Dry Transfer-Cell) eingespannt, die obere und untere Kammer mit Laufpuffer geflutet. Die Proteinproben wurden schließlich mit einer Pipette in die Geltaschen pipettiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 200 V für ca. 3 h.

2.11.5 Immunblot (Western-Blot)

Bei dieser Methode werden zunächst in einer SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennte Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf eine Membran übertragen. Dabei bleibt das bei der Auftrennung erhaltene Proteinmuster erhalten; es entsteht eine Kopie des Gels, wobei die Proteine auf der Membran immobilisiert werden: sie binden bei niedriger Ionenstärke über hydrophobe Wechselwirkung an die Membran. Da sowohl die Immunreaktivität als auch die funktionelle Aktivität der Proteine weitgehend erhalten bleiben, können diese durch den Einsatz spezifischer Antikörper immunologisch identifiziert werden.

2.11.6 Proteintransfer

Die für den Proteintransfer eingesetzte Polyvinyliden-Fluorid-Membran (PVDF Membran, Immobilon-Membran) wurde vor dem Zusammenbau in Methanol etwa 10 min benetzt und anschließend in PBS äquilibriert. Die eigentliche Proteinübertragung erfolgte mittels des Semi-Dry-Verfahrens. Der Aufbau des

Immunblot-Sandwiches bei diesem Verfahren besteht aus 1-2 Lagen in Transferpuffer getränkten Whatman-Papieren als unterste Schicht, der Immobilion-Membran, dem Polyacrylamidgel sowie als Abschluss erneut 1-2 Lagen in Transferpuffer getränkte Whatman-Papiere, so dass die Proteine in Richtung Anode auf die Membran übertragen werden. Der Transfer erfolgte bei 400 mA für ein halbe Stunde. Der Bloterfolg wurde durch Färbung mit Ponceau-Rot, einem Farbstoff, der unspezifisch alle Proteine anfärbt, überprüft. Nach Entfärben mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ sollten die entstanden Proteinbanden deutlich zu erkennen sein; gleichzeitig wurde hierbei der mitgelaufene Proteidlängenstandard mit einem Kugelschreiber auf der Membran markiert. Anschließend wurde die Membran in 3% PBS-BSA für 30 min zum Blocken inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen. Nach dem Blocken wurde die Membran einer immunologischen Färbung unterzogen.

2.11.7 Immunologischer Nachweis von Proteinen

Der Proteinnachweis erfolgte über einen Erstantikörper, der in 10 ml einer entsprechenden Verdünnung zugegeben wurde und bei 4°C unter leichtem Schwenken für 1-2 Stunden inkubiert wurde. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS, welches überschüssigen, ungebundenen Erstantikörper entfernen soll, erfolgte die Behandlung mit dem Zweitantikörper, an den Meerettich-Peroxidase kovalent gekoppelt ist. Dies machte die Proteine durch eine Farbreaktion sichtbar. Die Inkubation dauerte 2 h bei ebenfalls 4°C in 3% PBS-BSA unter Schwenken. Nicht gebundene Immunglobuline wurden durch Waschen mit PBS-Puffer entfernt.

2.11.8 Färbung von Proteinen mit Coomassie-Farbstoff

Das Polyacrylamidgel wurde in Coomassie-Blau-Färbelösung einige Minuten getränkt. Dabei werden alle Proteine durch nicht kovalente Anlagerung des Farbstoffs blau gefärbt. Zum Entfärben wird das Gel in einer Schale mehrmals mit etwas destilliertem Wasser in der Mikrowelle kurz aufgekocht, wobei das Wasser jedes Mal erneuert wird. Danach bleibt der Farbstoff nur in den Proteinen enthalten und das Gel kann photographisch dokumentiert werden.

2.11.9 Nachweisreaktion mit ECL+ (Enhanced chemiluminescence)

ECL+ stellt eine verbesserte, nicht radioaktive Nachweismethode Peroxidase-gekoppelter Antikörper dar, die sehr sensitiv ist. Die Methode beruht auf der durch die Peroxidase katalysierten Reduktion von Wasserstoffperoxid und der gleichzeitig stattfindenden Oxidation von Luminol (Substanzen enthalten im ECL+-Kit, Amersham). Sie unterscheidet sich vom Vorgänger ECL durch eine verlängerte Leuchtzeit. Bei der Oxidation des Luminols wird Licht der Wellenlänge 428nm emittiert, das einen lichtempfindlichen Röntgenfilm (Fuji™ Medical X-Ray Fims 03E260, Düsseldorf) schwärzt. Die Blots wurden hierfür in eine Wanne gelegt und mit kurz zuvor gemischten ECL+-Lösungen A, B sowie destilliertem Wasser im Verhältnis 1:1:2 für eine Minute inkubiert. Danach wurden die Blots in eine Filmkassette gelegt und ein Röntgenfilm für einige Minuten exponiert, anschließend entwickelt und fixiert.

3 Ergebnisse

Wir untersuchten 50 Patientenseren, die uns von dem Krankenhaus Nordwest in Frankfurt zur Verfügung gestellt wurden. Hierbei handelte sich um Patienten mit verschiedenen Tumorentitäten (Prostata-, Mamma -, Hypopharynx-, Magen-, Ovarial-, Kolon-, Ösophaguskarzinom, Sarkom, Plasmozytom, SCLC, NSCLC und Malignes Melanom). Um nun die Antikörperantwort gegen vordefinierte Antigene zu testen, verwendeten wir das RAYS-Verfahren. Hierbei handelt es sich um eine Weiterentwicklung der bekannten SEREX-Technologie. Im RAYS-Ansatz wird das Antigen als Oberflächenprotein auf der Zelloberfläche von *S. cerevisiae* präsentiert und auf eine humorale Immunantwort durch Immunglobuline der Klasse G untersucht. Die von uns so untersuchten CT-Antigene beinhalteten NY-ESO-1, LAGE-1a, LAGE-1b, SSX-2, SSX-4, CT7 und CT10.

3.1 Nachweis der Antigenexpression

Die CT-Antigene wurden jeweils in den pYD1-Expressionsvektor einkloniert, so dass sie nach Induktion der Hefen auf der Zelloberfläche nachweisbar waren. Ein Nachweis der Expressierung erfolgte durch die Western-Blot-Technik. Hierbei wurden die Proteine von der Hefeoberfläche abgespalten und, wie in Material und Methoden beschrieben, nachgewiesen. Dabei erfolgte die Entwicklung des Blots über den Myc-Taq mittels eines Anti-c-myc-Antikörpers. Exemplarisch wird dies in Abbildung 5 dargestellt.

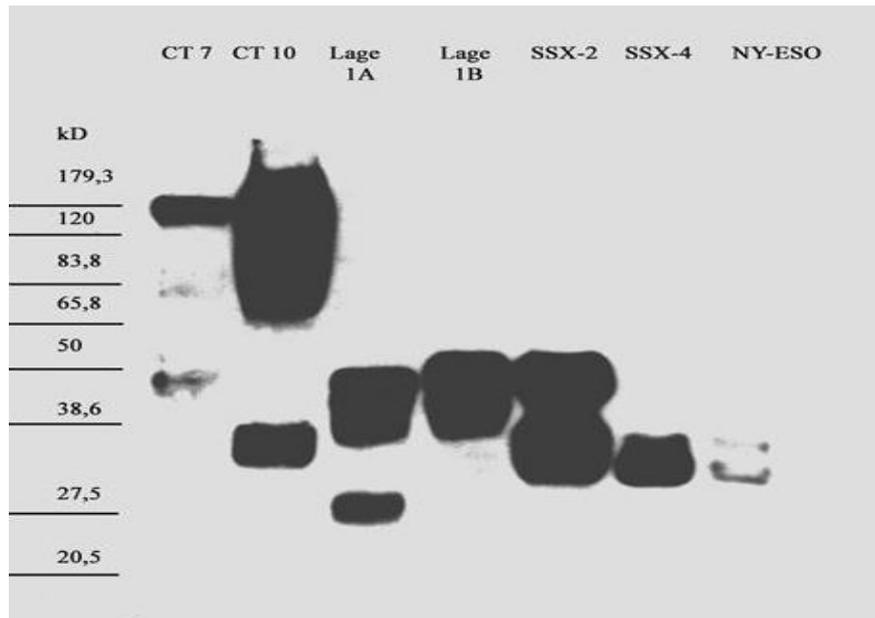


Abbildung 5: Expressionsnachweis des Vektors pYD1 und der darüber präsentierten CT-Antigene CT7, CT10 , LAGE-1a, LAGE-1b, SSX-2 und SSX-4 und NY-ESO-1. Western-Blot, Entwicklung über anti-c-myc-Antikörper. Das Molekulargewicht der von den Antikörpern erkannten Oberflächenstrukturen ist in Kilodalton angegeben und zeigt die Proteinbanden der jeweiligen CT-Antigene.

Wegen der starken Glykosylierung der, von den Hefen exprimierten, Proteine haben sie ein deutlich höheres Molekulargewicht als errechnet wurde. Anhand des bekannten Gewichts des AGA-2-Proteins der Hefe und der möglichen N- bzw. O-Glykosylierungsstellen ließen sich die Molekulargewichte der verschiedenen Proteine zuordnen. Folgende Tabelle zeigt einen Überblick über die getesteten CT-Antigene und die möglichen Molekulargewichte:

Tabelle 3: Darstellung der getesteten CT-Antigene mit dem jeweiligen MG errechnet mit ExPASy Proteomics tools: <http://us.expasy.org/tools>.

CT Antigen	errechnetes MG	
SSX-2	~ 25 kDa	+ Aga2 (~41,7 kDa) + 1 mögliche Säuger-N-Glycosylierungsstelle + 8 mögliche eukaryotische O-Glycosylierungsstellen
SSX-4	~22 kDa	+ Aga2 (~38,7 kDa) + 1 mögliche Säuger-N-Glycosylierungsstelle
NY-ESO-1	~ 18 kDa	+ Aga2 (~34,7 kDa) + 4 mögliche Säuger-N-Glycosylierungsstellen
LAGE-1a	~ 21 kDa	+ Aga2 (~37,7 kDa) + 6 mögliche eukaryotische Glycosylierungsstellen
LAGE-1b	~ 21 kDa	+ Aga2 (~37,7 kDa) + 6 mögliche eukaryotische Glycosylierungsstellen
CT7	~ 59 kDa	+ Aga2 (~75,7 kDa) + 1 mögliche Säuger-N- Glycosylierungsstellen + 69 mögliche eukaryotische O-Glycosylierungsstellen
CT10	~ 33,8 kDa	+ Aga2 (~51,5 kDa) + 14 mögliche eukaryotische Glycosylierungsstellen

Ein weiterer Nachweis der Induktion der CT-Antigene auf der Hefeoberfläche erfolgte antigenunabhängig durch eine Anti-His-Färbung des im Expressionsvektor enthaltenen His-Tags durch Durchflusszytometrie (siehe Abbildung 7).

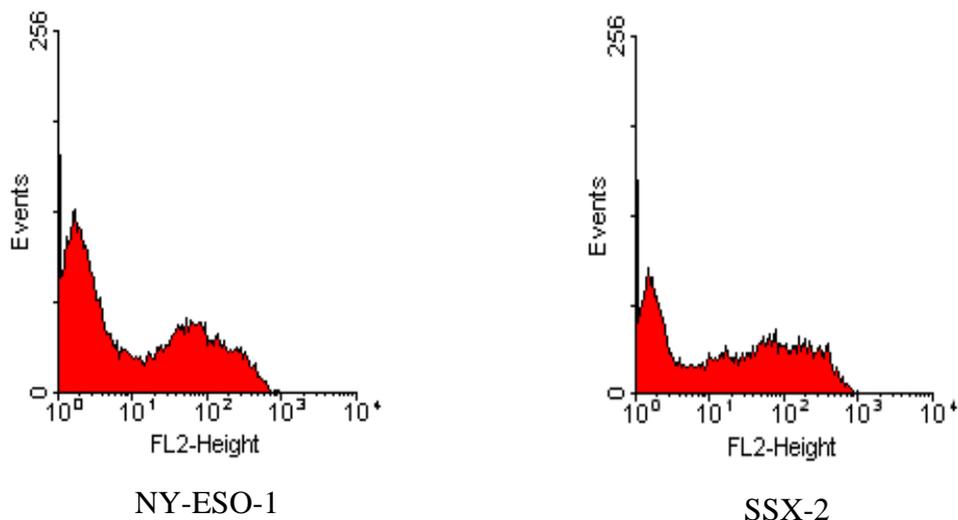


Abbildung 6: Induktionsnachweis durch antigenunabhängige Immunfluoreszenzfärbung. Histogramme der FACS-Messungen der induzierten Hefen am Beispiel NY-ESO-1 (links) und SSX-2 (rechts). Die Abszisse gibt die Verteilung der Fluoreszenzstärken (FL2-Height) und die Ordinate die Anzahl an Ereignissen (Events) an.

Bei Hefen, welche ein irrelevantes Antigen exprimierten, wurde keine Antikörperbindung detektiert. Erst nach sicherem Vorhandensein des Antigens auf der Hefeoberfläche erfolgte die Inkubation mit den Patientenseren. Die beiden exemplarisch in Abbildung 6 dargestellten Verteilungen der Hefepopulation zeigen eine deutliche Rechtsverlagerung der Hefepopulationen auf der Fluoreszenz 2-Height-Achse im Vergleich zur nicht induzierten Population in Abbildung 7. Hier waren also alle Hefeklone induziert.

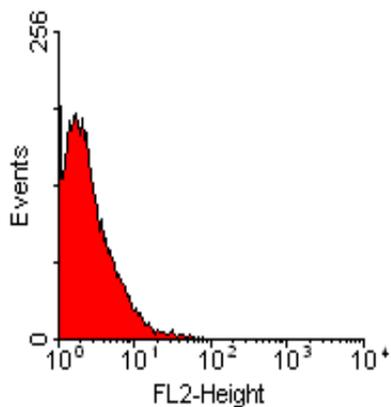


Abbildung 7: Fehlende Antigen-Expression. Wurde kein Antigen an der Hefe-Oberfläche exprimiert, fand keine Antikörperbindung statt und diente als Negativkontrolle.

Des Weiteren erfolgte durch eine subjektiv visuelle Auswertung der Hefen mittels eines Fluoreszenzmikroskops der Expressionsnachweis (Abbildung 4). Wurde das Antigen auf der Hefe exprimiert, kam es zu einer roten Fluoreszenz.

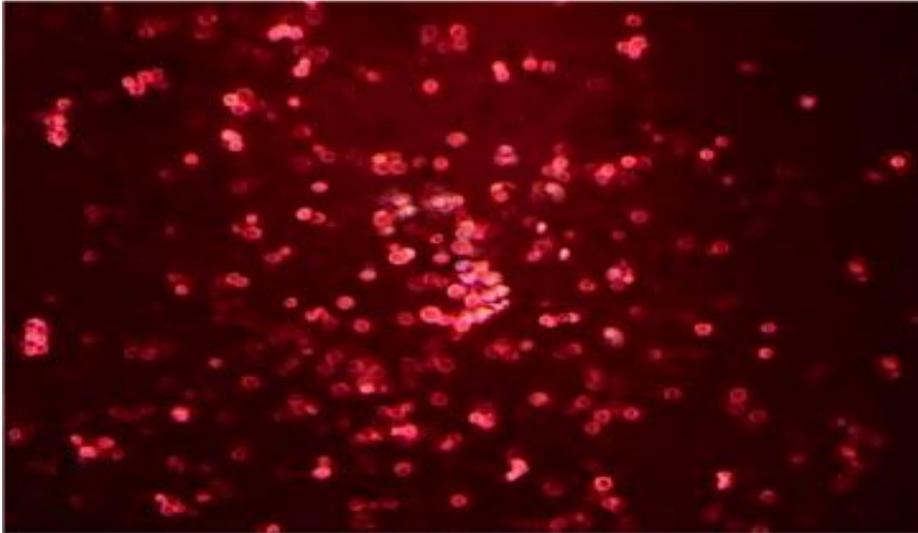


Abbildung 7: Fluoreszenz- bzw. lichtmikroskopische Aufnahme induzierter Hefen (Rotfilter). Die Abbildung zeigt, dass auf der Hefeoberfläche das Antigen (SSX-2) exprimiert wird.

3.2 Färbung der Seren auf die CT-Antigene

Um nun die humorale Immunität der Tumorpatienten mit dem FACScan Gerät quantifizieren zu können, ist eine Immunfluoreszenzfärbung erforderlich. Dabei wurden die induzierten Hefen jeweils mit den präabsorbierten Patientenserum (Verdünnung 1:100) inkubiert und über einen biotinylierten Anti-human-IgG-Antikörper an einen Streptavidin-gekoppelten fluoreszierenden Farbstoff gebunden, wodurch die Reaktion per Durchflusszytometrie gemessen werden konnte. Entsprechend der in Material und Methoden beschriebenen Kriterien wurde diese ausgewertet. Ein Serum wurde also dann als positiv bewertet, wenn die Ratio/ der Quotient aus dem g-mean-Wert (mittlere Fluoreszenzintensität) der Reaktion des Serums mit der antigenpräsentierenden Hefe und dem g-mean-Wert der Reaktion des Serums mit der Leervektor-exprimierenden Hefe größer als zwei war. Die folgenden Abbildungen zeigen einige Beispiele mit positiven Serumreaktionen auf die getesteten CT-Antigene am Beispiel Serum F26. Die Darstellung erfolgt mittels Dotplot und Histogramm. Das Färben war spezifisch für Antigen-exprimierende Hefen. Nur dort konnte der Antikörper binden. Bei nicht induzierten Hefen oder bei Expression eines anderen Antigens fand keine Detektion statt. Abbildung 8 zeigt die Färbung einer induzierten pYD1-transformierten Hefe. Das Gate für die Zellpopulation wurde entsprechend den Angaben in Material und Methoden festgelegt.

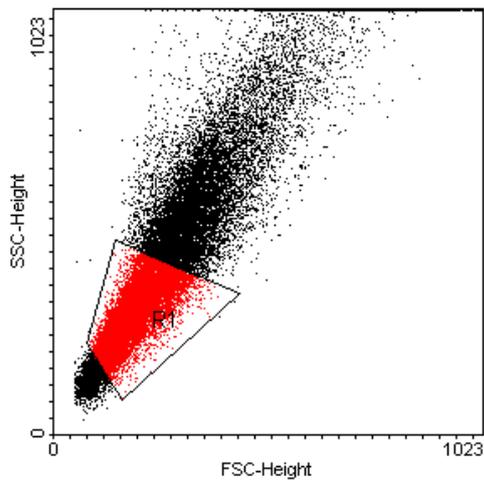


Abbildung 8: Dot-Plot-Darstellung pYD1-Hefen mit Frankfurt-Serum F26+ sek. Antikörper. R1 stellt das Gate der registrierten Zellen dar.

Abbildung 9 zeigt exemplarisch die Färbung einer induzierten pyD1-transformierten Zelle in einer histogrammischen Darstellung. Die rote Kurve zeigt dabei den Leervektor beziehungsweise Negativkontrolle an; die schwarze Kurve die Färbung der induzierten Hefen.

Die positiven Seren wurden mehrmals getestet. Daraus ergab sich die in Tabelle 4 dargestellte Verteilung.

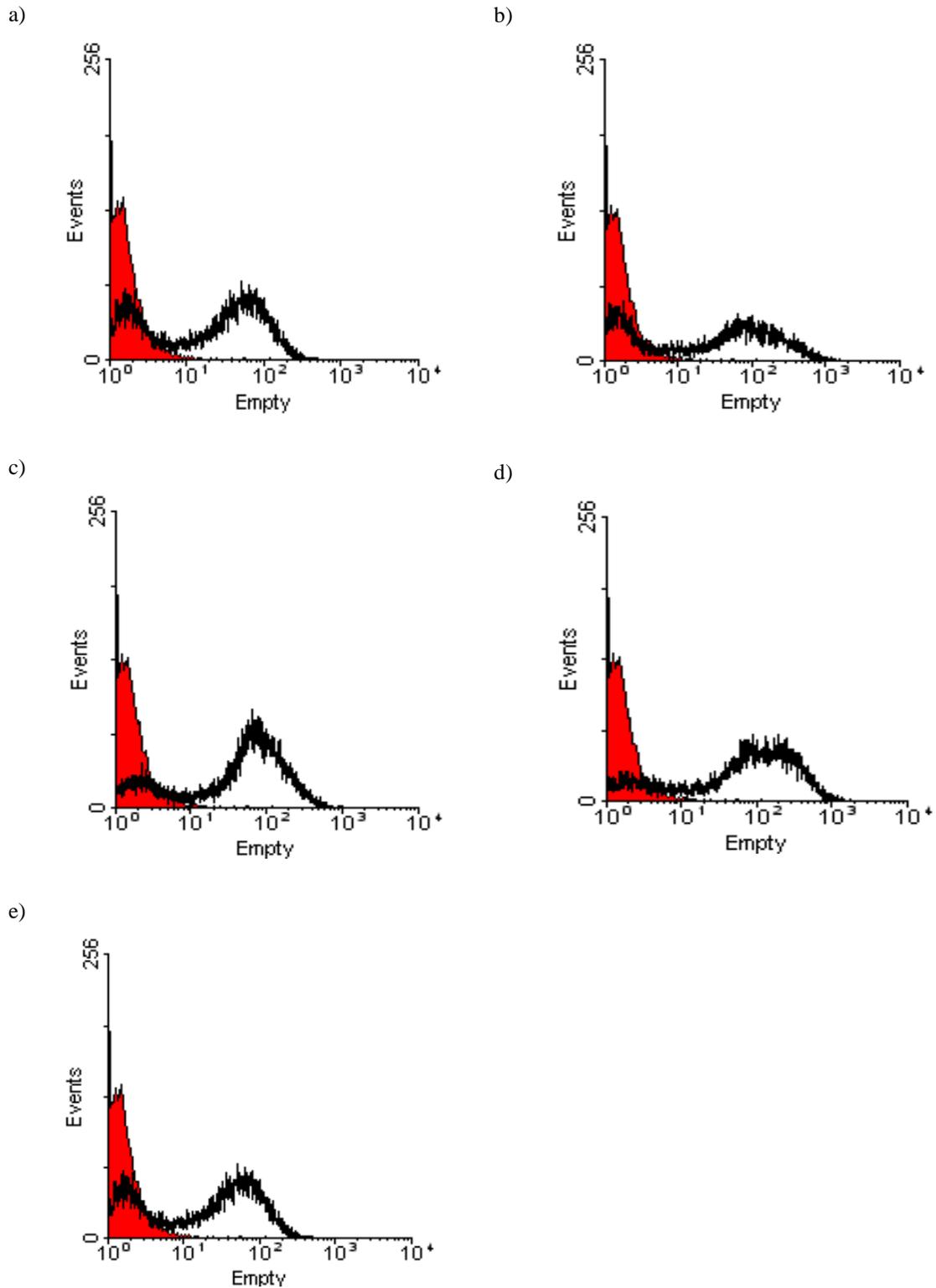


Abbildung 9: RAYS- Analyse auf spezifische Antikörperantwort. Die rote Kurve zeigt den Leervektor pyD1; die schwarze Kurve das jeweilige CT-Antigen (a) CT7, (b) CT10, (c) LAGE-1a, (d) LAGE-1b (e) NY-ESO-1 Hefen.

Ergebnisse

Tabelle 4: Übersicht der getesteten Seren. Positiv getestete Seren (odds ratio >2) sind durch + markiert.

	SSX-2	SSX-4	NY-ESO-1	LAGE-1a	LAGE-1b	CT7	CT10
F1			+	+	+		+
F2							
F3							
F4							
F5			+	+	+		
F6	+	+	+	+	+	+	
F7							
F8			+				
F9							
F10			+	+			
F11	+	+	+	+	+		
F12	+		+	+	+		
F13			+	+	+		
F14			+	+			
F15							
F16			+	+	+		
F17			+	+	+		
F18	+		+	+	+		
F19			+	+	+		
F20			+	+	+		
F21			+	+	+		
F22							
F23			+	+	+		
F24			+	+	+		
F25			+	+	+		
F26			+	+	+	+	+
F27			+	+	+		
F28				+			
F29			+	+			
F30	+					+	
F31							
F32							
F33			+				
F34							
F35							
F36							
F37							
F38							
F39			+			+	
F40							
F41							
F42							
F43							
F44							
F45			+				
F46							
F47							
F48			+				
F49			+				
F50			+				

Es zeigte sich, dass am häufigsten (54,0%) eine Antikörperreaktion auf NY-ESO-1 erfolgte. Für LAGE-1a (42,0%) und LAGE-1b (34,0%) konnte eine hohe Häufigkeit aufgezeigt werden, gefolgt von SSX-2 (10,0%), CT7 (8,0%), CT10 und SSX-4 (jeweils 4,0%).

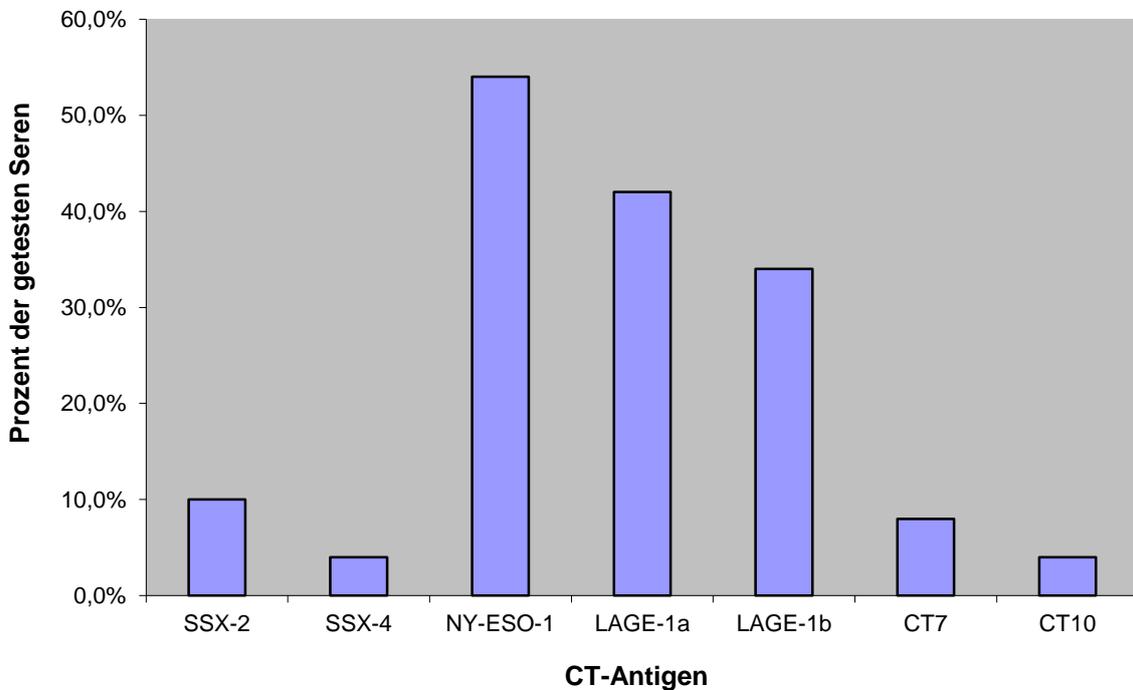


Abbildung 10: Häufigkeit der Reaktion auf hefeexprimierte CT-Antigene.

21 der Patienten zeigten keine Immunantwort auf die untersuchten Antigene. Sieben Patienten erkannten ein CT-Antigen. Insgesamt zeigten 44% der Patienten eine Expression von mehr als einem CT-Antigen. Bei fünf Patienten wurden zwei CT-Antigene, bei 11 Patienten wurden drei Antigene erkannt. Hierbei bestand, bis auf Serum F30, auch immer eine Antwort auf NY-ESO-1. Bei 40% (Gesamt) erfolgte eine gleichzeitige Erkennung von NY-ESO-1, LAGE-1a und LAGE-1b. Wurde ein Serum NY-ESO-1 positiv getestet, konnten in 74,1% der Fälle auch Antikörper gegen LAGE-1a bzw. LAGE-1b gefunden werden. Drei Patienten erkannten vier verschiedene CT-Antigene. Bei zwei Patienten konnten jeweils fünf verschiedene CT-Antigene detektiert werden. Ein Patient (Serum F6) erkannte sechs CT-Antigene. Auf alle CT-Antigene reagierte kein Patientenserum. Wurde CT7 oder CT10 erkannt, konnte auch immer ein weiteres CT-Antigen erkannt werden.

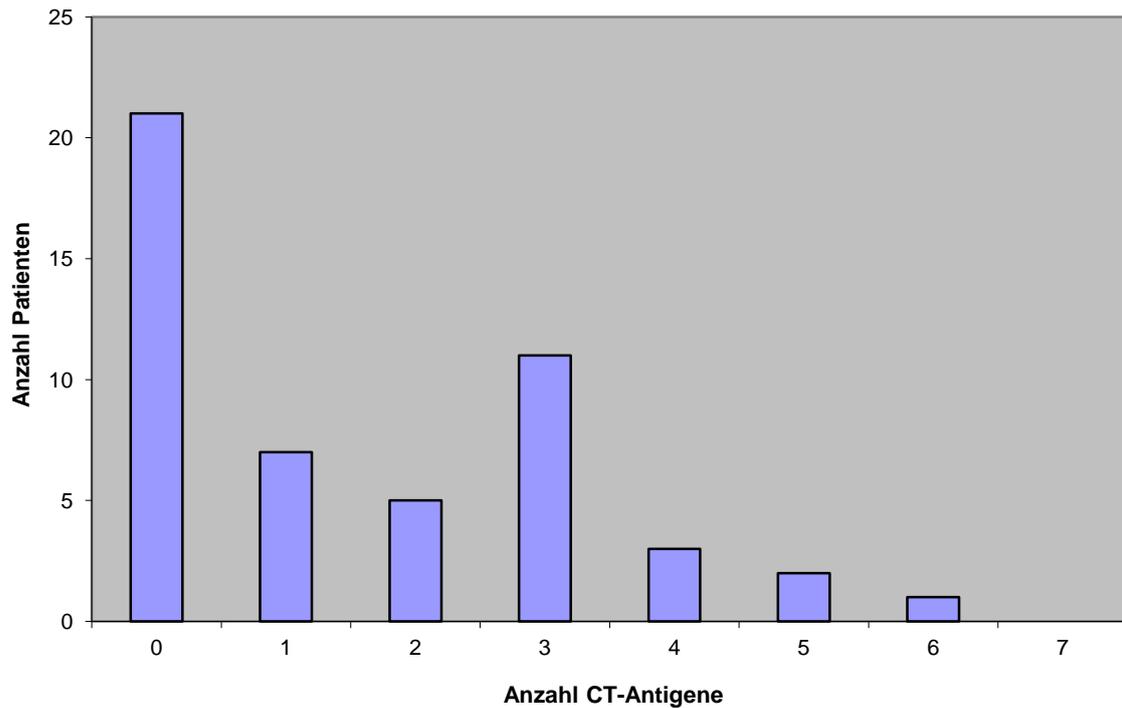


Abbildung 11: Gleichzeitige Erkennung mehrerer CT-Antigene.

3.2.1 IgG- Subklassen

Um nun die positiven Seren auf spezifische IgG-Antikörper gegen die exprimierten Antigene zu testen wurden diese, wie in Material und Methoden beschrieben, gefärbt. Hierbei wurden Antikörper gegen die IgG-Subklassen 1 bis 4 verwendet. Die Färbung der IgG-Subklassen wurde ähnlich der Färbung der CT-Antigene vorgenommen. Die NY-ESO-1-präsentierenden Hefen wurden mit den präabsorbierten Seren der Patienten inkubiert, anschließend jeweils mit den aus Kaninchenserum gewonnenen subklassenspezifischen Antikörpern (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) detektiert und über einen biotinylierten Anti-rabbit-IgG-Antikörper an einen Streptavidin gekoppelten fluoreszierenden Farbstoff gebunden. Die Messung erfolgte durchflusszytometrisch. Die Auswertung wird exemplarisch am Beispiel Serum F21 dargestellt. Abbildung 13 zeigt hierbei die histographische Auswertung.

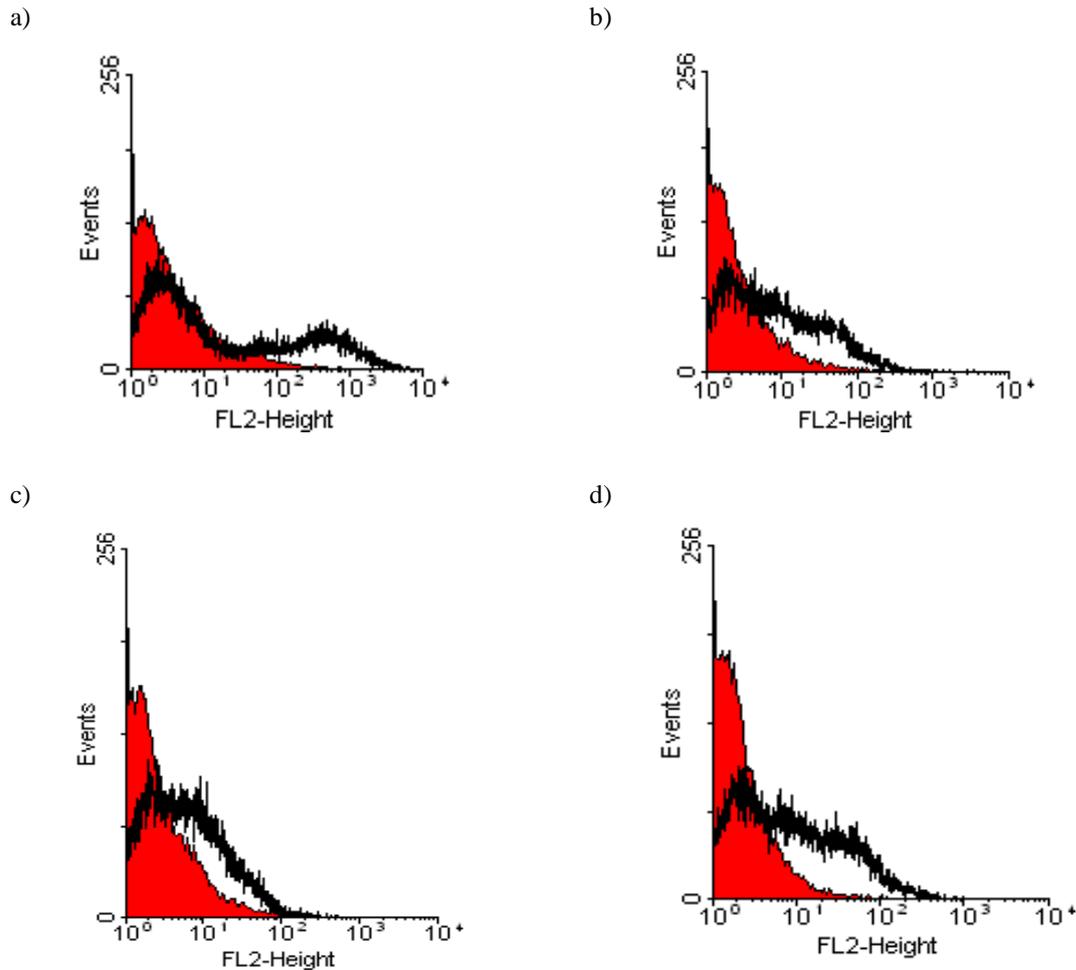


Abbildung 12: RAYS- Analyse auf spezifische Subklassen. Die rote Kurve zeigt den Leervektor pyD1; die schwarze Kurve NY-ESO-1 (a) NY-ESO-1 + IgG1 (b) NY-ESO-1 + IgG2 (c) NY-ESO-1 + IgG3 (d) NY-ESO-1 + IgG4.

Die folgenden Grafiken stellen die mittlere Fluoreszenz-Intensität der Seren, welche mit den jeweiligen CT-Antigen exprimierenden Hefen reagiert haben, dar. Auch hier wurde der Quotient aus Reaktivität des Serums mit der tumorantigentragenden Hefe und der Reaktivität der Kontrollhefe gebildet. Lag der Quotient für das betreffende Tumorantigen über zwei, wurde von einer positiven Reaktion ausgegangen. Es zeigte sich, dass bei allen positiv getesteten Seren eine IgG1-Antwort vorhanden war. Bei NY-ESO-1, LAGE-1a und LAGE-1b konnte darüber hinaus eine relevante IgG2-Antwort verzeichnet werden. Insgesamt bestand nur eine geringe IgG3- und IgG4- Antwort.

Ergebnisse

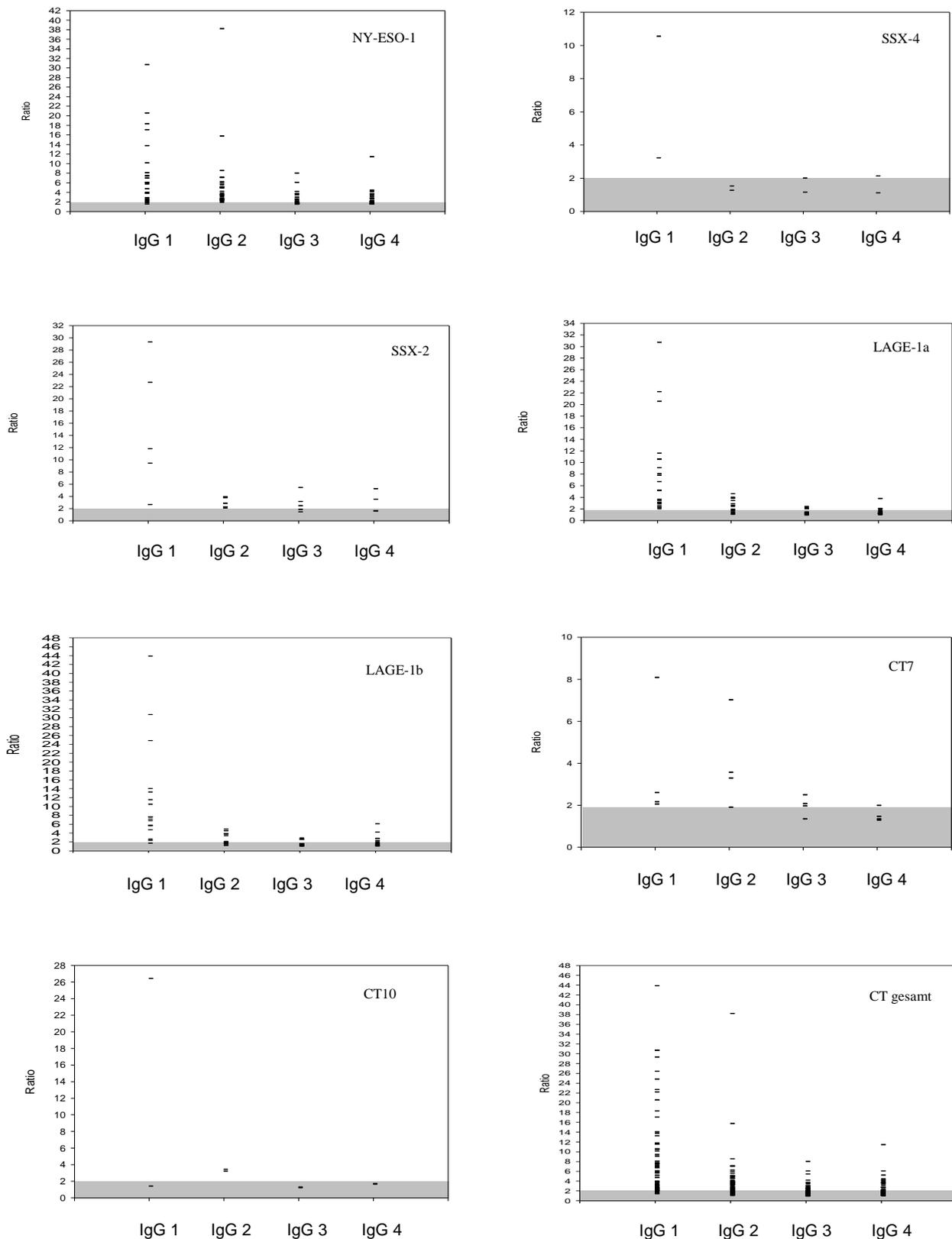


Abbildung 13: Antikörperantworten- Subklassenanalyse Dotplotdarstellung der mittleren Fluoreszenzintensität der Seren, welche mit den jeweiligen CT-Antigen exprimierenden Hefen reagiert haben. Seren mit einer mittleren Fluoreszenzintensität < 2 wurden als negativ gewertet (grau unterlegte Fläche).

Serum F21 zeigte bei den Antigenen NY-ESO-1, LAGE-1a und LAGE-1b eine Immunantwort aller IgG-Immunglobuline. Auch bei den Seren F24 und F27 konnte eine Reaktion auf IgG1 bis IgG4 mit NY-ESO-1 exprimierten Hefen verzeichnet werden. Wurden Antikörper gegen LAGE-1a gebildet, zeigten sich bei 89,47% auch Antikörper gegen LAGE-1b. Weitere Korrelationen ergaben sich nicht.

4 Diskussion

Serologische Untersuchungen von Krebspatienten haben in den letzten Jahren die Entdeckung einer Vielzahl von CT-Antigenen ermöglicht. Diese Antigene, welche von einer großen Anzahl von Tumoren gebildet werden, bieten vielversprechende Möglichkeiten für neue Therapieansätze. Um diese jedoch effektiv einsetzen zu können ist das Verständnis um die Rolle des Immunsystems unabdingbar. Die von den Antigenen ausgelöste Immunantwort ist jedoch meistens zu schwach, um den Tumor effektiv zu bekämpfen. Notwendig in der Behandlung von Tumoren wäre eine Vakzinierung zu entwickeln, die eine ausreichende humorale und zelluläre Immunantwort hervorruft, um das Tumorwachstum zu hemmen oder den Tumor zu zerstören. Die Vakzine sollte sowohl $CD8^+$ T-Zellen als auch $CD4^+$ T-Zellen stimulieren können [168;169;170]. Des Weiteren sollten die Zielstrukturen nur auf dem Tumor vorkommen, wie es bei den CT-Antigenen der Fall ist, was sie zu geeigneten Kandidaten für eine Vakzinierungstherapie machen. Durch die Entwicklung des SEREX und später des RAYS konnten bis zum jetzigen Zeitpunkt mehr als 2000 Antigene, welche als Zielstrukturen denkbar wären, identifiziert werden. Durch die neue Technologie konnte eine Verbindung zwischen der T-Zell- und B-Zell- Antwort, welche für eine starke Antikörperantwort verantwortlich ist, geschaffen werden [128]. Die Analyse des B-Zell Repertoires hilft Antigene zu identifizieren, welche als mögliche Ziele bei einer Vakzinierungstherapie in Frage kommen könnten, um eine CTL-Antwort zu induzieren [119].

Im Laufe der Jahre häuften sich jedoch die Beweise, dass das Antigen-Repertoire, welche durch das SEREX identifiziert werden konnten, limitiert ist. Dies mag vor allem an der fehlenden posttranslationalen Modifizierung in dem Bakterien-Expressions-System liegen. Als Konsequenz wurde das RAYS entwickelt. Es erwies sich als ein brauchbares System, um eine Immunantwort gegen CT-Antigene zu analysieren [171].

In unseren Versuchen analysierten wir daher die humorale Antwort des Immunsystems gegen die CT-Antigene NY-ESO-1, LAGE-1a, LAGE-1b, SSX-2, SSX-4, CT7 und CT10 mit Hilfe des RAYS. Hierbei untersuchten wir den IgG-Antikörper-Titer sowie die IgG-Antikörper-Subklassen-Titer (IgG1-IgG4). Zusammenhänge zwischen Tumorentität oder Tumorstadium wurden nicht untersucht. Insgesamt untersuchten wir 50 Seren von Patienten mit verschiedenen Tumorentitäten und Tumorstadien. Die dabei

verwendete RAYS-Methode hatte sich bereits in anderen Studien als ebenso sensitiv wie Western-Blot und ELISA in der Detektion von NY-ESO-1 und sensitiver in der Detektion von SSX-Antikörpern erwiesen [171].

4.1 NY-ESO-1

In dem von uns durchgeführten serologischen Screening konnte in 54% der Fälle Antikörper gegen NY-ESO-1 detektiert werden. NY-ESO-1 Antikörper wurden somit in einer hohen Anzahl gefunden. Bei fehlender NY-ESO-1-Antikörperantwort bestand der Verdacht, dass das Immunsystem keine Antikörper gebildet hat, dass diese nicht durch das RAYS gefunden wurden oder dass nur eine zelluläre und keine humorale Immunantwort bestand. Das Fehlen einer humoralen Immunantwort wurde vor allem bei kleiner Tumormasse beschrieben [172]. Des Weiteren könnte es auch zu einem Antigenverlust und somit zu einer fehlenden humoralen Immunantwort im Verlauf der Erkrankung gekommen sein [173].

Charakteristisch für NY-ESO-1 ist die hohe Immunogenität [174]. Patienten mit Tumoren, die NY-ESO-1 exprimieren, zeigen häufig eine spontane Immunantwort auf dieses Antigen. Es besteht die Hypothese, dass vor allem in Frühstadien von Tumorerkrankungen die Inzidenz von Antikörpern geringer ist als in fortgeschrittenen Stadien. In Studien konnte gezeigt werden, dass es bei 40-50% der Patienten mit Tumoren exprimiert wird, vor allem wenn es sich dabei um nekrotische oder große bzw. metastasierte Tumoren handelt [175;176;177]. Keine NY-ESO-1 Immunität bestand bei gesunden Patienten, bei NY-ESO-1 negativen Tumoren oder bei Patienten mit Frühstadien NY-ESO-1 positiver Tumoren. Jäger et al. beobachteten, dass NY-ESO-1 Antikörper im Serum abhängig von NY-ESO-1 exprimierenden Tumoren sind [178]. Änderungen des NY-ESO-1-Titers korrelierten mit der Entwicklung von NY-ESO-1 positiven Tumoren. Bei einer Zunahme der Tumormasse, erhöhte sich auch der Antikörpertiter. Nach chirurgischer oder chemotherapeutischer Behandlung sank dieser. Die Assoziation von NY-ESO-1 bzw. CT-Genen und klinischen Parametern muss jedoch mit Vorsicht bewertet werden. Häufig waren die Korrelationen zu schwach oder nicht signifikant [179]. Über die Tumorstadien bei den von uns getesteten Seren lagen uns keine Daten vor. Es wäre daher notwendig in weiteren Versuchen Patientenkollektive mit gleichen Tumorstadien zu wählen, um eine bessere

Vergleichbarkeit zu gewährleisten und um Korrelationen zwischen den einzelnen Tumorstadien und Immunantworten aufzeigen zu können.

Durch neue Fortschritte, allen voran das SEREX-Verfahren, gelang es, eine gleichzeitige Immunantwort aufzuzeigen [180;181]. Es zeigte sich, dass NY-ESO-1 in der Lage ist, sowohl eine humorale als auch eine zelluläre Immunantwort auszulösen und dass die Anwesenheit von CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen mit der Anwesenheit von NY-ESO-1 assoziiert ist [182]. Man nahm an, da auf Tumoren hauptsächlich MHC-I und nicht MHC-II-Moleküle exprimiert werden, dass tumorantigenspezifische CD8⁺ T-Zellen den Hauptmechanismus in der Tumorabwehr darstellen. *In vivo* konnten CD8⁺ T-Zellen direkt und effizient Tumore lysieren und zum Teil auch eine Regression erreichen [183]. Des Weiteren zeigte sich, dass bei einem hohen Antikörpertiter gleichzeitig eine CD8⁺ T-Zellantwort vorlag [176]. Daher wurde klar, dass auch CD4⁺ T-Zellen eine wichtige Rolle in der effizienten Immunantwort spielen [181]. Unter anderem beim Priming von CD8⁺ T-Zellen und der Aktivierung von B-Zellen zur Produktion von antigenspezifischen Antikörpern sowie der IFN- γ -abhängigen Monozyten-/Makrophagen-vermittelten Zytotoxizität. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind bisher jedoch nicht eindeutig erforscht. Es wird angenommen, dass IgG-Antikörper mit NY-ESO-1 Immunkomplexe bilden, welche die NY-ESO-1-Endozytose (im Gegensatz zu einer unspezifischen Endozytose) in die antigenpräsentierenden Zellen - und somit die Kreuzpräsentation - erleichtert. Dies führt dann zur Aktivierung und Aufrechterhaltung NY-ESO-1-spezifischer CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen [184]. Isobe et.al. zeigten am Beispiel eines Adenokarzinoms der Lunge eine spontane Tumorregression bei dem Vorhandensein einer integrierten Immunantwort; bestehend aus IgG-Antikörpern, CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen [185]. Des Weiteren wurde von Huartel et al. beobachtet, dass Patienten, die eine spontane Immunität gegen NY-ESO-1 bildeten, ein besseres Outcome haben, was dieses Antigen zu einem interessanten Kandidaten für eine Vakzinierungstherapie macht [186].

Wichtig für die Entwicklung von Vakzinen ist die Erkenntnis, dass abhängig vom individuellen MHC-Typ des Patienten unterschiedliche Peptide aus einem tumorassoziierten Protein als antigene Determinante präsentiert werden, das heißt, dass die Antigenität vom gegebenen MHC-Phänotyp abhängig ist bzw. von der richtigen Kombination aus Epitop (Peptid von 8-10 Aminosäuren bei MHC-I-Klasse und 9-15 Aminosäuren bei MHC-II-Klasse-Molekülen) und MHC-Molekül. Eine Impfung kann

also nur zum Erfolg führen, wenn das Peptid auf der Oberfläche des Tumors den Immunzellen -passend zurechtgeschnitten- präsentiert wird. Denn selbst wenn tumorspezifische Antigene in einer Tumorzelle vorhanden sein sollten, werden diese nicht immer von MHC-Molekülen präsentiert, was den Impferfolg mindern könnte. Platten et al. stellten kürzlich hierfür eine Lösung des Problems vor. Durch den entwickelten PLA-Test (Proximity Ligation Assay) kann abgeschätzt werden, ob eine zielgerichtete Immuntherapie helfen bzw. ob das Tumorantigen eine Immunantwort auslösen könnte. Das Prinzip des PLA-Tests beruht auf zwei Antikörpern, von denen einer das Tumorantigen, der andere das MHC-Molekül erkennt. Nur wenn beide Antikörper in allernächster Nähe liegen, kommt es durch eine molekularbiologische Reaktion zum Leuchtsignal. Die Leistungsfähigkeit des Tests wurde inzwischen an Gewebeproben von Gliomen, mit Nachweis von IDH1-mutiertem Peptid zusammen mit dem MHC-Molekül, aufgezeigt. Aber auch für NY-ESO wurde mit dem PLA-Test eine Verbindung mit den MHC-Molekülen nachgewiesen [187].

Wegen der hohen Immunogenität sowie der häufigen Expression von NY-ESO-1, wurden viele Vakzinierungsversuche mit den verschiedenen Epitopen dieses Antigens durchgeführt. Ein Problem stellte jedoch die oben beschriebene MHC-Abhängigkeit der Epitope dar. Zwischenzeitlich konnten jedoch verschiedene CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-Epitope, aber auch B-Zell-Epitope identifiziert werden [47;188;189]. Valmori et al. zeigten in einer NY-ESO-Vakzinierungsstudie eine dominante Bindungsregion im Bereich Aminosäure (AS) 80-110 und starke Antikörperreaktivität im Bereich AS 1-70 auf. Des Weiteren ließ sich aber auch eine geringere Antikörperreaktivität gegen den C-Terminus im Bereich AS 160-180 identifizieren. Diese Aminosäurebereiche deckten sich mit den vorher entdeckten B-Zell-Epitopen bei Patienten ohne eine Vakzinierungstherapie [190]. Mischo et al. konnten in einer Vakzinierungsstudie, welche auf Basis der RAYS-Analyse durchgeführt wurde, aufzeigen dass die gebildeten Antikörper im Bereich AS 1-80, AS 1-119 und AS 67-134 banden. Lag eine starke Immunreaktion vor, konnten auch Antikörper detektiert werden, welche im Bereich AS 1-153 banden [191]. Aufgrund der sich überlappenden Regionen ist davon auszugehen, dass sich dort ein immundominanter Bereich der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen (81-110) befindet. Die RAYS-Methode zeigte sich hierbei als eine gute Screeningmethode zum Nachweis des Impferfolges, da bei spontaner Immunantwort auf NY-ESO-1 spezifische CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen nur bei einer gleichzeitigen humoralen Immunantwort

gefunden wurden [81;188]. Es stellt somit ein Verfahren dar, welches sich sowohl zum Screening einer Vakzinierungstherapie, als auch zur Kontrolle einer Tumorthherapie eignet.

4.2 LAGE-1a und LAGE-1b

LAGE-1 besitzt eine starke Sequenzhomologie sowie ein ähnliches Expressionsmuster in Normalgeweben wie NY-ESO-1. Bei unserer Analyse fiel auf, dass Patienten, die eine Antikörperantwort auf NY-ESO-1 zeigten, häufig auch Antikörper gegen LAGE-1a und LAGE-1b bildeten. Dies mag vor allem an der hohen Sequenzhomologie liegen (94%). Bisher gab es jedoch keine eindeutigen Beweise, dass LAGE-1a oder LAGE-1b alleine in der Lage sind eine Immunantwort hervorzurufen. Da auch immer NY-ESO-1 in dem Screening gefunden wurde, ist es möglich, dass es sich hierbei um eine Kreuzreaktion handelte und NY-ESO-1 die Antikörperbildung auslöste [192]. In dem von uns durchgeführten Screening zeigte Serum F28 jedoch eine NY-ESO-1 unabhängige Antikörperantwort. Auch Rimoldi et al. konnten in einer Studie an Melanompatienten aufzeigen, dass NY-ESO-1 und LAGE-1 häufig koexprimiert waren, aber es auch Patienten gab, die entweder nur NY-ESO-1 oder LAGE-1 exprimierten. 23% exprimierten NY-ESO-1 und 33% LAGE-1 [193]. Hierbei wurde LAGE-1 sogar häufiger detektiert, was für das gelegentliche Auftreten einer NY-ESO-1-unabhängigen Reaktion spricht.

Aufgrund der großen Ähnlichkeit von LAGE-1a und NY-ESO-1 besteht die Hypothese, dass von einer Anti-NY-ESO-1-Vakzine auch Patienten mit Tumoren profitieren könnten, welche LAGE-1a, aber nicht NY-ESO-1 exprimieren [194]. Hierzu sind jedoch weitere Studien notwendig.

4.3 SSX-2 und SSX-4

Insgesamt konnten wir bei 10% (SSX-2) beziehungsweise 4% (SSX-4) der Patienten Antikörper nachweisen. Bei zwei Patienten, welche Antikörper gegen SSX-2 gebildet hatten, wurden auch Antikörper gegen SSX-4 nachgewiesen. Möglicherweise lag dies an der hohen Sequenzhomologie der beiden Antigene. Die Expression von SSX-2 und SSX-4 wird für verschiedene Tumore als sehr variabel beschrieben. Türeci et al.

untersuchten 325 unterschiedliche Tumore. Hierbei wurde eine Expression von jeweils 15% für SSX-2 und SSX-4 beobachtet [158].

Die Korrelation zwischen der Expression von SSX und Tumorwachstum ist zurzeit noch unklar. Jedoch gibt es einige Studien, die zeigten, dass eine SSX-Expression mit einem schlechten klinischen Outcome verbunden ist. Auch ergab sich, dass fortgeschrittene Tumore häufiger SSX exprimieren als Tumore in frühen Stadien. Studien an Melanom-Patienten konnten aufzeigen, dass bei dem Vorhandensein von SSX-1 bis SSX-5 die Überlebensrate geringer war als bei Patienten, bei denen drei oder weniger SSX-Antigene nachgewiesen werden konnte. Die stärkste Korrelation von geringerer Überlebensrate und Antigenexpression konnte bei SSX-2 exprimierenden Malignen Melanomen festgestellt werden [195].

Weitere Studien konnten nachweisen, dass SSX-Antigene auch in mesenchymalen Stammzellen exprimiert werden [196]. Interessanterweise kommt hierbei SSX mit Proteinen vor, die in die Zelladhäsion, Beweglichkeit und extrazelluläre Matrix-Interaktionen involviert sind (z.B. Metalloproteinase 2 und Vimentin). Bei Untersuchungen an Melanomzellen bot sich eine Verminderung der Migrationsfähigkeit, wenn SSX „down“-reguliert wurde. Dies führte zu der Annahme, dass SSX eine funktionelle Rolle in normalen Stammzellen und potentiell eine ähnliche Funktion in Tumormetastasen hat [47]. Greve et al. beobachteten schließlich ein onkogenes Potential von SSX-2, indem es eine genomische Instabilität verursacht und somit das Tumorwachstum langfristig unterstützt [197].

Das Vorhandensein von Antikörpern und der erbrachte Nachweis von CD8⁺ T-Zellen [153] gegen SSX macht dieses Antigen zu einem weiteren möglichen Ziel für zukünftige immuntherapeutische Therapien. Zumal durch die große Übereinstimmung der SSX-Antigene und der Nachweis von Kreuzreaktionen von SSX-Antikörpern mit mehreren Mitgliedern der SSX-Familie hoffen lässt, dass man durch eine Impfung eine Immunantwort nicht nur gegen eines, sondern gegen möglichst viele Mitglieder der SSX-Familie erzeugen kann. Song et al. konnten zudem zeigen, dass sie anhand des Nachweises von SSX-1 bis SSX-9 im Sputum von Patienten mit HNSCC 77,8% aller histologisch gesicherten T2-Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinome und 100% aller T1-Tumoren bestätigen konnten [198], was diese CT-Antigene zu einem wertvollen Instrument in der Tumorsuche machen.

4.4 CT7 und CT10

Das mit Hilfe der SEREX-Methode entdeckte CT-Antigen konnte in vielen verschiedenen Tumoren gefunden werden. Antikörper gegen CT7 konnten in unseren Untersuchungen mit Hilfe der RAYS-Methode bei 8% der Patienten nachgewiesen werden; CT10 bei 4%. Lediglich bei Serum F26 wurde eine Antikörperantwort auf beide CT-Antigene detektiert.

Für CT10 konnte in verschiedenen Studien eine Expression von 6-30% in unterschiedlichen Tumoren nachgewiesen werden. Für das Multiple Myelom im Stadium III konnte sogar eine Expression von 82% aufgezeigt werden [199;200]. Des Weiteren zeigte sich bei einer Untersuchung an Melanom-Patienten eine Anti-CT10-Immunantwort, was die Immunogenität dieses Antigens aufzeigte [147].

Bei Patienten mit einem Multiplen Myelom konnte vor allem bei dem Vorhandensein von CT7 eine schlechte Prognose mit einem frühzeitigen Rezidiv und reduziertem Überleben dokumentiert werden [201]. An Myelomzellen wurde beobachtet, dass durch Ausschalten von CT7 eine Apoptose induziert werden kann, und dass CT7 notwendig für das Überleben der Tumorzelle ist [202].

Von Boehmer et al. zeigten, dass bei Patienten mit Prostatakarzinom eine CT10-Expression vorlag. CT10 konnte in 17% der Patienten nachgewiesen werden. War der Tumor auf das Organ beschränkt waren es 3,3%. Hinsichtlich der Prognose und des Outcomes der Patienten scheint es im Vergleich zu der PSA-Bestimmung Vorteile zu bieten. Mit Bestimmung des PSA-Wertes werden auch asymptomatische low-stage-Tumore gefunden, aber unbeantwortet bleibt weiterhin die Frage wie aggressiv diese Patienten behandelt werden müssen. CT10 korrelierte in dieser Studie jedoch mit der Malignität und zeigte sich als unabhängiger Marker, welcher als Basis für eine bessere Therapie sowie Prognose des Patienten dient. In unserer Analyse waren Serum F1, F15 und F25 von Patienten mit Prostatakarzinom. Bezüglich des Tumorstadiums lagen uns keine Informationen vor. Lediglich bei Serum F1 konnte eine Antikörperantwort gegen CT10 nachgewiesen werden. Jedoch konnten wir auch eine, wie von Boehmer et al. beschriebene, Co-Expression mit NY-ESO-1 feststellen [203]. Mit Ausnahme von Serum F30 lag bei einer Immunantwort gegen CT7 oder CT10 auch immer eine Immunantwort gegen NY-ESO-1 vor.

Aufgrund des Vorkommens erscheinen diese CT-Antigene als ein mögliches Ziel einer Tumormimmuntherapie und könnten bedeutsam für die Entwicklung von polyvalenten Impfstoffen sein.

4.5 Gleichzeitige Erkennung mehrerer CT-Antigene

Häufig werden bei einem Tumorpatienten mehrere CT-Antigene gefunden. In unserer Arbeit exprimierten 44% der Patienten mehr als ein Antigen. Bei einigen konnte sogar eine Antikörperantwort gegen mehr als vier CT-Antigene gefunden werden. Dies deckt sich mit zahlreichen Studien, bei denen eine Co-Expression von CT-Antigenen nachgewiesen wurde [204]. Es wurde gezeigt, dass die Expression von CT-Antigenen mit einer genomweiten Hypomethylierung assoziiert ist. Dies wiederum geht mit einem schnellen Fortschreiten der Tumoren einher. Es ist daher nicht verwunderlich, dass eine CT-Antigen-Expression mit niedrig-differenzierten Spätstadien und einem schlechten Outcome der Patienten verbunden ist [205]. Inwieweit dies bei unserem Patientenkollektiv der Fall war, wurde nicht untersucht.

Li et al. [200], Sahin et al. [206] und Scanlan et al. [207] konnten bei Untersuchungen von Patienten mit Malignem Melanom, Mammakarzinom und nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom ein gleichzeitiges Auftreten mehrerer CT-Antigene aufzeigen. Dieses Phänomen könnte mit einer Aktivierung der CT-Gene in Tumoren verbunden sein. Es ist aber auch möglich, dass die Aktivierung eines einzigen CT-Gens andere CT-Gene aktivieren kann [200;208]. Es ist denkbar, dass unter anderem die CT-Antigene CT7 und CT10 eine Gatekeeper-Funktion besitzen, so dass die Expression dieser CT-Antigene die Expression anderer CT-Antigene ermöglicht oder zumindest erleichtert [209]. Auch in unserer Versuchsreihe wurden bei dem Nachweis von Antikörper gegen eines der beiden CT-Antigene auch Antikörper gegen mindestens ein weiteres CT-Antigen gefunden. Weitere Untersuchungen sind jedoch notwendig, um zu klären, zu welchem Zeitpunkt eine Co-Expression auftritt, bzw. welche Faktoren diese beeinflussen. Diese Co-Expression von CT-Antigenen könnte die Grundlage für die Entwicklung eines polyvalenten Impfstoffes sein [206]. Gerade in Hinblick auf die Möglichkeit, dass bei einer effektiven Immunantwort gegen nur ein CT-Antigen die Gefahr bestünde, dass durch Mutationen im Tumorgenom Zellen entstehen, die das Antigen nicht mehr exprimieren und sich so der Immunantwort entziehen könnten. Um

die Wahrscheinlichkeit des Entkommens von Tumorzellen zu verringern, wäre eine effektive Immunantwort gegen mehrere verschiedene CT-Antigene sinnvoll.

4.6 Subklassen

Es existieren 4 Subklassen von humanem IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4). Im Serum von gesunden Erwachsenen verteilt sich die Konzentration der einzelnen Subklassen auf 65%, 25%, 6% und 4% der Gesamtkonzentration [210]. In der von uns durchgeführten Analyse ergab sich eine ähnliche Verteilung. IgG1 konnte in 49%, IgG2 in 28%, IgG3 in 13% und IgG4 in 10% nachgewiesen werden.

Die Rolle der einzelnen Subklassen im Rahmen einer Tumor-Immunantwort ist bisher noch nicht ausreichend geklärt. Zwischenzeitlich ist jedoch bekannt, dass durch Interaktion des Antikörpers mit dem Fc-Rezeptor auf den dendritischen Zellen eine wesentliche Steigerung der MHC-I-Klasse restringierten Kreuzpräsentation von Antigenen und ein dadurch resultierendes Cross-priming stattfindet [211]. Studien ergaben, dass bei Protein-Antigenen häufig eine IgG1- und IgG3-Antwort ausgelöst wird [212;213]. Der Immunkomplex, bestehend aus IgG1 oder IgG3 bindet dabei hauptsächlich an den Fc-gamma RIIa-Rezeptor [214;215], welcher an der Oberfläche von dendritischen Zellen, B-Lymphozyten und Makrophagen vorkommt.

Die von uns getesteten Seren zeigten fast alle eine IgG1-Antwort. Eine IgG3-Antwort blieb jedoch in den meisten Fällen aus. In Studien wurde gezeigt, dass IgG1 und IgG3 stärker in der Lage sind Phagozytose, ADCC und eine komplementabhängige Zytolyse zu vermitteln als die beiden anderen Subklassen, wobei IgG1 ein größeres Potential besitzt dies zu vermitteln, als IgG3 [216]. Aus diesem Grund werden humanisierte monoklonale IgG1-Antikörper in der Behandlung von Lymphomen (Rituximab) und Brustkrebs (Trastuzumab) verwendet. In einer Untersuchung von IgG-Subklassen auf rhCEA konnte gezeigt werden, dass IgG1 in der Lage ist Tumorzellen zu zerstören. IgG2 und IgG4 hingegen haben einen schwachen antitumorösen Effekt. Möglicherweise verhindern sie jedoch Zell-Zell-Kontakte und interferieren bei der Metastasierung [210]. Es gibt einige Studien, die die Induktion einer Subklassenantwort nach Vakzinierung mit Tumor-Antigenen untersucht haben. Bei Kolonkarzinom-Patienten konnte man eine Dominanz von IgG1, IgG2 und IgG4 gegen CEA feststellen [217]. In einer anderen

Studie wurde eine starke IgG1- und IgG3-Antwort gegen MUC1 bei Mammakarzinom-Patienten gezeigt. IgG2 hingegen konnte nur gering nachgewiesen werden [218].

Unsere Untersuchungen ergaben, dass einige Tumorpatienten keine IgG-Antikörper gegen die von uns getesteten CT-Antikörper bildeten. Biggar et al. konnten bei Subklassenanalysen bei Non-Hodgkin-Lymphom-Patienten aufzeigen, dass bei einem B-Zell-NHL ein genereller Immunglobulinverlust auftrat [155]. Man könnte hier einen molekularen Mechanismus vermuten, welcher zu diesem Immunglobulinmangel führt. In dem von uns durchgeführten Screening konnten bei Serum F22, bei dem es sich um ein Serum eines NHL-Patienten handelte, ebenfalls keine IgG-Immunglobuline nachgewiesen werden. Dies ist jedoch nur eine Einzelbeobachtung in dem von uns untersuchten Patientenkollektiv.

Um herauszufinden, welche Korrelationen zwischen den einzelnen Subklassen und den jeweiligen Antigenen bestehen, müssten weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

4.7 Fazit und Ausblick

Antigene, die serologisch erkannt werden, können als Tumormarker dienen, sofern Antikörper nur in Patienten, nicht aber in gesunden Kontrollpersonen nachgewiesen werden. Zumeist steht die Höhe der serologischen Reaktivität in direktem Zusammenhang mit der Eignung des Antigens, als Marker zu dienen. Die von uns untersuchten Cancer/Testis-Antigene erweisen sich hierbei als besonders geeignet. In den meisten Seren konnten Antikörper gegen CT-Antigene, unabhängig von dem zugrunde liegenden Tumor, detektiert werden. Antikörper gegen diese immunogenen Ziele stehen hierbei schon seit langem im Brennpunkt der Tumordiagnostik. Sie können im Serum nachgewiesen werden, sind hochspezifisch, haben eine lange Halbwertszeit und können schnell mit charakterisierten Sekundärreagenzien und validierbaren Methoden gemessen werden. Zudem sind Antikörper bereits im Serum amplifiziert, auch wenn nur geringe Mengen an einem immunogenen Protein vorhanden sind [219] und bevor sich der Tumor klinisch bemerkbar macht [220]. Dies kann zum Beispiel in unterschiedlichen Krankheitsstadien, in denen erst wenig Antigene exprimiert bzw. down-reguliert werden, von Vorteil für die weitere Diagnostik und Therapie sein. Chapman et al. konnten Daten von Patienten mit Mammakarzinom präsentieren, bei

denen Antikörper gegen TAA nachgewiesen werden konnten noch bevor der Tumor in der Mammographie zur Darstellung kam [221].

Wenn ein Antikörper gegen ein Tumorantigen durch das RAYS detektiert wird, ist eine immunologische Relevanz der Antigene vermutlich vorhanden, da es hohe Antikörpertiter voraussetzt. Ein hoher Titer an spezifischen Antikörpern setzt wiederum die Hilfe von CD4⁺ T-Zellen voraus. RAYS spiegelt demnach auch das CD4⁺ T-Zell-Repertoire der Tumorerkrankung wieder und diese führen zu einer verstärkten CD8⁺ T-Zell-Antwort.

Gerade in Hinblick auf das Ziel, das Immunsystem so zu aktivieren oder zu stärken, dass es einen Tumor effektiv bekämpfen kann, sind diese Erkenntnisse von außerordentlichem Interesse. Mit dem immer besser werdenden Verständnis für Tumorerkrankungen wurden im Laufe der Jahre verschiedene Therapiekonzepte erarbeitet. Eine der aktuell vielversprechendsten Immuntherapien stellen die Checkpoint-Inhibitoren dar. Als Zielstrukturen werden derzeit "cytotoxic T-lymphocyte antigen 4" (CTLA-4) und "programmed death 1" (PD-1) therapeutisch genutzt. Nachdem das Antigen durch den T-Zell-Rezeptor erkannt wird, kommt es zu mehreren Interaktionen mit kostimulatorischen Molekülen und somit zur Aktivierung der T-Zelle. Damit es jedoch nicht zu einer überschießenden Reaktion kommt, werden unter anderem CTLA-4 und PD-1 hochreguliert und somit die T-Zell-Aktivität vermindert. Um nun diese "Bremse" wieder zu lösen, wurden spezifische Antikörper entwickelt: die sogenannten Checkpoint-Inhibitoren. Diese vermindern die Blockade tumorreaktiver T-Zellen und stellen somit die Fähigkeit, Tumorzellen zu attackieren, wieder her. Der erste Checkpoint-Inhibitor war der mAK Ipilimumab, welcher an CTLA-4 bindet und auf diese Weise antitumorale Effekte aktiviert. Ipilimumab wurde 2013 für die Erstlinienbehandlung von Melanomen zugelassen. Gegen den Checkpointrezeptor PD-1 bzw. seinen Liganden PD-1L wurden bereits mehrere mAK entwickelt. Am weitesten fortgeschritten sind hier Pembrolizumab und Nivolumab, die 2014 von der FDA zur Behandlung von Melanompatienten zugelassen wurden. Inzwischen haben beide mAK bei verschiedenen Tumorentitäten ihre Wirksamkeit belegt und damit die Zulassung erhalten. Um den Effekt noch zu verstärken wurden bereits in zahlreichen Studien erfolgreich Kombinationen aus verschiedenen Checkpoint-Inhibitoren Tumorpatienten verabreicht. Die Studienergebnisse für das Maligne Melanom zeigten hohe Responsraten von teilweise über 30% und eine Überlebensver-

längerung [222;223;224;225;226]. Im Gegensatz zu einer Vakzinierung mit tumorspezifischen Antigenen ist eine Checkpoint-Inhibition nicht tumorspezifisch. Sie können jedoch zelluläre und humorale tumorspezifische Immunantworten verstärken oder auslösen. Dies könnte man sich zu nutzen machen und zunächst durch das beschriebene Hefeexpressionssystem eine tumorspezifische Immunantwort gegen ein CT-Antigen (zum Beispiel NY-ESO-1) durch Vakzinierung auslösen und diese dann durch Checkpoint-Inhibitoren verstärken. Wadle et al. konnten aufzeigen, dass das Hefeexpressionssystem mit *Saccharomyces cerevisiae* genutzt werden kann, um Tumorzellen zu generieren [227]. Das auf der Hefeoberfläche präsentierte NY-ESO-1 konnte eine gleichzeitige CD4⁺-, CD8⁺- sowie B-Zell-Antwort hervorrufen. Nach "Abschaltung" der immunsupprimierenden Wirkung durch die Checkpoint-Inhibitoren wäre das Immunsystem in der Lage, den Tumor besser zu bekämpfen und vielleicht sogar zu besiegen. Durch die zusätzliche Gabe von Toll-like-Rezeptoragonisten (z.B. Resiquimod) oder der Gabe von DNA-Methyltransferaseinhibitoren (DNMT) wie z.B. 5-Aza-2'-Deoxycytidine könnte man diese Immunantwort noch verstärken [228]. Für DNMT wurde eine Hochregulierung einer CT-Antigen-Expression und einer damit verbundenen Immunantwort auf das Antigen beschrieben. Allerdings sind DNMT mit Vorsicht einzusetzen, da schädliche Effekte wie Verstärkung einer Epithelial-mesenchymalen Transition (EMT), welche eine Metastasierung unterstützt, beschrieben wurde [229].

Dos Santos et al. zeigten, dass die Verabreichung eines CTLA-4-Inhibitors während einer Vakzinierung mit einem *Trypanosoma cruzi*- Expressionssystem, welches NY-ESO-1 exprimiert, die Frequenz von NY-ESO-1 spezifischen CD8⁺-Zellen erhöhen können [230]. Unklar ist jedoch zum jetzigen Zeitpunkt, warum Checkpoint-Inhibitoren nicht bei jedem Patienten helfen. Wahrscheinlich spielt hierbei die unterschiedliche Immunogenität der verschiedenen Tumorentitäten eine Rolle. Es konnte beobachtet werden, dass der "Antitumoreffekt" von CTLA-4 bei Patienten am größten war, wenn schon eine Immunantwort gegen NY-ESO bestand oder induziert wurde [231]. Das RAYS könnte hierbei zusätzliche wichtige Informationen liefern, ob ein Tumor für eine entsprechende Therapie zugänglich ist. Wird eine Immunantwort durch die RAYS-Technologie erkannt, ist es sehr wahrscheinlich, dass ein "Booster-Effekt" nach Gabe von Checkpoint-Inhibitoren eintritt.

Als ein weiterer interessanter Ansatzpunkt eine derartige Vakzinierungstherapie zu verstärken, bestünde in Vakzinierungsstrategien mit sogenannten genetischen Vakzinen (DNA-, RNA-, virusbasiert). Hierdurch und durch Präsentation des Tumorantigens im Kontext mit MHC I- und MHC II- Molekülen wird eine Immunantwort gegen die Tumorzellen ausgelöst [232]. Zur Zeit wird eine virusbasierte Vakzine (Rilimogene galvacirepvec/ PROSTVAC) gegen das fortgeschrittene Prostatakarzinom in einer Phase-III-Studie untersucht. Ein genetisch aufbereitetes Virus (Fowlpox), welches PSA und drei kostimulierende Proteine (TRICOM = LFA-3, ICAM und B7.1) kodiert, wird dem Patienten subcutan verabreicht. Dann infiziert die PSA-TRICOM-Vakzine antigenpräsentierende Zellen und generiert Proteine, die an der Zelloberfläche der APC exprimiert werden und so eine Immunantwort auslösen können [233]. In einer prospektiv randomisierten klinischen Phase-II-Studie fand sich eine deutliche Verbesserung des Gesamtüberlebens von 25,1 im Vakzinierungsarm versus 16,6 Monaten im Kontrollarm [234]. In einer Phase-II-Studie wurden Vakzinierungen mit Hilfe eines rekombinaten Poxvirus, welches NY-ESO kodiert, durchgeführt. Untersucht wurden Melanompatienten sowie Patientinnen mit Ovarialkarzinom. Es konnte aufgezeigt werden, dass das Immunsystem der Patienten eine integrierte Immunantwort, bestehend aus NY-ESO-spezifischen Antikörpern, CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen entwickelten. Das Gesamtüberleben konnte hierbei deutlich verbessert werden [235]. Wie sich in unseren Versuchen gezeigt hat, eignet sich das RAYS, um eine integrierte Immunantwort, insbesondere der Antikörperantwort, zu untersuchen. Es wäre somit auch geeignet, eine derartige Vakzinierungstherapie zu überwachen und ein Therapieansprechen oder -versagen aufzuzeigen.

In den letzten Jahren haben eine Reihe von immuntherapeutischen Strategien eindrucksvolle Resultate in der Behandlung von Tumorpatienten gezeigt. Jedoch haben viele Studien enttäuschende Ergebnisse im Erreichen ihrer Endpunkte (Gesamtüberleben und progressionsfreies Überleben) gebracht [236], so dass nach weiteren Strategien gesucht werden muss, um ein besseres Ansprechen des Immunsystems im Kampf gegen den Krebs zu ermöglichen. Die Anwendung von verschiedenen oder kombinierten Tumormimmuntherapien erfordert hierbei ein Monitoring und Messen spezifischer Moleküle, um die beste Therapie für einen Patienten festlegen zu können. Die dabei von uns verwendete RAYS-Methode könnte hierzu einen wichtigen Beitrag leisten.

5 Literaturverzeichnis

- [1] U.N. Riede, O.D. Wiestler, Hj. Müller Autonomes Zellwachstum Tumorpathologie. Thieme (2001) 344.
- [2] B. Vogelstein, K.W. Kinzler, The multistep nature of cancer. Trends Genet. 9 (1993) 138-141.
- [3] D. Hanahan, R.A. Weinberg, Hallmarks of cancer: the next generation. Cell 144 (2011) 646–674.
- [4] E.R. Fearon, B. Vogelstein, A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell 61 (1990) 759-767.
- [5] P.C. Nowell, The clonal evolution of tumor cell populations. Science 194 (1976) 23-28.
- [6] R.A. Weinberg, Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis. Cancer Res. 49 (1989) 3713-3721.
- [7] J.M. Bishop, The molecular genetics of cancer. Science 235 (1987) 305-311.
- [8] C.M. Croce, Chromosome translocations and human cancer. Cancer Res. 46 (1986) 6019-6023.
- [9] M.F. Hansen, W.K. Cavenee, Genetics of cancer predisposition. Cancer Res. 47 (1987) 5518-5527.
- [10] A.G. Knudson, Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes. Cancer Res. 45 (1985) 1437-1443.
- [11] A.L. Murphree, W.F. Benedict, Retinoblastoma: clues to human oncogenesis. Science 223 (1984) 1028-1033.
- [12] T. Muto, H.J.R. Bussey, B.C. Morson, The evolution of cancer of the colon and rectum. Cancer Res. 36 (1975) 2251-2270.
- [13] A.C. Williams, S.J. Harper, C. Paraskeva, Neoplastic transformation of human colonic epithelial cell line: in vitro evidence for the adenoma to carcinoma sequence. Cancer Res. 50 (1990) 4724-4730.
- [14] T. Fukushima, S. Takenoshita, Colorectal carcinogenesis. Fukushima J.Med.Sci. 47 (2001) 1-11.
- [15] S. Ohki, M. Onda, T. Nomizu, A. Tsuchiya, H. Ami, T. Fukushima, K. Takita, M. Kanazawa, F. Watanabe, Y. Andoh, T. Yoshida, R. Abe, K-ras gene

- mutations in adenomas from familial adenomatous polyposis. *Gan To Kagaku Ryoho* 23 Suppl 2 (1996) 154-158.
- [16] M. Onda, R. Abe, A. Tsuchiya, T. Fukushima, Y. Ando, T. Yoshida, K-ras and p53 gene mutations in colorectal cancer in 57 Japanese patients. *Fukushima J.Med.Sci.* 43 (1997) 29-39.
- [17] I. Penn, Tumors of the immunocompromised patient. *Annu.Rev.Med.* 39 (1988) 63-73.
- [18] V. Shankaran, H. Ikeda, A.T. Bruce, J.M. White, P.E. Swanson, L.J. Old, R.D. Schreiber, IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410 (2001) 1107-1111.
- [19] J. Trowsdale, Genomic structure and function in the MHC. *Trends Genet.* 9 (1993) 117-122.
- [20] S.C. Knight, A.J. Stagg, Antigen-presenting cell types. *Curr.Opin.Immunol.* 5 (1993) 374-382.
- [21] J. Banchereau, R.M. Steinman, Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392 (1998) 245-252.
- [22] A. Lanzavecchia, F. Sallusto, Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cells. *Science* 290 (2000) 92-97.
- [23] A. Lanzavecchia, F. Sallusto, Antigen decoding by T lymphocytes: from synapses to fate determination. *Nat.Immunol.* 2 (2001) 487-492.
- [24] M.J. Smyth, D.I. Godfrey, J.A. Trapani, A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat.Immunol.* 2 (2001) 293-299.
- [25] M.J. Smyth, J.A. Trapani, Lymphocyte-mediated immunosurveillance of epithelial cancers. *Trends Immunol.* 22 (2001) 409-411.
- [26] R.M. Steinman, K. Inaba, S. Turley, P. Pierre, I. Mellman, Antigen capture, processing, and presentation by dendritic cells: recent cell biological studies. *Hum.Immunol.* 60 (1999) 562-567.
- [27] J.A. Villadangos, W.R. Heath, F.R. Carbone, Outside looking in: the inner workings of the cross-presentation pathway within dendritic cells. *Trends Immunol.* 28 (2007) 45-47.
- [28] D.J. Lenschow, K.C. Herold, L. Rhee, B. Patel, A. Koons, H.Y. Qin, E. Fuchs, B. Singh, C.B. Thompson, J.A. Bluestone, CD28/B7 regulation of Th1 and Th2

- subsets in the development of autoimmune diabetes. *Immunity*. 5 (1996) 285-293.
- [29] D.J. Lenschow, T.L. Walunas, J.A. Bluestone, CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu.Rev.Immunol.* 14 (1996) 233-258.
- [30] A.H. Sharpe, G.J. Freeman, The B7-CD28 superfamily. *Nat.Rev.Immunol.* 2 (2002) 116-126.
- [31] G. Zetler, E. Lenschow, W. Prenger-Berninghoff, Action of 11 indole alkaloids on the guinea pig heart in vivo and in vitro, compared with those of 2 synthetic azepinoindoles, quinidine and quindonium. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Exp.Pathol.Pharmakol.* 260 (1968) 26-49.
- [32] R.J. Greenwald, G.J. Freeman, A.H. Sharpe, The B7 family revisited. *Annu.Rev.Immunol.* 23 (2005) 515-548.
- [33] P.S. Linsley, J. Bradshaw, M. Urnes, L. Grosmaire, J.A. Ledbetter, CD28 engagement by B7/BB-1 induces transient down-regulation of CD28 synthesis and prolonged unresponsiveness to CD28 signaling. *J.Immunol.* 150 (1993) 3161-3169.
- [34] B. Salomon, J.A. Bluestone, Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation. *Annu.Rev.Immunol.* 19 (2001) 225-252.
- [35] B. Salomon, L. Rhee, H. Bour-Jordan, H. Hsin, A. Montag, B. Soliven, J. Arcella, A.M. Girvin, J. Padilla, S.D. Miller, J.A. Bluestone, Development of spontaneous autoimmune peripheral polyneuropathy in B7-2-deficient NOD mice. *J.Exp.Med.* 194 (2001) 677-684.
- [36] T.L. Walunas, D.J. Lenschow, C.Y. Bakker, P.S. Linsley, G.J. Freeman, J.M. Green, C.B. Thompson, J.A. Bluestone, CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity*. 1 (1994) 405-413.
- [37] S.L. Swain, T cell subsets and the recognition of MHC class. *Immunol.Rev.* 74 (1983) 129-142.
- [38] M.M. Davis, J.J. Boniface, Z. Reich, D. Lyons, J. Hampl, B. Arden, Y. Chien, Ligand recognition by alpha beta T cell receptors. *Annu.Rev.Immunol.* 16 (1998) 523-544.
- [39] S.J. Turley, Dendritic cells: inciting and inhibiting autoimmunity. *Curr.Opin.Immunol.* 14 (2002) 765-770.

- [40] S.J. Turley, K. Inaba, W.S. Garrett, M. Ebersold, J. Untermaier, R.M. Steinman, I. Mellman, Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells. *Science* 288 (2000) 522-527.
- [41] A. Zippelius, A. Knights, M. Tinguely, D. Jäger, C. Renner, A. Knuth, Identifizierung von Tumorantigenen: Strategien und Perspektiven. *Dtsch Med Wochenschr* 131 (2006) 1809-1812.
- [42] M. Moser, K.M. Murphy, Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. *Nat.Immunol.* 1 (2000) 199-205.
- [43] R.A. Seder, Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4⁺ T cells. *J.Allergy Clin.Immunol.* 94 (1994) 1195-1202.
- [44] C.N. Baxevanis, I.F. Voutsas, O.E. Tsitsilonis, A.D. Gritzapis, R. Sotiriadou, M. Papamichail, Tumor-specific CD4⁺ T lymphocytes from cancer patients are required for optimal induction of cytotoxic T cells against the autologous tumor. *J.Immunol.* 164 (2000) 3902-3912.
- [45] K. Hung, R. Hayashi, A. Lafond-Walker, C. Lowenstein, D. Pardoll, H. Levitsky, The central role of CD4⁺ T cells in the antitumor immune response. *J.Exp.Med.* 188 (1998) 2357-2368.
- [46] R.E. Toes, F. Ossendorp, R. Offringa, C.J. Melief, CD4⁺ T cells and their role in antitumor immune responses. *J.Exp.Med.* 189 (1999) 753-756.
- [47] D. Valmori, F. Qian, M. Ayyoub, C. Renner, A. Merlo, S. Gnjatich, E. Stockert, D. Driscoll, S. Lele, L.J. Old, K. Odunsi, Expression of synovial sarcoma X (SSX) antigens in epithelial ovarian cancer and identification of SSX-4 epitopes recognized by CD4⁺ T cells. *Clin.Cancer Res.* 12 (2006) 398-404.
- [48] R.F. Wang, The role of MHC class II-restricted tumor antigens and CD4⁺ T cells in antitumor immunity. *Trends Immunol.* 22 (2001) 269-276.
- [49] D.J. Shedlock, H. Shen, Requirement for CD4⁺ T cell help in generating functional CD8⁺ T cell memory. *Science* 300 (2003) 337-339.
- [50] C.M. Smith, N.S. Wilson, J. Waithman, J.A. Villadangos, F.R. Carbone, W.R. Heath, G.T. Belz, Cognate CD4⁺ T cell licensing of dendritic cells in CD8⁺ T cell immunity. *Nat.Immunol.* 5 (2004) 1143-1148.
- [51] J.C. Sun, M.J. Bevan, Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science* 300 (2003) 339-342.

- [52] F. Pages, A. Berger, M. Camus, F. Sanchez-Cabo, A. Costes, R. Molitor, B. Mlecnik, A. Kirilovsky, M. Nilsson, D. Damotte, T. Meatchi, P. Bruneval, P.H. Cugnenc, Z. Trajanoski, W.H. Fridman, J. Galon, Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N.Engl.J.Med.* 353 (2005) 2654-2666.
- [53] M. Kronenberg, A. Rudensky, Regulation of immunity by self-reactive T cells. *Nature* 435 (2005) 598-604.
- [54] M. Murakami, A. Sakamoto, J. Bender, J. Kappler, P. Marrack, CD25⁺CD4⁺ T cells contribute to the control of memory CD8⁺ T cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99 (2002) 8832-8837.
- [55] S. Suvas, U. Kumaraguru, C.D. Pack, S. Lee, B.T. Rouse, CD4⁺CD25⁺ T cells regulate virus-specific primary and memory CD8⁺ T cell responses. *J.Exp.Med.* 198 (2003) 889-901.
- [56] Le, T. Dung, Elizabeth M. Jaffee, Regulatory T Cell Modulation Using Cyclophosphamide in Vaccine Approaches: A Current Perspective. *Cancer Research* (2012) 3439–3444.
- [57] Nan Liu, Yijie Zheng, Ying Zhu, Shudao Xiong, Yiwei Chu, Selective Impairment of CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Regulatory T cells by paclitaxel is explained by Bcl-2/Bax mediated apoptosis. *International Immunopharmacology* (2011) 212-219.
- [58] G.M. Edelman, Antibody structure and molecular immunology. *Scand.J.Immunol.* 34 (1991) 1-22.
- [59] R.R. Porter, Lecture for the Nobel Prize for physiology or medicine 1972: Structural studies of immunoglobulins. 1972. *Scand.J.Immunol.* 34 (1991) 381-389.
- [60] Y. Yamaguchi, H. Kim, K. Kato, K. Masuda, I. Shimada, Y. Arata, Proteolytic fragmentation with high specificity of mouse immunoglobulin G. Mapping of proteolytic cleavage sites in the hinge region. *J.Immunol.Methods* 181 (1995) 259-267.
- [61] W. Han, J. Mou, J. Sheng, J. Yang, Z. Shao, Cryo atomic force microscopy: a new approach for biological imaging at high resolution. *Biochemistry* 34 (1995) 8215-8220.

- [62] R.J. Poljak, Structure of antibodies and their complexes with antigens. *Mol.Immunol.* 28 (1991) 1341-1345.
- [63] M.G. Sensel, L.M. Kane, S.L. Morrison, Amino acid differences in the N-terminus of C(H)2 influence the relative abilities of IgG2 and IgG3 to activate complement. *Mol.Immunol.* 34 (1997) 1019-1029.
- [64] D.R. Davies, H. Metzger, Structural basis of antibody function. *Annu.Rev.Immunol.* 1 (1983) 87-117.
- [65] D.R. Burton, L. Gregory, R. Jefferis, Aspects of the molecular structure of IgG subclasses. *Monogr Allergy* 19 (1986) 7-35.
- [66] R. Jefferis, J. Pound, J. Lund, M. Goodall, Effector mechanisms activated by human IgG subclass antibodies: clinical and molecular aspects. Review article. *Ann.Biol.Clin.(Paris)* 52 (1994) 57-65.
- [67] Y.M. Lucisano Valim, P.J. Lachmann, The effect of antibody isotype and antigenic epitope density on the complement-fixing activity of immune complexes: a systematic study using chimaeric anti-NIP antibodies with human Fc regions. *Clin.Exp.Immunol.* 84 (1991) 1-8.
- [68] G.A. Maguire, D.S. Kumararatne, H.J. Joyce, Are there any clinical indications for measuring IgG subclasses? *Ann.Clin.Biochem.* 39 (2002) 374-377.
- [69] D.G. Schatz, M.A. Oettinger, M.S. Schlissel, V(D)J recombination: molecular biology and regulation. *Annu.Rev.Immunol.* 10 (1992) 359-383.
- [70] R.R. Hardy, C.E. Carmack, S.A. Shinton, J.D. Kemp, K. Hayakawa, Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow. *J.Exp.Med.* 173 (1991) 1213-1225.
- [71] B.L. Kee, C.J. Paige, Murine B cell development: commitment and progression from multipotential progenitors to mature B lymphocytes. *Int.Rev.Cytol.* 157 (1995) 129-179.
- [72] N. Rosenberg, P.W. Kincade, B-lineage differentiation in normal and transformed cells and the microenvironment that supports it. *Curr.Opin.Immunol.* 6 (1994) 203-211.
- [73] A.G. Rolink, F. Melchers, J. Andersson, The transition from immature to mature B cells. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 246 (1999) 39-43.
- [74] J.J. Mond, Q. Vos, A. Lees, C.M. Snapper, T cell independent antigens. *Curr.Opin.Immunol.* 7 (1995) 349-354.

- [75] D.C. Parker, T cell-dependent B cell activation. *Annu.Rev.Immunol.* 11 (1993) 331-360.
- [76] A.J. van den Eertwegh, R.J. Noelle, M. Roy, D.M. Shepherd, A. Aruffo, J.A. Ledbetter, W.J. Boersma, E. Claassen, In vivo CD40-gp39 interactions are essential for thymus-dependent humoral immunity. I. In vivo expression of CD40 ligand, cytokines, and antibody production delineates sites of cognate T-B cell interactions. *J.Exp.Med.* 178 (1993) 1555-1565.
- [77] K. Rajewsky, Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* 381 (1996) 751-758.
- [78] R.A. Manz, A. Thiel, A. Radbruch, Lifetime of plasma cells in the bone marrow. *Nature* 388 (1997) 133-134.
- [79] A.J. Tilzey, Hepatitis B vaccine boosting: the debate continues. *Lancet* 345 (1995) 1000-1001.
- [80] R.B. Wainwright, B.J. McMahon, L.R. Bulkow, A.J. Parkinson, A.P. Harpster, Protection provided by hepatitis B vaccine in a Yupik Eskimo population. Seven-year results. *Arch.Intern.Med.* 151 (1991) 1634-1636.
- [81] E. Jager, Y.T. Chen, J.W. Drijfhout, J. Karbach, M. Ringhoffer, D. Jager, M. Arand, H. Wada, Y. Noguchi, E. Stockert, L.J. Old, A. Knuth, Simultaneous humoral and cellular immune response against cancer-testis antigen NY-ESO-1: definition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2-binding peptide epitopes. *J.Exp.Med.* 187 (1998) 265-270.
- [82] G. Kohler, C. Milstein, Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256 (1975) 495-497.
- [83] Villadolid, Jeryl, Asim Amin, Immune Checkpoint Inhibitors in Clinical Practice: Update on Management of Immune-Related Toxicities. *Translational Lung Cancer Research* (2015) 560-575.
- [84] T.K. Burki, Blinatumomab significantly improves overall survival. *Lancet Oncol.* (2017) 1470-2045.
- [85] M.S. Topp, N. Gokbuget, A.S. Stein et al, Safety and activity of blinatumomab for adult patients with relapsed or refractory B-precursor acute lymphoblastic leukaemia: a multicentre, single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol* 16 (2014) 57-66.

- [86] M. Goldenberg, The role of radiolabeled antibodies in the treatment of non-Hodgkin's lymphoma: the coming of age of radioimmunotherapy. *Crit.Rev.Oncol.Hematol.* 39 (2001) 195-201.
- [87] A.W. Tolcher, S. Sugarman, K.A. Gelmon, R. Cohen, M. Saleh, C. Isaacs, L. Young, D. Healey, N. Onetto, W. Slichenmyer, Randomized phase II study of BR96-doxorubicin conjugate in patients with metastatic breast cancer. *J.Clin.Oncol.* 17 (1999) 478-484.
- [88] M. Sznol, J. Holmlund, Antigen-specific agents in development. *Semin.Oncol.* 24 (1997) 173-186.
- [89] F. Morschhauser, J. Radford, A. Van Hoof, B. Botto, A.Z. Rohatiner, G.Salles, P. Soubeyran, H. Tilly, A. Bischof-Delaloye, W.L. van Putten, J.W. Klystra, A. Hagenbeek, ⁹⁰Yttrium-ibritumomab tiuxetan consolidation of first remission in advanced-stage follicular non-Hodgkin lymphoma: updated results after a median follow-up of 7.3 years from the International, Randomized, Phase III First-Line Indolent trial. *J Clin Oncol.* (2013) 1977-83.
- [90] H.E. Heslop, K.S. Slobod, M.A. Pule et al., Long-term outcome of EBV-specific T-cell infusions to prevent or treat EBV-related lymphoproliferative disease in transplant recipients. *Blood* 115 (2010) 925–9352.
- [91] S.A. Rosenberg, M.E. Dudley, Cancer regression in patients with metastatic melanoma after the transfer of autologous antitumor lymphocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101 Suppl 2 (2004) 14639-14645.
- [92] K.L. Knutson, W. Wagner, M.L. Disis, Adoptive T cell therapy of solid cancers. *Cancer Immunol.Immunother.* 55 (2006) 96-103.
- [93] N. Singh, I Kulikovskaya, D.M. Barrett, T cells targeting NY-ESO-1 demonstrate efficacy against disseminated neuroblastoma. *Oncoimmunology* (2016) e1040216.
- [94] X.S. Zhong, M. Matsushita, J. Plotkin, I. Riviere, M. Sadelain, Chimeric antigen receptors combining 4-1BB and CD28 signaling domains augment PI3kinase/AKT/Bcl-XL activation and CD8⁺ T cell-mediated tumor eradication. *Mol Ther* 18 (2010) 413-420.
- [95] C.P. Duong, C.S. Yong, M.H. Kershaw, C.Y. Slaney, P.K. Darcy, Cancer immunotherapy utilizing gene-modified T cells: From the bench to the clinic. *Immunol.* (2015) 46-57.

- [96] S.L. Maude, N. Frey, P.A. Shaw et al, Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N Engl J Med* (2014) 1507–1517.
- [97] C.U. Louis, B. Savoldo, G. Dotti et al, Antitumor activity and long-term fate of chimeric antigen receptor-positive T cells in patients with neuroblastoma. *Blood* 118 (2011) 6050–6056.
- [98] C. Renner, F. Hartmann, M. Pfreundschuh, Immuntherapeutische Strategien zur Behandlung solider Tumoren. *Deutsches Ärzteblatt* 19 (2002) A-850/B-704/C-658.
- [99] L.H. Butterfield, Cancer vaccines. *The BMJ* (2015).
- [100] J.S. Weber, Current perspectives on immunotherapy. *Semin Oncol* 41(Suppl 5) (2014) 14-29.
- [101] W.W. Overwijk, D.S. Lee, D.R. Surman, K.R. Irvine, C.E. Touloukian, C.C. Chan, M.W. Carroll, B. Moss, S.A. Rosenberg, N.P. Restifo, Vaccination with a recombinant vaccinia virus encoding a "self" antigen induces autoimmune vitiligo and tumor cell destruction in mice: requirement for CD4⁺ T lymphocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96 (1999) 2982-2987.
- [102] X. Ye, J. McCarrick, L. Jewett, B.B. Knowles, Timely immunization subverts the development of peripheral nonresponsiveness and suppresses tumor development in simian virus 40 tumor antigen-transgenic mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91 (1994) 3916-3920.
- [103] A. Anichini, C. Vegetti, R. Mortarini, The paradox of T-cell-mediated antitumor immunity in spite of poor clinical outcome in human melanoma. *Cancer Immunol.Immunother.* 53 (2004) 855-864.
- [104] P.G. Coulie, H. Ikeda, J.F. Baurain, R. Chiari, Antitumor immunity at work in a melanoma patient. *Adv.Cancer Res.* 76 (1999) 213-242.
- [105] Y. Kawakami, N. Dang, X. Wang, J. Tupesis, P.F. Robbins, R.F. Wang, J.R. Wunderlich, J.R. Yannelli, S.A. Rosenberg, Recognition of shared melanoma antigens in association with major HLA-A alleles by tumor infiltrating T lymphocytes from 123 patients with melanoma. *J.Immunother.* 23 (2000) 17-27.
- [106] F.M. Marincola, The multiple ways to tumor tolerance. *J.Immunother.* 20 (1997) 178-179.
- [107] L.D. Bergelson, Gangliosides and antitumor immunity. *clin.Investig.* 71 (2006) 590-594.

- [108] H. Nakagomi, M. Petersson, I. Magnusson, C. Huhlin, M. Matsuda, H. Mellstedt, J.L. Taupin, E. Vivier, P. Anderson, R. Kiessling, Decreased expression of the signal-transducing zeta chains in tumorinfiltrating T-cells and NK-cells of patients with colorectal carcinoma. *Cancer Res.* 53 (1993) 5610-5612.
- [109] M. Yagita, A. Seppo, O. Renkonen, E. Saksella, Deacetylase activity of human tumor cells producing immunosuppressive aminosugars: its possible role in resistance to cell-mediated cytotoxicity. *Cancer Res.* 53 (1993) 5600-5604.
- [110] C. Traversari, B.P. van der, E.B. Van den, P. Hainaut, C. Lemoine, N. Ohta, L. Old, T. Boon, Transfection and expression of a gene coding for a human melanoma antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes. *Immunogenetics* 35 (1992) 145-152.
- [111] B.P. van der, C. Traversari, P. Chomez, C. Lurquin, P.E. De, E.B. Van den, A. Knuth, T. Boon, A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254 (1991) 1643-1647.
- [112] P. van der Bruggen, Y. Zhang, P. Chaux, V. Stroobant, C. Panichelli, E.S. Schultz, J. Chapiro, B.J. Van den Eynde, F. Brasseur, T. Boon, Tumor-specific shared antigenic peptides recognized by human T cells. *Immunol.Rev.* 188 (2002) 51-64.
- [113] T. Boon, P. van der Bruggen, Human tumor antigens recognized by T lymphocytes. *J.Exp.Med.* 183 (1996) 725-729.
- [114] P. Boel, C. Wildmann, M.L. Sensi, R. Brasseur, J.C. Renauld, P. Coulie, T. Boon, P. van der Bruggen, BAGE: a new gene encoding an antigen recognized on human melanomas by cytolytic T lymphocytes. *Immunity.* 2 (1995) 167-175.
- [115] B.J. Van den Eynde, T. Boon, Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Int.J.Clin.Lab Res.* 27 (1997) 81-86.
- [116] M.J. Scanlan, A.O. Gure, A.A. Jungbluth, L.J. Old, Y.T. Chen, Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy. *Immunol.Rev.* 188 (2002) 22-32.
- [117] U. Sahin, O. Tureci, H. Schmitt, B. Cochlovius, T. Johannes, R. Schmits, F. Stenner, G. Luo, I. Schobert, M. Pfreundschuh, Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92 (1995) 11810-11813.

- [118] M.L. Disis, E. Calenoff, G. McLaughlin, A.E. Murphy, W. Chen, B. Groner, M. Jeschke, N. Lydon, E. McGlynn, R.B. Livingston, Existent T-cell and antibody immunity to HER2/neu protein in patients with breast cancer. *Cancer Res.* 54 (1994) 16-20.
- [119] Y.T. Chen, M.J. Scanlan, U. Sahin, O. Tureci, A.O. Gure, S. Tsang, B. Williamson, E. Stockert, M. Pfreundschuh, L.J. Old, A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94 (1997) 1914-1918.
- [120] R.F. Wang, X. Wang, S.L. Johnston, G. Zeng, P.F. Robbins, S.A. Rosenberg, Development of a retrovirus-based complementary DNA expression system for the cloning of tumor antigens. *Cancer Res.* 58 (1998) 3519-3525.
- [121] K.D. Preuss, C. Zwick, C. Bormann, F. Neumann, M. Pfreundschuh, Analysis of the B-cell repertoire against antigens expressed by human neoplasms. *Immunol.Rev.* 188 (2002) 43-50.
- [122] H.A. Doyle, M.J. Mamula, Post-translational protein modifications in antigen recognition and autoimmunity. *Trends Immunol.* 22 (2001) 443-449.
- [123] L. Stoltze, M. Schirle, G. Schwarz, C. Schroter, M.W. Thompson, L.B. Hersh, H. Kalbacher, S. Stevanovic, H.G. Rammensee, H. Schild, Two new proteases in the MHC class I processing pathway. *Nat.Immunol.* 1 (2000) 413-418.
- [124] E.T. Boder, K.D. Wittrup, Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. *Nat.Biotechnol.* 15 (1997) 553-557.
- [125] E.T. Boder, K.D. Wittrup, Yeast surface display for directed evolution of protein expression, affinity, and stability. *Methods Enzymol.* 328 (2000) 430-444.
- [126] E.T. Boder, K.S. Midelfort, K.D. Wittrup, Directed evolution of antibody fragments with monovalent femtomolar antigen-binding affinity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97 (2000) 10701-10705.
- [127] E.V. Shusta, P.D. Holler, M.C. Kieke, D.M. Kranz, K.D. Wittrup, Directed evolution of a stable scaffold for T-cell receptor engineering. *Nat.Biotechnol.* 18 (2000) 754-759.
- [128] A. Wadle, A. Mischo, L. Old, M. Pfreundschuh, C. Renner, Serological identification of breast cancer-related antigens from a *Saccharomyces cerevisiae* surface display library. *Int.J.Cancer* 117 (2005) 104-113.

- [129] P.S. Daugherty, B.L. Iverson, G. Georgiou, Flow cytometric screening of cell-based libraries. *J.Immunol.Methods* 243 (2000) 211-227.
- [130] J.J. VanAntwerp, K.D. Wittrup, Fine affinity discrimination by yeast surface display and flow cytometry. *Biotechnol.Prog.* 16 (2000) 31-37.
- [131] Y.A. Yeung, K.D. Wittrup, Quantitative screening of yeast surface-displayed polypeptide libraries by magnetic bead capture. *Biotechnol.Prog.* 18 (2002) 212-220.
- [132] R.F. Wang, Human tumor antigens: implications for cancer vaccine development. *J.Mol.Med.* 77 (1999) 640-655.
- [133] R.F. Wang, S.A. Rosenberg, Human tumor antigens for cancer vaccine development. *Immunol.Rev.* 170 (1999) 85-100.
- [134] N. Renkvist, C. Castelli, P.F. Robbins, G. Parmiani, A listing of human tumor antigens recognized by T cells. *Cancer Immunol.Immunother.* 50 (2001) 3-15.
- [135] L.J. Old, Y.T. Chen, New paths in human cancer serology. *J.Exp.Med.* 187 (1998) 1163-1167.
- [136] M.J. Scanlan, Y.T. Chen, B. Williamson, A.O. Gure, E. Stockert, J.D. Gordan, O. Tureci, U. Sahin, M. Pfreundschuh, L.J. Old, Characterization of human colon cancer antigens recognized by autologous antibodies. *Int.J.Cancer* 76 (1998) 652-658.
- [137] M.V. Dhodapkar, K. Osman, J. Teruya-Feldstein, D. Filippa, C.V. Hedvat, K. Iversen, D. Kolb, M.D. Geller, H. Hassoun, T. Kewalramani, R.L. Comenzo, K. Coplan, Y.T. Chen, A.A. Jungbluth, Expression of cancer/testis (CT) antigens MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, CT-7, and NY-ESO-1 in malignant gammopathies is heterogeneous and correlates with site, stage and risk status of disease. *Cancer Immunity* 3 (2003) 9.
- [138] B.J. Van den Eynde, P. van der Bruggen, T cell defined tumor antigens. *Curr.Opin.Immunol.* 9 (1997) 684-693.
- [139] S.L. Topalian, L. Rivoltini, M. Mancini, N.R. Markus, P.F. Robbins, Y. Kawakami, S.A. Rosenberg, Human CD4⁺ T cells specifically recognize a shared melanoma-associated antigen encoded by the tyrosinase gene. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91 (1994) 9461-9465.

- [140] G.F. Hofbauer, Melan A/MART-1 immunoreactivity in formalin-fixed paraffinembedded primary and metastatic melanoma: frequency and distribution. *Melanoma Res* 8(4) (1998) 337-343.
- [141] B. Fisk, C. Savary, J.M. Hudson, C.A. O'Brian, J.L. Murray, J.T. Wharton, C.G. Ioannides, Changes in an HER-2 peptide upregulating HLA-A2 expression affect both conformational epitopes and CTL recognition: implications for optimization of antigen presentation and tumor-specific CTL induction. *J.Immunother.Emphasis.Tumor Immunol.* 18 (1995) 197-209.
- [142] R. Kiessling, Cellular immunity to the Her-2/neu protooncogene. *Adv.Cancer Res.* 85 (2002) 101-44.
- [143] M.S. Greenblatt, W.P. Bennett, M. Hollstein, C.C. Harris, Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res.* 54 (1994) 4855-4878.
- [144] T. Soussi, Y. Legros, R. Lubin, K. Ory, B. Schlichtholz, Multifactorial analysis of p53 alteration in human cancer: a review. *Int.J.Cancer* 57 (1994) 1-9.
- [145] C.C. Harris, Tumor suppressor genes: at the crossroads of molecular carcinogenesis molecular epidemiology, and human assessment. *Prev Med* 25(1) (1996) 10-2.
- [146] A.O. Gure, N.K. Altorki, E. Stockert, M.J. Scanlan, L.J. Old, Y.T. Chen, Human lung cancer antigens recognized by autologous antibodies: definition of a novel cDNA derived from the tumor suppressor gene locus on chromosome 3p21.3. *Cancer Res.* 58 (1998) 1034-1041.
- [147] A.O. Gure, E. Stockert, K.C. Arden, A.D. Boyer, C.S. Viars, M.J. Scanlan, L.J. Old, Y.T. Chen, CT10: a new cancer-testis (CT) antigen homologous to CT7 and the MAGE family, identified by representational-difference analysis. *Int.J.Cancer* 85 (2000) 726-732.
- [148] H.J. Bontkes, T.D. de Gruijl, A.J. van den Muysenberg, R.H. Verheijen, M.J. Stukart, C.J. Meijer, R.J. Scheper, S.N. Stacey, M.F. Duggan-Keen, P.L. Stern, S. Man, L.K. Borysiewicz, J.M. Walboomers, Human papillomavirus type 16 E6/E7-specific cytotoxic T lymphocytes in women with cervical neoplasia. *Int.J.Cancer* 88 (2000) 92-98.
- [149] M.E. Rensing, A. Sette, R.M. Brandt, J. Ruppert, P.A. Wentworth, M. Hartman, C. Oseroff, H.M. Grey, C.J. Melief, W.M. Kast, Human CTL epitopes encoded

- by human papillomavirus type 16 E6 and E7 identified through in vivo and in vitro immunogenicity studies of HLA-A*0201-binding peptides. *J.Immunol.* 154 (1995) 5934-5943.
- [150] M.P. Rudolf, S. Man, C.J. Melief, A. Sette, W.M. Kast, Human T-cell responses to HLA-A-restricted high binding affinity peptides of human papillomavirus type 18 proteins E6 and E7. *Clin.Cancer Res.* 7 (2001) 788s-795s.
- [151] S.J. Youde, P.R. Dunbar, E.M. Evans, A.N. Fiander, L.K. Borysiewicz, V. Cerundolo, S. Man, Use of fluorogenic histocompatibility leukocyte antigen-A*0201/HPV 16 E7 peptide complexes to isolate rare human cytotoxic T-lymphocyte-recognizing endogenous human papillomavirus antigens. *Cancer Res.* 60 (2000) 365-371.
- [152] K. Bieganowska, P. Hollsberg, G.J. Buckle, D.G. Lim, T.F. Greten, J. Schneck, J.D. Altman, S. Jacobson, S.L. Ledis, B. Hanchard, J. Chin, O. Morgan, P.A. Roth, D.A. Hafler, Direct analysis of viral-specific CD8⁺ T cells with soluble HLA-A2/Tax11-19 tetramer complexes in patients with human T cell lymphotropic virus-associated myelopathy. *J.Immunol.* 162 (1999) 1765-1771.
- [153] A.O. Gure, O. Tureci, U. Sahin, S. Tsang, M.J. Scanlan, E. Jager, A. Knuth, M. Pfreundschuh, L.J. Old, Y.T. Chen, SSX: a multigene family with several members transcribed in normal testis and human cancer. *Int.J.Cancer* 72 (1997) 965-971.
- [154] A.O. Gure, I.J. Wei, L.J. Old, Y.T. Chen, The SSX gene family: characterization of 9 complete genes. *Int.J.Cancer* 101 (2002) 448-453.
- [155] R.J. Biggar, M. Christiansen, K. Rostgaard, K.E. Smedby, H.O. Adami, B. Glimelius, H. Hjalgrim, M. Melbye, Immunoglobulin subclass levels in patients with non-Hodgkin lymphoma. *Int.J.Cancer* 124 (2009) 2616-2620.
- [156] M. Ayyoub, M. Brehm, G. Metthez, S. Talbot, V. Dutoit, R.N. Taub, M.L. Keohan, A.O. Gure, Y.T. Chen, B. Williamson, A.A. Jungbluth, L.J. Old, C.S. Hesdorffer, D. Valmori, SSX antigens as tumor vaccine targets in human sarcoma. *Cancer Immun.* 3 (2003) 13.
- [157] N. Naka, N. Araki, H. Nakanishi, K. Itoh, M. Mano, S. Ishiguro, D.R. de Bruijn, A. Myoui, T. Ueda, H. Yoshikawa, Expression of SSX genes in human osteosarcomas. *Int.J.Cancer* 98 (2002) 640-642.

- [158] O. Tureci, Y.T. Chen, U. Sahin, A.O. Gure, C. Zwick, C. Villena, S. Tsang, G. Seitz, L.J. Old, M. Pfreundschuh, Expression of SSX genes in human tumors. *Int.J.Cancer* 77 (1998) 19-23.
- [159] O. Tureci, U. Sahin, I. Schobert, M. Koslowski, H. Scmitt, H.J. Schild, F. Stenner, G. Seitz, H.G. Rammensee, M. Pfreundschuh, The SSX-2 gene, which is involved in the t(X;18) translocation of synovial sarcomas, codes for the human tumor antigen HOM-MEL-40. *Cancer Res.* 56 (1996) 4766-4772.
- [160] J. Clark, P.J. Rocques, A.J. Crew, S. Gill, J. Shipley, A.M. Chan, B.A. Gusterson, C.S. Cooper, Identification of novel genes, SYT and SSX, involved in the t(X;18)(p11.2;q11.2) translocation found in human synovial sarcoma. *Nat.Genet.* 7 (1994) 502-508.
- [161] A.J. Crew, J. Clark, C. Fisher, S. Gill, R. Grimer, A. Chand, J. Shipley, B.A. Gusterson, C.S. Cooper, Fusion of SYT to two genes, SSX1 and SSX2, encoding proteins with homology to the Kruppel-associated box in human synovial sarcoma. *EMBO J.* 14 (1995) 2333-2340.
- [162] T.S. Park et al., Expression of MAGE-A and NY-ESO-1 in Primary and Metastatic. *Cancers. Jimmunother.* (2016) 39.
- [163] Y.T. Chen, A.D. Boyer, C.S. Viars, S. Tsang, L.J. Old, K.C. Arden, Genomic cloning and localization of CTAG, a gene encoding an autoimmunogenic cancer-testis antigen NY-ESO-1, to human chromosome Xq28. *Cytogenet.Cell Genet.* 79 (1997) 237-240.
- [164] B. Lethe, S. Lucas, L. Michaux, S.C. De, D. Godelaine, A. Serrano, P.E. De, T. Boon, LAGE-1, a new gene with tumor specificity. *Int.J.Cancer* 76 (1998) 903-908.
- [165] Y.T. Chen, A.O. Gure, S. Tsang, E. Stockert, E. Jager, A. Knuth, L.J. Old, Identification of multiple cancer/testis antigens by allogeneic antibody screening of a melanoma cell line library. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95 (1998) 6919-6923.
- [166] S. Lucas, S.C. De, K.C. Arden, C.S. Viars, B. Lethe, C. Lurquin, T. Boon, Identification of a new MAGE gene with tumor-specific expression by representational difference analysis. *Cancer Res.* 58 (1998) 743-752.
- [167] A.A. Jungbluth, Y.T. Chen, K.J. Busam, K. Coplan, D. Kolb, K. Iversen, B. Williamson, F.K. Van Landeghem, E. Stockert, L.J. Old, CT7 (MAGE-C1)

- antigen expression in normal and neoplastic tissues. *Int.J.Cancer* 99 (2002) 839-845.
- [168] C. Bourgeois, B. Rocha, C. Tanchot, A role for CD40 expression on CD8⁺ T cells in the generation of CD8⁺ T cell memory. *Science* 297 (2002) 2060-2063.
- [169] C. Bourgeois, H. Veiga-Fernandes, A.M. Joret, B. Rocha, C. Tanchot, CD8 lethargy in the absence of CD4 help. *Eur.J.Immunol.* 32 (2002) 2199-2207.
- [170] S.P. Schoenberger, R.E. Toes, E.I. van der Voort, R. Offringa, C.J. Melief, T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* 393 (1998) 480-483.
- [171] A. Mischo, A. Wadle, K. Watzig, D. Jager, E. Stockert, D. Santiago, G. Ritter, E. Regitz, E. Jager, A. Knuth, L. Old, M. Pfreundschuh, C. Renner, Recombinant antigen expression on yeast surface (RAYS) for the detection of serological immune responses in cancer patients. *Cancer Immun.* 3 (2003) 5.
- [172] A.W. Marjam, J. Barysch, Cancer-Testis Antigens and Immunosurveillance in Human Cutaneous Squamous Cell and Basal Cell Carcinomas, *Clin Cancer Res* (2010) 3562-70.
- [173] M.J. Scanlan, S. Welt, C.M. Gordon, Y.T. Chen, A.O. Gure, E. Stockert, A.A. Jungbluth, G. Ritter, D. Jager, E. Jager, A. Knuth, L.J. Old, Cancer-related serological recognition of human colon cancer: identification of potential diagnostic and immunotherapeutic targets. *Cancer Res.* 62 (2002) 4041-4047.
- [174] S. Gnjatic, H. Nishikawa, A.A. Jungbluth, A.O. Gure, G. Ritter, E. Jager, A. Knuth, Y.T. Chen, L.J. Old, NY-ESO-1: review of an immunogenic tumor antigen. *Adv.Cancer Res.* 95 (2006) 1-30.
- [175] E. Jager, Y. Nagata, S. Gnjatic, H. Wada, E. Stockert, J. Karbach, P.R. Dunbar, S.Y. Lee, A. Jungbluth, D. Jager, M. Arand, G. Ritter, V. Cerundolo, B. Dupont, Y.T. Chen, L.J. Old, A. Knuth, Monitoring CD8 T cell responses to NY-ESO-1: correlation of humoral and cellular immune responses. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97 (2000) 4760-4765.
- [176] E. Jager, E. Stockert, Z. Zidianakis, Y.T. Chen, J. Karbach, D. Jager, M. Arand, G. Ritter, L.J. Old, A. Knuth, Humoral immune responses of cancer patients against "Cancer-Testis" antigen NY-ESO-1: correlation with clinical events. *Int.J.Cancer* 84 (1999) 506-510.

- [177] E. Stockert, E. Jager, Y.T. Chen, M.J. Scanlan, I. Gout, J. Karbach, M. Arand, A. Knuth, L.J. Old, A survey of the humoral immune response of cancer patients to a panel of human tumor antigens. *J.Exp.Med.* 187 (1998) 1349-1354.
- [178] E. Jager, E. Stockert, Z. Zidianakis, Y.T. Chen, J. Karbach, D. Jager, M. Arand, G. Ritter, L.J. Old, A. Knuth, Humoral immune responses of cancer patients against "Cancer-Testis" antigen NY-ESO-1: correlation with clinical events. *Int.J.Cancer* 84 (1999) 506-510.
- [179] A. Mischo, B. Kubuschok, K. Ertan, K.D. Preuss, B. Romeike, E. Regitz, C. Schormann, B.D. de, A. Wadle, F. Neumann, W. Schmidt, C. Renner, M. Pfreundschuh, Prospective study on the expression of cancer testis genes and antibody responses in 100 consecutive patients with primary breast cancer. *Int.J.Cancer* 118 (2006) 696-703.
- [180] P. Chaux, V. Vantomme, V. Stroobant, K. Thielemans, J. Corthals, R. Luiten, A.M. Eggermont, T. Boon, P. van der Bruggen, Identification of MAGE-3 epitopes presented by HLA-DR molecules to CD4⁺ T lymphocytes. *J.Exp.Med.* 189 (1999) 767-778.
- [181] R.F. Wang, The role of MHC class II-restricted tumor antigens and CD4⁺ T cells in antitumor immunity. *Trends Immunol.* 22 (2001) 269-276.
- [182] L.J. Old, Cancer vaccines: an overview. *Cancer Immun.* 8 Suppl 1 (2008) 1.
- [183] M. Ayyoub, C.S. Hesdorffer, G. Metthez, S. Stevanovic, G. Ritter, Y.T. Chen, L.J. Old, D. Speiser, J.C. Cerottini, D. Valmori, Identification of an SSX-2 epitope presented by dendritic cells to circulating autologous CD4⁺ T cells. *J.Immunol.* 172 (2004) 7206-7211.
- [184] Y. Nagata, S. Ono, M. Matsuo, S. Gnjatic, D. Valmori, G. Ritter, W. Garrett, L.J. Old, I. Mellman, Differential presentation of a soluble exogenous tumor antigen, NY-ESO-1, by distinct human dendritic cell populations. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99 (2002) 10629-10634.
- [185] M. Isobe, S. Eikawa, A. Uenaka, Y. Nakamura, T. Kanda, S. Kohno, K. Kuzushima, E. Nakayama, Correlation of high and decreased NY-ESO-1 immunity to spontaneous regression and subsequent recurrence in a lung cancer patient. *Cancer Immun.* 9 (2009) 8.

- [186] E. Huarte, J. Karbach, S. Gnjatic, A. Bender, D. Jager, M. Arand, D. Atanackovic, J. Skipper, G. Ritter, Y.T. Chen, L.J. Old, A. Knuth, E. Jager, HLA-DP4 expression and immunity to NY-ESO-1: correlation and characterization of cytotoxic CD4⁺. *Cancer Immun.* 4 (2004) 15.
- [187] L. Bunse et al., Proximity ligation assay evaluates IDH1R132H presentation in gliomas. *The Journal of Clinical Investigation* (2015) 593-606.
- [188] S. Gnjatic, Y. Nagata, E. Jager, E. Stockert, S. Shankara, B.L. Roberts, G.P. Mazzara, S.Y. Lee, P.R. Dunbar, B. Dupont, V. Cerundolo, G. Ritter, Y.T. Chen, A. Knuth, L.J. Old, Strategy for monitoring T cell responses to NY-ESO-1 in patients with any HLA class I allele. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97 (2000) 10917-10922.
- [189] E. Jager, D. Jager, J. Karbach, Y.T. Chen, G. Ritter, Y. Nagata, S. Gnjatic, E. Stockert, M. Arand, L.J. Old, A. Knuth, Identification of NY-ESO-1 epitopes presented by human histocompatibility antigen (HLA)-DRB4*0101-0103 and recognized by CD4⁺ T lymphocytes of patients with NY-ESO-1-expressing melanoma. *J.Exp.Med.* 191 (2000) 625-630.
- [190] D. Valmori, N.E. Souleimanian, V. Tosello, N. Bhardwaj, S. Adams, D. O'Neill, A. Pavlick, J.B. Escalon, C.M. Cruz, A. Angiulli, F. Angiulli, G. Mears, S.M. Vogel, L. Pan, A.A. Jungbluth, E.W. Hoffmann, R. Venhaus, G. Ritter, L.J. Old, M. Ayyoub, Vaccination with NY-ESO-1 protein and CpG in Montanide induces integrated antibody/Th1 responses and CD8 T cells through cross-priming. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 104 (2007) 8947-8952.
- [191] A. Mischo, N. Bubel, J.S. Cebon, P. Samaras, U. Petrusch, F. Stenner-Liewen, N.G. Schaefer, B. Kubuschok, C. Renner, A. Wadle, Recombinant NY-ESO-1 protein with ISCOMATRIX adjuvant induces broad antibody responses in humans, a RAYS-based analysis. *Int.J.Oncol.* 39 (2011) 287-294.
- [192] Y.T. Chen, A.O. Gure, S. Tsang, E. Stockert, E. Jager, A. Knuth, L.J. Old, Identification of multiple cancer/testis antigens by allogeneic antibody screening of a melanoma cell line library. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95 (1998) 6919-6923.
- [193] D. Rimoldi, V. Rubio-Godoy, V. Dutoit, D. Lienard, S. Salvi, P. Guillaume, D. Speiser, E. Stockert, G. Spagnoli, C. Servis, J.C. Cerottini, F. Lejeune, P. Romero, D. Valmori, Efficient simultaneous presentation of NY-ESO-1/LAGE-

- 1 primary and nonprimary open reading frame-derived CTL epitopes in melanoma. *J.Immunol.* 165 (2000) 7253-7261.
- [194] C.F. de, A.L. Vettore, R.J. Inaoka, B. Karia, V.C. Andrade, S. Gnjatic, A.A. Jungbluth, G.W. Colleoni, Evaluation of LAGE-1 and NY-ESO-1 expression in multiple myeloma patients to explore possible benefits of their homology for immunotherapy. *Cancer Immun.* 11 (2011) 1.
- [195] B.J. Taylor, T. Reiman, J.A. Pittman, J.J. Keats, D.R. de Bruijn, M.J. Mant, A.R. Belch, L.M. Pilarski, SSX cancer testis antigens are expressed in most multiple myeloma patients: co-expression of SSX1, 2, 4, and 5 correlates with adverse prognosis and high frequencies of SSX-positive PCs. *J.Immunother.* 28 (2005) 564-575.
- [196] G. Cronwright, B.K. Le, C. Gotherstrom, P. Darcy, M. Ehnman, B. Brodin, Cancer/testis antigen expression in human mesenchymal stem cells: down-regulation of SSX impairs cell migration and matrix metalloproteinase 2 expression. *Cancer Res.* 65 (2005) 2207-2215.
- [197] K.B.Greve et al., Ectopic expression of cancer/testis antigen SSX2 induces DNA damage and promotes genomic instability, *Mol Oncol.* (2014) 437-49.
- [198] D.W. Song, S.J. Shin, D.E. Kim, S.G. Jung, J.W. Park, K.D. Lee, Detection of MAGE and SSX gene expressions by RT-nested PCR using common primers in head and neck cancer. *Clin.Exp.Otorhinolaryngol.* 1 (2008) 97-102.
- [199] A.A. Jungbluth, S. Ely, M. DiLiberto, R. Niesvizky, B. Williamson, D. Frosina, Y.T. Chen, N. Bhardwaj, S. Chen-Kiang, L.J. Old, H.J. Cho, The cancer-testis antigens CT7 (MAGE-C1) and MAGE-A3/6 are commonly expressed in multiple myeloma and correlate with plasma-cell proliferation. *Blood* 106 (2005) 167-174.
- [200] M. Li, Y.H. Yuan, Y. Han, Y.X. Liu, L. Yan, Y. Wang, J. Gu, Expression profile of cancer-testis genes in 121 human colorectal cancer tissue and adjacent normal tissue. *Clin.Cancer Res.* 11 (2005) 1809-1814.
- [201] D. Atanackovic, T. Luetkens, Y. Hildebrandt, J. Arfsten, K. Bartels, C. Horn, T. Stahl, Y. Cao, A.R. Zander, C. Bokemeyer, N. Kroger, Longitudinal analysis and prognostic effect of cancer-testis antigen expression in multiple myeloma. *Clin.Cancer Res.* 15 (2009) 1343-1352.

- [202] D. Atanackovic, Y. Hildebrandt, A. Jadcak, Y. Cao, T. Luetkens, S. Meyer, S. Kobold, K. Bartels, C. Pabst, N. Lajmi, M. Gordic, T. Stahl, A.R. Zander, C. Bokemeyer, N. Kroger, Cancer-testis antigens MAGE-C1/CT7 and MAGE-A3 promote the survival of multiple myeloma cells. *Haematologica* (2009).
- [203] L. von Boehmer, L. Keller, A. Mortezaei, M. Provenzano, G. Sais, T. Hermanns, T. Sulser, A.A. Jungbluth, L.J. Old, G. Kristiansen, M. van den Broek, H. Moch, A. Knuth, P.J. Wild, MAGE-C2/CT10 protein expression is an independent predictor of recurrence in prostate cancer. *PLoS.One.* 6 (2011) e21366.
- [204] O.L. Caballero, Y.T. Chen, Cancer/testis (CT) antigens: potential targets for immunotherapy. *Cancer Sci.* 100 (2009) 2014-2021.
- [205] A.O. Gure, R. Chua, B. Williamson, M. Gonen, C.A. Ferrera, S. Gnjatic, G. Ritter, A.J. Simpson, Y.T. Chen, L.J. Old, N.K. Altorki, Cancer-testis genes are coordinately expressed and are markers of poor outcome in non-small cell lung cancer. *Clin.Cancer Res.* 11 (2005) 8055-8062.
- [206] U. Sahin, O. Tureci, Y.T. Chen, G. Seitz, C. Villena-Heinsen, L.J. Old, M. Pfreundschuh, Expression of multiple cancer/testis (CT) antigens in breast cancer and melanoma: basis for polyvalent CT vaccine strategies. *Int.J.Cancer* 78 (1998) 387-389.
- [207] M.J. Scanlan, N.K. Altorki, A.O. Gure, B. Williamson, A. Jungbluth, Y.T. Chen, L.J. Old, Expression of cancer-testis antigens in lung cancer: definition of bromodomain testis-specific gene (BRDT) as a new CT gene, CT9. *Cancer Lett.* 150 (2000) 155-164.
- [208] K. Kijima, H. Matsubara, S. Murasawa, K. Maruyama, N. Ohkubo, Y. Mori, M. Inada, Regulation of angiotensin II type 2 receptor gene by the protein kinase C-calcium pathway. *Hypertension* 27 (1996) 529-534.
- [209] J. Arfsten, Untersuchung des Expressionsmuster von Cancer/Testis Antigenen im Knochenmark von Patienten mit Multiplem Myelom. Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg. (2008).
- [210] G.J. Ullenhag, J.E. Frodin, K. Strigard, H. Mellstedt, C.G. Magnusson, Induction of IgG subclass responses in colorectal carcinoma patients vaccinated with recombinant carcinoembryonic antigen. *Cancer Res.* 62 (2002) 1364-1369.

- [211] K.M. Dhodapkar, J. Krasovsky, B. Williamson, M.V. Dhodapkar, Antitumor monoclonal antibodies enhance cross-presentation of cellular antigens and the generation of myeloma-specific killer T cells by dendritic cells. *J.Exp.Med.* 195 (2002) 125-133.
- [212] M.H. Nahm, M.G. Scott, P.G. Shackelford, Expression of human IgG subclasses. *Ann.Clin.Lab Sci.* 17 (1987) 183-196.
- [213] M. Huffenbaecher, Giavina-Bianchi, Pedro Francisco Giavina-Bianchi Junior, Cyro Festa Neto, Melanoma: tumor microenvironment and new treatments. *An Bras Dermatol.* (2017) 156–166.
- [214] A.N. Houghton, D.A. Scheinberg, Monoclonal antibody therapies-a 'constant' threat to cancer. *Nat.Med.* 6 (2000) 373-374.
- [215] J.G. van de Winkel, P.J. Capel, Human IgG Fc receptor heterogeneity: molecular aspects and clinical implications. *Immunol.Today* 14 (1993) 215-221.
- [216] M. Bruggemann, G.T. Williams, C.I. Bindon, M.R. Clark, M.R. Walker, R. Jefferis, H. Waldmann, M.S. Neuberger, Comparison of the effector functions of human immunoglobulins using a matched set of chimeric antibodies. *J.Exp.Med.* 166 (1987) 1351-1361.
- [217] K.A. Foon, W.J. John, M. Chakraborty, R. Das, A. Teitelbaum, J. Garrison, O. Kashala, S.K. Chatterjee, M. Bhattacharya-Chatterjee, Clinical and immune responses in resected colon cancer patients treated with anti-idiotypic monoclonal antibody vaccine that mimics the carcinoembryonic antigen. *J.Clin.Oncol.* 17 (1999) 2889-5.
- [218] S. Adluri, T. Gilewski, S. Zhang, V. Ramnath, G. Ragupathi, P. Livingston, Specificity analysis of sera from breast cancer patients vaccinated with MUC1-KLH plus QS-21. *Br.J.Cancer* 79 (1999) 1806-1812.
- [219] K.S. Anderson, J. LaBaer, The sentinel within: exploiting the immune system for cancer biomarkers. *J.Proteome.Res.* 4 (2005) 1123-1133.
- [220] A. Gagnon, J.H. Kim, J.O. Schorge, B. Ye, B. Liu, K. Hasselblatt, W.R. Welch, C.A. Bandera, S.C. Mok, Use of a combination of approaches to identify and validate relevant tumor-associated antigens and their corresponding autoantibodies in ovarian cancer patients. *Clin.Cancer Res.* 14 (2008) 764-771.

- [221] C. Chapman, A. Murray, J. Chakrabarti, A. Thorpe, C. Woolston, U. Sahin, A. Barnes, J. Robertson, Autoantibodies in breast cancer: their use as an aid to early diagnosis. *Ann.Oncol.* 18 (2007) 868-873.
- [222] P.A. Ott, F.S. Hodi, H.L.Kaufman, J.M. Wigginton, D. Jedd, Combination immunotherapy: a road map *Wolchok Journal for Immunotherapy of Cancer* (2017) 5-16.
- [223] M. A. Curran, W. Montalvo, H. Yagita, J.P. Allison, PD-1 and CTLA-4 combination blockade expands infiltrating T cells and reduces regulatory T and myeloid cells within B16 melanoma tumors. *PNAS* (2010) 4275-4280.
- [224] D.M. Pardoll, FOCUS ON: Tumour immunology & immunotherapy - The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer* (April 2012) 252-264.
- [225] “Pembrolizumab”. *Australian Prescriber* (2015) 180–182.
- [226] J.D. Wolchok et al, Efficacy and safety results from a phase III trial of nivolumab (NIVO) alone or combined with ipilimumab (IPI) versus IPI alone in treatment-naive patients (pts) with advanced melanoma (MEL) (CheckMate 067). *J Clin Oncol* 33 (2015).
- [227] A. Wadle, A. Mischo, S. Strahl, H. Nishikawa, G. Held, F. Neumann, B. Wullner, E. Fischer, S. Kleber, J. Karbach, E. Jager, H. Shiku, K. Odunsi, P.A. Shrikant, A. Knuth, V. Cerundolo, C. Renner, NY-ESO-1 protein glycosylated by yeast induces enhanced immune responses. *Yeast* 27 (2010) 919-931.
- [228] R.L. Sabado, A. Pavlick, S. Gnjatic, CM Cruz, I. Vengco, Resiquimod as an immunologic adjuvant for NY-ESO-1 protein vaccination in patients with high-risk melanoma, *Cancer Immunol Res.* (2015) 278-87.
- [229] M.F. Gjerstorff, M. H. Andersen, H.J. Ditzel, Oncogenic cancer/testis antigens: prime candidates for immunotherapy. *Oncotarget* (2015) 15772–15787.
- [230] L. Dos Santos, B. Galvão-Filho, P.C. de Faria, C. Junqueira, M.S. Dutra, S.M. Teixeira, M.M. Rodrigues, G. Ritter, O. Bannard, D.T. Fearon, L.R. Antonelli, R.T. Gazzinelli, Blockade of CTLA-4 promotes the development of effector CD8⁺ T lymphocytes and the therapeutic effect of vaccination with an

- attenuated protozoan expressing NY-ESO-1. *Cancer Immunol Immunother.* (2015) 311-23.
- [231] J. Yuana, S. Gnjaticb, L. J. Old, Integrated NY-ESO-1 antibody and CD8⁺ T-cell responses correlate with clinical benefit in advanced melanoma patients treated with ipilimumab. *PNAS* (2011) 16723-16728.
- [232] Mary L. Disis, Mechanism of Action of Immunotherapy. *Seminars in Oncology* (2014) 3-13.
- [233] R.A. Madan, P.M. Arlen, M. Mohebtash, J.W. Hodge, J.L. Gulley, Prostavac-VF: a vector-based vaccine targeting PSA in prostate cancer. *Expert opinion on investigational drugs.* (2009) 1001-1011.
- [234] P.W. Kanthoff, T.J. Schuetz, B.A. Blumenstein et al, Overall survival analysis of a phase II randomized controlled trial of a poxviral-based PSA-targeted immunotherapy in metastatic castration resistant prostate cancer. *J Clin Oncol* 28 (2010) 1099-1105.
- [235] K. Odunsia, J. Matsuzaki, Efficacy of vaccination with recombinant vaccinia and fowlpox vectors expressing NY-ESO-1 antigen in ovarian cancer and melanoma patients. *PNAS* (2012) 5797-5802.
- [236] H.T. Kissick, M.G. Sanda, The role of active vaccination in cancer immunotherapy: lessons from clinical trials. *Curr Opin Immunol.* (2015) 15-22.

6 Danksagung

Besonders möchte ich mich bei Prof. Dr. C. Renner bedanken, ohne den ich diese Arbeit wohl nicht vollendet hätte, und für die Überlassung des Themas sowie für die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe.

Außerdem danke ich allen Mitarbeitern des onkologischen Labors, die mir bei meiner Tätigkeit geholfen und mich motiviert haben.

Mein Dank gilt außerdem Dr. M. Dickerhof für die konstruktive Kritik bei der Fertigstellung der Arbeit.

Von ganzem Herzen bedanke ich mich schließlich bei meiner Familie, die mich während der ganzen Zeit unterstützt und in schwierigen Phasen wieder aufgebaut hat.