

Aus der Klinik für Innere Medizin I
der Universitätskliniken des Saarlandes, Homburg/Saar
Arbeitsgruppe : Prof. Dr. med. Christoph Renner

**RAYS-basierte Analyse der Antikörperinduktion nach
Vakzinierung mit NY-ESO-1/ISCOMATRIX™**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2018

vorgelegt von: Nina Bubel
geb. am: 03. Juni 1980
in Saarbrücken

Inhalt

Inhalt.....	I
Glossar.....	IV
1.1. Zusammenfassung.....	1
1.2. Summary	2
2. Einleitung	3
2.1. Epidemiologie der Krebserkrankungen.....	3
2.2. Tumorentstehung.....	4
2.3. Tumorimmunologie.....	5
2.3.1. Humorale und zelluläre Immunreaktion.....	6
2.3.1.1. Aktivierung von CD4 ⁺ - und CD8 ⁺ T-Zellen	6
2.3.1.2. Sonderrolle der dendritischen Zellen	7
2.3.1.3. IgG-Subklassen	7
2.3.2. Tumorassoziierte Antigene (TAA).....	8
2.3.2.1. CT-Antigene	11
2.3.2.2. Charakterisierung der getesteten CT-Antigene.....	13
2.4. Immunologische Therapieansätze	14
2.4.1. Passive Immunisierung	14
2.4.1.1 Checkpoint-Inhibitoren	14
2.4.1.2 Signaltransduktionsinhibitoren	15
2.4.2. Aktive Immunisierung.....	16
2.4.2.1 Peptid-/Protein-Vakzination.....	16
2.4.2.2 Zellbasierte Vakzination	18
2.4.2.3 Genetische Vakzination	19
2.4.3. Adoptiver T-Zelltransfer	20
2.4.3.1 TIL	20
2.4.3.2 Genmodifizierte T-Zellen (TCR und CAR).....	20
2.6. Ziel der Arbeit	23
3. Material und Methoden	25

3.1. Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Kits	25
3.2. Puffer und Lösungen	26
3.3. Möglichkeiten des immunologischen Screenings	28
3.3.1. SEREX	28
3.3.2. RAYS	28
3.4. Hefeoberflächenexpressionsvektor pYD1 (Invitrogen)	29
3.5. Bearbeitung der Hefen.....	30
3.5.1. Herstellung kompetenter Hefen und Transformation.....	30
3.5.2. Glycerolstock	31
3.5.3. Hefekultivierung.....	31
3.6. Nachweis der Antigenpräsentation.....	32
3.6.1. Abspaltung und Fällung von Hefeoberflächenproteinen	32
3.6.2. Western-Blot	32
3.6.3. Probenvorbereitung	32
3.6.4. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)	33
3.6.5. Proteintransfer	33
3.6.6. Färbung/Entwicklung	34
3.7. Seren.....	34
3.7.1. Herkunft der Seren	34
3.7.2. Vorbereitung der Patientenserum	35
3.8. Screening der Patientenserum	35
3.8.1. Immunfluoreszenzfärbung von Hefen.....	35
3.8.2. FACS-Messung und Auswertung durch WinMDI.....	37
4. Ergebnisse	38
4.1. Studienaufbau.....	38
4.2. CT-Antigen-Expression auf Hefeoberfläche und Detektion durch humanes Serum	38
4.2.1. Nachweis der Antigenexpression	39
4.2.2. Induktion der antigenpräsentierenden Hefen	40

4.2.3. Detektion der CT-Antigene durch humanes Serum	41
4.3. Ergebnisse der Serumfärbung	42
4.3.2. Zusammenfassung der Korrelationen.....	45
4.4. NY-ESO-1-Fragmente	46
4.4.1. Ergebnisse der Serumfärbung	47
4.4.2. Zusammenfassung der Korrelationen.....	49
4.5. IgG-Subklassen	50
4.5.1. Serumfärbung	50
4.5.2. Subklassenanalyse	51
5. Diskussion	52
5.1. CT-Antigen NY-ESO-1.....	52
5.2. NY-ESO-1/ISCOMATRIX Studie.....	54
5.2.1. Kontrolle des Impferfolgs	54
5.2.2. Serologie über RAYS.....	55
5.3. ISCOMATRIX-Adjuvanz	56
5.4. CD4 ⁺ T-, CD8 ⁺ T- und B-Zell-Epitope	58
5.5. Kreuzreaktivität mit LAGE-1.....	59
5.6. SSX-2, SSX-4, CT7 und CT10	60
5.7. IgG-Subklassenanalyse	61
5.8. Schlussfolgerung/Resümee	63
5.9. Klinisches Outcome der Patienten	62
6. Literaturverzeichnis.....	66
7. Publikation/Danksagung	81
7.1. Publikation	81
7.2. Dank	81
8. Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Glossar

Abb.	Abbildung
ACT	adoptive cell transfer
ADCC	Antikörperabhängige Zellzytotoxizität
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
APC	Antigen-presenting cell
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
Ca	Karzinom
CAA	Casaminsäuren (Casamino-acid)
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CAR	chimeric antigen receptor
CD	Cluster of Differentiation
CDK4	Cyclin-abhängige (dependent) Kinase 4
cDNA	zyklische Desoxyribonukleinsäure
CEA	Karzinoembryonales Antigen
°C	Grad Celsius
CIN	chromosomal instability
c-kit	receptor tyrosine kinase
cm	Zentimeter
CT-Antigen	Cancer/Testis-Antigen
CTL	Zytotoxische T-Lymphozyten
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
d.h.	das heißt
dd	bidestilliert
dd-NTP	Didesoxynukleotidtriphosphate
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphate
DTH	Delayed type hypersensitivity
E. coli	Escherichia coli

EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (Ethylendiamintetraacetat)
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
etc.	et cetera
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FAMMM	Familiäres atypisches Muttermalmelanom
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
gekid	Gesellschaft der Epidemiologischen Krebsregister in Deutschland
GM2	ganglioside monosialic 2
GM-CSF	Granulozyte and macrophage colony stimulating factor
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HBV	Hepatitis- B-Virus
HCl	Salzsäure
HCV	Hepatitis- C-Virus
Her-2/neu	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
HHV-8	Humanes Herpesvirus 8
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HPV	Humanes Papilloma-Virus
HPV	humanes Papillomavirus
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL-2	Interleukin-2
IMX	Iscomatrix
ISCOM	immunostimulatory complexes
Kap.	Kapitel
kDa	kiloDalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
LAG3	lymphocyte activation gene 3
LB-Agar/Gel	Luria Bertoni-Agar/Gel
Leu	Leucin

M	Molar
mA	Milliampère
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MD	Minimal Dextrose
MDSC	myeloid-derived suppressor cell
MEK	MAPK/ERK Kinase
MHC	Major Histocompatibility Complex
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
MIN	microsatellite instability
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
MUC-1	Mucin-1
MUM-1	Multiples Myelom Onkogen 1
Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NIN	nucleotide excision repair related instability
NRAS	neuroblastoma rat sarcoma
OD	Optische Dichte
OH-Gruppe	Hydroxyl-Gruppe
Page	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PD-1	programmed cell death protein 1
PD-L1	programmed cell death ligand-1
pH	potentia Hydrogenii
pmol	Picomol
Prot.	Protein
PVDF	Polyvinylidenfluorid

RAF	rapidly accelerated fibrosarcoma
ras	Rat sarcoma
RAYS	Recombinant Antigen expression on Yeast Surface
RB-Gen	Retinoblastom-Gen
RDA	representational difference analysis
RE	Restriktionsendonukleasen
rf-NY-ESO-1	recombinant fowlpox-NY-ESO-1
RKI	Robert-Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
rv-NY-ESO-1	recombinant vaccinia-NY-ESO-1
s.	siehe
S.c.	Saccharomyces cerevisiae
s.o.	siehe oben
SDS	Laurylsulfat
SEREX	Serological identification of antigens by Recombinant Expression cloning
TAA	Tumorassoziierte Antigene
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TAP	transporter associated with antigen presentation
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20
TCR	T cell receptor
TENS	Tris-EDTA-NaOH-SDS
TH	T-Helfer-Zelle
TIL	tumor-infiltrating lymphocytes
TIM3	T cell membrane protein 3
Tris-Base	Trishydroxymethylaminomethan
TrisHCl	Trishydrochlorid
TRP1-Gen	Tryptophan-Synthese-Gen
trunk.	Trunkiert
T-VEC	Talimogene laherparepvec
U	Unit
U/min	Umdrehungen pro Minute

UICC	Union Internationale Contre Cancer
UICC	Union internationale contre le cancer
UV	Ultraviolett
V	Volt
VEGF	vascular endothelial growth factor
W	Watt
YNB	Yeast nitrogen base without aminoacids
YPD	Yeast Extract Peptone Dextrose
z.B.	zum Beispiel

1.1. Zusammenfassung

Die Antikörperantwort auf Tumorantigene scheint über Vermittlung der Antigen-Kreuzpräsentation und des T-Zell-Kreuzprimings eine wichtige Rolle in der Initialisierung einer zellulären Anti-Tumorantwort zu spielen. Therapeutische Vakzinierungsstrategien müssen daher durch die Nutzung geeigneter Adjuvanzen eine gleichzeitige Aktivierung des humoralen und des zellulären Immunsystems erreichen.

In der LUD99-008 Studie wurde den Patienten das CT-Antigen NY-ESO-1 mit dem Adjuvanz ISCOMATRIX intramuskulär injiziert. Es konnte gezeigt werden, dass diese Impfkombination ein sicherer und sehr potenter Aktivator des humoralen und zellulären Immunsystems ist.

Wir untersuchten mit Hilfe der RAYS-Methode die humorale Immunantwort vor und nach der Impfung im Detail: Im Laufe der wiederholten Impfungen mit dem Adjuvanz nahmen die Antikörpertiter gegen NY-ESO-1 und die Kreuzreaktion gegen LAGE-1A und LAGE-1B als Indikator einer gesteigerten Immunantwort zu, wohingegen nach Impfung ohne Adjuvanz keine Veränderung der Immunantwort festgestellt werden konnte.

In unserer Analyse der NY-ESO-Fragmente zeigte sich, dass die humorale Immunantwort nur gegen N-terminale Fragmente gerichtet war, und dass im Laufe der Impfung die Anzahl der Fragmente und deren Länge, die durch die spezifischen NY-ESO-1-Antikörper erkannt wurden, anstiegen.

Die humorale Immunantwort bestand hauptsächlich aus Antikörpern der Subklassen IgG1 und IgG3; nur selten fanden wir Antikörper der Subklassen IgG2 und IgG4.

Die Ergebnisse zeigen, dass durch eine Vakzinierung mit dem Tumorantigen NY-ESO-1 in Kombination mit dem Adjuvanz ISCOM die Induktion einer humoralen Immunantwort möglich ist. Es bleibt herauszufinden, welche Rahmenbedingungen dazu führen, dass ein Patient gut oder schlecht bzw. lang- oder kurzandauernd anspricht, und wie dies durch neue Therapiekonzepte modifiziert werden kann. In einer Kombinationstherapie mit den neuen Immuntherapien kann die Vakzinierung ein wichtiger Baustein sein.

1.2. Summary

The antibody response to tumor antigens seems to play an important role in initiating a cellular antitumor response with respect to antigen cross-presentation and T cell-cross-priming. Vaccination strategies need to take account of an optimally timed activation of the humoral and cellular immune system by using appropriate adjuvant stimulation.

The LUD99-008 trial used the cancer testis antigen NY-ESO-1 formulated with ISCOMATRIX adjuvant injected into patients intramuscularly. It was shown, that this vaccination strategy is a safe and highly potent activator of the humoral and cellular immune system.

Using the RAYS technology, we analyzed in detail the humoral immune response in these patients before and after vaccination: During the course of repeated vaccinations with the adjuvant, antibody titers against NY-ESO-1 and cross-reactivity to LAGE-1A and B increased as an indicator of an enhanced immune response, whereas no antibody response could be detected after vaccination without the adjuvant.

Our fragment analysis revealed that the humoral response was almost exclusively directed against the N-terminal fragments and the number of fragments and their length being recognized by the NY-ESO-1 specific antibodies was increasing during the course of vaccination.

The humoral immune response mainly consisted of antibodies of the IgG1 and IgG3 subclass. We rarely found IgG2 and IgG4 subclass antibodies.

Our results show that a vaccination with the cancer testis antigen NY-ESO-1 in combination with the adjuvant ISCOM can induce a humoral immune response. We have to find out which conditions are responsible for a positive or a negative answer of the patient's immune system, why the immune answer lasts for a short or long time and how we are able to modify this with new therapy concepts. In combination with the new immune therapies the vaccination can be an important component.

2. Einleitung

2.1. Epidemiologie der Krebserkrankungen

Krebserkrankungen sind nach den Erkrankungen des kardiovaskulären Systems mit ca. 25% aller Todesfälle die zweithäufigste Todesursache in Westeuropa. In Deutschland erkranken jährlich ca. 436.500 Menschen an bösartigen Neoplasien.

Die häufigste Krebsneuerkrankung bei Männern ist das Prostatakarzinom (25%), bei Frauen steht das Mammakarzinom (28%) an erster Stelle, gefolgt von Kolon- (16% bzw. 18%) und Bronchialkarzinom (14% bzw. 6%). Während sich diese Reihenfolge bei den Frauen auch in der Mortalitätsstatistik widerspiegelt (Mammakarzinom 18%, Kolonkarzinom 14%, Bronchialkarzinom 11,2%), ist bei den Männern das Bronchialkarzinom die am häufigsten zum Tode führende Krebserkrankung (26%), gefolgt von Kolon- (12%) und Prostatakarzinom (10%).

Insgesamt ist seit den 70er Jahren für Frauen und seit Mitte der 80er Jahre auch für Männer ein Rückgang der Krebsmortalität zu beobachten, was zum einen auf Verbesserungen der Therapie und zum anderen auf eine frühere Diagnosestellung zurückzuführen ist, aber leider nur für manche Tumorentitäten zutrifft.

So sind die Behandlungsmöglichkeiten beispielsweise eines Pankreaskarzinoms (5-Jahres-Überlebensrate ca. 7%) oder eines Bronchialkarzinoms (5-Jahres-Überlebensrate ca. 16%), die bei Diagnosestellung häufig schon metastasiert sind, immer noch unzureichend.

[„Krebs in Deutschland 2003-2004, Häufigkeiten und Trends“, Broschüre des RKI/gekid]

Um eine bessere Überlebensrate bzw. sogar Heilung zu erreichen, bedarf es – neben den bereits langjährig etablierten Therapiemaßnahmen wie chirurgischer Therapie, Chemotherapie, Radiotherapie und Hormontherapie – einer Entwicklung neuer Therapieoptionen.

Eine Möglichkeit stellt die Immuntherapie dar, die in den vergangenen Jahren enorme Fortschritte gemacht hat [BAXEVANIS et al., 2009]. So ist die Therapie mit monoklonalen Antikörpern in vielen Therapieprotokollen bereits Standard (z.B. Trastuzumab (Herceptin®) beim Mammakarzinom oder Rituximab beim Non-Hodgkin-Lymphom der B-Zellklasse).

Zur Entwicklung neuer Strategien ist jedoch eine genaue Kenntnis der Tumorentstehung und der Tumorummunologie erforderlich.

2.2. Tumorentstehung

Krebszellen sind durch zwei charakteristische Merkmale geprägt: ein von äußeren Einflüssen unabhängiges – also autonomes – Wachstum und die Fähigkeit andere Gewebe zu infiltrieren, in entfernte Organe zu gelangen und dort Metastasen zu bilden.

Es ist also erst die Fähigkeit der Infiltration, die aus einem benignen Tumor einen malignen Tumor und somit Krebs entstehen lässt.

Aufgrund dieser vielfältigen Fähigkeiten von Krebszellen scheint klar, dass mehrere Genmutationen zur Entstehung einer malignen Zelle – mindestens drei bis sechs – benötigt werden [VOGELSTEIN und KINZLER, 1993]. Diese Genmutationen sind jedoch seltene Ereignisse.

Im Folgenden werden die wichtigsten Aspekte zur Tumorentstehung und -entwicklung dargestellt:

a. Rolle der Protoonkogene und Tumorsuppressorgene

Bereits 1914 stellte THEODOR BOVERI die Hypothese auf, dass Zellen entweder aufgrund der Überaktivierung eines Gens, das die Zellteilung fördert, oder aufgrund des Funktionsverlustes eines Gens, das normalerweise das Wachstum hemmt, maligne entarten [BOVERI, 1914]. Diese Hypothese gilt mittlerweile als bestätigt. So gibt es sogenannte Protoonkogene, die das normale Zellwachstum fördern, welche aber durch Aktivierung, z.B. durch Punktmutation, Amplifikation oder Dysregulation zu Onkogenen transformiert werden können [BISHOP, 1991; STANBRIDGE, 1990].

Gleichzeitig gibt es auch sogenannte Tumorsuppressorgene („Gate-keeper“- oder „Caretaker“-Gene), die inhibierend wirken und bei Funktionsverlust z.B. zu unkontrolliertem Wachstum, aber auch zu einer erhöhten Mutagenität – durch fehlende Aktivierung von DNA-Reperaturmechanismen oder Verhinderung der Apoptose – dieser Zellen beitragen. Diese führen dann im Verlauf zur Transformation einer malignen Zelle [KINZLER und VOGELSTEIN, 1996 und 1997].

Ein Musterbeispiel eines solchen Tumorsuppressorgens ist das Retinoblastomgen (RB-Gen) oder das *p53*-Gen, das in vielen soliden Tumoren verändert vorliegt.

All diese Gene müssen jedoch auf beiden Allelen defekt sein, um tumorfördernd zu wirken [KNUDSON, 1996].

b. Genomische Instabilität

Eine weitere Ursache der Tumorentstehung ist deren genomische Instabilität [LENGAUER, KINZLER und VOGELSTEIN, 1998; KINZLER und VOGELSTEIN, 1996].

Am häufigsten fällt eine chromosomale Instabilität (chromosomal instability, CIN) auf, d.h. es kommt zum Zugewinn oder Verlust von Chromosomenbruchstücken oder ganzen Chromosomen. Die Bruchpunkte einiger wiederkehrender Translokationen liegen häufig im Bereich von Protoonkogenen; so liegt beim Burkitt-Lymphom t(8;14) der Bruchpunkt nahe des Myc-Locus auf Chromosom 8, welcher durch die Verschmelzung mit dem Ig-heavy-chain-Locus auf Chromosom 14 aktiviert wird.

Seltener findet man eine Instabilität auf Nukleotid-Ebene (Nucleotide excision repair-related instability, NIN; microsatellite instability, MIN). Dabei handelt es sich um eine fehlerhafte DNA-Reparatur durch Mutationen in den dafür verantwortlichen Enzymen.

c. Klonale Vermehrung durch Selektionsvorteile

Aufgrund der hohen Mutagenität von Krebszellen ist es ihnen möglich, sich an veränderte Bedingungen anzupassen, was sich in Medikamentenresistenz oder in erhöhter Malignität mit schnellerem Krankheitsfortschritt äußern kann.

Krebs ist also eine genetisch bedingte Erkrankung, die in einer einzelnen Zelle entsteht. Somit entsteht ein Tumor, der zunächst monoklonal ist. Erst im Verlauf kommt es zu weiteren genetischen Veränderungen, die, wenn sie einen Selektionsvorteil bieten, zur Vermehrung anderer Zellpopulationen führen [TOMLINSON, NOVELLI und BODMER, 1996; TOMLINSON und BODMER, 1999].

2.3. Tumorimmunologie

Es ist seit langem bekannt, dass das Immunsystem Einfluss auf die Entwicklung einer malignen Tumorerkrankung hat. So entwickeln Menschen mit Immunsuppression durch Erkrankung (z.B. AIDS) oder durch Medikamente (z.B. nach Transplantation) gehäuft

Tumoren; gleichzeitig ist jedoch auch eine spontane Regression durch eine kompetente Immunantwort möglich.

Dies ist jedoch eher selten der Fall, da eine maligne Tumorerkrankung meistens auch zu einer Immunsuppression mit Unterdrückung der T-Zellaktivität führt.

Ein weiteres Problem ist, dass Tumore häufiger körpereigene Proteine präsentieren, gegen welche das eigene Immunsystem tolerant ist, als sogenannte Neoantigene zu exprimieren.

Falls doch eine Immunreaktion ausgelöst werden kann, ist diese meist zu schwach oder die Tumorzellen verändern sich in ihrer Struktur durch veränderte Antigenpräsentation (s. Kap. 2.2.c) oder Down-Regulation des MHC-Klasse-I-Komplexes so, dass sie vom Immunsystem nicht mehr attackiert werden können.

Zur Entwicklung spezifischer Immuntherapiestrategien ist es also wichtig, zum einen die humorale und zelluläre Immunreaktion und entsprechende „Tumor-escape-Mechanismen“ zu verstehen, und zum anderen mögliche Zielantigene des Tumors zu identifizieren und zu charakterisieren.

2.3.1. Humorale und zelluläre Immunreaktion

2.3.1.1. Aktivierung von CD4⁺- und CD8⁺ T-Zellen

Grundsätzlich gibt es zwei Typen von MHC-Rezeptoren: MHC-I-Rezeptoren, die von allen kernhaltigen Zellen und MHC-II-Rezeptoren, die nur von antigenpräsentierenden Zellen wie B-Lymphozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert werden.

Peptide, die von MHC-I-Molekülen präsentiert werden, entstehen durch Proteolyse intrazellulär synthetisierter Proteine im Proteasom. Die dabei entstandenen Fragmente gelangen nun unter Vermittlung des TAP1/TAP2-Komplexes (transporter associated with antigen presentation) in das endoplasmatische Retikulum (ER), wo sie an MHC-I-Moleküle gebunden und anschließend mit ihnen an die Zelloberfläche transportiert werden.

Werden in einem MHC-I-Molekül fremde Peptide – wie z.B. bestimmte Tumorantigene – präsentiert, so können diese von einem spezifischen T-Zellrezeptor erkannt werden. Dies führt zur Proliferation und Aktivierung dieser T-Zelle zur zytotoxischen CD8⁺T-Zelle (CTL) und damit zur Elimination der betroffenen Tumorzelle.

Allerdings kann eine alleinige CTL-Antwort keine ausreichende Immunantwort gegen Tumorzellen erbringen, da zum optimalen Priming der CTLs und zur Bildung von T-Gedächtniszellen eine Beteiligung von CD4⁺T-Zellen (T-Helfer-Zellen) nötig ist.

[SCHOENBERGER et al., 1998; RIDGE et al., 1998; BOURGEOIS et al., 2002; SUN und BEVAN, 2003]

Die Aktivierung von T-Helferzellen erfolgt durch professionelle antigenpräsentierende Zellen. Diese nehmen ein durch Sekretion oder Tumorzelllyse freigesetztes Antigen durch Bindung an spezifische Fc-Rezeptoren über Endozytose oder unspezifisch über Makro-/Mikrozytose oder Pinozytose auf, welches dann in sekundären Lysosomen fragmentiert, an MHC-II-Moleküle gebunden und in die Plasmamembran eingebaut wird.

Die so präsentierten Antigene können nun von den T-Helferzellen erkannt werden, was zu deren Aktivierung und somit zum einen zu einer verbesserten CTL-Antwort (s.o.), aber auch zu einer Induktion einer Antikörperbildung durch B-Plasmazellen führt. [DAVIS et al., 1998]

Durch die Kombination von zellulärer und humoraler Abwehr ist also eine wesentlich effizientere Immunantwort zu erwarten.

2.3.1.2. Sonderrolle der dendritischen Zellen

Eine besondere Rolle scheinen hierbei dendritische Zellen zu spielen, die als einzige Zellen in der Lage sind eine Kreuzpräsentation von Antigenen in MHC-Klasse-I- und -II-Proteinen zu bewerkstelligen und damit eine effiziente Immunantwort auszulösen. Sie benutzen zur Präsentation fremder Antigene, wie z.B. Tumorantigene, in MHC-I-Rezeptoren einen besonderen Mechanismus: Die fremden Antigene werden über Endozytose (Phagozytose oder Makropinozytose) aufgenommen und entweder vom Phagosom ins Zytosol transferiert und wie oben beschrieben über den Proteasom-abhängigen Weg im ER oder in Phagosomen an MHC-Klasse-I-Moleküle gebunden („phagosome-to-cytosol-pathway“) [RODRIGUEZ et al., 1999; KOVACSOVICS-BANKOWSKI und ROCK, 1995; ROCK und SHEN, 2005; GUERMONPREZ et al., 2003; HOUDE et al., 2003] oder das Antigen wird von endosomalen Proteasen in Peptide gespalten und vermutlich im selben Kompartiment an MHC-I-Moleküle gebunden („vacuolar pathway“) [ROCK, 1996, 2003; ROCK und SHEN, 2005].

2.3.1.3. IgG-Subklassen

Die humanen Immunglobuline der Klasse G lassen sich in 4 Subklassen aufteilen: IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4. Die Konzentrationen dieser Subklassen betragen beim gesunden Erwachsenen ca. 65% IgG1, 25% IgG2, 6% IgG3 und 4% IgG4. Die Verteilung dieser Subklassen bei einer Immunantwort unterscheidet sich je nach Natur des Antigens, der Dosis,

der Eintrittspforte, aber auch vom jeweiligen Genotyp. Die Hauptfunktionen des IgGs liegen in der Neutralisierung und Opsonierung von Pathogenen und in der Aktivierung des Komplementsystems, welche nach Bindung an das Antigen über den Fc γ -Anteil des IgGs vermittelt werden. Die zellulären Funktionen, die über die Antikörper vermittelt werden, sind sehr komplex. Sie hängen von Zelltyp und Isoform des Fc γ -Rezeptors ab und können eine antikörperabhängige Zell-Zytotoxizität (ADCC), eine verstärkte Antikörperpräsentation und eine Regulation der Antikörperantwort bewirken. Im Allgemeinen kann man sagen, dass die Effektivität von IgG1 und IgG3 höher ist als die von IgG2 und IgG4.

[ULLENHAG et al., 2002; PAPADEA et al., 1989; CLARK, 1997]

2.3.2. Tumorassoziierte Antigene (TAA)

Um eine gezielte Immuntherapie gegen maligne Tumoren entwickeln zu können, bedurfte es der Entdeckung von Antigenen, die nur in Tumorzellen exprimiert werden und in der Lage sind eine effektive T- bzw. B-Zellantwort auszulösen.

Es war die Brüsseler Arbeitsgruppe um THIERRY BOON, der es 1991 erstmals gelang, ein tumorassoziiertes Antigen beim malignen Melanom (MAGE 1 – **M**elanoma **a**ntigen) mit Hilfe des „T-cell epitope cloning“, auch „autologous typing“ genannt, molekular zu charakterisieren [van der BRUGGEN et al., 1991 und 2007; TRAVERSARI et al., 1992]. Über dieses Verfahren, bei dem die tumorspezifischen Antigene über zytotoxische T-Zellen identifiziert werden, wurden in der Folgezeit eine Reihe weiterer Antigene wie z.B. die MAGE- und BAGE-Antigene entdeckt (s. Kapitel 2.3.2.1).

Der Nachteil des „autologous typing“ lag – außer in dem hohen Zeit- und Kostenaufwand – auch darin, dass man autologe CTL-Linien und Tumorzellen des gleichen Patienten benötigt, was für die meisten epithelialen Tumoren nicht möglich ist.

Mitte der 90er Jahre kam es zur Weiterentwicklung des „autologous typing“: PFREUNDSCHUH und Mitarbeiter entwickelten das SEREX (**S**erological identification of antigens by **R**ecombinant **E**Xpression cloning) [SAHIN et al., 1995] (s. Kapitel 3.3.1.), dass eine Reihe von Vorteilen im Vergleich zu anderen Verfahren aufweist:

- a. Im Gegensatz zur ursprünglichen Technik des „autologous typing“ bleibt die serologische Analyse durch Verwendung einer cDNA-Expressionsbibliothek nicht nur auf Oberflächenantigene beschränkt, sondern deckt einen großen Teil aller von der Tumorzelle exprimierten Proteine ab.
- b. Durch Verwendung von frischem Tumormaterial zur Herstellung der cDNA-Bibliothek können Phänomene wie Neoexpression oder Verlust von Antigenen, die bei der *in vitro*-Kultur von Tumorzelllinien auftreten, umgangen werden.
- c. Die hohe Verdünnung der Patientenserum (1:1000) sowie die Verwendung eines gegen humanes IgG gerichteten Detektionsantikörpers beschränken die SEREX-Methode auf die Identifikation von Antigenen, die eine starke humorale Immunantwort der IgG-Klasse im Patienten hervorrufen, sodass auch von der Induktion einer T-Zell-Hilfe ausgegangen werden kann. Damit stellt das SEREX ein Bindeglied zwischen der humoralen und der zellulären Antwort dar.
- d. Der Gebrauch von polyklonalen Patientenserum erlaubt die Identifikation einer Vielzahl von Antigenen mit einem Screen-Durchlauf.

Das erste mit SEREX entdeckte Antigen war das HOM-MEL-40-Gen, das später als SSX-2-Gen identifiziert wurde. Mittlerweile konnten weit mehr als 2000 tumorassoziierte Antigene verschiedenster Tumorentitäten (SEREX Datenbank: www2.licr.org/CancerImmunomeDB) entdeckt werden, von denen viele eine wichtige Rolle in der Pathogenese von malignen Tumorerkrankungen spielen. Allerdings hat sich herausgestellt, dass das Antigenrepertoire, das durch das SEREX identifiziert werden kann, limitiert ist [PREUSS et al.; 2002].

Dies könnte damit zusammenhängen, dass post-translationale Veränderungen in einem bakteriellen Expressionssystem nicht entdeckt werden können. Diese spielen jedoch eine wichtige Rolle in der Funktion vieler Proteine und deren Immunogenität. Die Möglichkeiten der post-translationalen Veränderungen beinhalten Glykolisierung, Lipidierung, Phosphorylierung, Methylierung, Acetylierung, Citrullinierung, Deiminierung und auch Trunkierung [DOYLE und MAMULA, 2001; STOLTZE et al., 2000].

Diese Gedanken führten zur Entwicklung des RAYS (**R**ecombinant **A**ntigen expression on **Y**east **S**urface) (s. Kap. 3.3.2.) Dieses eukaryotische Expressionssystem kann die Antigene in

ihrer nativen Faltung bzw. mit den typischen post-translationalen Veränderungen präsentieren, was ihrer natürlichen Konformation entspricht [MISCHO et al., 2003; WADLE et al., 2005]. Da der Expressions- und Transportmechanismus der Hefen auf post-translationaler Ebene dem menschlichen System sehr ähnlich ist, sind die Ergebnisse durchaus übertragbar [BODER et WITTRUP, 1997 und 2000], weshalb die RAYS-Technik erfolgreich zur serologischen Charakterisierung von Tumorantigenen genutzt werden kann [WADLE et al., 2006; MISCHO et al., 2006; KIM MS et al., 2007].

Ein weiterer Vorteil der Verwendung von *Saccharomyces cerevisiae* ist, dass Hefen, im Verhältnis zu z.B. Säugerzellen, einfach zu kultivieren sind.

Je nach Gewebsexpression, Genfunktion oder Entstehung können die Antigene in verschiedene Gruppen eingeteilt werden:

a. Antigene, die in unterschiedlicher Frequenz in verschiedenen Tumoren, nicht jedoch in Normalgeweben exprimiert werden („**tumorspecific shared antigens**“), hierzu zählen auch die **CT-Antigene** (s. Kapitel 2.3.2.1)

b. Differenzierungsantigene, die gewebespezifisch sind und sowohl im Tumor als auch im entsprechenden Normalgewebe – hier jedoch nur in bestimmten Entwicklungsstadien – exprimiert werden. Bei einer Immuntherapie besteht hier also die Gefahr einer Autoimmunreaktion; so werden z.B. bei einer Reaktion gegen die melanozyten- und melanomspezifische Tyrosinase auch gesunde Melanozyten abgetötet [TOPALIAN et al., 1994], was sich im Krankheitsbild der Vitiligo äußern kann.

Bsp.: Melan-A/MART-1, Tyrosinase [Romero et al., 2002]

c. mutierte Antigene

Diese Antigene leiten sich von ubiquitären Proteinen ab und liegen in mutierter Form im Tumorgewebe vor. Diese Mutationsantigene sind mit wenigen Ausnahmen für den jeweiligen Tumor spezifisch und werden deshalb auch „**tumorspecific unique antigens**“ genannt. [WANG et al., 1999]

Bsp: β -Catenin, MUM-1, CDK-4, *p53*, *ras*

- d. überexprimierte „selbst“Antigene** sind Antigene, die auch in gesundem Gewebe exprimiert werden, aber im Tumorgewebe durch eine Überexpression auffallen.

Bsp.: Her-2/neu, p53, MUC-1

[a-d: BOON und van der BRUGGEN, 1996]

- e. virale Antigene**

Einige Viren können durch Integration ihres Genoms bzw. bestimmter Genabschnitte in eine normale Zelle diese zur Tumorzelle transformieren.

Bsp.: E6/E7 von HPV-16 (Zervixkarzinom) [Harper et al., 2004], HBV, HCV (beide Leberzellkarzinom), EBV (Burkitt-Lymphom), HHV-8 (Kaposi-Sarkom)

2.3.2.1. CT-Antigene

Als CT-Antigene (Cancer/testis-Antigene) bezeichnet man eine Kategorie von Tumorantigenen, die sich dadurch auszeichnen, dass sie nur in malignen Tumoren und in männlichen Keimzellen (Spermatogonien) bzw. in fetalen Strukturen (Ovar, Plazenta) vorkommen. Sie gehören zur Gruppe der sogenannten „tumorspecific shared antigens“.

Häufig finden sich sogenannte Genfamilien, die untereinander häufig eine starke Homologie aufweisen; die codierenden Gene liegen fast alle auf dem X-Chromosom.

Die Funktion dieser CT-Antigene ist zum großen Teil unklar, wobei eine Rolle in der Regulierung der Genexpression anzunehmen ist. [LLOYD J. OLD, 2001; SCANLAN et al., 2002]

Mittlerweile sind deutlich über hundert CT-Antigene bekannt. Die Expression ist sehr heterogen, d.h. ein CT-Antigen kann von den verschiedensten Tumoren exprimiert werden und gleichzeitig kann ein Tumor verschiedene CT-Antigene exprimieren. Am häufigsten sind CT-Antigene bei Melanomen, Sarkomen, dem Bronchialkarzinom, Mammakarzinom, Prostatakarzinom und bei anderen epithelialen Karzinomen zu finden. Es scheint eine Korrelation zwischen der Wahrscheinlichkeit der Expression von CT-Antigenen und einem fortgeschrittenen Tumorstadium bzw. einem maligneren Potential des Tumors vorzuliegen. So konnte in mehreren Studien bei Melanompatienten eine häufigere Expression von CT-Antigenen im metastasierten Stadium detektiert werden [BRASSEUR et al., 1995; GOYDOS et al., 2001]. Man nimmt an, dass die Aktivierung dieser Antigene über Hypomethylierung und/oder Histondeacetylierung vermittelt wird, da sowohl Keimzellen als auch maligne Zellen wesentlich weniger CpG-methylierte DNA aufweisen als normale somatische Zellen

[CABALLERO und CHEN, 2009]. Die große Heterogenität der Expression von CT-Antigenen lässt sich jedoch nur schwerlich als Prozess einer globalen Demethylierung erklären.

Eine weitere Hypothese ist, dass die Expression von CT-Antigenen die Folge einer Aktivierung oder Induktion des Keimzellprogramms ist, da es viele Gemeinsamkeiten in den Eigenschaften von malignen Tumorzellen und Trophoblastenzellen gibt wie Immortalisierung, Invasion, Adhäsionsdefizit, Angiogenese, Demethylierung oder eine down-Regulation von MHC-Molekülen. So wäre die unterschiedliche Expression der CT-Antigene auf verschiedene Phasen der Keimzell-/Trophoblastenentwicklung zurückzuführen.

Ob die Demethylierung das Keimzellprogramm in malignen Zellen induziert oder aber Konsequenz des anderweitig induzierten Keimzellprogramms ist, ist unklar.

[LLOYD J. OLD, 2001; SCANLAN et al., 2002]

Zur Familie der CT-Antigene gehören z.B. die über zytotoxische T-Lymphozyten identifizierten Antigene der MAGE, BAGE und GAGE-Familie [van der BRUGGEN et al., 2007; De PLAEN et al., 1994; BOËL et al., 1995; De BACKER et al., 1999], die über RDA (representational difference analysis) entdeckten LAGE-Antigene und CT10, sowie die über SEREX identifizierten Antigene NY-ESO-1 und die der SSX-Familie.

Durch ihre Immunogenität, d.h. der Möglichkeit in Krebspatienten eine sowohl zelluläre als auch humorale Immunantwort auszulösen, und durch ihr auf Krebs- und Testiszellen beschränktes Vorkommen eignen sie sich hervorragend als Ziel für eine Immuntherapie durch Vakzinierung. Eine Beeinträchtigung der Eignung durch das Vorkommen in Testisgewebe ist nicht gegeben, da dieses wie auch die Plazenta zu den immunprivilegierten Geweben zählt, die keine klassischen MHC Klasse-I Moleküle exprimieren [HAAS et al., 1988].

Somit findet auch keine Präsentation der Antigene über MHC Klasse-I Moleküle statt und eine Autoimmunreaktion durch gegen den Tumor gerichtete CTLs bleibt aus [UYTTENHOVE et al., 1997].

2.3.2.2. Charakterisierung der getesteten CT-Antigene

Tabelle 1: Übersicht über die getesteten CT-Antigene

CT-Antigen	Gen	Expression physiologisch	Häufigste Tumorexpression	Besonderheiten
NY-ESO-1	<i>Xq28</i>	Testis und fetales Ovar	Melanom, Sarkom, Mamma-, Prostata-, Blasen- und hepatozelluläres Ca	hohe Immunogenität mit spontaner Induktion einer zellulären und humoralen Immunreaktion
LAGE-1 A LAGE-1 B	<i>Xq28</i>	Testis, schwach in Uterus und Plazenta	Melanom, Nicht-kleinzelliges Bronchial-Ca, Blasen-Prostata- und Kopf-/Hals-Ca	hohe Korrelation in Expression von LAGE-1 und NY-ESO-1-Antigenen
SSX-2/ HOM-MEL-40 SSX-4	<i>Xp11.2</i> - <i>Xp11.4</i>	Testis, schwache Expression in Schilddrüse	Hals-/ Kopf-, Ovarialzell-Ca, Melanom, Lymphom, Kolorektales und Mamma-Ca	Gehört zur SSX-Familie, die aus 9 sehr homologen Antigenen besteht; SSX-2 und SSX-4 am häufigsten exprimiert
CT7/ MAGE-C1	<i>Xq24</i> - <i>Xq28</i>	Testis, fetales Ovar, Pankreas	Melanom, Sarkom, Blasen-, Kopf-/Hals-, Mamma-Ca, nicht-kleinzelliges Bronchial-Ca,	
CT10/ MAGE- E1	<i>Xq27</i>	Testis	Melanom, Blasen-, Mamma-, Kopf-/Hals-Ca, nicht-kleinzelliges Bronchial-Ca	Starke Homologie zu CT7/MAGE-C1

[CHEN et al., 1997 und 1998; GÜRE et al., 1997, 2000 und 2002; JUNGBLUTH et al., 2002; LETHÉ et al., 1998; SCANLAN et al., 2004; TÜRECI et al., 1998]

2.4. Immunologische Therapieansätze

Die verbesserte Kenntnis der Tumorimmunologie und die Identifizierung von spezifischen Tumorantigenen haben in den letzten Jahren zur Entwicklung von neuen immuntherapeutischen Strategien als Behandlungsoption von soliden Tumoren geführt. Das gemeinsame Ziel aller Methoden ist eine zweckgerichtete Aktivierung des Immunsystems, um maligne Zellen gezielt abzutöten. [RENNER, HARTMANN und PFREUNDSCHUH, Deutsches Ärzteblatt 2002]

Die zwei zurzeit am besten erforschten Ansätze sind die passive Immuntherapie über Antikörper und die aktive Immuntherapie über Vakzinierung.

2.4.1. Passive Immunisierung

Die ersten monoklonalen Antikörper wurden von KÖHLER und MILSTEIN im Jahre 1975 hergestellt und sollten im Rahmen einer passiven Immuntherapie im Patienten spezifische Zellen auffinden und zerstören [KÖHLER, MILSTEIN, 1975].

Mittlerweile gibt es verschiedene für onkologisch-hämatologische Erkrankungen zugelassene bzw. in klinischer Erprobung befindliche Antikörper. Der erste zugelassene Antikörper war Rituximab; er richtet sich gegen den CD20-Rezeptor, der von einem Teil der Non-Hodgkin-Lymphome der B-Zellklasse exprimiert wird. In der bislang größten Studie für Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphomen (RICOVER 60) wurden im Vergleich zu anderen Kombinationsbehandlungen die besten Ergebnisse erzielt [McLAUGHLIN et al., 1998].

2.4.1.1 Checkpoint-Inhibitoren

Eine Revolution einiger Tumorentitäten war die Entwicklung der Checkpoint-Inhibitoren. Diese geht auf James P. Allison zurück, der in den frühen Neunzigern das Prinzip der Immuncheckpoints entdeckte [Cancer Research Institute, 2016]. Dieser Durchbruch führte zur Entwicklung und Zulassung des ersten CTLA4-Antikörper Ipilimumab und zur Entwicklung weiterer Checkpoint-Inhibitoren wie die PD-1-Inhibitoren Nivolumab und Pembrolizumab.

CTLA4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) ist ein Protein der T-Zell-Oberfläche, das über eine Hemmung der frühen Immunantwort durch Interaktion mit antigenpräsentierenden Zellen und Modulation regulatorischer T-Zellen eine T-Zell-Aktivierung vermindert [SANSOM et al., 2000] und somit indirekt tumorfördernd wirkt.

PD-1 (programmed cell death protein 1) ist ebenfalls ein inhibitorischer Rezeptor der T-Zell-Oberfläche, der mit seinen Liganden PD-L1 und PD-L2 zur Abschwächung einer Effektor-T-Zell-Antwort führt und, da die Liganden PD-L1 und PD-L2 auch selbst von Tumoren oder anderen Zellen aus dem Mikromilieu des Tumors exprimiert werden, direkt ein Immunescape der Tumorzelle bewirkt [CARTER et al., 2002]. Zusätzlich befindet sich PD-1 auch auf der Oberfläche von B-Lymphozyten und NK-Zellen, sodass auch deren Funktionen gestört werden.

Über eine Hemmung dieser inhibitorischen Immuncheckpoints werden die Negativregulationen also verhindert und es kommt es zu einer Steigerung der antitumorösen Immunantwort.

Sie sind mittlerweile fester Bestandteil in der Therapie des Melanoms, des Lungenkarzinoms, des Nierenzellkarzinoms, des Hodgkin-Lymphoms, des Plattenepithelkarzinoms im Kopf-Hals-Bereich und des Urothelkarzinoms. Weitere Einsatzmöglichkeiten sind im Moment Bestandteil von Studien.

Weitere Checkpoint-Moleküle wie TIM3, LAG3, CD80 und andere sind Gegenstand aktueller Forschungen [SHARMA et al., 2015].

2.4.1.2 Signaltransduktionsinhibitoren

Eine andere nicht mehr wegzudenkende Klasse der Immuntherapeutika sind die Signaltransduktions-Inhibitoren mit den BRAF- (Vemurafenib, Dabrafenib) und MEK-Inhibitoren (Cobimetinib, Trametinib).

Das BRAF Protein ist ein wichtiger Bestandteil des MAPK-Signalwegs, der für das Wachstum, die Differenzierung und das Überleben der Zelle verantwortlich ist. Durch aktivierende Mutationen in diesem Bereich kommt es zu ungebremstem Wachstum mit der möglichen Entstehung von Tumoren. Die häufigste ist die BRAF-V600-Mutation, die bei ca. 40% aller Melanompatienten zu finden ist; bei anderen Tumorentitäten liegt die Zahl darunter, schätzungsweise bei 8% aller soliden Tumoren [SCHADENDORF et al., 2015; DAVIES et al., 2002]. Bei nachgewiesener BRAF-Mutation hat sich die Therapie mit einem BRAF-Inhibitor in der Behandlung des fortgeschrittenen Melanoms etabliert (S3-Leitlinie). Problematisch ist die schnelle Resistenzentwicklung mit unterschiedlichen Mechanismen unter Monotherapie innerhalb von 7-9 Monaten [ROESCH et al., 2016], was zur Entwicklung der MEK-Inhibitoren führte. MEK ist ein im MAPK-Signalweg dem BRAF nachgelagertes Molekül, weshalb es sich als weiterer Angriffspunkt zur Unterbindung der Überaktivierung

anbietet. Die Anwendung als Kombination kann die Entwicklung der Resistenzen deutlich hinauszögern, weshalb es 2015 zur Zulassung der Kombinationstherapie kam. Es zeigte sich aber auch ein Effekt bei alleiniger Therapie bei BRAF-mutierten Melanomen [FLAHERTY et al., 2012].

Aktuell laufen in Deutschland Studien an verschiedenen Hauttumorzentren zu Triple-Therapien mit PD-1- bzw. PD-L1-Inhibitoren, um das weiterhin bestehende Problem der Resistenzentwicklung zu verbessern [UTIKAL 2017].

2.4.2. Aktive Immunisierung

Im Gegensatz zur passiven Immuntherapie wird hierbei das körpereigene Immunsystem über eine Vakzine stimuliert.

Grundsätzlich können die Vakzinierungsstrategien in drei Kategorien unterteilt werden: die Peptid-/Protein-Vakzination (wie in dieser Arbeit), die zellbasierte Vakzination und die genetische Vakzination auf DNA-, RNA- oder Virusbasis.

2.4.2.1 Peptid-/Protein-Vakzination

Bei der Peptid-/Protein-Vakzination werden dafür meist – wie auch in dieser Studie – CT-Antigene bzw. einzelne Fragmente davon genutzt, um eine gezielte Antwort gegen die Tumorzellen zu generieren. In den letzten Jahren wurden viele klinische Studien über die aktive T-Zell-basierte Immuntherapie durchgeführt, in denen auch gezeigt werden konnte, dass diese Peptidvakzinierungen eine Tumorantigen-spezifische T-Zellantwort induzieren können.

Allerdings vermag eine alleinige CTL-Antwort keine ausreichende Immunantwort gegen Tumorzellen zu erbringen, da zum optimalen Priming der CTLs und zur Bildung von T-Gedächtniszellen eine Beteiligung von $CD4^+$ T-Zellen (T-Helfer-Zellen) nötig ist [SCHOENBERGER et al., 1998; RIDGE et al., 1998; BOURGEOIS et al., 2002; SUN und BEVAN, 2003]. Um dies zu ermöglichen, muss eine Kreuzpräsentation des Antigens sowohl in MHC-I- als auch in MHC-II-Molekülen erfolgen.

Außerdem scheint die gesteigerte Bildung spezifischer Antikörper nach Impfung wichtig, um die Aufnahme in dendritische Zellen und die Kreuzpräsentation zu fördern und somit eine gute $CD8^+$ T-Zell-Antwort auszulösen [VALMORI et al., 2007].

Um dies zu erreichen, wurden verschiedene Strategien entwickelt; aufgrund seiner hohen Immunogenität mit spontaner Induktion einer zellulären und humoralen Abwehr wurde dafür – wie auch hier – in Studien häufig das CT-Antigen NY-ESO-1 als Modellantigen verwandt:

- a.** Die Gabe des Volllänge-Proteins scheint für die Kreuzpräsentation von Vorteil zu sein, da dieses sowohl eine CD8⁺-T-Zell- als auch eine CD4⁺-T-Zell-Antwort gegen verschiedene Epitope auslösen kann [STOCKERT et al., 1998; JÄGER et al., 1998 und 2000; VALMORI et al., 2000].
- b.** Man benutzt dendritische Zellen, die als einzige Zellen in der Lage sind, sowohl MHC-I- als auch MHC-II-Moleküle zu exprimieren, die mit entsprechenden Peptiden beladen wurden [DAVIS et al., 2003; ALJAGIC et al., 1995; SCHIRMBECK et al., 1995].
- c.** Durch die Bildung von Antigen-Antikörper-Immunkomplexen – eventuell auch über die Gabe von monoklonalen Antikörpern – kann über Bindung an den Fcγ-Rezeptor durch erleichterte Aufnahme in antigenpräsentierende Zellen eine effiziente Kreuzpräsentation erreicht werden [RODRIGUEZ et al., 1999; REGNAULT et al., 1999; DHODAPKAR et al., 2002; NAGATA et al., 2002]. Die Prozessierung dieses Komplexes erfolgt in den dendritischen Zellen über den normalen „phagosome-to-cytosol“ Proteasom-abhängigen Weg [SCHNURR et al., 2005].
- d.** Durch die Zugabe von Adjuvanzen wird die Immunogenität des Proteins über Stimulierung von Kofaktoren oder Zytokinen erhöht [MATZINGER et al., 1994]. Beispiele dafür sind GM-CSF (granulozyte and macrophage colony stimulating factor) oder ISCOMATRIX™ (IMX).
GM-CSF bewirkt eine verbesserte Antigenpräsentation in dermalen dendritischen Zellen (Langerhans-Zellen) mit Induktion einer andauernden TH1- und CD8⁺-T-Zell-Antwort [JÄGER et al., 2001; DRANOFF et al., 1993].
IMX, ein aus Saponin entwickeltes Adjuvanz, basiert auf der ISCOM (immunostimulatory complexes) -Technik und bewirkt sowohl eine verbesserte Antigenpräsentation als auch eine Immunstimulation, die sich in einer besseren Antikörperantwort, wie auch in einer effizienteren CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellantwort äußert [SJOLANDER et al., 1998; MARASKOVSKY et al., 2004]. Interessanterweise

fiel auf, dass der NY-ESO-1/IMX-Komplex in dendritischen Zellen hierbei über einen alternativen Proteasom-unabhängigen Weg prozessiert wird [SCHNURR et al., 2005].

Eine weitere Limitierung dieser Impfungen ist auch, dass die T-Zellerkennung von bestimmten Epitopen eines Antigens HLA (humane Lymphozytenantigene) -Typ-restringiert ist, d.h. Menschen mit unterschiedlichen HLA-Typen erkennen unterschiedliche T-Zellepitope. Eine Impfung mit einem bestimmten Peptid kann also im Allgemeinen nur für Patienten mit der gleichen HLA-Klasse eingesetzt werden.

Es existieren drei Hauptgene der Klasse I (HLA-A, -B und -C) und drei Paare von α - und β -Ketten der Klasse II (HLA-DR, -DP und -DQ), sodass also mindestens drei verschiedene HLA-Klasse-I- und vier verschiedene HLA-Klasse-II-Moleküle exprimiert werden können.

Da der Genotyp HLA*0201 in der weißen westlichen Bevölkerung mit ca. 50% der häufigste ist, werden die meisten Impfungen mit HLA*0201-restringierten Peptiden durchgeführt.

Insgesamt ist zu sagen, dass die meisten Forschungsansätze im Bereich der Peptid-/Protein-Vakzination bisher eher enttäuschend waren.

Neue Hoffnung gibt es durch erste Erfolge von personalisierten Impfstoffen, bei denen durch computergestützte Analyse das gesamte Tumorexom auf mögliche Neoantigene untersucht, und auf dieser Basis eine individuelle Antitumorvakzine hergestellt wird. Hier konnte in einer Studie am Dana-Farber Cancer Institute in Boston bei Melanom-Patienten im fortgeschrittenen Stadium eine deutliche Verlängerung des progressionsfreien Überlebens gezeigt werden. [OTT et al., 2017]

2.4.2.2 Zellbasierte Vakzination

Bei diesem Ansatz werden meist dendritische Zellen aufgrund ihrer bekannten Effektivität in der Antigenpräsentation genutzt. Diese werden aus dem Blut eines Patienten isoliert und *ex vivo* mit Antigenen aus Peptiden oder Tumorzelllysaten beladen, aktiviert und dann reinfundiert [PALUCKA et al., 2010].

Der einzige zugelassene Impfstoff dieser Klasse ist Sipuleucel-T (Provenge®) zur Therapie des kastrationsresistenten Prostatakarzinoms, nachdem in der IMPACT-Studie am Dana-Farber Cancer Institut in Boston 2010 ein leichter, aber signifikanter Vorteil in der mittleren Überlebenszeit nachgewiesen werden konnte [KANTOFF et al., 2010].

Weitere Ansätze mit autologen oder allogenen Tumorzellen, wie z.B. Canvaxin von CancerVax, Delaware bei fortgeschrittenem Melanom konnten bisher nicht überzeugen [DISIS 2014].

2.4.2.3 Genetische Vakzination

Die genetische Vakzine kann DNA-, RNA- oder virusbasiert sein und soll nach Injektion *in vivo* eine Transfektion körpereigener Zellen (Myozyten, Keratinozyten, dendritische Zellen) mit nachfolgender Expression der gewünschten Neoepitope und damit verbundener Immunantwort durch Cross-Priming und Antigenpräsentation erreichen. Der Vorteil dieses Ansatzes ist, dass gleichzeitig mehrere Antigene verabreicht und mehrere Arme des Immunsystems stimuliert werden können.

Obwohl präklinisch gute Erfolge erzielt wurden, ist der erhoffte Durchbruch bei den DNA-Impfstoffen bisher ausgeblieben.

Bei den RNA-Impfstoffen sieht es aktuell jedoch vielversprechend aus. Diese scheinen mit deutlich weniger Nebenwirkungen einherzugehen. Aktuell laufen bereits mehrere Phase I/II Studien zur Behandlung des Melanoms und des Nierenzellkarzinoms.

[GUO et al., 2013; DISIS et al., 2014]

Der Gruppe um UGUR SAHIN in Mainz ist es mittlerweile gelungen, einen personalisierten RNA-Impfstoff durch computergestützte Analyse des Tumorgewebes auf Neoepitope herzustellen. Die im Rahmen der Studie mit ihrem jeweils individuellen Impfstoff geimpften Melanompatienten zeigten allesamt eine T-Zell-Antwort gegen eine Vielzahl der in der Vakzine enthaltenen Neoepitope. Es konnte eine signifikante Reduktion der Metastasenbildung nach Beginn der Impfung mit entsprechender Verlängerung des progressionsfreien Überlebens gezeigt werden.

[SAHIN et al., 2017]

Beim Einsatz onkolytischer Viren konnte ebenfalls ein Erfolg verbucht werden:

Als erster Vertreter dieser Gruppe erhielt Talimogen Laherparepvec (T-VEC) (Imlygic®) 2015 die Zulassung bei nicht resezierbarem Melanom.

Hier wurde ein abgeschwächtes HSV-1 Virus gentechnisch so verändert, dass es sich nach lokaler Injektion in den Tumorzellen vermehrt und dort GM-CSF bildet, was zu einer gesteigerten T-Zellantwort mit Infiltration und Antigenpräsentation führt.

In der OPTiM-Studie konnte eine statistisch signifikante Überlegenheit in allen Bereichen im Vergleich zur isolierten subkutanen GM-CSF-Gabe in dieser Patientengruppe nachgewiesen werden [ANDTBACKA et al., 2015].

2.4.3. Adoptiver T-Zelltransfer

Beim adoptiven T-Zelltransfer (ACT, „adoptive cell transfer“) handelt es sich um eine sehr personalisierte Therapieform, bei der Patienten Lymphozyten entnommen werden, die *ex vivo* aufgearbeitet und expandiert werden, um dann dem Patienten mit dem Ziel einer direkten antitumorösen T-Zell-Effektorantwort wieder zugeführt zu werden.

Am weitesten fortgeschritten sind im Moment drei Ansätze: Tumordinfiltrierende Lymphozyten (TIL) und genmodifizierte T-Zellen mit chimärem Antigenrezeptor (CAR) oder spezifischem T-Zellrezeptor (TCR).

2.4.3.1 TIL

T-Zellen in Tumorgewebe haben eine selektive Antitumoraktivität und das Vorhandensein von tumordinfiltrierenden Lymphozyten ist bekanntermaßen mit einer besseren Prognose bei Tumorerkrankungen verknüpft [CLEMENTE et al., 1996]. So kam es zur Idee, den Patienten tumordinfiltrierende Lymphozyten zu entnehmen und nach Expansion wieder zu reinfundieren, um eine stärkere Antitumorantwort zu erhalten. Seitdem 1988 die erste Pilotstudie eine Regression verschiedener solider Tumoren nachweisen konnte [TOPOLIAN et al., 1988], entwickelt sich diese Therapieform immer weiter über Modifizierung der *ex vivo*-Kulturbedingungen, der Präkonditionierung von Patienten und der gleichzeitigen Gabe von T-Zell-aktivierenden Zytokinen. Mittlerweile konnte in verschiedenen Studien eine Ansprechrate von ca. 50% und anhaltende Remissionen bei Melanompatienten im fortgeschrittenen Stadium nachgewiesen werden [DUDLEY et al., 2008; ROSENBERG et al., 2011].

2.4.3.2 Genmodifizierte T-Zellen (TCR und CAR)

Die Übertragung dieser Form der T-Zell-Therapie auf anderen Tumorentitäten gestaltet sich durch schwierige oder zu geringe Isolation von tumordinfiltrierenden Lymphozyten sehr schwierig. Daraus entstand die Idee durch gentechnische Veränderung der peripheren T-

Zellen eines Patienten diesen eine Antitumor-Kompetenz zu verleihen, die nach Reinfusion einen direkten Effekt auf die Tumorzelle haben.

Bei der TCR-Variante wird hierbei durch genetische Veränderung die Expression eines tumorspezifischen T-Zell-Rezeptors induziert, der bei Patienten mit passendem Tumorantigen und passender MHC-Klasse eingesetzt werden kann.

Bei der CAR-Variante wird die Expression eines chimären Antigenrezeptors induziert, der über seine extrazelluläre Bindungsstelle auch intakte Tumoroberflächenstrukturen erkennen kann und darüber eine T-Zellaktivierung initiiert. Die so modifizierten T-Zellen werden nach einem Antigenkontakt MHC-unabhängig aktiviert und können so zur Tumorzelllyse und zur Ausbildung eines immunologischen Gedächtnis führen.

Mehrere Pilotstudien dazu zeigen ein gutes Ansprechen verschiedener solider und hämatologischer Tumoren.

[DUONG et al., 2015]

2.5. Malignes Melanom der Haut

Das Melanom ist ein neuroektodermaler maligner Tumor, der sich von Melanozyten ableitet und am häufigsten an der Haut, aber auch an Schleimhäuten, Aderhaut, Iris, Innenohr und der Substantia nigra auftreten kann. Es ist der aggressivste Tumor aller Hautkrebsarten. Betroffen sind vor allem Menschen mittleren Lebensalters zwischen 40 und 65 Jahren.

Jährlich erkranken in Deutschland ca. 21.000 Menschen an einem Malignen Melanom, wobei seit Jahren eine steigende Inzidenz zu beobachten ist. Gleichzeitig hat sich die Mortalitätsrate (ca. 1% aller Krebstodesfälle) jedoch kaum verändert, was bei weiterhin fehlendem Therapiedurchbruch bezüglich Heilungserfolgen vermutlich auf eine frühzeitigere Diagnosestellung (Einführung des Hautkrebsscreenings 2008) zurückzuführen ist. Mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 92% gehört das Melanom zu den prognostisch eher günstigen Tumorerkrankungen; bei bereits vorhandener Metastasierung sind die Überlebensaussichten jedoch deutlich schlechter (Zahlen rki 2012).

Das kutane Melanom ist mit einer Inzidenz von 20 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner in Deutschland die häufigste Form, die für 75% der hautkrebsbedingten Todesfälle verantwortlich ist [JEMAL et al., 2007; GARBE et al., 2001].

Als Risikofaktoren gelten eine große Anzahl an Pigmentmalen (insbesondere kongenitale und dysplastische Formen), ein heller Hauttyp und eine genetische Disposition (z.B. „FAMMM“: „Familiäres atypisches multiples Muttermalmelanom“ oder „Dysplastisches Nävusssyndrom“)

[BATAILLE, 2003].

Haupttrisikofaktor ist jedoch die intensive Sonnen- bzw. UV-Exposition, wobei vor allem Sonnenbrände in der Kindheit und eine intermittierende Exposition hoher UV-Dosen (wie z.B. im Sommerurlaub) eine Rolle spielen. Bei Kombination verschiedener Risikofaktoren kann das Risiko auf das 100-fache ansteigen.

[GARBE et al., 1994; GARBE, 1998; Veröffentlichungen der Strahlenschutzkommission, 1998]

Die Therapie hat sich in den letzten Jahren zum einen durch eine neu erarbeitete Klassifikation (Union Internationale Contre Cancer [UICC] 2002) des malignen Melanoms mit einer deutlich besseren prognostischen Unterteilung und einer verbesserten chirurgischen Primärtherapie (1-2 cm Sicherheitsabstand) verändert.

Durch eine solche Exzision können mehr als 90% der Patienten mit Melanomen eines Breslow-Indexes < 1 mm geheilt werden.

Bei den metastasierten Melanomen sind die Therapiemöglichkeiten bisher jedoch immer noch sehr begrenzt. Es kommen jedoch positive Signale aus dem Bereich der immunologischen Tumorforschung, die das maligne Melanom aufgrund seiner immunologischen Eigenschaften häufig als „Modelltumor“ zur Erforschung von Tumorabwehrmechanismen benutzt.

In der adjuvanten Therapie wird nach vollständiger Resektion des Primärtumors Interferon- α eingesetzt, welches in einer Metaanalyse der Cochrane skin group von 2013 eine statistisch signifikante Verlängerung des rezidivfreien Überlebens und des Gesamtüberleben zeigen konnte. Eine Aussage zur optimalen Dosierung oder Therapiedauer konnte jedoch nicht gemacht werden [MOCELLIN et al., 2013]. In Deutschland wird diese Therapie in der S3-Leitlinie für Patienten der Stadien IIA angeboten und für Patienten der Stadien IIB/C und IIIA-C empfohlen, aber soll individuell nach Abwägung von zu erwartenden Vorteilen und möglichen Nebenwirkungen diskutiert werden.

Einen festen Platz in der adjuvanten Therapie hat weiterhin die Strahlentherapie. Sie ist etabliert in der Behandlung von nodal und regional metastasierten Melanomen zur lokalen Kontrolle der Tumorerkrankung [S3-Leitlinie].

Weitere adjuvante Therapieansätze befinden sich zurzeit in klinischer Erprobung. Dazu gehören die Checkpoint-Inhibitoren Ipilimumab (EORTC18071) und Pembrolizumab (EORTC1325) und die Signaltransduktions-Inhibitoren Vemurafenib, Dabrafenib (BRAF-Inhibitoren) und Trametinib (MEK-Inhibitor) (CombiAD-Studie, GO27826). Eine Zulassung für diese Indikation gibt es bisher jedoch nur für Ipilimumab, da in der Studie eine deutlichen

Steigerung des medianen rezidivfreien Überlebens nachgewiesen werden konnte [EGGERMONT et al., 2015 und 2016].

Weiterhin wurden auch verschiedene Vakzinierungsstrategien getestet, die im adjuvanten Ansatz aber bisher nicht die gewünschten Erfolge erbringen konnten. Zu den verwendeten Impfstoffen gehörten das Gangliosid GM2 mit und ohne Modifikation, autologe oder allogene Melanomzellvakzine (z.B. Canvaxin™, Melacine® etc.) oder rekombinante CT-Antigene wie MAGE-A3 [FLUCK et GARBE, 2014; SCHADENDORF et al., 2015] oder – wie in dieser Arbeit – NY-ESO-1.

Ab Stadium IIIB sollte nach der neuesten S3 Leitlinie auf vorhandene Mutationen (BRAF, NRAS, c-kit) getestet und entsprechende Therapien eingeleitet werden.

Bei lokoregionalen Metastasen gibt es bei Inoperabilität die Möglichkeit von intratumoralen IL-2 oder einer Elektrochemotherapie mit Bleomycin oder Cisplatin. Eine weitere Option ist Talimogene Laherparepvec (T-VEC), ein onkolytischer Virus, der seit 2015 in Europa zugelassen ist.

Im fernmetastasierten Stadium IV haben die neuen Immuntherapeutika wie die Checkpoint-Inhibitoren (CTLA4- und PD1-Antikörper) und die Signaltransduktionsinhibitoren (BRAF/MEK/c-kit-Inhibitoren) die klassischen Chemotherapeutika praktisch verdrängt.

Die Therapie sollte angepasst an das molekulargenetische Profil des Tumors gewählt werden um einen größtmöglichen Erfolg zu gewährleisten. Wegen fehlender Vergleichsstudien kann jedoch keine Aussage zur optimalen Therapiesequenz oder Kombination gemacht werden.

Das traditionelle Dacarbazin spielt in den neuen Leitlinien nur noch eine untergeordnete Rolle als Reservemedikament bei Kontraindikationen gegen die überlegenen Therapieschemata der Immuntherapeutika.

[S3-Leitlinie]

2.6. Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit geht es um eine Vakzinierungsstudie, die NY-ESO-1-Iscomatrix-Studie des Ludwig Institute for Cancer Research in Melbourne. 46 Patienten mit NY-ESO-1-exprimierenden Tumoren (hauptsächlich Melanome) wurden nach deren Resektion adjuvant mit der NY-ESO-1/Iscomatrix-Vakzine behandelt (drei intramuskuläre Injektionen), wobei ein Teil der Patienten NY-ESO-1/IMX in unterschiedlicher Dosierung, ein weiterer Teil nur Protein und ein kleiner Teil nur Placebo bekam [DAVIS et al., 2004].

Die zu 5 verschiedenen Zeitpunkten entnommen Seren wurden mithilfe des RAYS auf Antikörperbildung gegen das CT-Antigen NY-ESO-1 und dessen Fragmente, die in ihrer Struktur sehr ähnlichen CT-Antigene LAGE-1 A und B, sowie gegen die Antigene SSX-2, SSX-4, CT7 und CT10 untersucht. Ebenso wurde eine IgG-Subklassenanalyse durchgeführt. Uns interessierte hierbei besonders der Verlauf der Antikörperkonzentrationen und die eventuelle Entwicklung von Kreuzreaktivitäten insbesondere im Zusammenhang mit der jeweiligen Vakzinierung.

3. Material und Methoden

3.1. Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Kits

Amersham	ECL-Kit
BioRad, München	Streptavidin-conjugated Horse-Raddish-Peroxidase
Difco, Detroit; USA	Agar Trypton Yeast-Extract
Invitrogen	BenchMark™ Pre-Stained Protein Lader pYD1 Yeast display vector kit modifiziert S.c. easyComp™ Transformation Kit
Jackson Immuno Research	Biotin-SP-conjugated Affini Pure F(ab') ₂ Fragment goat, Anti-Mouse IgG (H+L) Biotin-SP-conjugated Affini Pure Mouse Anti-human-IgG, Fcγ-specific Biotin-SP-conjugated Affini Pure Rabbit Anti-sheep IgG (H+L) R-Phycoerythrin-conjugated Streptavidin
Kodak	X-Omat AR Film
Millipore (Bedford, USA)	Immobilon-P Transfer Membrane
Merck, Darmstadt	β-Mercaptoethanol Chloroform D(+)-Glucose Ethylendiamintetraacetat (EDTA) Formamid <i>Gelatine</i> Glycin <i>Magnesiumchlorid</i> Methanol Natriumchlorid p.a. Natriumhydroxid
Quiagen, Hilden	Penta-His Biotin conjugated

Santa Cruz Biotechnology	c-Myc (9E10)
Sigma, St. Louis; USA	Bromphenolblau Laurylsulfat (SDS) Sucrose Trishydrochlorid (TrisHCl) Trishydroxymethylaminomethan (TrisBase)

3.2. Puffer und Lösungen

<u>Blaumarker und Ladepuffer für Agarosegele:</u> 0,25 % Bromphenolblau 0,25 % Xylenxanol FF 0,25 % Orange G 1 mM EDTA 40 % Sucrose •in H ₂ O _{dest} lösen	<u>Laemmli Elektrodenpuffer:</u> 50 mM Tris-Base 6 g 384 mM Glycin 28,8 g 0,1% SDS 1 g •ad 1000 ml H ₂ O •pH 8,3 ggf. mit HCl einstellen
<u>MD-Leu-Platten (Minimal Dextrose Plates):</u> 6,7 g YNB (mit Ammoniumsulfat, ohne Aminosäuren) 15 g Agar •ad 900 ml H ₂ O 100 ml Glucose 20% 10 ml Leucin 10mg/ml •Glucose und Leucin erst nach dem Autoklavieren zusetzen und im Kühlschrank aufbewahren.	<u>PBS:</u> 8 g NaCl 0,2 g KH ₂ PO ₄ 1,35 g Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O •ad 1000 ml H ₂ O

<u>SDS 2x Proteinprobepuffer:</u> 0,6 ml Tris pH 6,0 1M 2,5 ml Glycerol 100 % 2,0 ml SDS 10 % 0,5 ml Bromphenolblau 2 % 3,9 ml H ₂ O dest	<u>YNB-CAA-Medium:</u> 6,7 g YNB (mit Ammoniumsulfat, ohne Aminosäuren) 5 g Casaminosäuren •ad 900 ml H ₂ O 100 ml Glucose 20 % oder Galaktose 20 % •Glucose bzw. Galaktose erst nach dem Autoklavieren zusetzen und im Kühlschrank aufbewahren.
<u>10-fach Transferpuffer:</u> 3 g Tris-Base 14,4 g Glycin •ad 1000 ml H ₂ O	<u>1-fach Transferpuffer:</u> (für 100ml) 10 ml 10-fach Transferpuffer 20 ml Methanol 70 ml H ₂ O

3.3. Möglichkeiten des immunologischen Screenings

3.3.1. SEREX

Das SEREX (**SE**rological identification of antigens by **R**ecombinant **EX**pression cloning) [SAHIN et al., 1995] ist eine von Pfreundschuh und Mitarbeitern etablierte Methode, die es erlaubt, Tumorantigene aufgrund ihrer durch ihre Immunogenität hervorgerufenen Antikörperbildung, molekular zu identifizieren. Dazu wird aus frischem Tumormaterial eine cDNA-Bank generiert, diese in einen λ -Phagen-Expressionsvektor kloniert und damit *E. coli* transfiziert. Während der lytischen Infektion werden die rekombinanten Proteine exprimiert, diese auf Nitrozellulosemembran geblottet und anschließend mit verdünntem autologem Patientenserum inkubiert. Klone, die mit hochtitrigen IgG-Antikörpern reagieren, können dann mit einem enzymgebundenen, gegen humanes IgG gerichteten Sekundärantikörper detektiert, dann weiter isoliert und schließlich über DNA-Sequenzierung molekularbiologisch charakterisiert werden.

3.3.2. RAYS

Das RAYS (**R**ecombinant Antigen expression on **Y**east **S**urface) ist ein aus dem klassischen SEREX entwickeltes Verfahren, das im Gegensatz zum SEREX ein eukaryotisches Expressionssystem darstellt. Somit werden hier die exprimierten Antigene in ihrer nativen Faltung präsentiert bzw. typischen post-translationalen Modifikationen, wie Glycosylierung, Phosphorylierung, Methylierung etc. unterworfen und können in ihrer natürlichen Konformation untersucht werden [MISCHO et al., 2003]. Da der Expressions- und Transportmechanismus der Hefen auf post-translationaler Ebene dem menschlichen System sehr ähnlich ist, sind die Ergebnisse durchaus übertragbar [BODER et WITTRUP, 1997].

Hier werden die kodierenden Regionen der CT-Antigene NY-ESO-1, LAGE-1A, LAGE-1B, SSX-2, SSX-4, CT7 (AS 599-1143) und CT10 bzw. der NY-ESO-1-Fragmente über die Restriktionsschnittstellen EcoRI und Xho in den modifizierten pYD1-Hefevektor (Invitrogen, s. Abb. 1) kloniert. Dazu wird die Vektor-DNA zunächst durch entsprechende Restriktionsenzyme gespalten und anschließend das jeweilig zu inserierende Plasmid, dessen DNA zuvor mittels PCR generiert und sequenziert wurde, durch das Enzym Ligase eingefügt. Das jeweilige Antigen wird dann durch entsprechende Induktion auf der Hefeoberfläche exprimiert, wo es von in den Patientenseren vorhandenen Antikörpern detektiert werden kann.

Die Färbung erfolgt über ein gegen humanes IgG gerichteten Sekundärantikörper und ein fluoreszierendes Detektionsreagenz, dessen Fluoreszenzstärke mit Hilfe des FACScans gemessen wird. (s. Kapitel 3.9)

3.4. Hefeoberflächenexpressionsvektor pYD1 (Invitrogen)

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-reistance-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 Anfärbbarkeit wurden zusätzlich ein c-Myc-tag und ein weiterer Polyhistidine-tag (10xHis) eingefügt. Die genauen Änderungen sind den Abbildungen 1 und 2 zu entnehmen.

Das Kopplungsstück ist das AGA2-Gen der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, das für eine Untereinheit des α -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 einzuklonierenden 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 Galaktose 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*.

[INVITROGEN, pYD1 Yeast display vector kit]

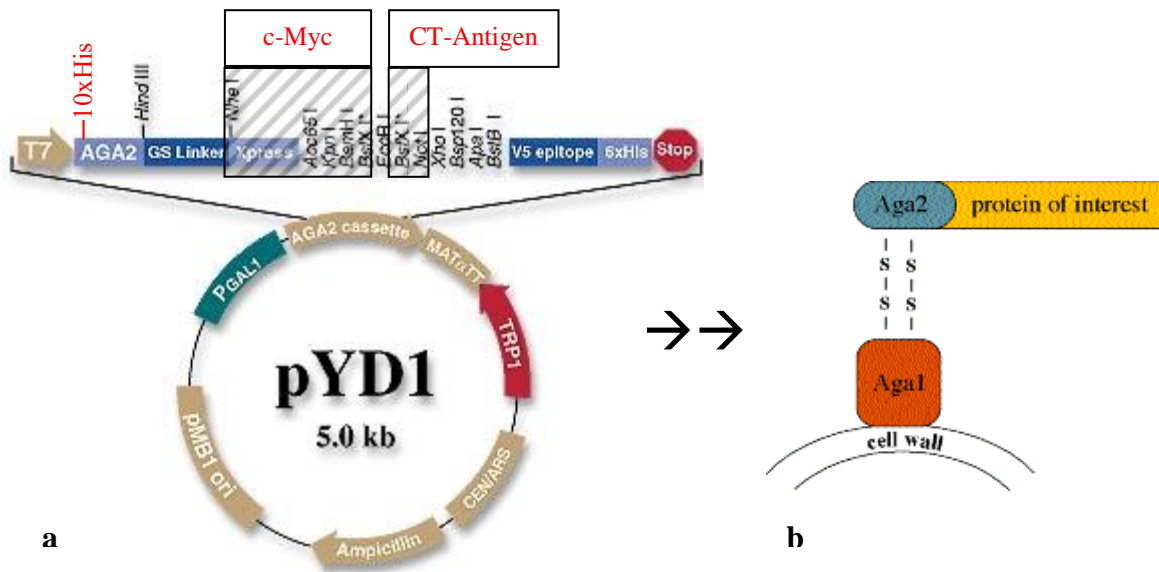


Abbildung 1: pYD1 Yeast display vector kit modifiziert

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-Antigen 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

3.5. Bearbeitung der Hefen

3.5.1. Herstellung kompetenter Hefen und Transformation

Hier wird das S.c. easyCompTM Transformation Kit von Invitrogen verwendet. Dies ist ein speziell für *Saccharomyces cerevisiae* entwickeltes Verfahren, das eine schnelle und einfache Retransformation zuvor gewonnener bakterieller Plasmide in diese Hefen erlaubt.

Hierzu wird zunächst eine Hefeübernachtkultur in YPD bis zu einer OD₆₀₀ von 3-5 angezogen, was der Phase des mittleren exponentiellen Wachstums und damit der vitalsten Phase der Zellen entspricht. Diese Kulturen werden anschließend auf eine OD₆₀₀ zwischen 0,2 und 0,4 verdünnt und wieder bis zu einer OD₆₀₀ zwischen 0,6 und 1 kultiviert. Dann wird die Suspension zentrifugiert (500 x g), der Überstand verworfen, die Suspension zum Waschen in Lösung I aufgenommen, erneut zentrifugiert und in 1 ml Lösung II resuspendiert. Diese Lösung enthält Lithium-Kationen und macht die Hefen ähnlich dem Verfahren bei Bakterien kompetent. Danach werden zu 30 µl der kompetenten Hefen 1 µl Vektor-DNA und 300 µl

Lösung III dazugegeben, alles gut vermischt und für 1 Stunde im 30 °C Wasserbad erwärmt, wobei die Proben alle 15 min gevortext werden müssen. Danach wird der gesamte Probeninhalt auf MD-LEU-Platten ausgestrichen und für 2-4 Tage im 30 °C Wärmeschrank inkubiert. Bei entsprechendem Wachstum können dann einzelne Klone gepickt, in 96-well-Platten in Galaktosemedium bei 20 °C für 3 Tage in einer Schüttelkultur induziert und die Induktion der Klone durch Anti-His-Färbung (Betrachtung unter Fluoreszenzmikroskop) nachgewiesen werden.

Die positiven Klone können dann direkt weiterverwendet oder als Glycerolstock langfristig haltbar gemacht werden.

3.5.2. Glycerolstock

Die Hefekultur wird hierzu in Glucose bei 30 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 herangezogen und anschließend mit 30% Glycerin versetzt. Die so vorbereiteten Proben können dann bei -80 °C aufbewahrt werden.

3.5.3. Hefekultivierung

Zunächst wird das YNB-CAA+Glucose-Medium mit der Hefe aus dem Glycerolstock angeimpft, die das entsprechende Antigen präsentiert, und für 24-48 h bei 30 °C unter Schütteln inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 2-5 erreicht ist. Danach werden die Hefen durch Zentrifugieren vom Glucose-Medium getrennt, mit PBS gereinigt und zur Induktion der Oberflächenproteine mit YNB-CAA+Galaktose-Medium auf eine OD₆₀₀ zwischen 0,6 und 1 verdünnt. Die Hefekulturen werden dann erneut für 2-4 Tage bei 20 °C unter Schütteln inkubiert.

3.6. Nachweis der Antigenpräsentation

3.6.1. Abspaltung und Fällung von Hefeoberflächenproteinen

Da die beiden Untereinheiten des Oberflächenproteins, das membranständige Aga1p und Aga2p, über Disulfidbrücken kovalent verknüpft sind, eignet sich das Reduktionsmittel β -Mercaptoethanol zur Abspaltung dieses Proteins. Dabei werden die Disulfide (Cystine) zu Sulfhydrylen (Cysteine) umgewandelt und das Oberflächenprotein in das Medium freigesetzt, woraus es mit Hilfe der Chloroform/Methanol-Fällung gewonnen werden kann. Dazu werden 200 μ l gereinigtes Hefe-Pellet mit 200 μ l β -Mercaptoethanol in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen vermischt (vortexen) und für eine Stunde auf dem Drehrad inkubiert. Danach werden die Proben zentrifugiert (5000 rpm für 10 min) und 200 μ l des Überstands in neue Reaktionsgefäße überführt. Dieser die Oberflächenproteine enthaltende Überstand wird anschließend mit 4 Volumen Methanol und 1 Volumen Chloroform gut vermischt, dann 3 Volumen ddH₂O dazugegeben und die Proben nochmals für 1 min kräftig geschüttelt. Nach Zentrifugation (8000 x g für 5 min) kann die obere wässrige Phase abpipettiert und verworfen werden; die untere Phase und die Interphase werden erneut mit 3 Volumen Methanol vermischt, zentrifugiert und der gesamte Überstand verworfen. Das Sediment der Proben wird über Nacht unter dem Abzug getrocknet.

3.6.2. Western-Blot

Um die abgespaltenen Proteine genauer zu charakterisieren wird hier der Western-Blot [TOWBIN et al., 1979] angewendet. Dabei werden aus Geweben oder Zellkulturen extrahierte Proteine im SDS-Page elektrophoretisch aufgetrennt und im elektrischen Feld auf Nitrocellulosemembran übertragen. Anschließend können die interessierenden Proteine durch Reaktion mit entsprechenden Antikörpern und Nutzung von Entwicklersystemen sichtbar gemacht werden.

3.6.3. Probenvorbereitung

Das bei der Fällung entstandene Sediment wird in 50 μ l Loadingpuffer aufgenommen, gut vermischt, für 5 min auf 95 °C erhitzt, nochmals gemischt und anschließend zentrifugiert

(13000 rpm für 2 min). Die Proben können dann bei Erreichen von Raumtemperatur direkt weiterverwendet oder weggefroren werden.

3.6.4. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)

SDS-Page ist ein Verfahren zur Auftrennung von Proteinen im elektrischen Feld [LAEMMLI, 1970]. Man macht sich hierbei die Eigenschaft des stark anionischen Detergenz SDS zu Nutze, sich proportional zum Molekulargewicht an denaturierte Polypeptide zu binden, um so eventuelle Ladungsunterschiede auszugleichen und nur das Gewicht Einfluss auf die Auftrennung nehmen zu lassen. Um die Auflösung der Gele zu erhöhen, werden Zwei-Phasen-Gele verwendet, die aus einem Sammelgel, in dem sich die SDS-Polypeptidkomplexe ausrichten, und einem Trenngel, in dem die eigentliche Auftrennung stattfindet, bestehen [KING und LAEMMLI, 1971].

Hier wird nach Standardprotokoll ein 10% SDS-Page gegossen, dieses nach der Polymerisation zwischen zwei Glasplatten in die Elektrophoresekammer eingespannt und die Kammer mit Laemmli-Elektrodenpuffer geflutet. Eine Tasche des Gels wird mit 5 µl Proteinlängenmarker, die übrigen Taschen mit 25 µl der vorbereiteten Proben geladen. Zunächst wird die Ausrichtung der Proteine im Sammelgel bei 10 mA abgewartet, dann die eigentliche Elektrophorese bei 20 mA durchgeführt. Bei Erreichen des unteren Gelendes durch die Blaufront wird die Elektrophorese beendet.

3.6.5. Proteintransfer

Nach dem Gellauf wird das Sammelgel vom Trenngel abgetrennt und die im Trenngel aufgetrennten Proteine durch das Semi-dry-Verfahren [TOWBIN et al. 1979] auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Dazu wird das Gel glatt auf die in Methanol vorinkubierte und anschließend in Transferpuffer getränkte PVDF-Membran (Millipore) gelegt, von oben und unten mit 1-2 Lagen des in Transferpuffer getränkten Filterpapiers bedeckt und in die Blotkammer (Trans-Blot SD[®] Semi-dry Transfer Cell, BIO-RAD, München) eingespannt. Bei einer Spannung von 21 V für 45 min werden die Proteine vom SDS-Page auf die Nitrozellulosemembran übertragen.

3.6.6. Färbung/Entwicklung

Nach Beendigung des Transfers wird die Membran zum Blocken über Nacht bei 4 °C in 5% Magermilch/PBS inkubiert um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Danach wird die Membran jeweils für 5 min zweimal in PBS-T (0,05% Tween20 in PBS) und einmal in PBS gewaschen und anschließend für 45 min bei Raumtemperatur mit dem Primärantikörper α -c-Myc, 1:500 in 1% Magermilch/PBS verdünnt, inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift (s.o.) erfolgt die Inkubation mit dem Sekundärantikörper α -Mouse-HRP, 1:3000 in 1% Magermilch/PBS verdünnt, ebenfalls für 45 min bei Raumtemperatur. Daraufhin werden die Blots erneut gewaschen.

Die Entwicklung erfolgt mit Hilfe des ECL-Kit (Amersham) nach Angaben des Herstellers. Durch Auflegen eines Röntgenfilms und anschließender Entwicklung bzw. Fixierung desselben können dann darauf die Proteinbanden sichtbar gemacht werden.

3.7. Seren

3.7.1. Herkunft der Seren

Die Seren stammen aus der NY-ESO-1-Iscomatrix-Studie des Ludwig Institute for Cancer Research in Melbourne. 46 Patienten mit NY-ESO-1-exprimierenden Tumoren (hauptsächlich Melanome) wurden adjuvant mit der NY-ESO-1/Iscomatrix-Vakzine behandelt. Die Impfung wurde dreimal in vierwöchentlichem Abstand intramuskulär injiziert. Blutentnahmen fanden am Tag der ersten Impfung (Tag 0), zwei Wochen nach jeder Impfung (Tag 14, 42, 70) und abschließend vier Wochen nach der letzten Impfung (Tag 84) statt. Insgesamt wurden 230 Seren in der Studie ausgewertet.

Die Patienten wurden in vier Kohorten eingeteilt: Je drei Patienten gehörten der Kohorten A und B an, je zwanzig der Kohorten C und D, wobei je zehn Patienten HLA-A2+ und zehn HLA-A2- waren. Eine fünfte Kohorte „Placebo“ wurde durch insgesamt acht randomisierte Patienten der Kohorten C und D (je zwei HLA-A2+ und zwei HLA-A2- pro Kohorte) gebildet.

Die Kohorten A, B und C erhielten 10, 30 bzw. 100 μ g NY-ESO-1-Protein entsprechend kombiniert mit 12, 36 bzw. 100 μ g des Adjuvanz Iscomatrix (A:10+IMX, B:30+IMX, C:100+IMX), Kohorte D nur 100 μ g des reinen NY-ESO-1-Proteins (D: Protein 100 alone). Die Placebogruppe erhielt nur sterile Kochsalzlösung. [DAVIS et al., PNAS 2004]

3.7.2. Vorbereitung der Patientenseren

Da Hefen in unserer Umwelt weit verbreitet sind und das menschliche Immunsystem entsprechend Antikörper gegen Oberflächenproteine der Hefen gebildet haben könnte, ist es wichtig, diese unspezifischen Antikörper vorher aus den Seren zu entfernen. Dadurch können falsch positive Ergebnisse und der Gesamthintergrund in der FACS-Analyse minimiert werden.

Eine Aufreinigung der Patientenseren erfolgt daher durch Präabsorption mit induzierten Hefen, die den Leervektor pYD1 exprimieren.

Dafür wird das mit PBS 1:50 verdünnte Serum mit gereinigter Leervektorhefe des ungefähr selben Volumens für 24 h bei 4°C unter Rotation inkubiert. Anschließend werden die 1,5 ml Reaktionsgefäße bei 5000 U/min abzentrifugiert, der Überstand, der das präabsorbierte Serum enthält, in neue Reaktionsgefäße überführt und mit PBS-Azid 0,2% auf 1:100 verdünnt.

3.8. Screening der Patientenseren

Zum Nachweis einer Immunantwort wird hier das RAYS (s. Kapitel 3.2.) eingesetzt.

3.8.1. Immunfluoreszenzfärbung von Hefen

Die Immunfluoreszenzfärbung wird hier eingesetzt, um die Induktion der Hefen nachzuweisen und in den Patientenseren vorhandene Antikörper zu detektieren. Das Prinzip ist hierbei das gleiche: Zunächst wird die Hefe mit dem Primärantikörper inkubiert, der gegen einen Teil des exprimierten Oberflächenproteins gerichtet ist (p-his oder Patientenserum), dann mit dem Sekundärantikörper, der gegen das Fc-Fragment des Primärantikörpers gerichtet und biotinyliert ist (α -M-IgG-b oder α -Hum-IgG-b), und schließlich mit dem Detektionsreagenz Streptavidin, das an Biotin bindet und an das fluoreszierende Phycoerythrin gekoppelt ist (Strep-PE).

Bei der Färbung der IgG-Subklassen sind 3 Antikörper und das Detektionsreagenz notwendig (1. Serum, 2. α -IgG1/2/3/4-Sheep, 3. α -Sheep-IgG-b, 4. Strep-PE), da zwischen der Reaktion mit dem Primär- und dem Sekundärantikörper die einzelnen Subklassen detektiert werden müssen; die sonstigen Schritte sind die gleichen.

Die benutzten Antikörper sind in Tabelle 2 nach Färbung mit Herstellerangabe aufgelistet.

Tabelle 2: Benutzte Antikörper

	Induktionsnachweis	Färbung der Seren	Färbung der IgG-Subklassen
Primär-antikörper	<u>Quiagen:</u> Anti-Penta-His (1:400)	Serum (1:100)	Serum (1:100)
Sekundär-antikörper	<u>Jackson Immuno Research:</u> Biotin-SP-conjugated Affini Pure F(ab') ₂ Fragment goat, Anti-Mouse IgG (H+L) (1:200)	<u>Jackson Immuno Research:</u> Biotin-SP-conjugated Affini Pure Mouse Anti-Human-IgG, Fcγ-specific (1:200)	<u>The Binding Site:</u> Anti-Human-IgG1-AFF Anti-Human-IgG2-AFF Anti-Human-IgG3-AFF Anti-Human-IgG4-AFF (1:200)
Tertiär-antikörper bzw. Detektionsreagenz	<u>Jackson Immuno Research:</u> R-Phycoerythrin-conjugated Streptavidin (1:200)	<u>Jackson Immuno Research:</u> R-Phycoerythrin-conjugated Streptavidin (1:200)	<u>Jackson Immuno Research:</u> Biotin-SP-conjugated Affini Pure Rabbit Anti-sheep IgG (H+L) (1:200)
Detektionsreagenz	—	—	<u>Jackson Immuno Research:</u> R-Phycoerythrin-conjugated Streptavidin (1:200)

Zunächst werden je well 5-10 µl der induzierten Hefe in 96-well-Platten pipettiert, dann einmal mit 200 µl PBS pro well gewaschen (2000 U/min für 5 min). Anschließend werden 30 µl des Primärantikörpers (p-His, Verdünnung 1:400 oder präabsorbiertes Serum, Verdünnung 1:100) aufgetragen, durch Vortexen mit der Hefe gemischt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach abermaligem Waschen folgen 30 µl des Sekundärantikörpers (α-M-IgG-b, Verdünnung 1:200 oder α-Hum-IgG-b, Fcγ-spec., Verdünnung 1:200), dann 30 µl des Detektionsreagenz (Strep-PE, Verdünnung 1:200), beide ebenfalls für 20 min bei Raumtemperatur, die Inkubation mit Strep-PE erfolgt jedoch abgedunkelt.

Die Färbung der Subklassen erfolgt ebenso, wobei das Serum 1:100, die Antikörper α-IgG1/2/3/4-Sheep, α-Sheep-IgG-b und Strep-PE 1:200 verdünnt werden.

Nach dem letzten Färbeschritt werden die gewaschenen und gefärbten Hefen mit 200 µl PBS abpipettiert und in FACS-Röhrchen überführt.

3.8.2. FACS-Messung und Auswertung durch WinMDI

Die in die Falcons überführten Proben werden 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 wird das Programm WinMDI®, Version 2.8 benutzt. Die Messung im Forward-Scatter wird in Dotplots und Histogrammen dargestellt. Zur Minimierung von Hintergrundleuchten durch Zelldetritus oder andere störende Einflüsse wird ein Gate gesetzt und vom Programm ein entsprechender g-mean als Ausdruck der Fluoreszenzstärke errechnet. Um die Reaktion auf die Hefe an sich herauszufiltern wird die Ratio aus dem Quotienten g-mean (antigenpräsentierende Hefe) / g-mean (Leervektor) ermittelt. Ab einer Ratio ≥ 2 wird die Probe als positiv bewertet.

4. Ergebnisse

4.1. Studienaufbau

Es wurden insgesamt 46 Patienten in die Studie aufgenommen. Sie hatten nach chirurgischer Resektion eines NY-ESO-1 exprimierenden Tumors (hauptsächlich Melanome) nur noch minimale oder keine Tumorresiduen und erhielten als adjuvante Therapie drei intramuskuläre Impfungen in vierwöchentlichem Abstand. Der Impfstoff bestand je nach Kohorte nur aus rekombinantem NY-ESO-1-Protein oder aus einer Kombination mit dem auf Saponin basierenden Adjuvanz ISCOMATRIX™ (IMX). Zu bestimmten Zeitpunkten vor und nach den Impfungen wurde den Patienten Blut entnommen; letztendlich gingen 230 Seren in die Studie ein. [DAVIS et al., 2004]

4.2. CT-Antigen-Expression auf Hefeoberfläche und Detektion durch humanes Serum

Diese 230 Seren wurden mit Hilfe der RAYS-Methode, einer Weiterentwicklung der bekannten SEREX-Technologie, untersucht. 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 [MISCHO et al., Cancer Immun. 2003]. Im Einzelnen wurden hier die CT-Antigene NY-ESO-1 Volllänge (1-180), NY-ESO-1 trunkiert (1-134), LAGE-1A, LAGE-1B, SSX-2, SSX-4 und teilweise CT7 und CT10 betrachtet. Die NY-ESO-1 VL-positiven Seren wurden anschließend noch auf die Reaktion gegen einzelne Fragmente des Antigens untersucht. (s. Kapitel 4.4.)

4.2.1. Nachweis der Antigenexpression

Die CT-Antigene bzw. Fragmente waren jeweils in den pYD1-Expressionsvektor einkloniert worden, sodass sie nach Induktion der Hefen auf der Zelloberfläche nachweisbar waren. Zur Überprüfung wurden die unter reduzierenden Bedingungen von der Zelloberfläche abgespaltenen Proteine im Westernblot dargestellt. Die Entwicklung des Blots erfolgte über den Myc-Tag mittels eines Anti-c-Myc-Antikörpers (9E10) (s. Abb.2).

Wegen der starken Glykosylierung der hefeexprimierenden Proteine lag das erreichte Molekulargewicht der einzelnen Proteine im Westernblot deutlich über dem jeweils errechneten Wert. Anhand des bekannten Gewichts des AGA-2-Proteins der Hefe und der möglichen N- bzw. O-Glykosylierungsstellen ließen sich die Molekulargewichte der verschiedenen Proteine jedoch abschätzen und somit eindeutig zuordnen.

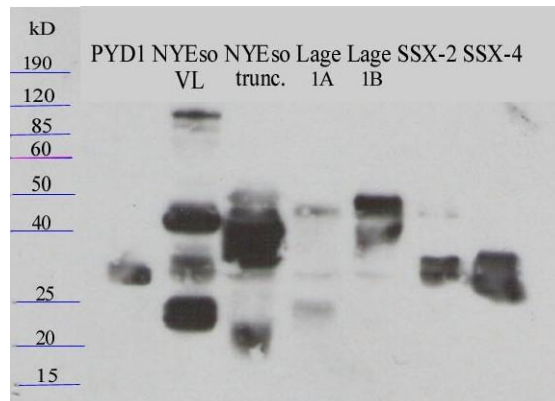


Abb.2: Expressionsnachweis des Vektors pYD1 und der darüber präsentierten CT-Antigene NY-ESO-1 Volllänge, NY-ESO-1 trunziert., LAGE-1A, LAGE-1B, SSX-2 und SSX-4. Westernblot, Entwicklung über anti-c-Myc-Antikörper, Angabe des Molekulargewichts in Kilodalton.

4.2.2. Induktion der antigenpräsentierenden Hefen

Die Hefen wurden zunächst in Glucose-Medium kultiviert und anschließend in Galaktose-Medium induziert. Die Induktion wurde durch eine Anti-His-Färbung des im Expressionsvektor enthaltenen His-Tags per Durchflusszytometrie/FACS-Messung nachgewiesen.

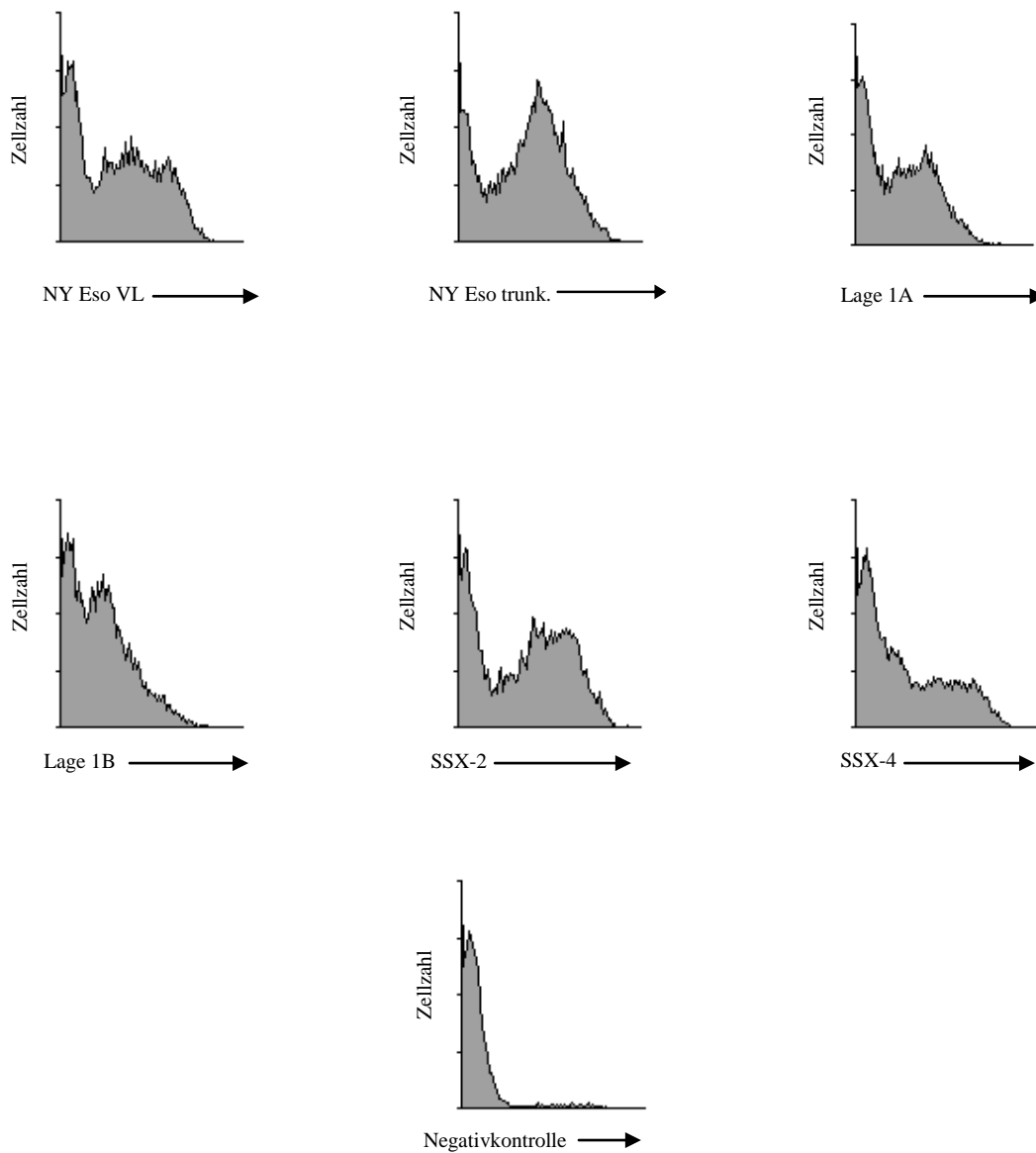


Abb.3: Induktionsnachweis. Histogramme der FACS-Messungen der induzierten Hefen NY-ESO-1 Volllänge, NY-ESO-1 trunziert, LAGE-1A, LAGE-1B, SSX-2, SSX-4 und einer Negativkontrolle.

4.2.3. Detektion der CT-Antigene durch humanes Serum

Die induzierten Hefen wurden jeweils mit den präabsorbierten Patientenserum inkubiert und über einen biotinylierten Anti-Human-IgG-Antikörper an einen Streptavidin-gekoppelten fluoreszierenden Farbstoff gebunden, wodurch die Reaktion per Durchflusszytometrie gemessen werden konnte. Ein Serum wurde dann als positiv bezeichnet, wenn die Ratio, d. h., 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. Dieser cut-off Wert wurde bereits in unseren vorangegangenen Studien [MISCHO et al., 2003; WADLE et al., 2005; WADLE et al., 2006] und auch in anderen Forschungsgruppen [KIM et al., 2007] erfolgreich etabliert.

$$\text{Ratio} = \frac{\text{g-mean (Antigen)}}{\text{g-mean (Leervektor)}} \rightarrow \text{positiv, wenn } > 2$$

Einige positive Seren sind als Beispiel in Abbildung 4 dargestellt.

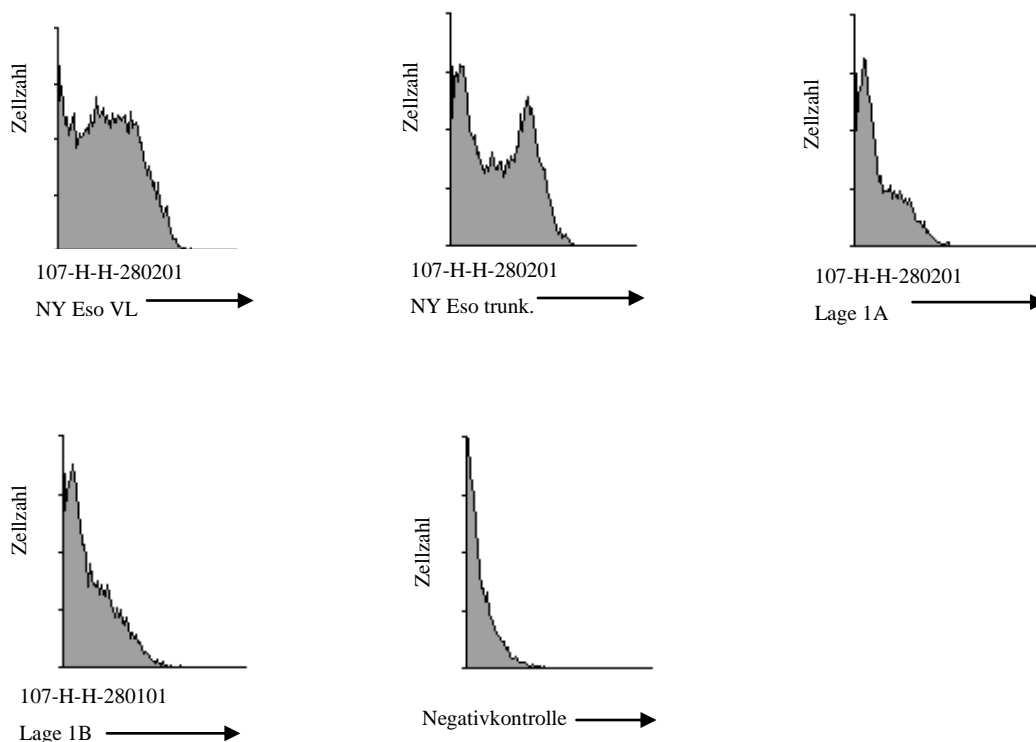


Abb. 4: Serum 107-H-H-280201 als Beispiel einer positiven Serumantwort: Histogramme der FACS-Messungen auf NY-ESO-1 VL, NY-ESO-1 trunkiert, LAGE-1A und LAGE-1B; Negativkontrolle.

4.3. Ergebnisse der Serumfärbung

Die Seren der ersten 10 Patienten (49 Seren) waren zusätzlich auf die Antigene CT7 und CT10 getestet worden. Da jedoch keine positive Antwort nachweisbar war, wurde von einer Testung der weiteren Seren abgesehen (Daten nicht abgebildet).

Auf die ebenfalls nicht homologen Antigene der SSX-Familie konnten insgesamt sechs positive Seren auf SSX-2 gefunden werden, jedoch keine auf SSX-4. Ein Patient (139-BJC) zeigte dabei durchgehend eine deutliche Immunantwort auf SSX-2, die im Verlauf rückläufig war. Ein weiterer Patient zeigte erst nach Beendigung der Vakzinierung eine positive Reaktion. Diese Patienten entwickelten jedoch keine Immunantwort auf NY-ESO-1 oder ein anderes getestetes CT-Antigen.

Wie zu erwarten, konnte am häufigsten eine Antikörperentwicklung gegen NY-ESO-1 VL nachgewiesen werden. Insgesamt reagierten 78 Seren positiv auf NY-ESO-1 VL, 40 Seren auf NY-ESO-1 trunkiert, 22 Seren auf LAGE-1A und 18 Seren auf LAGE-1B (s.Abb.5). Eine positive Reaktion auf NY-ESO-1 trunkiert, LAGE-1A und LAGE-1B fand sich nur bei gleichzeitiger Immunantwort auf NY-ESO-1 VL.

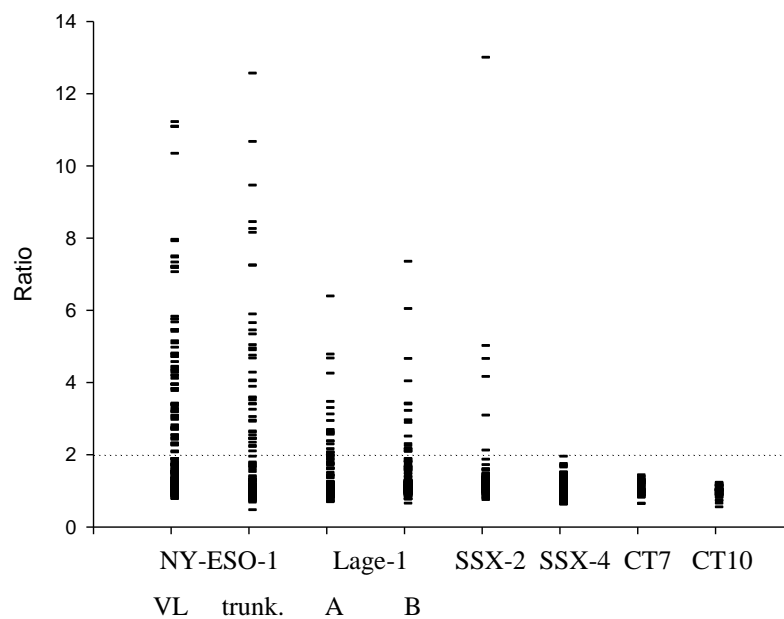


Abb.5: Antikörperantwort auf NY-ESO-1 VL, NY-ESO-1 trunkiert, Lage-1A, Lage-1B, SSX-2, SSX-4, CT7 und CT10. Y-Achse: Darstellung der Fluoreszenzstärke der Serumfärbung anhand der Ratio.

Auffällig war hierbei, dass alle positiven Seren aus den Kohorten A, B und C, d. h. aus den Gruppen, in denen der Impfstoff in Kombination mit dem Adjuvanz ISCOM verabreicht worden war, stammten. Aus den Kohorten D und E, d. h. Impfung nur mit Protein oder Placebo, reagierte kein einziges Serum positiv auf NY-ESO-1- oder LAGE-1-Antigene. Der Verlauf der Immunreaktion gegen NY-ESO-1 VL in den verschiedenen Kohorten ist in Abbildung 6 dargestellt.

Die Kohorten A, B und C unterschieden sich in der Dosis des Impfstoffes, der von 10 µg über 30 µg auf 100 µg Protein + IMX gesteigert worden war. Hier ließ sich anhand von Häufigkeit und Stärke der Serumreaktionen keine eindeutige Dosisabhängigkeit erkennen. Allerdings kam es in der Kohorte C wesentlich häufiger im Verlauf zu Antikörperentwicklung gegen NY-ESO-1 trunkiert, LAGE-1A und LAGE-1B, was auf die höhere Dosis zurückgeführt werden könnte.

Acht Patienten hatten bereits eine vorbestehende Immunantwort mindestens gegen NY-ESO-1 VL. Bei vier dieser Patienten bestand nur eine Reaktion gegen NY-ESO-1 VL, die sich im Verlauf der Vakzinierung nicht oder nur wenig änderte. Die anderen vier Patienten zeigten im Verlauf eine Steigerung der Immunreaktion und eine Zunahme der Kreuzreaktivität.

Nach Beendigung der Vakzinierung kam es teilweise zu einer Abschwächung der Immunantwort. Bei einigen Patienten kam es jedoch auch danach noch zu einer weiteren, teilweise sogar deutlichen Steigerung der Immunreaktion (s. Abb.6).

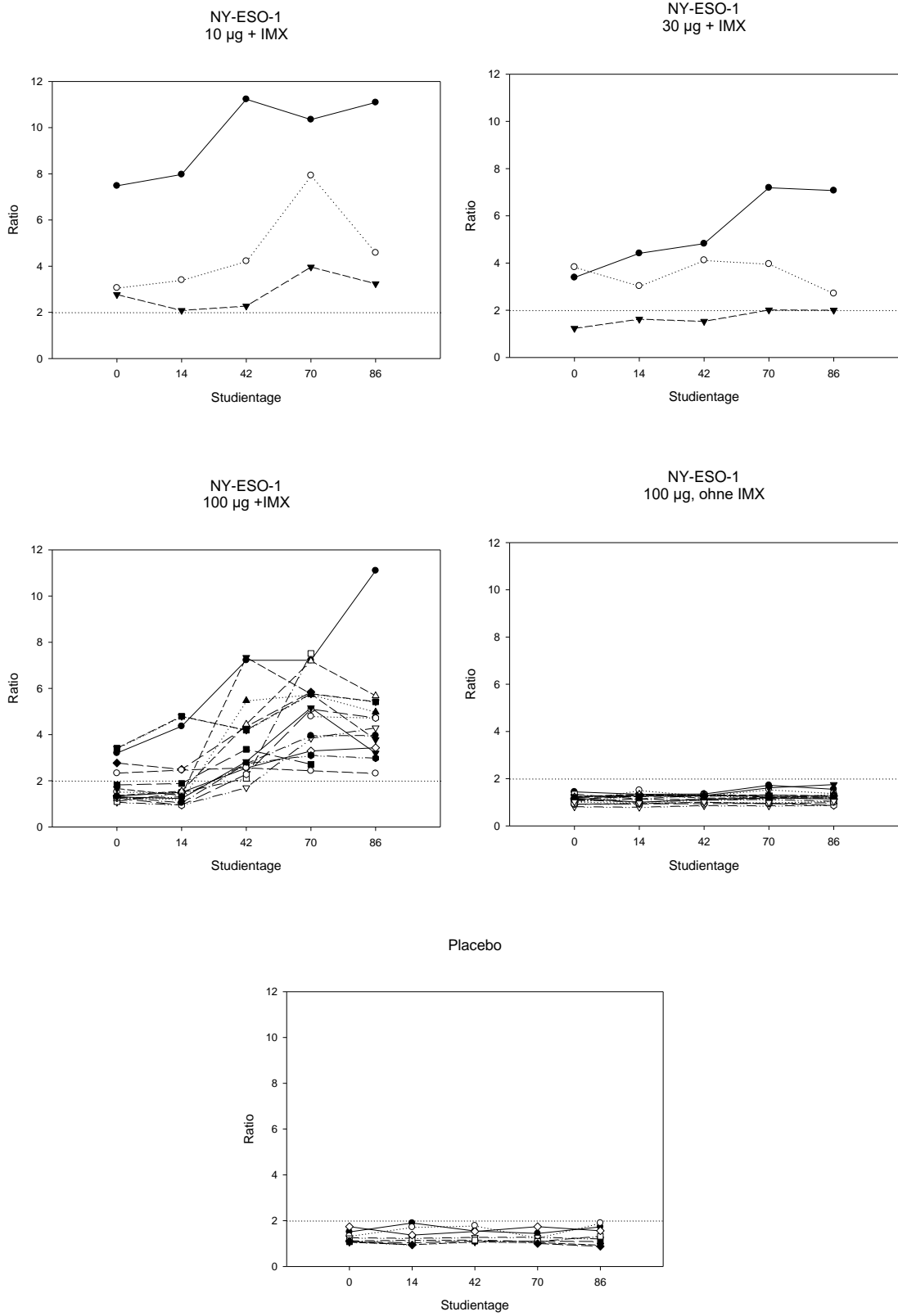


Abb.6: Verlauf der Immunreaktion gegen NY-ESO-1 VL innerhalb der verschiedenen Kohorten. Kohorte A: 10 µg Prot.+ISCOM, B: 30 µg Prot.+ISCOM, C: 100 µg Prot.+ISCOM, D: 100 µg reines Protein, E: Placebo.

4.3.2. Zusammenfassung der Korrelationen

1. Positive Reaktionen auf die Antigene NY-ESO-1 trunkiert, LAGE-1A und LAGE-1B fanden sich nur bei gleichzeitiger Reaktion auf NY-ESO-1 VL.
2. Insgesamt bestand eine sehr hohe Korrelation zwischen den Antigenen NY-ESO-1 trunkiert, LAGE-1A und LAGE-1B. So fand sich eine positive Reaktion auf die beiden LAGE-Antigene nur bei gleichzeitiger, insbesondere stark positiver, Reaktion auf NY-ESO-1 trunkiert.
3. Im Verlauf der Vakzinierung kam es zu einer Zunahme der Immunantwort und der Kreuzreaktivität.
4. Dosisabhängigkeit der Entwicklung von Kreuzreaktivität (s. auch Kap.4.4.1.; Abb.9).
5. Nach Beendigung der Vakzinierung kam es teilweise zu einer Abschwächung der Immunantwort. Bei einigen Patienten kam es jedoch auch danach noch zu einer weiteren, teilweise sogar deutlichen Steigerung der Immunreaktion (s. Abb.6).

4.4. NY-ESO-1-Fragmente

Um die für die humorale Immunantwort gegen NY-ESO-1 wichtigen Epitope zu identifizieren, wurden die auf NY-ESO-1 VL-positiven Seren zusätzlich zu NY-ESO-1 trunziert auf weitere Fragmente dieses CT-Antigens getestet. Im Einzelnen waren dies die Fragmente 1-80, 1-119, 1-153, 8-134 (= trunziert), 67-129, 67-180, 100-153, 105-180 und 139-180 (s. Abb.7).

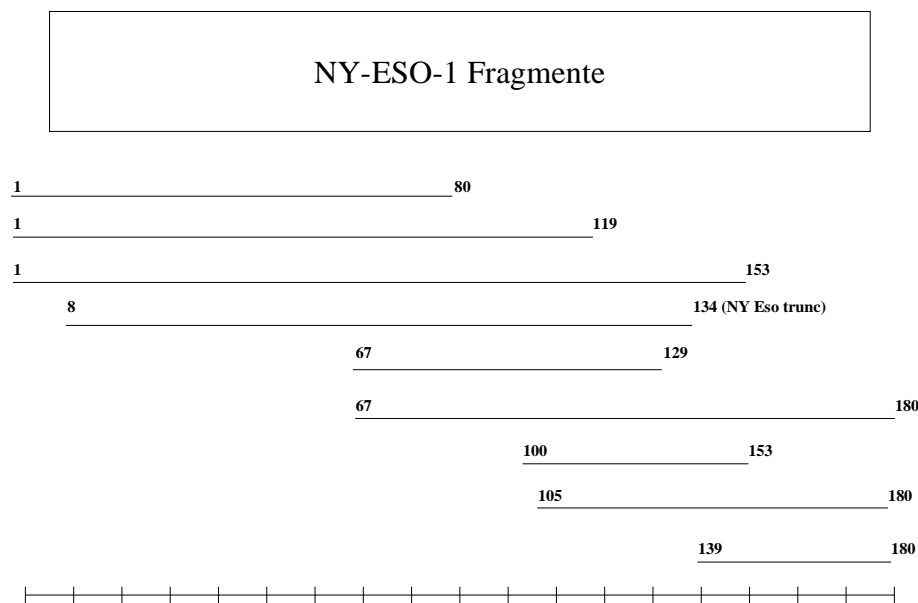


Abb.7: **NY-ESO-1-Fragmente.** Darstellung der jeweils exprimierten Aminosäuresequenz. Volllänge NY-ESO-1 = AS 1-180.

Der Expressionsnachweis der NY-ESO-1-Fragmente über Westernblot und der Nachweis der Induktion der antigenpräsentierenden Hefen durch Penta-His-Färbung und Durchflusszytometrie wurde – wie in Kapitel 4.2.1 und 4.2.2. beschrieben – analog zu den anderen CT-Antigenen durchgeführt (Daten nicht abgebildet).

4.4.1. Ergebnisse der Serumfärbung

Insgesamt zeigte sich eine Bindung an den N-terminalen Anteil des Proteins, wobei Stärke und Häufigkeit der Reaktion mit Zunahme der Fragmentlänge nachließen.

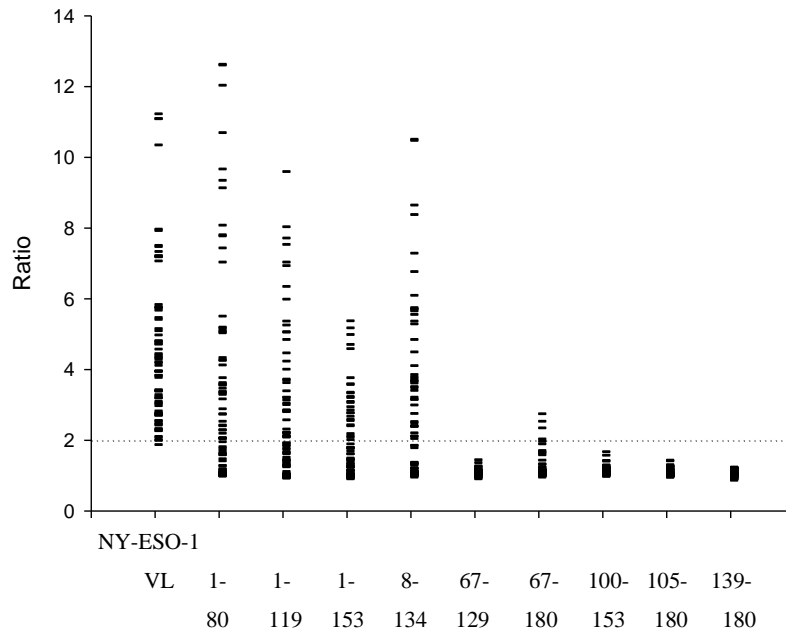


Abb.8: Antikörperantwort auf NY-ESO-1 VL und NY-ESO-1-Fragmente. Y-Achse: Darstellung der Fluoreszenzstärke der Serumfärbung anhand der Ratio.

Von den 78 Seren zeigten 47 eine Immunantwort gegen das NY-ESO-1 - Fragment 1-80. Bei fünf Seren war dies die einzig positive Reaktion auf ein Fragment, alle weiteren reagierten ebenfalls positiv auf das Fragment 1-119. Von diesen 38 Seren zeigten bis auf zwei Seren eines Patienten alle auch eine Antikörperbildung gegen NY-ESO-1 trunkiert (8-134). 27 der NY-ESO-1-positiven Seren reagierten weiterhin auf Fragment 1-153.

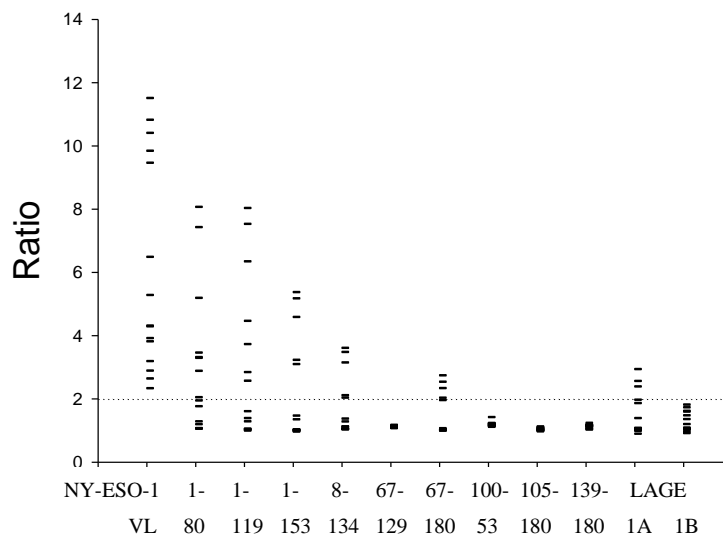
Ein einziger Patient (101-MEM) reagierte mit allen fünf Seren zusätzlich auf das Fragment 67-180. Dies war ein Patient, der bereits vorbestehende Antikörper sowohl gegen NY-ESO-1 VL, als auch gegen die bereits aufgeführten Fragmente aufwies.

Vorbestehende Antikörper gegen einzelne Fragmente (1-80, 1-119, 1-153, 8-134 = trunkiert) fanden sich bei einem weiteren Patienten (129-RJS) mit vorbestehender Immunreaktion gegen NY-ESO-1 VL. Alle anderen Patienten mit vorbestehenden Antikörpern zeigten erst im Verlauf der Vakzinierung eine Reaktion gegen mindestens ein weiteres Fragment.

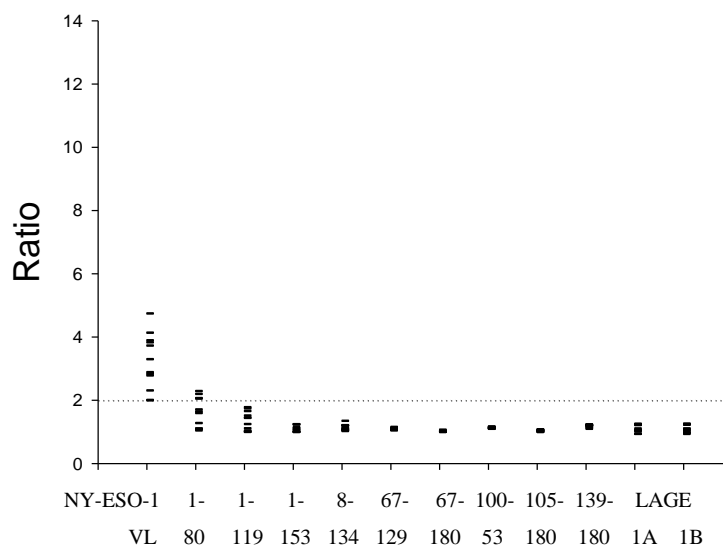
Gegen die Fragmente 67-129, 100-153, 105-180 und 139-180 ließ sich keine Antikörperbildung nachweisen.

Ähnlich wie es bereits bei der Kreuzreaktivität zwischen NY-ESO-1 VL, NY-ESO-1 trunkiert und den LAGE-1-Antigenen aufgefallen war, ließ sich eine eindeutige Dosisabhängigkeit der Antikörperbildung vor allem gegen längere Fragmente nachweisen. So reagierten die Patienten der Kohorte A mit Ausnahme des Patienten 101-MEM (siehe oben) nur auf die Fragmente 1-80 und 1-119, die Patienten der Kohorte B nur auf das Fragment 1-80. Die Patienten der Kohorte C hingegen reagierten bis auf einen Patienten (124-AMB), dessen Seren auch keine positive Reaktion auf NY-ESO-1 VL zeigten, fast alle positiv auf die Fragmente 1-80, 1-119, 8-134 = trunkiert und meistens auch 1-153 (s. Abb.9).

Kohorte A



Kohorte B



Kohorte C

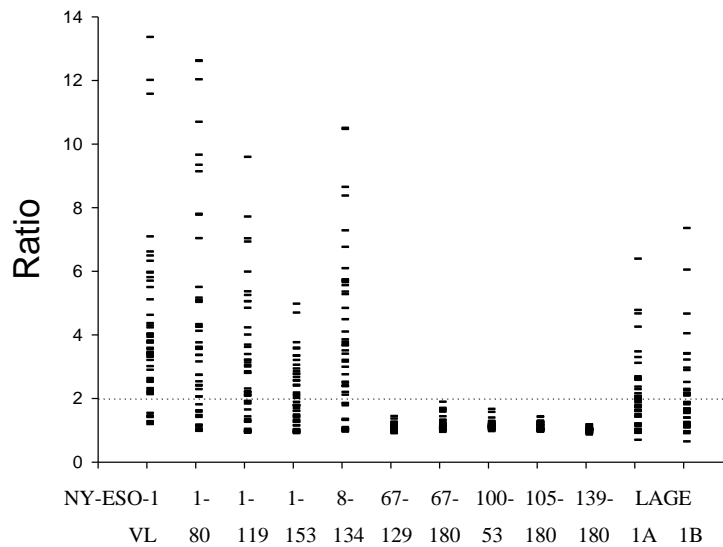


Abb. 9: Antikörperantwort auf NY-ESO-1-Fragmente und Kreuzreaktivität zu LAGE-1A und -1B der verschiedenen Patientenkohorten. Antikörperantwort der verschiedenen Versuchskohorten mit ISCOMATRIX auf NY-ESO-1-VL und NY-ESO-1-Fragmente und LAGE-1A und -1B. Y-Achse: Darstellung der Fluoreszenzstärke der Serumfärbung anhand der Ratio.

4.4.2. Zusammenfassung der Korrelationen

1. Bindung erfolgt fast ausschließlich an den N-Terminus des Proteins.
2. Bei positiver Reaktion auf ein längeres Fragment bestand immer auch eine positive Reaktion auf das bzw. die kürzere/n Fragment/e. Das bedeutet, dass eine positive Immunantwort auf NY-ESO-1 trunkiert hundertprozentig mit einer positiven Immunantwort auf die NY-ESO-1-Fragmente 1-80 und 1-119 korrelierte.
3. Hohe Korrelation zwischen Reaktionsstärke auf NY-ESO-1 VL und Reaktion auf NY-ESO-1-Fragmente. Schwach positive Seren reagierten eher selten auf einzelne Fragmente, insbesondere nicht auf längere; stark positive hingegen meistens.
4. Dosisabhängigkeit der zusätzlichen Antikörperbildung gegen einzelne Fragmente (s. 4.3.2., Punkt 4; Abb.9).
5. Hohe Korrelation zwischen Reaktion auf NY-ESO-1 trunkiert und Reaktion auf LAGE-Antigene (s. 4.3.2., Punkt 2).

6. Antikörperbildung gegen einzelne Fragmente im Verlauf der Vakzinierung. Diese war bei vorbestehenden NY-ESO-1 VL-Antikörpern meist ab der dritten Blutentnahme nachweisbar, ansonsten zeitgleiche Induktion einer Immunantwort gegen NY-ESO-1 VL und -Fragmente. Ebenso kam es bei einer Reaktion gegen mehrere Fragmente zu einer zeitgleichen Bildung der Antikörper.
7. Im Verlauf der Vakzinierung kam es zu einer Zunahme der Immunantwort, nach deren Beendigung jedoch teilweise wieder zu einer Abschwächung.

4.5. IgG-Subklassen

Die NY-ESO-1 VL-positiven Seren, die weiter auf einzelne Fragmente des CT-Antigens getestet worden waren, wurden zusätzlich einer IgG-Subklassenanalyse unterzogen. Damit sollte die Bevorzugung einer bestimmten Subklasse bei der durch die Vakzinierung induzierten Antikörperbildung überprüft werden. In einer von MARASKOVSKY et al. durchgeführten Studie waren in mit einer NY-ESO-1/ISCOMATRIX-Vakzine behandelten C57BL/6-Mäusen deutlich höhere IgG2a-(300fach) und etwas höhere IgG1-Titer (8fach) nachgewiesen worden [MARASKOVSKY et al., 2004].

Betrachtet wurden hier die Subklassen 1, 2, 3 und 4 der Immunglobuline der Klasse G.

4.5.1. Serumfärbung

Die Färbung der IgG-Subklassen wurde ähnlich der Färbung der CT-Antigene vorgenommen. Die NY-ESO-1 VL-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 per Durchflusszytometrie. Ein Serum wurde dann als positiv bezeichnet, wenn die Ratio, d. h. der Quotient aus dem g-mean-Wert der subklassenspezifischen Reaktion des Serums mit der NY-ESO-1 VL-präsentierenden Hefe und dem g-mean-Wert der subklassenspezifischen Reaktion des Serums mit dem Leervektor größer als zwei war.

$$\text{Ratio} = \frac{\text{g-mean (NY-ESO-1 VL + anti-IgG1/2/3/4)}}{\text{g-mean (pYD1 + anti-IgG1/2/3/4)}}$$

→ positiv, wenn > 2

4.5.2. Subklassenanalyse

Es fand sich fast ausschließlich eine Reaktion der Subklasse IgG1. Bis auf den Patienten 124-AMB, der bereits durch eine fehlende Immunantwort auf NY-ESO-1 VL aufgefallen war, zeigten alle eine Bildung von Antikörpern der Subklasse IgG1. Dieser Patient 124-AMB zeigte eher eine IgG2-Antwort. Außer diesem wiesen vier weitere Patienten vereinzelt IgG2-Antworten auf (insgesamt 5 Seren); positive Reaktionen auf IgG3 fanden sich bei sechs Patienten (insgesamt 12 Seren). Ein Patient (101-MEM) mit vorbestehenden Antikörpern gegen NY-ESO-1 VL und die Fragmente 1-80, 1-119, 1-153, 8-134 (= trunk.) und 67-180 bildete zusätzlich zu IgG1-Antikörpern vereinzelt IgG2- und IgG3-Antikörper und durchgehend IgG4-Antikörper.

Im Vergleich zu den IgG1-Antikörpern, die zum Teil recht deutlich positiv reagierten, fielen die Reaktionen der Subklassen IgG2, IgG3 und IgG4 eher schwach positiv aus (s. Abb.10).

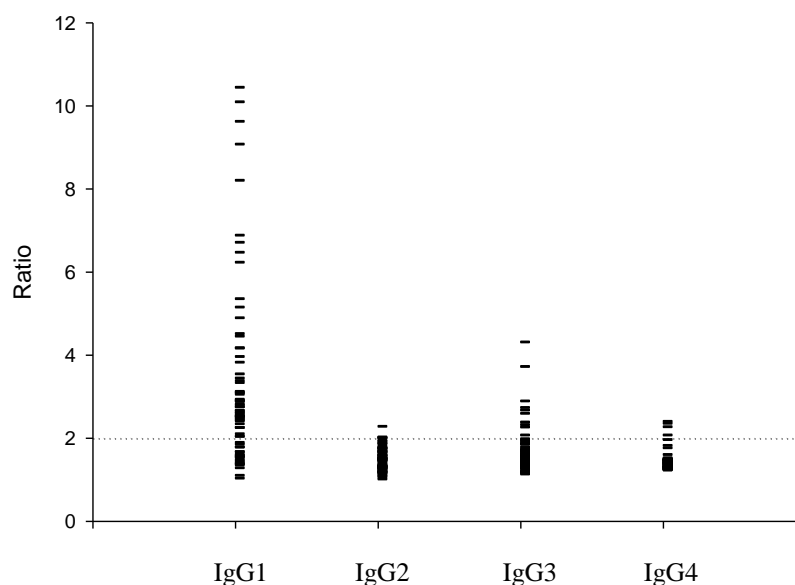


Abb.10: Subklassenanalyse der NY-ESO-1 VL-Antikörperantwort. Y-Achse: Darstellung der Fluoreszenzstärke der Serumfärbung anhand der Ratio.

5. Diskussion

Die Identifizierung bestimmter CT-Antigene als tumorspezifische Strukturen hat in den letzten Jahren zur Entwicklung der Vakzinierungstherapie als adjuvante Therapiemaßnahme bei bestimmten Krebserkrankungen geführt.

Voraussetzung für eine solche Vakzinierung ist, dass der entsprechende Tumor CT-Antigene exprimiert, was häufig erst in einem fortgeschrittenen Stadium – besonders nach Metastasierung [BRASSEUR et al., 1995; GOYDOS et al., 2001] – der Fall ist. Am häufigsten finden sich CT-Antigene in Melanomen, Sarkomen, dem Bronchialkarzinom, Mammakarzinom, Prostatakarzinom und in anderen epithelialen Karzinomen.

Um eine effektive und langandauernde Immunantwort auszulösen, muss die Vakzine sowohl CD8⁺ als auch CD4⁺T-Zellen stimulieren können [SCHOENBERGER et al., 1998; RIDGE et al., 1998; BOURGEOIS et al., 2002; SUN und BEVAN, 2003].

Da eine spontane Immunität gegen NY-ESO-1 scheinbar mit einem besseren Outcome einiger Patienten assoziiert ist, muss man annehmen, dass diese Immunität eine Rolle in der Kontrolle des Tumorwachstums spielt [HUARTE et al., 2004]. Dies macht es zu einem attraktiven Kandidaten für die Entwicklung neuer immuntherapeutischer Strategien.

5.1. CT-Antigen NY-ESO-1

NY-ESO-1 ist ein aus 180 Aminosäuren bestehendes Antigen, das zur Familie der CT-Antigene gehört und von vielen verschiedenen Tumoren exprimiert wird. Es scheint das CT-Antigen mit der höchsten Immunogenität zu sein und kann sowohl eine zelluläre als auch eine humorale Immunantwort induzieren. So sind in 40-50% aller Patienten mit NY-ESO-1-exprimierenden Tumoren in fortgeschrittenem Stadium NY-ESO-1-Antikörper zu finden. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass besonders Patienten mit fortgeschrittener Krebserkrankung NY-ESO-1-Antikörper produzieren [JÄGER et al., 1999 und 2000; STOCKERT et al., 1998] und dass die Antikörpertiter nach erfolgreicher Entfernung bzw. Therapie dieser NY-ESO-1-exprimierenden Tumoren abfielen [STOCKERT et al., 1998]. Dies bedeutet, dass die Antikörperproduktion gegen NY-ESO-1 stark von einer persistierenden Antigenstimulation abhängt.

Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass Patienten mit hohen Antikörpertitern auch eine CD8⁺T-Zellantwort zeigen [JÄGER et al., 2000]. Durch diese Korrelation konnten auch

Patienten anderer HLA-Typen bzw. mit bisher unbekanntem T-Zell-Epitopen identifiziert werden, was vorher aufgrund einer fehlenden Nachweismethode fremder T-Zell-Epitope nicht möglich war. Über diesen Ansatz kam es auch zu einer Weiterentwicklung des CD8⁺-T-Zell-Monitorings, das in dieser Form bei allen Patienten ungeachtet des HLA-Typs eingesetzt werden und somit gleichzeitig zur Entdeckung weiterer T-Zell-Epitope beitragen kann [GJNATIC et al., 2000].

Diese Korrelation zwischen hohen Antikörpertitern und nachweisbarer CD8⁺-T-Zellantwort führte zu der Annahme, dass auch CD4⁺-T-Zellen in das Geschehen involviert sind, was in einer Studie von GJNATIC et al. bewiesen wurde. Das CD4⁺-Monitoring konnte auch hier über eine neue, dem CD8⁺-Monitoring ähnliche, Methode HLA-unabhängig durchgeführt werden [ATACKANOVIC et al., 2003].

So korrelierte die CD4⁺-Aktivität eindeutig mit dem Antikörperstatus der Patienten [GJNATIC et al., 2003], was bedeutet, dass NY-ESO-1-exprimierende Tumoren eine integrierte Immunantwort mit hohen Antikörpertitern, starker CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellantwort – ähnlich wie auch bei HIV [HOGAN und HAMMER, 2001] – auslösen. In tierischen Modellen war eine solche Konstellation mit erfolgreicher Tumor- bzw. Virusabwehr assoziiert [RIBERDY et al., 1999; REILLY et al., 2001].

Vermutlich bilden sich durch die starke Antikörperantwort gegen NY-ESO-1 Immunkomplexe mit durch Tumorzelllyse freigesetzten Antigenen, was die Aufnahme in antigenpräsentierende Zellen und damit die Kreuzpräsentation erleichtert. Dies führt dann zur Aktivierung und Aufrechterhaltung NY-ESO-1-spezifischer CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen [NAGATA et al., 2002].

Wenn also das Immunsystem durch eine NY-ESO-1-Vakzine stimuliert wird, müsste die Antikörperproduktion – evtl. auch nach chirurgischer Therapie – weiter angeregt werden und so über die oben beschriebenen Mechanismen zur Bekämpfung von Tumorzellen beitragen.

Mittlerweile konnten auch erste Erfolge beim adoptiven T-Zell-Transfer mit gegen NY-ESO-1-gerichteten T-Zellrezeptoren bei therapierefraktären Melanom- und Synovialzellsarkompatienten gezeigt werden [ROBBINS et al., 2011 und 2015], nachdem zuvor schon die Wirksamkeit von tumorinfiltrierenden Lymphozyten gegen NY-ESO-1 bei fortgeschrittenem Melanom nachgewiesen werden konnte [ROSENBERG et al., 2011]. Auch hier kam es jedoch nur bei einem Teil der Patienten überhaupt zu einem Ansprechen, bei manchen nur kurzzeitig; die Gründe dafür sind jedoch unbekannt. Vermutet werden Unterschiede in der individuellen Fähigkeit des Patienten in der Rekonstitution von bestimmten Lymphozytensubtypen wie den regulatorischen CD4⁺-T-Zellen oder aber

Unterschiede in der Charakteristik des individuellen Tumors. Ein Biomarker, der prognostisch auf ein Ansprechen hinwies, konnte nicht identifiziert werden; auch korrelierte die Höhe der nachgewiesenen persistierenden anti-NY-ESO-1-TCR-transduzierten T-Zellen nicht mit dem klinischen Erfolg. [ROBBINS et al., 2011 und 2013]

5.2. NY-ESO-1/ISCOMATRIX Studie

Wegen der hohen Immunogenität und der häufigen Expression des NY-ESO-1 Antigens wurden bereits viele Vakzinierungsstudien mit verschiedenen Epitopen durchgeführt. Diese hatten sich als sicher erwiesen, problematisch war nur die HLA-Abhängigkeit dieser Epitope. In der Studie (LUD99-008), deren Seren in dieser Arbeit untersucht wurden, war die Vakzinierung mit rekombinantem Volllängenprotein – und damit HLA-unabhängig – erfolgt [DAVIS et al., 2004].

Die Vakzine war sicher, wurde gut vertragen und löste in Kombination mit IMX sowohl eine zelluläre als auch eine humorale Immunantwort aus. Bei den immunisierten Patienten konnten viele verschiedene – teilweise auch unbekannte – natürlich prozessierte HLA-Klasse I- und II-Epitope identifiziert werden.

5.2.1. Kontrolle des Impferfolgs

Um den Impferfolg zu kontrollieren gibt es verschiedene Möglichkeiten:

Zum einen können durch spezielle Verfahren spezifische CD4⁺- bzw. CD8⁺T-Zellen nachgewiesen, zum anderen Antikörper serologisch über ELISA, Western-Blot oder RAYS detektiert werden.

Wir benutzten im Rahmen dieser Arbeit die RAYS-Methode (s. Kap. 3.3.2). Eine serologische Kontrolle zum Nachweis des Impferfolgs ist als Screeningmethode ausreichend, da bei spontaner Immunantwort auf NY-ESO-1 spezifische CD4⁺- oder CD8⁺T-Zellen nur bei gleichzeitiger Antikörperantwort gefunden wurden [JÄGER et al., 1998 und 2000; GNJATIC et al., 2000 und 2003; ATANACKOVIC et al., 2003].

Die RAYS-Methode hat 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-2 - Antikörpern erwiesen [MISCHO et al., 2003].

Auch diese Seren wurden zur Kontrolle parallel zur vorliegenden Arbeit blind per ELISA auf Antikörperbildung gegen NY-ESO-1 und NY-ESO-1 trunk. getestet (Daten von Prof. Renner). Die Ergebnisse der Untersuchungen korrelierten fast 100%, was ein neuerlicher Beweis für die äquivalente Sensitivität von RAYS und ELISA in Bezug auf die Detektion von Antikörpern gegen NY-ESO-1 ist.

Im Rahmen der Studie LUD99-008 wurden auch die CD4⁺- und die CD8⁺T-Zellantwort und die DTH (delayed type hypersensitivity)-Reaktion untersucht [DAVIS et al., 2004].

Zunächst wurden die Seren auf das bekannte CD8⁺ HLA-A2-restriktive Epitop 157-165 getestet. Überraschenderweise fanden sich nur drei Patienten, die auf dieses Epitop ansprachen. In weiteren HLA-unabhängigen Untersuchungen von Blut- und Hautproben (aus DTH-Test) wurden viele andere CD4⁺- und CD8⁺T-Zell-Epitope identifiziert, was vermuten lässt, dass das Epitop 157-165 nicht – wie angenommen – immunodominant ist. Ein weiterer Grund könnte sein, dass die spezifischen T-Zellen nur in geringer Konzentration im peripheren Blut vorliegen und somit dort nicht nachweisbar sind.

Alle über ELISA seropositiv getesteten Patienten zeigten eine spezifische zelluläre Immunreaktion. Unter diesen war auch ein Patient der Protein-Kohorte, der allerdings eine schwächere zelluläre Reaktion zeigte und in unserer Serologie sowohl über ELISA als auch über RAYS negativ blieb.

Die durchgeführten DTH-Tests (intradermale Gabe von 1 µg NY-ESO-1-Protein an Tag 84, positiv, wenn Induration > 5 mm) zeigten in den IMX-Kohorten häufiger positive Ergebnisse; vor allem in der 100+IMX-Kohorte korrelierte eine positive DTH-Reaktion mit der Antikörperbildung. Allerdings war auch bei einem seronegativen Patienten aus der Placebokohorte eine starke DTH-Reaktion nachweisbar, was an der Signifikanz dieses Tests zweifeln lässt.

5.2.2. Serologie über RAYS

Alle Patienten, die die Vakzine aus rekombinant exprimiertem Protein und IMX erhalten hatten, entwickelten im Verlauf eine Antikörperantwort; aus der Protein- bzw. Placebogruppe

jedoch kein einziger. Das bedeutet zum einen, dass das Protein alleine nicht in der Lage ist, das Immunsystem ausreichend zu stimulieren und zum anderen, dass IMX ein sehr potentes Adjuvanz darstellt. Dies beruht vermutlich darauf, dass IMX gleichzeitig eine verbesserte Antigenpräsentation und Immunstimulation bewirkt, was sich in einer effizienten CD4⁺-, CD8⁺- und Antikörperantwort äußert [SJOLANDER et al., 1998; MARASKOVSKY et al., 2004].

Der Impferfolg war nicht nur an einer Steigerung der Antikörpertiter ersichtlich, sondern auch an der im Verlauf stattfindenden Entwicklung von Antikörpern gegen einzelne NY-ESO-1-Fragmente und Kreuzreaktivität gegen LAGE-1 zu erkennen. Für letztere bestand im Gegensatz zu den Antikörpertitern eine eindeutige Dosisabhängigkeit. So waren in der Kohorte C (100+IMX) wesentlich häufiger Antikörpertiter gegen längere NY-ESO-1-Fragmente, LAGE-1A und LAGE-1B zu vermerken. Diese Kreuzreaktivität gegen die LAGE-1-Antigene ist vermutlich eher auf die große Homologie von NY-ESO-1 und LAGE-1 als auf eine Epitopausweitung (epitope spreading) zurückzuführen.

Patienten mit bereits vorbestehenden Antikörpern schienen nur etwa zur Hälfte von der Impfung zu profitieren, was sich in einem Anstieg der Antikörpertiter bzw. in der Entwicklung einer Kreuzreaktivität auf LAGE-1 oder einzelne NY-ESO-1-Fragmente zeigte. Nach Beendigung der Vakzinierung kam es teilweise zu einer Abschwächung der Immunantwort, was die Beobachtungen von JÄGER und STOCKERT, dass eine persistierende Antigenstimulation zur Antikörperproduktion gegen NY-ESO-1 nötig ist, bestätigen würde (s. Kap. 5.1) [JÄGER et al., 1999 und 2000; STOCKERT et al., 1998].

Der andere Teil der Patienten zeigte jedoch noch eine teilweise deutliche Steigerung der Immunreaktion. Es wäre also interessant herauszufinden, welche Mechanismen im Aufrechterhalten der Immunantwort in diesen Patienten eine zusätzliche Rolle spielen.

5.3. ISCOMATRIX-Adjuvanz

Das Adjuvanz IMX zeigte sich als äußerst effektiv, sowohl eine humorale, als auch eine zelluläre Immunantwort auszulösen. So konnte bei den geimpften Patienten eine T-Zell-Antwort gegen viele verschiedene natürlich prozessierte HLA-Klasse I- und II-Epitope nachgewiesen werden.

IMX basiert auf der ISCOM (immunostimulatory complexes) - Technik und bewirkt sowohl eine verbesserte Antigenpräsentation als auch eine Immunstimulation, die sich in einer

besseren Antikörperantwort, wie auch einer effizienten CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellantwort äußert [SJOLANDER et al., 1998; MARASKOVSKY et al., 2004].

Eine weitere Erklärung für das gute Ansprechen ist, dass der NY-ESO-1/IMX-Komplex in dendritischen Zellen über einen alternativen Proteasom-unabhängigen Weg prozessiert wird, was zur Präsentation anderer T-Zell-Epitope führt. So könnten über zwei unterschiedliche Prozessierungswege eine große Breite an T-Zell-Epitopen präsentiert und die spezifischen T-Zellen leichter aktiviert werden [SCHNURR et al., 2005].

In anderen bisher durchgeführten Studien mit rekombinantem Protein oder Peptiden konnte keine so deutliche Immunantwort erreicht werden.

Immunisierungen mit dem CD8⁺T-Zell-Peptid 157-165, teilweise auch in Kombination mit GM-CSF konnten zwar in nicht-immunen Patienten eine CD8⁺T-Zellantwort induzieren, dies erforderte aber oft viele wiederholte Injektionen und zeigte nur eine schwache Affinität. Außerdem konnten diese durch künstliche Peptide erzeugten CD8⁺T-Zellen *in vitro* keine natürlich prozessierten NY-ESO-1-Epitope erkennen [JÄGER et al., 2000; LE GAL et al., 2005].

In einer Studie mit rekombinantem Vakzinia-NY-ESO-1 (rV-NY-ESO-1) und rekombinantem Fowlpox-NY-ESO-1 (rF-NY-ESO-1)-Konstrukt kam es zur Induktion einer humoralen und zellulären Antwort, die sich aber von der durch NY-ESO-1/IMX-induzierten unterschied. So war die Serokonversion seltener und die CD8⁺T-Zell-Reaktion war hauptsächlich gegen die Regionen AS81-110 und AS151-170 gerichtet. Diese CD8⁺T-Zellen waren auch in der Lage, natürlich prozessiertes NY-ESO-1-Antigen zu erkennen [JÄGER et al., 2006].

Eine andere Studie benutzte rekombinantes NY-ESO-1-Protein mit Montanide und CpG, welches ein potenter Stimulator der B- und CD4⁺T-Zellen vom TH1-Typ ist. Hier kam es bereits in einer frühen Phase des Vakzinierungsprotokolls bei den meisten Patienten zu einer guten CD4⁺- und Antikörperantwort, die CD8⁺-Antwort entwickelte sich aber erst später und nur bei einem Teil der Patienten. Dies hängt vermutlich damit zusammen, dass eine ausreichende Menge an spezifischen Antikörpern zur effizienten Kreuzpräsentation und damit zur Aktivierung von CD8⁺T-Zellen vonnöten ist. Auch hier war die CD8⁺T-Zellantwort auf ein oder wenige Epitop/e im Bereich der immunodominanten Region AS81-110 beschränkt und zeigte Anti-Tumor-Reaktivität [VALMORI et al., 2007].

Die NY-ESO-1/IMX-Vakzine ist also bisher einzigartig in ihrer Fähigkeit eine solch breite Immunantwort auszulösen. Optimierungen über eine Änderung des Vakzinierungsprotokolls oder die Zugabe weiterer Adjuvanzien oder Zytokinen sind sicherlich möglich und müssen weiter erforscht werden. Auch eine Kombination mit immunmodulierenden Wirkstoffen wie

insbesondere den Checkpointinhibitoren, aber auch den Signaltransduktionsinhibitoren sind sicher eine Möglichkeit, die Wirkung der Vakzine zu verbessern.

5.4. CD4⁺T-, CD8⁺T- und B-Zell-Epitope

Mittlerweile sind viele verschiedene durch spontane Immunantwort oder Vakzinierung induzierte CD4⁺- und CD-8⁺-T-Zell-Epitope [ZENG et al., 2000 und 2001; JÄGER et al., 2000; GJNATIC et al., 2003], aber auch B-Zell-Epitope [VALMORI, 2007; ZENG et al., 2006] identifiziert worden.

Grundsätzlich kann man sagen, dass die CD4⁺T-Zell- und B-Zell-Epitope eher zentral bis N-terminal [GJNATIC et al., 2003; VALMORI et al., 2005; ZENG et al., 2005], die CD8⁺T-Zellepitope eher zentral bis C-terminal liegen.

VALMORI et al. identifizierten in ihrer NY-ESO-1-Vakzinierungsstudie eine dominante Bindungsregion im Bereich AS 80-110 und starke Antikörperreaktivität im Bereich AS 1-70; es ließ sich aber auch eine geringere Antikörperreaktivität gegen den C-Terminus im Bereich AS 160-180 feststellen [VALMORI et al., 2007]. Diese AS-Bereiche deckten sich mit den bereits vorher entdeckten B-Zell-Epitopen bei Patienten mit spontaner Immunantwort [VALMORI et al., 2005].

Auch ZENG et al. beschrieben ein dominantes B-Zell-Epitop im Bereich AS 1-40, das in der Detektion von Antikörpern gegen NY-ESO-1 genauso sensitiv war wie das rekombinante Vollängenprotein [ZENG et al., 2005].

Diese Beobachtungen decken sich mit unseren Ergebnissen: So banden die gebildeten Antikörper fast ausschließlich an den N-Terminus des Proteins und hier bevorzugt an die kürzeren Fragmente AS 1-80, AS 1-119 und AS 67-134 (trunk.), bei starker Immunreaktion auch noch an AS 1-153.

Nur ein Patient mit bereits vorbestehender Antikörperreaktion auf NY-ESO-1 VL und die einzelnen Fragmente bis einschließlich NY-ESO-1 trunk. entwickelte auch Antikörper gegen das C-terminale NY-ESO-1-Fragment 67-180.

Das Vorkommen von Antikörpern gegen längere Fragmente korrelierte immer mit einer gleichzeitigen Reaktion gegen kürzere Fragmente, was für hauptsächlich lineare Epitope spricht.

Bei bereits vor Vakzinierung seropositiven Patienten kam es teilweise erst im Verlauf zur Bildung von Epitop-spezifischen Antikörpern, womit diese eindeutig auf die Impfung

zurückzuführen sind. Ein weiterer Beweis dafür ist, dass Epitop-spezifische Antikörper besonders in der Kohorte mit der höchsten Dosierung (100+IMX) zu ermitteln waren. Die Impfung mit rekombinantem Volllängenprotein kann also eine Immunität gegen natürlicherweise vorkommende B-Zell-Epitope vermitteln.

Die von VALMORI beschriebene dominante B-Zell-Region 80-110, die in unserem trunkierten NY-ESO-1-Fragment 8-134 enthalten ist, scheint insofern eine wichtige Rolle zu spielen, als dass in diesem Bereich auch ein immundominanter Bereich der CD4⁺ (81-100) und der CD8⁺T-Zellen (81-110) zu finden ist.

In diesem Bereich konnten viele verschiedene Epitope identifiziert werden, die sowohl nach Vakzinierung als auch bei spontaner Immunantwort zu finden waren [GJNATIC, 2003; VALMORI 2007, DAVIS 2004, JÄGER 2006].

Die Entdeckung überlappender Cluster von MHC-Klasse I- und -Klasse II-bindenden Sequenzen in immundominanten Bereichen des NY-ESO-1-Proteins, die eine hohe Dichte an möglichen proteasomalen Spaltungsstellen aufweisen, stellte die molekulare Basis für eine integrierte Immunantwort in einem kurzen Genabschnitt dar. So ist anzunehmen, dass die CTL-Epitope im immundominanten CD8⁺T-Zellbereich 81-110 durch effiziente Kreuzpräsentation entstehen. Gleichzeitig können die Epitope durch an sie gebundene Antikörper während der Antigenprozessierung geschützt werden [AYYOUB et al., 2006; VALMORI et al., 2007]. Die Induktion einer Immunantwort in diesem Bereich könnte also mit dem Erfolg der Impfung zusammenhängen.

5.5. Kreuzreaktivität mit LAGE-1

Es fiel auf, dass Patienten, die im Verlauf der Impfung eine starke Antikörperantwort auf NY-ESO-1 VL und NY-ESO-1 trunkiert (8-134) entwickelten, häufig auch Antikörper gegen LAGE-1 A oder LAGE-1 B bildeten.

LAGE-1 ist ein zu NY-ESO-1 sehr homologes CT-Antigen. Durch alternatives Spleißen entstehen zwei verschiedene Transkripte, die entweder 180 oder ungespleißt 210 Aminosäuren enthalten, wobei die kürzere Variante auf Nukleotidebene eine Homologie von 94%, auf Aminosäureebene von 87% zu NY-ESO-1 aufweist. Lethé stellte eine hohe Korrelation in der Expression von NY-ESO-1 und LAGE-1 Antigenen in bestimmten Tumoren, besonders Melanom (5/6) und Blasenkarzinom (6/7), fest [LETHÉ et al., 1998]. Diese hohe Korrelation ließ sich in anderen Studien bei Melanom- bzw.

Blasenkarzinompatienten jedoch nicht so bestätigen. Die beiden Antigene waren zwar häufig koexprimiert (ca. 2/3 der Fälle), aber es gab auch eine isolierte Expression von NY-ESO-1 bzw. LAGE-1, wobei letzteres sogar häufiger war [RIMOLDI et al., 2000; SHARMA et al., 2003].

Bei dieser Studie gab es nur einen Patienten, der bereits vorbestehende Antikörper gegen Lage-1 A – auch hier in Kombination mit NY-ESO-1 trunkiert – aufwies, was evtl. für eine Koexpression von LAGE-1 spricht.

Alle anderen Patienten entwickelten diese Kreuzreaktivität erst im Verlauf, was bedeutet, dass diese auf rekombinantem NY-ESO-1-Volllängenprotein basierende Impfung auch eine Immunität gegen LAGE-1-exprimierende Tumoren vermitteln kann. Diese Reaktion konnte mittlerweile auch in anderen Vakzinierungsstudien mit NY-ESO-1 beobachtet werden [VALMORI et al., 2007] und lässt sich am ehesten durch die starke Homologie dieser beiden Gene erklären, die im Bereich des NY-ESO-1-Epitops 8-134 (trunk.) scheinbar besonders ausgeprägt ist.

Auch auf T-Zell-Ebene ließ sich ein ähnlicher Effekt feststellen: So konnten SLLMWITQC₁₅₇₋₁₆₅-spezifische CD8⁺-T-Zellen des NY-ESO-1-Antigens auch nur LAGE-1-exprimierende Tumorzellen lysieren [MARASKOWSKY et al., 2004]. Auch in diesem Bereich scheint also eine starke Homologie vorzuliegen.

5.6. SSX-2, SSX-4, CT7 und CT10

Eine Kreuzreaktivität gegen SSX-2, SSX-4, CT7 oder CT10 ließ sich nicht beobachten. Lediglich zwei Patienten aus der Protein-Kohorte, die keine Antikörper gegen NY-ESO-1 entwickelten, zeigten eine Reaktion gegen SSX-2, was am ehesten auf einen SSX-2-exprimierenden Tumor zurückzuführen ist.

Antikörper gegen SSX-4, CT7 und CT10 konnten in keinem Patienten detektiert werden, was entweder daran liegt, dass diese Antigene nicht vom entsprechenden Tumor exprimiert wurden oder keine ausreichende humorale Immunantwort ausgelöst wurde.

Dies wäre insofern möglich, als dass die Expression dieser CT-Antigene – insbesondere CT7 und CT10 – in Melanompatienten seltener als die Expression von NY-ESO-1 ist und durch die Immunisierung keine Kreuzreaktivität wie bei dem stark homologen Antigen LAGE-1 zu erwarten war. Zusätzlich sind auch die Immunogenität dieser Antigene und damit die Wahrscheinlichkeit einer stark humoralen Immunantwort geringer.

5.7. IgG-Subklassenanalyse

In unserer Subklassenanalyse fiel auf, dass praktisch alle seropositiven Patienten vorwiegend eine IgG1-Antwort, teilweise auch eine IgG3-Antwort entwickelt hatten. Nur ein Patient entwickelte neben einer deutlichen IgG1- auch eine IgG4-Antwort.

Eine bevorzugte IgG2a-Antwort (300fach) wie in der Studie von MARASKOVSKY et al., in der C57BL/6-Mäuse mit der NY-ESO-1/ISCOMATRIX-Vakzine behandelt worden waren, ließ sich nicht nachweisen. Allerdings waren auch in seiner Studie etwas erhöhte IgG1-Titer (8-fach) aufgefallen [MARASKOVSKY et al., 2004].

Eine IgG1- wie auch eine IgG3-Antwort sprechen für eine TH1-artige Immunantwort. Eine hohe IFN γ -Konzentration, wie sie bei einer TH1-artigen Reaktion erreicht wird, bewirkt bei Mäusen gleichzeitig ein Switching zur Produktion von Antikörpern der Subklasse IgG2a, was somit auch eine Erklärung für das Ergebnis der MARASKOVSKY-Studie sein könnte [Handbuch der molekularen Medizin: Immunsystem und Infektiologie; 1999; Detlev Ganten u. Klaus Ruckpaul].

Die Induktion einer Antikörperbildung der Subklasse IgG1 konnte ebenfalls in anderen NY-ESO-1-Vakzinierungsstudien beobachtet werden [GNJATIC et al., 2003; VALMORI et al., 2007], was teilweise wohl auch auf das verwendete Adjuvanz zurückzuführen ist (s. Kap. 5.3).

Dies könnte für den Erfolg der Impfung insofern wichtig sein, als dass die unterschiedlichen Subklassen in Verbindung mit ihren spezifischen Fc γ -Rezeptoren unterschiedliche Effektivität besitzen. Die Fc γ -Rezeptoren gehören zur Immunglobulin-Superfamilie und sind glykosilierte Membranproteine, die sich je nach Typ in ihrer Fähigkeit IgG zu binden stark unterscheiden [HULETT und HOGARTH, 1994; van de WINKEL und CAPEL, 1993].

Beim Menschen sind die Subklassen IgG1 und IgG3 aufgrund ihrer Fähigkeit der Opsonierung, Komplementaktivierung und antikörperabhängiger Zellzytotoxizität (ADCC) die wichtigsten Vertreter einer Typ 1-Reaktion [PAPADEA et al., 1989].

Die Subklassen 1 und 3 binden an den Fc γ RII (CD32), der monomeres IgG zwar schwach, aber Immunkomplexe mit hoher Affinität bindet und ein potenter Leukozytenaktivator und Stimulator der Freisetzung inflammatorischer Zytokine ist. Da bekannt ist, dass Antikörper durch Bildung von Immunkomplexen eine wichtige Rolle für das Kreuz-Priming durch Kreuzpräsentation spielen [REGNAULT et al., 1999], ist die Bildung von Immunkomplexen bestehend aus Antigen und Immunglobulin der Subklassen 1 oder 3, die hauptsächlich an den

Fc γ RII (CD32) binden [van de WINKEL und CAPEL, 1993; Houghton et al., 2000] sehr erfolgsversprechend.

Die Subklassen 2 und 4 binden hingegen an den Fc γ RI-Rezeptor (CD64), der monomeres IgG zwar mit hoher Affinität bindet, aber dessen Signalübermittlung erst in Gang gesetzt wird, wenn dieses IgG an einen spezifischen polymeren Liganden gebunden ist.

Somit ist die Induktion einer starken IgG1- bzw. IgG3-Antwort – wie sie durch unsere ISCOMATRIX-Vakzine induziert wurde – gleichbedeutend mit einer effektiven Immunantwort, da hierüber eine Aktivierung und Reifung der APCs und T-Zellen und zusätzlich eine Komplementaktivierung über den klassischen Weg ermöglicht wird [VALMORI et al., 2007].

In dieser Studie entwickelte nur ein Patient neben einer deutlichen IgG1- auch eine IgG4-Antwort, die als einzige auch gegen das C-terminale Fragment 67-180 gerichtet war, was eher ungewöhnlich war. Da diese IgG4-Antwort nur bei einem einzigen Patient vorkam, glauben wir eher, dass es sich hier um eine individuelle Reaktion als eine auf die Vakzine zurückzuführende typische Immunantwort handelt. In einer zuvor veröffentlichten Studie über Vakzinierung mit rekombinantem karzinoembryonalen Antigen (CEA) bei Patienten mit kolorektalem Karzinom entwickelten die Patienten zunächst eine IgG1- und IgG2-Antwort und erst einige Monate später eine IgG4-Antwort. Zudem wurde eine allmähliche Verschiebung von einer überwiegenden IgG1- nach sechs Monaten zu einer IgG4-Antwort nach 15 Monaten beobachtet. Dieser Unterschied im Vergleich zu unserer Studie mag an den unterschiedlichen Vakzinierungsbedingungen liegen, denn zum einen wurde als Adjuvanz GM-CSF benutzt und zum anderen sah das Vakzinierungsschema wiederholte Impfungen über ein ganzes Jahr vor [ULLENHAG et al., 2002].

5.8. Klinisches Outcome der Patienten

Auch wenn das Studiendesign nicht die Beurteilung des klinischen Effekts vorgesehen hatte, so ergab sich doch der Eindruck, dass es in der Placebo- bzw. der Protein-Kohorte mehr Rezidive als in der NY-ESO-1/IMX-Kohorte gab. Diese Daten müssen jedoch mit Vorsicht interpretiert werden, da die Patienten in den verschiedenen Kohorten nicht randomisiert waren und die Analyse retrospektiv und ungeplant erfolgt ist [DAVIS et al., 2004].

Andere Studien zeigen jedoch ähnliche ermutigende Ergebnisse: So konnte in der Vakzinierungsstudie von JÄGER et al. mit rV- bzw. rF-NY-ESO-1 ein längeres Überleben

der Patienten mit Stadium III/IV-Melanom im Vergleich zum Durchschnitt beobachtet werden [JÄGER et al., 2006].

Auch ODUNSI et al. erreichten in ihrer Studie mit einer NY-ESO-1-Peptid 157-170-Vakzine eine längere mittlere progressionsfreie Zeit in Patientinnen mit Ovarialkarzinom [ODUNSI et al., 2007]. Allerdings sprechen nicht alle Patienten auf die bisherigen Vakzinierungstherapien an und entwickeln ein Rezidiv bzw. ein Fortschreiten der Tumorerkrankung. Es sind also weitere Studien notwendig um herauszufinden, welches die Gründe für ein gutes oder schlechtes Ansprechen auf die Therapie sind, um optimale Voraussetzungen für eine erfolgreiche Vakzinierungstherapie zu schaffen.

5.9. Schlussfolgerung/Resümee

In dieser Studie wurde das neue Adjuvanz ISCOMATRIX benutzt, welches in der Lage ist, gleichzeitig eine CD4⁺-, CD8⁺-T-Zell - und Antikörperantwort zu induzieren [DAVIS et al., 2004; CHEN et al., 2004] und hauptsächlich eine TH1-artige Immunantwort auslöst [MARASKOVSKY et al., 2004], was insgesamt sehr gute Bedingungen für eine breite und effiziente T-Zell-Antwort sind. Da die Impfung – wie oben erwähnt – durch das Zusammenspiel der beiden Systeme gleichzeitig eine zelluläre und humorale Immunantwort auslöst, reicht eine einfache Serumanalyse der Antikörper als Screeningmethode auf eine Immunantwort aus.

Um eine effektive und dauerhafte Immunantwort zu erreichen, muss eine Vakzine fähig sein, eine CD4⁺- und eine CD8⁺-T-Zell-Antwort auszulösen [WILLIAMS et al., 2006; RIDGE et al., 1998; BOURGEOIS et al., 2002]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Patienten mit hohen Antikörper-Titern gegen NY-ESO-1 auch eine effektive CD8⁺-T-Zell-Antwort aufweisen [JÄGER et al., 2000]. Desweiteren wurde eine deutliche Korrelation zwischen einer spezifischen NY-ESO-1-Antikörperantwort und dem Auftreten spezifischer CD4⁺-T-Zellen beschrieben [GNJATIC et al., 2003].

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass ein geordnetes Zusammenspiel der verschiedenen Komponenten des Immunsystems notwendig ist, um eine effiziente und dauerhafte Immunantwort hervorzurufen. Dieses Zusammenspiel wurde auch noch weiter analysiert: Den zeitlichen Ablauf betreffend konnte gezeigt werden, dass eine humorale Immunantwort und eine CD4⁺-T-Zellreaktion einer CD8⁺-T-Zellreaktion vorausgehen. Dies lässt annehmen, dass eine ausreichende Menge an spezifischen Antikörpern und eine wirkungsvolle T-Zell-Hilfe für ein effektives Kreuzpriming und eine effektive Kreuzpräsentation notwendig sind

[VALMORI et al., 2007]. Unsere Ergebnisse sprechen für die Theorie, dass das Binden spezifischer Antikörper an die Zielproteine eine Hauptrolle in der Aufnahme von Protein-Immunkomplexen (Uptake) durch bestimmte dendritische Zellen spielt und somit einen großen Anteil an der Kreuzpräsentation von Antigenen und einer effizienten T-Zell-Aktivierung hat [NAGATA et al., 2002].

Trotz positiver Ansätze mit vereinzelt Erfolgen konnten bisher nur ganz wenige Vakzinationsstudien signifikante Ergebnisse bezüglich des progressionsfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens liefern und verliefen insgesamt eher enttäuschend.

Problematisch ist hierbei insbesondere das nur teilweise oder aber nur kurze Ansprechen der Patienten, dessen Ursachen noch nicht hinreichend geklärt sind. Ein Grund ist sicherlich eine durch den Tumor ausgelöste Immunevasion („immune evasion“), eine Immunsuppression insbesondere in seinem lokalen Mikromilieu, die zu einer Toleranz gegenüber seiner Antigenen führt und eine ausreichende Immunantwort verhindert.

So war eine erhöhte Anzahl von myeloiden Suppressorzellen (MDSC) in naher Tumorumgebung mit Inhibition einer effektiven T-Zell-Antwort mit einer schlechteren Prognose vergesellschaftet. Höhere Spiegel von IL-10 und VEGF hatten durch Blockierung der Differenzierung dendritischer Zellen mit nachfolgender T-Zell-Anergie einen ähnlichen Effekt. [MAKKOUK et al., 2015]

Ein weiterer Ansatz sind die Immuncheckpoints, derer sich die Tumorzellen direkt durch Expression entsprechender Liganden (z.B. PD-L1) oder indirekt über Expression durch andere Zellen in der unmittelbaren Tumorumgebung bedienen [CARTER et al., 2002, s. Kap. 2.4.1.1.].

Durch Kombination von Vakzinierung und Immuncheckpoint-Inhibitoren wie Anti-CTLA-4- oder Anti-PD-1- bzw. PD-L1-Antikörper oder auch Signaltransduktionsinhibitoren könnte sicher eine verbesserte Immunantwort erreicht werden.

Ein weiterer Grund für das fehlende Ansprechen auf die Vakzination könnte der Zeitpunkt des Therapiebeginns sein. So scheint eine Vakzination bei nur geringer Tumorlast effektiver zu sein, da die Immuntoleranz leichter zu überwinden ist [BOCCHIA et al., 2000]. Unterstützt wird diese These auch durch den Erfolg der präventiven Impfungen zur Vermeidung krebsassoziierter Infektionen wie HPV. Hier muss keine Toleranz durchbrochen werden, was zu einem sehr guten Ansprechen auch bei nur zwei- bis dreimaliger Gabe führt. Mit dem neuen Impfstoff Gardasil 9® kann sogar ein Schutz vor 90% aller HPV-assoziierten Cervixkarzinome erreicht werden [ZHANG et al., 2017].

Die meisten Studien zu Vakzinationstherapien wurden jedoch in fortgeschrittenem Krankheitsstadium durchgeführt, weshalb hier ein Umdenken und die Initiierung entsprechender Studien – durchaus auch in Kombination mit anderen Therapiestrategien – interessant wäre.

Ein weiterer Schwachpunkt ist, dass die Limitierung der Vakzinationen auf ein oder wenige Antigene (wie auch in dieser Studie) bzw. Epitope auch nur begrenzt wirksam ist, da diese nicht von allen Tumoren exprimiert werden und sich die Tumoren durch Mechanismen wie dem „Immune escape“ durch Mutation und Selektion dieser entziehen können, was ein zeitlich begrenztes Ansprechen vorprogrammiert. Durch Multi-Epitop-Vakzinen kann diesen Problemen entgegengewirkt werden.

Vielversprechende Erfolge konnten durch personalisierte Impfstoffe, die durch computergestützte Analyse des Tumorexons auf Neoantigene bzw. Neoepitope entwickelt wurden, erreicht werden. Hier wurde bei Melanompatienten sowohl in der Gruppe um Catherine Wu, die einen peptidbasierten Impfstoff entwickelte, als auch in der Gruppe um Ugur Sahin, die einen RNA-basierten Impfstoff herstellte, eine Immunreaktion mit teilweise langanhaltender Remission erreicht. Teilweise wurde auch eine Kombination mit Checkpoint-Inhibitoren mit guten Ansprechraten durchgeführt.

[SAHIN et al., 2017; WU et al.; 2017]

Diese erfreulichen Ergebnisse zeigen, dass eine gezielte Impfung zur Therapie des Melanoms möglich ist. Durch neuartige Software-Programme, die gezielt mögliche Neoepitope erkennen können, und daraus entwickelten individuellen Impfstoffen ist eine neue Ära der Vakzinierungstherapien eingeleitet worden. In Kombination mit anderen immuntherapeutischen Strategien, insbesondere den Checkpoint-Inhibitoren, wird dies sicherlich die Zukunft der Vakzinierungsstrategie sein.

6. Literaturverzeichnis

1. Alijagic S, Möller P, Artuc M, Jurgovsky K, Czarnetzki BM, Schadendorf D (1995) Dendritic cells generated from peripheral blood transfected with human tyrosinase induce specific T cell activation. *Eur J Immunol* 25:3100-3107
2. Andtbacka RH, Kaufman HL, Collichio F, Amatruda T, Senzer N, Chesney J, Delman KA, Spitler LE, Puzanov I, Agarwala SS, Milhem M, Cranmer L, Curti B, Lewis K, Ross M, Guthrie T, Linette GP, Daniels GA, Harrington K, Middleton MR, Miller WH Jr, Zager JS, Ye Y, Yao B, Li A, Doleman S, VanderWalde A, Gansert J, Coffin RS (2015) Talimogene Laherparepvec improves durable response rate in patients with advanced melanoma. *J Clin Onc* 33(25):2780-2788
3. Atanackovic D, Matsuo M, Ritter E, Mazzara G, Ritter G, Jäger E, Knuth A, Old LJ, Gnjatic S (2003) Monitoring CD4+ T cell responses against viral and tumor antigens using T cells as novel target APC. *J Immunol Methods*. 278(1-2):57-66
4. Ayyoub M, Souleimanian NE, Godefroy E, Scotto L, Hesdorffer CS, Old LJ, Valmori D (2006) A phenotype based approach for the immune monitoring of NY-ESO-1-specific CD4+ T cell responses in cancer patients. *Clin Immunol*. 118:188-194
5. Bataille V (2003) Genetic epidemiology of melanoma. *Eur J Cancer* 39(10):1341-1347
Review
6. Baxevanis CN, Perez SA, Papamichail M (2009) Combinatorial treatments including vaccines, chemotherapy and monoclonal antibodies for cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother* 58:317-324
7. Bishop JM (1991) Molecular themes in oncogenesis. *Cell*. 64(2):235-248
8. Bocchia M, Bronte V, Colombo MP, De Vincentiis A, Di Nicola M, Forni G, Lanata L, Lemoli RM, Massaia M, Rondelli D, Zanon P, Tura S (2000) Antitumor vaccination: Where we stand. *Haematologica* 85: 1172–1206
9. Boder ET, Wittrup KD (1997) Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. *Nat Biotechnol*. 15(6):553-557
10. Boder ET, Wittrup KD (2000) Yeast surface display for directed evolution of protein expression, affinity, and stability. *Methods Enzymol* 328:430-444
11. Boël P, Wildmann C, Sensi ML, Brasseur R, Renauld JC, Coulie P, Boon T, van der Bruggen P (1995) BAGE: a new gene encoding an antigen recognized on human melanomas by cytolytic T lymphocytes. *Immunity* 2(2):167-175

12. Boon T, van der Bruggen P (1996) Human tumor antigens recognized by T lymphocytes. *J Exp Med.* 183(3):725-729
13. Bourgeois C, Rocha B, Tanchot C (2002) A role for CD40 expression on CD8+ T cells in the generation of CD8+ T cell memory. *Science* 297:2060-2063
14. Boveri, T (1914) *Zur Trage der Entstehung maligner Tumoren.* G. Fischer, Jena Germany
15. Brasseur F, Rimoldi D, Liénard D, Lethé B, Carrel S, Arienti F, Suter L, Vanwijck R, Boulond A, Humblet Y et al.(1995) Expression of MAGE genes in primary and metastatic cutaneous melanoma. *Int J Cancer* 63(3):375-380
16. Butterfield LH (2015) Cancer vaccines. *BMJ* 350:h988
17. Caballero OL, Chen YT (2009) Cancer/testis (CT) antigens: Potential targets for immunotherapy. *Cancer Sci.* 100(11):2014-2021
18. Cancer Research Institute (2016) Jump up „James Allison“. Cancer Research Institute. Retrieved 4 August 2016
19. Carter L, Fouser LA, Jussif J, Fitz L, Deng B, Wood CR, Collins M, Honjo T, Freeman GJ, Carreno BM (2002) PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4(+) and CD8(+) T cells and is overcome by IL-2. *Eur J Immunol* 32(3):634-643
20. Chen Q, Jackson H, Parente P, Luke T, Rizkalla M, Tai TY, Zhu HC, Mifsud NA, Dimopoulos N, Masterman KA, Hopkins W, Goldie H, Maraskovsky E, Green S, Miloradovic L, McCluskey J, Old LJ, Davis ID, Cebon J, Chen W (2004) Immunodominant CD4+ responses identified in a patient vaccinated with full-length NY-ESO-1 formulated with ISCOMATRIX adjuvant. *PNAS* 101:9363-9368
21. Chen YT, Gure AO, Tsang S, Stockert E, Jager E, Knuth A, Old LJ (1998) Identification of multiple cancer/testis antigens by allogeneic antibody screening of a melanoma cell line library. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:6919-6923
22. Chen YT, Scanlan MJ, Sahin U, Türeci Ö, Gure AO, Tsang S, Williamson B, Stockert E, Pfreundschuh M, Old LJ (1997) A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(5):1914-1918
23. Clark MR (1997) IgG effector mechanisms. *Chem. Immunol.* 65:88-110
24. Clemente CG, Mihm MC Jr, Bufalino R, Zurrida S, Collini P, Cascinelli N (1996) Tumor infiltrating lymphocytes in lymph node melanoma metastases: a histopathologic prognostic indicator and an expression of local immune response. *Lab Invest* 74(1):43-47

25. Davies H, Bignelli GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA (2002) Mutations of the *BRAF* gene in human cancer. *Nature* 417(6892):949-954
26. Davis ID, Chen W, Jackson H, Parente P, Shackleton M, Hopkins W, Chen Q, Dimopoulos N, Luke T, Murphy R, Scott AM, Maraskovsky E, McArthur G, MacGregor D, Sturrock S, Tai TY, Green S, Cuthbertson A, Maher D, Miloradovic L, Mitchell SV, Ritter G, Jungbluth AA, Chen YT, Gnjatic S, Hoffman EW, Old LJ, Cebon JS (2004) Recombinant NY-ESO-1 protein with ISCOMATRIX adjuvant induces broad integrated antibody and CD4+ and CD8+ T cell responses in humans. *PNAS* Jul 101(29):10697-702
27. Davis ID, Jefford M, Parente P and Cebon J (2003) Rational approaches to human cancer immunotherapy. *Journal of Leukocyte Biology* 73:3-29
28. Davis MM, Boniface JJ, Reich Z, Lyons D, Hampl J, Arden B, Chien Y (1998) Ligand recognition by alpha beta T cell receptors. *Annu Rev Immunol* 16:523-44
29. De Backer O, Arden KC, Boretti M, Vantomme V, De Smet C, Czekay S, Viars CS, De Plaen E, Brasseur F, Chomez P, Van den Eynde B, Boon T, van der Bruggen P (1999) Characterization of the GAGE genes that are expressed in various human cancers and in normal testis. *Cancer Res.* 59(13):3157-3165
30. De Plaen E, Arden K, Traversari C, Gaforio JJ, Szikora JP, De Smet C, Brasseur F, van der Bruggen P, Lethé B, Lurquin C et al. (1994) Structure, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the MAGE family. *Immunogenetics* 40(5):360-9
31. Dhodapkar KM, Krasovsky J, Williamson B, Dhodapkar MV (2002) 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(1): 125-133
32. Disis ML (2014) Mechanism of action of immunotherapy. *Semin Oncol* 41(Suppl5):3-13

33. Doyle HA, Mamula MJ (2001) Post-translational protein modifications in antigen recognition and autoimmunity. *Trends Immunol* 22:443-449
34. Dranoff G, Jaffee E, Lazenby A, Golumbek P, Levitsky H, Brose K, Jackson V, Hamada H, Pardoll D, Mulligan RC (1993) Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *PNAS* 90:3539-3543
35. Dudley ME, Yang JC, Sherry R, Hughes MS, Royal R, Kammula U, Robbins PF, Huang J, Citrin DE, Leitman SF, Wunderlich J, Restifo NP, Thomasian A, Downey SG, Smith FO, Klapper J, Morton K, Laurencot C, White DE, Rosenberg SA (2008) Adoptive cell therapy for patients with metastatic melanoma: evaluation of intensive Myeloablative Chemoradiation Preparative regimens. *J Clin Oncol* 26(32):5233-5239
36. Duong CP, Yong CS, Kershaw MH, Slaney CY, Darcy PK (2015) Cancer immunotherapy utilizing gene-modified T cells: From the bench to the clinic. *Mol Immunol* 67(2):46-57
37. Eggermont AMM, Chiaron-Sileni V, Grob JJ, Dummer R, Wolchok, JD, Schmidt H, Hamid O, Robert C, Ascierto PA, Richards JM, Lebbé C, Ferraresi V, Smylie M, Weber JS, Maio M, Konto C, Hoos A, de Pril V, Gurunath RK, de Schaetzen G, Suciú S, Testori A (2015) Adjuvant ipilimumab versus placebo after complete resection of high-risk stage III melanoma (EORTC 18071): a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 16(5):522–530
38. Eggermont AMM, Chiaron-Sileni V, Grob JJ, Dummer R, Wolchok, JD, Schmidt H, Hamid O, Robert C, Ascierto PA, Richards JM, Lebbé C, Ferraresi V, Smylie M, Weber JS, Maio M, Bastholt L, Mortier L, Thomas L, Tahir S, Hauschild A, Hassel JC, Hodi FS, Taitt C, de Pril V, de Schaetzen G, Suciú S, Testori A (2016) Prolonged survival in stage III melanoma with Ipilimumab adjuvant therapy. *N Engl J Med* 375(19):1845-1855
39. Flaherty KT, Robert C, Hersey P, Nathan P, Garbe C, Milhem M, Demidov LV, Hassel JC, Rutkowski P, Mohr P, Dummer R, Trefzer U, Larkin JM, Utikal J, Dreno B, Nyakas M, Middleton MR, Becker JC, Casey M, Sherman LJ, Wu FS, Ouellet D, Martin AM, Patel K, Schadendorf D; METRIC Study Group (2012) Improved survival with MEK inhibition in *BRAF*-mutated melanoma. *N Engl J Med* 367(2):107-114

40. Fluck M, Garbe C (2014) Adjuvante Strategien bei Hochrisikomelanomen. *Onkologe* 20(6):555-567
41. Ganten D, Ruckpaul K (1999) Immunsystem und Infektiologie. *Handbuch der molekularen Medizin*. Springer, Berlin
42. Garbe C (1998) Qualitätssicherung in der Onkologie: Diagnostische und therapeutische Standards in der Dermatologischen Onkologie. W. Zuckschwerdt Verlag
43. Garbe C, Blum A (2001) Epidemiology of cutaneous melanoma in Germany and worldwide. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 14(5):280-290
44. Garbe C, Büttner P, Weis J, Soyer HP, Stocker U, Krüger S, Roser M, Weckbecker J, Panizzon R, Bahmer F, et al. (1994) Risk factors for developing cutaneous melanoma and criteria for identifying persons at risk: multicenter case-control study of the central malignant melanoma registry of the German Dermatological Society; *J Invest Dermatol.* 102(5):695-9
45. Gnjatic S, Atanackovic D, Jager E, Matsuo M, Selvakumar A, Altorki NK, Maki RG, Dupont B, Ritter G, Chen YT, Knuth A, Old LJ (2003) Survey of naturally occurring CD4+ T cell responses against NY-ESO-1 in cancer patients: correlation with antibody responses. *PNAS* 100:8862-8867
46. Gnjatic S, Nagata Y, Jäger E, Stockert E, Shankara S, Roberts BL, Mazzara GP, Lee SY, Dunbar PR, Dupont B, Cerundolo V, Ritter G, Chen YT, Knuth A, Old LJ (2000) Strategy for monitoring T cell responses to NY-ESO-1 in patients with any HLA class I allele. *PNAS* 97(20):10917-10922
47. Goydos JS, Patel M, Shih W (2001) NY-ESO-1 and CTp11 expression may correlate with stage of progression in melanoma. *J Surg Res.* 98(2):76-80
48. Guermonprez P, Saveanu L, Kleijmeer M, Davoust J, Van Endert P, Amigorena S (2003) ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature* 425: 397-402
49. Guo C, Manjili MH, Subjeck JR, Sarkar D, Fisher PB, Wang XY (2013) Therapeutic cancer vaccines: past, present, and future. *Adv Cancer Res* 119:421-475
50. Güre AO, Stockert E, Arden KC, Boyer AD, Viars CS, Scanlan MJ, Old LJ, Chen YT (2000) CT10: a new cancer-testis (CT) antigen homologous to CT7 and the MAGE family, identified by representational-difference analysis. *Int J Cancer* 85(5):726-732

51. Güre AO, Türeci O, Sahin U, Tsang S, Scanlan MJ, Jäger E, Knuth A, Pfreundschuh M, Old LJ, Chen YT (1997) SSX: a multigene family with several members transcribed in normal testis and human cancer. *Int J Cancer* 72(6):965-971
52. Güre AO, Wei IJ, Old LJ, Chen YT (2002) The SSX gene family: characterization of 9 complete genes. *Int J Cancer* 101(5):448-453
53. Haas GG Jr, D'Cruz OJ, De Bault LE, Am J (1988) Distribution of human leukocyte antigen-ABC and -D/DR antigens in the unfixed human testis. *Reprod Immunol Microbiol.* 18(2):47-51
54. Harper DM, Franco EL, Wheeler C, Ferris DG, Jenkins D, Schuind A, Zahaf T, Innis B, Naud P, De Carvalho NS, Roteli-Martins CM, Teixeira J, Blatter MM, Korn AP, Quint W, Dubin G (2004) Efficacy of a bivalent L1 virus like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial. *Lancet* 364(9447):1757-1765
55. Hogan CM, Hammer SM (2001) Review. Host determinants in HIV infection and disease. Part 1: cellular and humoral immune responses. *Ann Intern Med.* 134(9 Pt 1):761-776
56. Houde M, Bertholet S, Gagnon E, Brunet S, Goyette G, Laplante A, Princiotta MF, Thibault P, Sacks D, Desjardins M (2003) Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature* 425: 402-406
57. Houghton AN, Scheinberg DA (2000) Monoclonal antibody therapies - a "constant" threat to cancer. *Nature* 4:373-374
58. Huarte E, Karbach J, Gnjatic S, Bender A, Jäger D, Arand M, Atanackovic D, Skipper J, Ritter G, Chen YT, Old LJ, Knuth A, Jäger E (2004) HLA-DP4 expression and immunity to NY-ESO-1: correlation and characterization of cytotoxic CD4+ CD25- CD8- T cell clones. *Cancer Immunity* 4:15
59. Hulett MD, Hogarth PM (1994) Molecular basis of Fc receptor function. *Adv Immunol.* 57:1-127
60. INVITROGEN: pYD1 Yeast display vector kit
61. Jäger D, Jäger E, Knuth A (2001) Immune responses to tumour antigens: implications for antigen specific immunotherapy of cancer. *J. Clin. Pathol.* 54:669-674
62. Jäger E, Chen YT, Drijfhout JW, Karbach J, Ringhoffer M, Jäger D, Arand M, Wada H, Noguchi Y, Stockert E, Old LJ, Knuth A (1998) 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: 265-270
63. Jäger E, Jäger D, Karbach J, Chen YT, Ritter G, Nagata Y, Gnjatic S, Stockert E, Arand M, Old LJ, Knuth A (2000) 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.* 191:625-630
64. Jäger E, Karbach J, Gnjatic S, Neumann A, Bender A, Valmori D, Ayyoub M, Ritter E, Ritter G, Jäger D, Panicali D, Hoffman E, Pan L, Oettgen H, Old LJ, Knuth A (2006) Recombinant vaccinia/fowlpox NY-ESO-1 vaccines induce both humoral and cellular NY-ESO-1-specific immune responses in cancer patients. *PNAS* 103(39): 14453–14458
65. Jäger E, Nagata Y, Gnjatic S, Wada H, Stockert E, Karbach J, Dunbar PR, Lee SY, Jungbluth A, Jäger D, Arand M, Ritter G, Cerundolo V, Dupont B, Chen YT, Old LJ, Knuth A (2000) Monitoring CD8 T cell responses to NY-ESO-1: Correlation of humoral and cellular immune responses. *PNAS* 97(9):4760–4765
66. Jäger E, Stockert E, Zidianakis Z, Chen Y T, Karbach J, Jäger D, Arand M, Ritter G, Old L J, Knuth A. (1999) Humoral immune responses of cancer patients against "Cancer-Testis" antigen NY-ESO-1: correlation with clinical events. *Int J Cancer* 84:506–510
67. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ (2007) Cancer statistics, 2007. *Cancer J Clin*57(1):43-66
68. Jungbluth AA, Chen YT, Busam KJ, Coplan K, Kolb D, Iversen K, Williamson B, Van Landeghem FK, Stockert E, Old LJ (2002) CT7 (MAGE-C1) antigen expression in normal and neoplastic tissues. *Int J Cancer* 99(6):839-845
69. Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, Berger ER, Small EJ, Penson DF, Redfern CH, Ferrari AC, Dreicer R, Sims RB, Xu Y, Frohlich MW, Schellhammer PF; IMPACT Study Investigators (2010) Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N Engl J Med* 363(5):411-422
70. Karolina Palucka, Jacques Banchereau, Ira Mellman (2010) Designing vaccines based on biology of human dendritic cell subsets. *Immunity* 33(4):464-478
71. Kim MS, Choi HY, Choi YS, Kim J, Kim YS (2007) Optimized serological isolation of lung-cancer-associated antigens from a yeast surface-expressed cDNA library. *J Microbiol Biotechnol* 17:993-1001

72. King J, Laemmli UK (1971) Polypeptides of the tail fibres of bacteriophage T4. *J Mol Biol.* 62(3):465-477
73. Kinzler KW, Vogelstein B (1996) Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell.* 87(2):159-170
74. Kinzler KW, Vogelstein B (1997) Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature* 386(6627):761-763
75. Knudson AG (1996) Hereditary cancer: two hits revisited. *J Cancer Res Clin Oncol.* 122(3):135-140
76. Köhler G, Milstein C (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256:495-497
77. Kovacsovics-Bankowski M, Rock KL (1995) A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science* 267:243-24
78. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
79. Le Gal FA, Ayyoub M, Dutoit V, Widmer V, Jäger E, Cerottini JC, Dietrich PY, Valmori D (2005) Distinct structural TCR repertoires in naturally occurring versus vaccine-induced CD8⁺ T-cell responses to the tumor-specific antigen NY-ESO-1. *J Immunother.* 28(3):252-257
80. Leitlinienprogramm Onkologie: S3-Leitlinie zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms. Version 2.0, Juli 2016. AWMF-Register-Nummer: 032/024OL
81. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B (1998) Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396:643-649
82. Lethé B, Lucas S, Michaux L, De Smet C, Godelaine D, Serrano A, De Plaen E, Boon T (1998) LAGE-1, a new gene with tumor specificity. *Int. J. Cancer* 76:903-908
83. Makkouk A, Weiner GJ (2015) Cancer immunotherapy and breaking immune tolerance: new approaches to an old challenge. *Cancer Res* 75(1):5-10
84. Maraskovsky E, Sjölander S, Drane DP, Schnurr M, Le TT, Mateo L, Luft T, Masterman KA, Tai TY, Chen Q, Green S, Sjölander A, Pearse MJ, Lemonnier FA, Chen W, Cebon J, Suhrbier A (2004) NY-ESO-1 protein formulated in ISCOMATRIX adjuvant is a potent anticancer vaccine inducing both humoral and CD8⁺ T-cell-mediated immunity and protection against NY-ESO-1⁺ tumors. *Clin Cancer Res.* 10: 2879-2890
85. Matzinger P (1994) Tolerance, Danger, and the Extended Family. *Annu. Rev. Immunol.* 12:991-1045

86. McLaughlin P, Grillo-Lopez AJ, Link BK, Levy R, Czuczman MS, Williams ME, Heyman MR, Bence-Bruckler I, White CA, Cabanillas F, Jain V, Ho AD, Lister J, Wey K, Shen D, Dallaire BK (1998) Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol* 16(8):2825-2833
87. Mischo A, Kubuschok B, Ertan K, Preuss KD, Romeike B, Regitz E, Schormann C, de Bruijn D, Wadle A, Neumann F, Schmidt W, Renner C, Pfreundschuh M (2006) Prospective study on the expression of cancer testis genes and antibody responses in 100 consecutive patients with primary breast cancer. *Int J Cancer* 118:696-703
88. Mischo A, Wadle A, Wätzig K, Jäger D, Stockert E, Santiago D, Ritter G, Regitz E, Jäger E, Knuth A, Old L, Pfreundschuh M, Renner C (2003) Recombinant antigen expression on yeast surface (RAYS) for the detection of serological immune responses in cancer patients. *Cancer Immunity* 3:5
89. Mocellin S, Lens MB, Pasquali S, Pilati P, Sileni VC (2013) Interferon alpha for the adjuvant treatment of cutaneous melanoma (Review). *Cochrane Database Syst Rev* 6:CD008955
90. Nagata Y, Ono S, Matsuo M, Gnjatic S, Valmori D, Ritter G, Garrett W, Old LJ, Mellman I (2002) Differential presentation of a soluble exogenous tumor antigen, NY-ESO-1, by distinct human dendritic cell populations. *PNAS* 99(16):10629-10634
91. Odunsi K, Qian F, Matsuzaki J, Mhawech-Fauceglia P, Andrews C, Hoffman EW, Pan L, Ritter G, Vilella J, Thomas B, Rodabaugh K, Lele S, Shrikant P, Old LJ, Gnjatic S (2007) Vaccination with an NY-ESO-1 peptide of HLA class I/II specificities induces integrated humoral and T cell responses in ovarian cancer. *PNAS* 104(31):12837-12844
92. Old LJ (2001) Cancer/Testis (CT) antigens - a new link between gametogenesis and cancer. *Cancer Immunity* 1:1
93. Papadea C, Check IJ (1989) Human immunoglobulin G and immunoglobulin G subclasses: biochemical, genetic, and clinical aspects. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 27:27-58
94. Patrick A. Ott, Zhuting Hu, Derin B. Keskin, Sachet A. Shukla, Jing Sun, David J. Bozym, Wandu Zhang, Adrienne Luoma, Anita Giobbie-Hurder, Lauren Peter, Christina Chen, Oriol Olive, Todd A. Carter, Shuqiang Li, David J. Lieb, Thomas Eisenhaure, Evisa Gjini, Jonathan Stevens, William J. Lane, Indu Javeri, Kaliappanadar Nellaiappan, Andres M. Salazar, Heather Daley, Michael Seaman,

- Elizabeth I. Buchbinder, Yoon CH, Harden M, Lennon N, Gabriel S, Rodig SJ, Barouch DH, Aster JC, Getz G, Wucherpennig K, Neuberg D, Ritz J, Lander ES, Fritsch EF, Hacohen N, Wu CJ (2017) An immunogenic personal neoantigen vaccine for patients with melanoma. *Nature* 547(7):217-221
95. Preuss KD, Zwick C, Bormann C, Neumann F, Pfreundschuh M. (2002) Analysis of the B-cell repertoire against antigens expressed by human neoplasms. *Immunol Rev.* 188:43-50
96. Regnault A, Lankar D, Lacabanne V, Rodriguez A, Théry C, Rescigno M, Saito T, Verbeek S, Bonnerot C, Ricciardi-Castagnoli P, Amigorena S (1999) Fcγ receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *J Exp Med.* 189(2):371-380
97. Reilly RT, Machiels JP, Emens LA, Ercolini AM, Okoye FI, Lei RY, Weintraub D, Jaffee EM (2001) The collaboration of both humoral and cellular HER-2/neu-targeted immune responses is required for the complete eradication of HER-2/neu-expressing tumors. *Cancer Res.* 61(3):880-883
98. Renner C, Hartmann F, Pfreundschuh M (2002) Immuntherapeutische Strategien zur Behandlung solider Tumoren. *Deutsches Ärzteblatt* 99(13):A-850/B-704/C-658
99. Riberdy JM, Flynn KJ, Stech J, Webster RG, Altman JD, Doherty PC (1999) Protection against a lethal avian influenza A virus in a mammalian system. *J Virol.* 73(2):1453-1459
100. Ridge JP, Di Rosa F, Matzinger P (1998) A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4⁺ T-helper and a T-killer cell. *Nature* 393:474-47
101. Rimoldi D, Rubio-Godoy V, Dutoit V, Lienard D, Salvi S, Guillaume P, Speiser D, Stockert E, Spagnoli G, Servis C, Cerottini JC, Lejeune F, Romero P, Valmori D (2000) Efficient simultaneous presentation of NY-ESO-1/LAGE-1 primary and non-primary open reading frame-derived CTL epitopes in melanoma. *J Immunol.* 165:7253-7261
102. RKI/gekid (2008) Krebs in Deutschland 2003-2004, Häufigkeiten und Trends. Broschüre des rki/gekid, 6. überarbeitete Auflage 2008
103. Robbins PF, Kassim SH, Tran TL, Crystal JS, Morgan RA, Feldman SA, Yang JC, Dudley ME, Wunderlich JR, Sherry RM, Kammula US, Hughes MS, Restifo NP, Raffeld M, Lee CC, Li YF, El-Gamil M, Rosenberg SA (2015) A pilot trial using

- lymphocytes genetically engineered with an NY-ESO-1-reactive T-cell receptor: long-term follow-up and correlates with response. *Clin Cancer Res* 21(5):1019-1027
104. Robbins PF, Morgan RA, Feldman SA, Yang JC, Sherry RM, Dudley ME, Wunderlich JR, Nahvi AV, Helman LJ, Mackall CL, Kammula US, Hughes MS, Restifo NP, Raffeld M, Lee CC, Levy CL, Li YF, El-Gamil M, Schwarz SL, Laurencot C, Rosenberg SA (2011) Tumor regression in patients with metastatic synovial cell sarcoma and melanoma using genetically engineered lymphocytes reactive with NY-ESO-1. *J Clin Oncol* 29(7):917-924
105. Rock KL (1996) A new foreign policy: MHC class I molecules monitor the outside world. *Immunol Today* 17:131-137
106. Rock KL (2003) The ins and outs of cross-presentation. *Nat Immunol.* 4:941-943
107. Rock KL, Shen L (2005) Cross-presentation: underlying mechanisms and role in immune surveillance. *Immunol Rev.* 207:166-183
108. Rodriguez A, Regnault A, Kleijmeer M, Ricciardi-Castagnoli P, Amigorena S (1999) Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells. *Nat Cell Biol.* 1:362-368
109. Roesch A, Paschen A, Landsberg J, Helfrich I, Becker JC, Schadendorf D (2016) Phenotypic tumour cell plasticity as a resistance mechanism and therapeutic target in melanoma. *Eur J Cancer* 59:109-112
110. Romero P, Valmori D, Pittet MJ, Zippelius A, Rimoldi D, Levy F, Dutoit V, Ayyoub M, Rubio-Godoy V, Michielin O, Guillaume P, Batard P, Luescher IF, Lejeune F, Lienard D, Rufer N, Dietrich PY, Speiser DE, Cerottini JC (2002) Antigenicity and immunogenicity of Melan-A/MART-1 derived peptides as targets for tumor reactive CTL in human melanoma. *Immunol Rev* 188:81-96
111. Rosenberg SA, Restifo NP (2015) Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science* 348(6230):62-68
112. Rosenberg SA, Yang JC, Sherry RM, Kammula US, Hughes MS, Phan GQ, Citrin DE, Restifo NP, Robbins PF, Wunderlich JR, Morton KE, Laurencot CM, Steinberg SM, White DE, Dudley ME (2011) Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. *Clin Cancer Res* 17(13):4550-4557
113. Sahin U, Derhovanessian E, Miller M, Kloke BP, Simon P, Löwer M, Bukur V, Tadmor AD, Luxemburger U, Schrörs B, Omokoko T, Vormehr M, Albrecht C,

- Paruzynski A, Kuhn AN, Buck J, Heesch S, Schreeb KH, Müller F, Ortseifer I, Vogler I, Godehardt E, Attig S, Rae R, Breitzkreuz A, Tolliver C, Suchan M, Martic G, Hohberger A, Sorn P, Diekmann J, Ciesla J, Waksman O, Brück AK, Witt M, Zillgen M, Rothermel A, Kasemann B, Langer D, Bolte S, Diken M, Kreiter S, Nemecek R, Gebhardt C, Grabbe S, Höller C, Utikal J, Huber C, Loquai C, Türeci Ö. (2017) Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer. *Nature* 547(7662):222-226
114. Sahin U, Tureci O, Schmitt H, Cochlovius B, Johannes T, Schmits R, Stenner F, Luo G, Schobert I, Pfreundschuh M (1995) Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *PNAS* 92:11810-11813
115. Sansom DM (2000) CD28, CTLA-4 and their ligands. Who does what and to whom? *Immunology* 101(2):169-177
116. Scanlan MJ, Gure AO, Jungbluth AA, Old LJ, Chen YT (2002) Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy. *Immunol Rev.* 188:22-32
117. Scanlan MJ, Simpson AJ, Old LJ (2004) The cancer/testis genes: Review, standardization, and commentary. *Cancer Immunity* 4:1
118. Schadendorf D, Fisher DE, Garbe C, Gershenwald JE, Grob JJ, Halpern A, Herlyn M, Marchetti MA, McArthur G, Ribas A, Roesch A, Hauschild A (2015) Melanoma. *Nat Rev Dis Prim* 1(4):1-20.
119. Schirmbeck R, Melber K, Reimann J (1995) Hepatitis B virus small surface antigen particles are processed in a novel endosomal pathway for major histocompatibility complex class I-restricted epitope presentation. *Eur J Immunol* 25:1063-1070
120. Schnurr M, Chen Q, Shin A, Chen W, Toy T, Jenderek C, Green S, Miloradovic L, Drane D, Davis ID, Villadangos J, Shortman K, Maraskovsky E, Cebon J (2005) Tumor antigen processing and presentation depend critically on dendritic cell type and the mode of antigen delivery. *Blood* 105(6):2465-2472
121. Schoenberger SP, Toes RE, van der Voort EI, Offringa R, Melief CJ (1998) T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* 393:480-483
122. Sharma P, Allison JP (2015) The future of immune checkpoint therapy. *Science* 348(6230):56-61

123. Sharma P, Gnjatic S, Jungbluth AA, Williamson B, Herr H, Stockert E, Dalbagni G, Donat SM, Reuter VE, Santiago D, Chen YT, Bajorin DF, Ritter G, Old LJ (2003) Frequency of NY-ESO-1 and LAGE-1 expression in bladder cancer and evidence of a new NY-ESO-1 T-cell epitope in a patient with bladder cancer. *Cancer Immunity* 3:19
124. Sjölander A, Cox JC, Barr IG (1998) ISCOMs: an adjuvant with multiple functions. *J Leukoc Biol.* 64:713-723
125. Stanbridge EJ (1990) Human tumor suppressor genes. *Annu Rev Genet.* 24:615-57 Review
126. Stockert E, Jäger E, Chen YT, Scanlan MJ, Gout I, Karbach J, Arand M, Knuth A, Old LJ (1998) A survey of the humoral immune response of cancer patients to a panel of human tumor antigens. *J Exp Med.* 187:1349-1354
127. Stoltze L, Schirle M, Schwarz G, Schroter C (2000) Two new proteases in the MHC class I processing pathway. *Nat Immunol* 1:413-418
128. Strahlenschutzkommission (1998) Ultraviolette Strahlung und malignes Melanom. Bewertung epidemiologischer Studien von 1990–1996. Veröffentlichungen der Strahlenschutzkommission, Band 44
129. Sun JC, Bevan MJ (2003) Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science* 300:339-342
130. Tomlinson I, Bodmer W (1999) Selection, the mutation rate and cancer: ensuring that the tail does not wag the dog. *Nat Med.* 5(1):11-12
131. Tomlinson IP, Novelli MR, Bodmer WF (1996) The mutation rate and cancer. *PNAS* 93(25):14800-14803
132. Topalian SL, Rivoltini L, Mancini M, Markus NR, Robbins PF, Kawakami Y, Rosenberg SA (1994) Human CD4+ T cells specifically recognize a shared melanoma-associated antigen encoded by the tyrosinase gene. *PNAS* 91(20):9461-9465
133. Topalian SL, Solomon D, Avis FP, Chang AE, Freerksen DL, Linehan WM, Lotze MT, Robertson CN, Seipp CA, Simon P, Simpson G, Rosenberg SA (1988) Immunotherapy of patients with advanced cancer using tumor-infiltrating lymphocytes and recombinant interleukin-2: a pilot study. *J Clin Oncol* 6(5):839-853
134. Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *PNAS* 76(9):4350-4354

135. Traversari C, van der Bruggen P, Van den Eynde B, Hainaut P, Lemoine C, Ohta N, Old L, Boon T (1992) Transfection and expression of a gene coding for a human melanoma antigen recognized by autologous cytolytic T- Lymphocytes. *Immunogenetics* 35(3):145-152
136. Türeci O, Chen YT, Sahin U, Güre AO, Zwick C, Villena C, Tsang S, Seitz G, Old LJ, Pfreundschuh M (1998) Expression of SSX genes in human tumors. *Int J Cancer* 77(1):19-23
137. Ullenhag GJ, Frödin JE, Strigård K, Mellstedt H, Magnusson CGM (2002) Induction of IgG Subclass Responses in Colorectal Carcinoma Patients Vaccinated with Recombinant Carcinoembryonic Antigen. *Cancer Research* 62:1364-1369
138. Utikal J (2017) RAF-Inhibitoren. *Der Onkologe* 23(8):639-643
139. Uyttenhove C, Godfraind C, Lethé B, Amar-Costesec A, Renauld JC, Gajewski TF, Duffour MT, Warnier G, Boon T, Van den Eynde BJ (1997) The expression of mouse gene P1A in testis does not prevent safe induction of cytolytic T cells against a P1A-encoded tumor antigen. *Int J Cancer* 70(3):349-356
140. Valmori D, Dutoit V, Lienard D, Rimoldi D, Pittet MJ, Champagne P, Ellefsen K, Sahin U, Speiser D, Lejeune F, Cerottini JC, Romero P (2000) Naturally occurring human lymphocyte antigen-A2 restricted CD8+ T-cell response to the cancer testis antigen NY-ESO-1 in melanoma patients. *Cancer Res.* 60:4499-4506
141. Valmori D, Levy F, Godefroy E, Scotto L, Souleimanian NE, Karbach J, Tosello V, Hesdorffer CS, Old LJ, Jager E, Ayyoub M (2007) Epitope clustering in regions undergoing efficient proteasomal processing defines immunodominant CTL regions of a tumor antigen. *Clin Immunol.* 122:163-172
142. Valmori D, Souleimanian NE, Hesdorffer CS, Ritter G, Old LJ, Ayyoub M (2005) Identification of B cell epitopes recognized by antibodies specific for the tumor antigen NY-ESO-1 in cancer patients with spontaneous immune responses. *Clin Immunol.* 117:24-30
143. Valmori D, Souleimanian NE, Tosello V, Bhardwaj N, Adams S, O'Neill D, Pavlick A, Escalon JB, Cruz CM, Angiulli A, Angiulli F, Mears G, Vogel SM, Pan L, Jungbluth AA, Hoffmann EW, Venhaus R, Ritter G, Old LJ, Ayyoub M (2007) Vaccination with NY-ESO-1 protein and CpG in Montanide induces integrated antibody/Th1 responses and CD8 T cells through cross-priming. *PNAS* 104(21):8947-8952

144. van de Winkel JG, Capel PJ (1993) Human IgG Fc receptor heterogeneity: molecular aspects and clinical implications. *Immunol Today* 14(5):215-221
145. van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, Knuth A, Boon T (1991) A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254(5038):1643-1647; Republished in: *J Immunol.* 2007 178(5):2617-2621
146. Vogelstein B, Kinzler KW (1993) The multistep nature of cancer. *Trends Genet.* 9(4):138-141
147. Wadle A, Kubuschok B, Imig J, Wuellner B, Wittig C, Zwick C, Mischo A, Waetzig K, Romeike BF, Lindemann W, Schilling M, Pfreundschuh M, Renner C (2006) Serological immune response to cancer testis antigens in patients with pancreatic cancer. *Int J Cancer* 119:117-125
148. Wadle A, Mischo A, Imig J, Wüllner B, Hensel D, Wätzig K, Neumann F, Kubuschok B, Schmidt W, Old LJ, Pfreundschuh M, Renner C (2005) Serological identification of breast cancer-related antigens from a *Saccharomyces cerevisiae* surface display library. *Int J Cancer* 117(1):104-113
149. Wang RF (1999) Human tumor antigens: implications for cancer vaccine development. *J Mol Med.* 77(9):640-655
150. Williams MA, Holmes BJ, Sun JC, Bevan MJ (2006) Developing and maintaining protective CD8+ memory T cells. *Immunol Rev.* 211:146-53
151. Zeng G, Aldridge ME, Wang Y, Pantuck AJ, Wang AY, Liu YX, Han Y, Yuan YH, Robbins PF, Dubinett SM, deKernion JB, Belldegrun AS (2005) Dominant B cell epitope from NY-ESO-1 recognized by sera from a wide spectrum of cancer patients: implications as a potential biomarker. *Int J Cancer* 114(2):268-273
152. Zeng G, Touloukian CE, Wang X, Restifo PN, Rosenberg SA, Wang RF (2000) Identification of CD4+ T Cell Epitopes from NY-ESO-1 Presented by HLA-DR Molecules. *J Immunol.* 165(2): 1153–1159
153. Zeng G, Wang X, Robbins PF, Rosenberg SA, Wang RF (2001) CD4+ T cell recognition of MHC class II-restricted epitopes from NY-ESO-1 presented by a prevalent HLA DP4 allele: Association with NY-ESO-1 antibody production. *PNAS* 98(7): 3964–3969
154. Zhang Z, Zhang J, Xia N, Zhao Q (2017) Expanded strain coverage for a highly successful public health tool: Prophylactic 9-valent human papillomavirus vaccine. *Hum Vaccin Immunother* 13(10):2280-2291

7. Publikation/Danksagung

7.1. Publikation

Mischo A, Bubel N, Cebon JS, Samaras P, Petrausch U, Stenner-Liewen F, Schaefer NG, Kubuschok B, Renner C, Wadle A (2011) **Recombinant NY-ESO-1 protein with ISCOMATRIX adjuvant induces broad antibody responses in humans, a RAYS-based analysis.** International Journal of Oncology 39(1):287-94.

7.2. Dank

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Christoph Renner für die Überlassung des Themas und die schnelle, freundliche und konstruktive Unterstützung bei der wissenschaftlichen Arbeit und insbesondere der Fertigstellung der Dissertation.

Ich danke allen Mitarbeitern des onkologischen Labors, insbesondere Kristin Wätzig und Gabi Carbon, die mich in die Techniken der Molekularbiologie eingeführt, mich bei meiner Arbeit unterstützt und mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben.

Ich bedanke mich beim Ludwig Institute for Cancer Research Melbourne für die Überlassung der Seren der NY-ESO-1-Iscomatrix-Studie.

Ganz herzlich danke ich auch Dr. Aliani, meinen Freunden und meiner Familie, von denen jeder seinen Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.