

Dissertation  
Zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaft

**Individualisierte Krebstherapie:  
Präklinischer „proof of concept“ einer  
mutationsspezifischen Immuntherapie**

Am Fachbereich Biologie  
Der Johannes Gutenberg –Universität Mainz

Vorgelegt von  
Niels van de Roemer  
Geb. am 12.08.1981 in Frankfurt a.M.

Mainz, 2015



Diese Promotion widme ich meiner  
Familie in Dankbarkeit

## Zusammenfassung

Da nicht-synonyme tumorspezifische Punktmutationen nur in malignen Geweben vorkommen und das veränderte Proteinprodukt vom Immunsystem als „fremd“ erkannt werden kann, stellen diese einen bisher ungenutzten Pool von Zielstrukturen für die Immuntherapie dar. Menschliche Tumore können individuell bis zu tausenden nicht-synonymer Punktmutationen in ihrem Genom tragen, welche nicht der zentralen Immuntoleranz unterliegen. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Hypothese zu untersuchen, dass das Immunsystem in der Lage sein sollte, mutierte Epitope auf Tumorzellen zu erkennen und zu klären, ob auf dieser Basis eine wirksame mRNA (RNA) basierte anti-tumorale Vakzinierung etabliert werden kann. Hierzu wurde von Ugur Sahin und Kollegen, das gesamte Genom des murinen B16-F10 Melanoms sequenziert und bioinformatisch analysiert. Im Rahmen der NGS Sequenzierung wurden mehr als 500 nicht-synonyme Punktmutationen identifiziert, von welchen 50 Mutationen selektiert und durch Sanger Sequenzierung validiert wurden.

Nach der Etablierung des immunologischen Testsystems war eine Hauptfragestellung dieser Arbeit, die selektierten nicht-synonyme Punktmutationen in einem *in vivo* Ansatz systematisch auf Antigenität zu testen. Für diese Studien wurden mutierte Sequenzen in einer Länge von 27 Aminosäuren genutzt, in denen die mutierte Aminosäure zentral positioniert war. Durch die Länge der Peptide können prinzipiell alle möglichen MHC Klasse-I und -II Epitope abgedeckt werden, welche die Mutation enthalten. Eine Grundidee des Projektes Ansatzes ist es, einen auf *in vitro* transkribierter RNA basierten oligotopen Impfstoff zu entwickeln. Daher wurden die Impfungen naiver Mäuse sowohl mit langen Peptiden, als auch in einem unabhängigen Ansatz mit peptidkodierender RNA durchgeführt. Die Immunphänotypisierung der Impfstoff induzierten T-Zellen zeigte, dass insgesamt 16 der 50 (32%) mutierten Sequenzen eine T-Zellreaktivität induzierten.

Die Verwendung der vorhergesagten Epitope in therapeutischen Vakzinierungsstudien bestätigten die Hypothese das mutierte Neo-Epitope potente Zielstrukturen einer anti-tumoralen Impfstofftherapie darstellen können. So wurde in therapeutischen Tumorstudien gezeigt, dass auf Basis von RNA 9 von 12 bestätigten Epitopen einen anti-tumoralen Effekt zeigte.

Überraschenderweise wurde bei einem MHC Klasse-II restringierten mutiertem Epitop (Mut-30) sowohl in einem subkutanen, als auch in einem unabhängigen therapeutischen Lungenmetastasen Modell ein starker anti-tumoraler Effekt auf B16-F10 beobachtet, der dieses Epitop als neues immundominantes Epitop für das B16-F10 Melanom etabliert. Um den immunologischen Mechanismus hinter diesem Effekt näher zu untersuchen wurde in verschiedenen Experimenten die Rolle von CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> sowie NK-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten der Tumorentwicklung untersucht. Die Analyse des Tumorgewebes ergab, eine signifikante erhöhte Frequenz von NK-Zellen in den mit Mut-30 RNA vakzinierten Tieren. Das NK Zellen in der frühen Phase der Therapie eine entscheidende Rolle spielen wurde anhand von Depletionsstudien bestätigt. Daran anschließend wurde gezeigt, dass im fortgeschrittenen Tumorstadium die NK Zellen keinen weiteren relevanten Beitrag zum anti-tumoralen Effekt der RNA Vakzinierung leisten, sondern die Vakzine induzierte adaptive Immunantwort. Durch die Isolierung von Lymphozyten aus dem Tumorgewebe und deren Einsatz als Effektorzellen im IFN- $\gamma$  ELISPOT wurde

nachgewiesen, dass Mut-30 spezifische T-Zellen das Tumorgewebe infiltrieren und dort u.a. IFN- $\gamma$  sekretieren. Dass diese spezifische IFN- $\gamma$  Ausschüttung für den beobachteten antitumoralen Effekt eine zentrale Rolle einnimmt wurde unter der Verwendung von IFN- $\gamma^{-/-}$  K.O. Mäusen bestätigt.

Das Konzept der individuellen RNA basierten mutationsspezifischen Vakzine sieht vor, nicht nur mit einem mutations-spezifischen Epitop, sondern mit mehreren RNA-kodierten Mutationen Patienten zu impfen um der Entstehung von „escape“-Mutanten entgegenzuwirken. Da es nur Erfahrung mit der Herstellung und Verabreichung von Monotop-RNA gab, also RNA die für ein Epitop kodiert, war eine wichtige Fragestellungen, inwieweit Oligotope, welche die mutierten Sequenzen sequentiell durch Linker verbunden als Fusionsprotein kodieren, Immunantworten induzieren können. Hierzu wurden Pentatope mit variierender Position des einzelnen Epitopes hinsichtlich ihrer *in vivo* induzierten T-Zellreaktivitäten charakterisiert. Die Experimente zeigten, dass es möglich ist, unabhängig von der Position im Pentatop eine Immunantwort gegen ein Epitop zu induzieren. Des weiteren wurde beobachtet, dass die induzierten T-Zellfrequenzen nach Pentatop Vakzinierung im Vergleich zur Nutzung von Monotopen signifikant gesteigert werden kann.

Zusammenfassend wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit präklinisch erstmalig nachgewiesen, dass nicht-synonyme Mutationen eine numerisch relevante Quelle von Zielstrukturen für die anti-tumorale Immuntherapie darstellen. Überraschenderweise zeigte sich eine dominante Induktion MHC-II restringierter Immunantworten, welche partiell in der Lage waren massive Tumorabstoßungsreaktionen zu induzieren. Im Sinne einer Translation der gewonnenen Erkenntnisse wurde ein RNA basiertes Oligotop-Format etabliert, welches Eingang in die klinische Testung des Konzeptes fand.

### Abstract

Non-synonymous tumor-specific mutations are an attractive target pool for cancer immunotherapy as they lack expression in healthy tissues and can potentially be recognized as neo-antigens by the mature T-cell repertoire. In principle, any genetic alteration has the potential to generate mutated peptides that are presented by either surface MHC class-I or -II molecules and may represent an ideal target for neo-epitope tumor vaccination. As human cancers are expected to carry thousands of non-synonymous mutations on average which are not subject to central immune tolerance, these mutations may represent optimal candidates for vaccine development. To characterize the immunogenicity of such mutations in a given tumor, a streamlined approach for the prediction and validation of neo-epitopes derived from B16-F10 murine melanoma was implemented. More than 500 non-synonymous point mutations were identified by whole exome sequencing. After selection of expressed genes and good potential MHC binders of the respective mutated epitopes, 50 mutations were chosen and validated by Sanger sequencing.

Intending to define the immunogenicity of mutation-coding sequences, 27-mer peptides (comprising all potential MHC class I and II epitopes of 8 to 14 amino acids in length) were designed that encoded either the mutated or the wild-type amino acid to immunize C57BL/6 mice. Anti-tumor potency of all immunogenic epitopes was investigated in a transplantable B16-F10 melanoma model where mice immunized with mutation-encoding mRNA (RNA) revealed tumor control in the protective as well as the therapeutic setting for a substantial number of mutated epitopes.

Surprisingly, one MHC class II-restricted epitope (Mut-30) was identified that conferred tumor control beyond the efficacy of known immunodominant tumor-associated antigens like Trp2 or gp100. To further examine the mechanism of the anti-tumoral potency of this mutated epitope, the active role of CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> and NK T cells was investigated during early and late stages of tumor development and therapy. Depletion studies demonstrated that CD4<sup>+</sup> but not CD8<sup>+</sup> T cells are crucial for the observed anti-tumoral activity of Mut-30 RNA vaccination. Mutation-specific, IFN- $\gamma$ -expressing CD4<sup>+</sup> T cells were shown to be increased in the tumor tissue in response to Mut-30 RNA vaccination, and IFN- $\gamma$  induced upregulation of MHC molecules on B16-F10 MHC molecules. The data suggest that CD4<sup>+</sup> T cell-derived IFN- $\gamma$  exerts direct anti-proliferative effects on B16-F10 tumor cells in addition to facilitating lytic interactions of other effectors with tumor targets.

Although anti-tumoral activity in mice was achieved with a single mutation, to combine several mutations would be preferable to address tumor heterogeneity and prevent escape. It was demonstrated that vaccination with an RNA encoding five different mutated epitopes interconnected by non-immunogenic linkers (pentatope RNA) had strong anti-tumoral effects, independent of the epitope position.

This work demonstrates that non-synonymous point mutations are a relevant source for anticancer vaccine repertoire, whose strongest feature may be the combined induction of mutation specific T-cell responses.

## Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b> .....	
<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>III</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Tumorerkrankungen.....	1
1.2 Immuntherapie.....	1
1.2.1 Die Immuntherapie und ihre historische Entwicklung.....	1
1.2.2 Tumor Neo-Epitope und ihre Bedeutung für die Immuntherapie.....	3
1.2.3 Das suppressive Tumormikromilieu.....	4
1.2.4 Tumor-Immuneditierung.....	5
1.2.5 Immuntherapie von Tumorerkrankungen.....	6
1.2.6 RNA basierte Immuntherapie.....	7
1.3 Individualisierte Vakzine am Beispiel des malignen Melanoms.....	10
1.4 Aufgabenstellung.....	12
<b>2 Material &amp; Methoden</b> .....	<b>13</b>
2.1 Verwendetes Material.....	13
2.1.1 Geräte.....	13
2.1.2 Plastikwaren.....	13
2.1.3 Reagenzien und Chemikalien.....	14
2.1.4 Peptide.....	15
2.1.5 RNA.....	15
2.1.6 Liposomen.....	15
2.1.7 Antikörper, Mikrobeads und Pentamere.....	15
2.1.8 Kits.....	16
2.1.9 Medien und Puffer.....	16
2.1.10 Software.....	17
2.2 Zellkultur.....	18
2.2.1 Zellkulturtechniken.....	18
2.2.2 Zellzahlbestimmung.....	18
2.2.3 Kultivierung der Melanomzelllinie B16-F10.....	18
2.2.4 Kultivierung der transgenen Melanomzelllinie B16-Luc-eGFP-Cl2.....	18
2.2.5 Einfrieren von Zellen.....	18
2.2.6 Zellvorbereitung für die subkutane Inokulation.....	19
2.2.7 Zellvorbereitung für die intravenöse Inokulation.....	19
2.3 Isolierung und Kultivierung von immunkompetenten Zellen.....	19
2.3.1 Die Gewinnung muriner dendritischer Zellen aus dem Knochenmark (mBMDC).....	19
2.3.2 Gewinnung muriner Milzzellen.....	19
2.3.3 Magnetische Zellsortierung (MACS).....	20
2.3.4 Gewinnung muriner T-Lymphozyten aus Tumorgewebe.....	20
2.3.5 Gewinnung muriner T-Lymphozyten aus Blut.....	20

---

2.3.6	Transfektion von murinen Zellen mit RNA mittels Elektroporation.....	21
2.4	<i>Durchflusszytometrie</i> .....	21
2.4.1	Oberflächenfärbung.....	21
2.5	<i>Intrazelluläre Färbung von Zytokinen</i> .....	22
2.6	<i>In Vivo Imaging</i> .....	22
2.6.1	Nicht invasive Imaging Methode.....	22
2.7	<i>Molekularbiologische Methoden</i> .....	23
2.7.1	SDS-PAGE.....	23
2.7.2	Western Blot.....	23
2.8	<i>Verwendete Vakzine</i> .....	24
2.8.1	Peptid-Formulierung.....	24
2.8.2	RNA-Formulierung (Liposomen).....	24
2.8.3	RNA-Formulierung (Lipofectamine® RNAiMAX, Lifetechnologies).....	25
2.9	<i>Tierexperimentelle-Methoden</i> .....	25
2.9.1	Mäuse und Haltungsbedingungen.....	25
2.9.2	Subkutane Tumorinduktion.....	25
2.9.3	Intravenöse Tumorinduktion.....	26
2.9.4	Peptid-Immunisierung.....	26
2.9.5	RNA-Immunisierung.....	26
2.10	<i>Immunologische Methoden</i> .....	26
2.10.1	ELISPOT-Zytokinsekretionstest.....	26
2.11	<i>Immunohistologische Methoden</i> .....	27
2.11.1	Präparation von Geweben für immunhistologische Färbungen.....	27
2.11.2	Immunfluoreszenz von Gewebeschnitten.....	27
2.11.3	Immunfluoreszenz von Zelllinien.....	28
2.11.4	Konfokale Lasermikroskopie.....	28
2.12	<i>Statistische Auswertung</i> .....	28
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>29</b>
3.1	<i>Etablierung eines immunologischen Testsystems zur Identifizierung von Immunantworten gegen tumor-spezifische Punktmutationen</i> .....	29
3.1.1	Optimierte subkutane Peptidimmunisierung: Testung verschiedener Adjuvantien....	29
3.1.2	Optimierte subkutane Peptidimmunisierung: Testung verschiedener Zeitpunkte.....	30
3.2	<i>In vivo Testung von identifizierten und validierten Punkt Mutationen</i> .....	31
3.2.1	Screen mit priorisierten Mutationen.....	31
3.2.2	RNA basierte <i>in vivo</i> Testung bestätigter Mutationen.....	33
3.2.3	Phänotypisierung der induzierten T-Zellen.....	34
3.3	<i>Analyse der anti-tumoralen Potenz von mutations-spezifischen Epitopen</i> .....	36
3.3.1	Analyse der spontanen Immunität in Wildtyp-Mäusen.....	36
3.3.2	Therapeutischer Effekt nach Peptidimmunisierung.....	37
3.3.3	Therapeutischer Effekt nach liposomaler RNA Vakzinierung.....	39
3.4	<i>MoA Analyse der antitumoralen Wirkung eines mutierten Epitopes</i> .....	41

3.4.1	Das MHC-II restringierte Epitop Mut-30 zeigt ein starkes anti-tumorales Potenzial...	41
3.4.2	Phänotypisierung der Mut-30 spezifischen Immunantwort.....	43
3.4.3	Definition des Mut-30 Minimalepitops .....	44
3.5	<i>Analyse des anti-tumoralen Effekt nach liposomaler Mut-30 RNA Vakzinierung.....</i>	<i>45</i>
3.5.1	Induktion von Mut-30 spezifischen Gedächtniszellen.....	45
3.5.2	Therapeutisches Lungen Model .....	47
3.5.3	<i>In vitro</i> Analyse von Mut-30 spezifischen CD4 <sup>+</sup> T-Zellen.....	48
3.5.4	TIL-ELISPOT nach liposomaler Mut-30 RNA Vakzinierung.....	50
3.6	<i>Analysen der tumorinfiltrierenden T-Lymphozyten.....</i>	<i>51</i>
3.6.1	T-Lymphozyten Infiltration im Rahmen der liposomalen RNA Vakzinierung.....	51
3.6.2	Analyse der regulatorischen T-Zellen.....	55
3.6.3	MHC Expression von Tumorzellen nach liposomaler Mut-30 RNA Vakzinierung.....	56
3.7	<i>Analyse der anti-tumoralen Effektorpopulation.....</i>	<i>57</i>
3.7.1	Frühe Depletion von Lymphozyten .....	57
3.7.2	Verzögerte Depletion von Lymphozyten.....	59
3.7.3	Therapeutisches Tumorexperiment in IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> K.O. Mäusen.....	62
3.8	<i>Etablierung eines RNA Polytop Formates .....</i>	<i>62</i>
3.8.1	Testung von drei verschiedenen Model-Pentatop Varianten .....	63
3.8.2	Pentatop v.s. Monotop v.s. Mix.....	66
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>69</b>
4.1	<i>Analyse der Immunogenität von identifizierten und validierten nicht-synonymen Punktmutationen.....</i>	<i>70</i>
4.1.1	Das B16-F10 Mutanom .....	70
4.1.2	Frequenz immunogener Mutationen .....	71
4.1.3	RNA basierte <i>in vivo</i> Testung bestätigter Mutationen .....	72
4.1.4	Antigenität korreliert nicht mit onkogener Relevanz.....	74
4.1.5	Neo-Epitope induzieren eine starke sowie spezifische Immunantwort .....	74
4.1.6	Die induzierte Immunantwort zeigt antitumorale Wirksamkeit.....	75
4.2	<i>Charakterisierungen eines immundominanten Neo-Epitopes.....</i>	<i>76</i>
4.2.1	Mut-30 ist eine Punktmutation in einem Gen welches das Protein KIF18b kodiert....	76
4.2.2	Nach therapeutischer Vakzinierung wird KIF18b nicht herunter reguliert.....	77
4.2.3	Phänotypisierung der Mut-30 spezifischen Immunantwort.....	78
4.2.4	Mut-30 spezifische T-Zellen vermitteln potente anti-tumorale Wirkung.....	79
4.2.5	NK-Zellen spielen in der frühen Phase der Therapie eine entscheidende Rolle.....	79
4.2.6	RNA aktiviert NK-Zellen via DCs .....	80
4.2.7	Mut-30 spezifische T-Zellen invadieren den Tumor.....	81
4.2.8	IFN- $\gamma$ spielt eine zentrale Rolle für den gezeigten anti-tumoralen Effekt.....	82
4.2.9	Mut-30 spezifische T-Zellen beeinflussen das Tumormikromillieu.....	83
4.2.10	Spezifischer Einfluss auf T-regs .....	84
4.2.11	Spezifische CD4 <sup>+</sup> T-zellen fördern Makrophagen und hemmen MDSC im Tumor.....	84
4.2.12	Mut-30 spezifische T-Lymphozyten migrieren in das Zentrum der Tumore.....	85
4.2.13	CD4 <sup>+</sup> T-Zellen als Effektoren.....	85
4.2.14	Einfluss von CD8 <sup>+</sup> T-Zellen .....	86

---

4.2.15	NK und spezifische CD4 <sup>+</sup> T-Zellen wirken in einem zwei Phasenmodell.....	87
4.3	<i>Etablierung eines RNA Polytop Formates zur Vakzinierung mehrerer Tumor spezifischer Antigene.....</i>	<i>88</i>
5	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>91</b>
6	<b>Appendix.....</b>	<b>105</b>
7	<b>Abkürzungen.....</b>	<b>108</b>
8	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>1</b>
9	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>2</b>
10	<b>Veröffentlichungen.....</b>	<b>3</b>
10.1	<i>Orginalarbeiten.....</i>	<i>3</i>
10.2	<i>Abstracts und Poster.....</i>	<i>3</i>
11	<b>Danksagung.....</b>	<b>5</b>
12	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>6</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Tumorerkrankungen

Tumorerkrankungen stellen in einer technisch hochentwickelten Industrienation wie der Bundesrepublik Deutschland im 21. Jahrhundert die zweithäufigste Todesursache dar (26% aller Sterbefälle, Statistisches Bundesamt Wiesbaden, Stand 2011). Der Anteil der bösartigen Tumorerkrankungen unter den Verstorbenen ist laut Statistischem Bundesamt in den letzten 30 um ca. 25% Jahren gestiegen, was vor allem auf die alternde Bevölkerung, sowie bessere Früherkennung zurückzuführen ist. Die Haupttodesursache bei Krebsleiden (ca. 30%) waren Erkrankungen der Verdauungsorgane gefolgt von Lungen- und Bronchialkrebs (26%) bei Männern und Brustkrebs (18%) bei Frauen. Frauen sterben heute doppelt so häufig (+124%) an Lungen-, Kehlkopf- oder Luftröhrenkrebs als vor 30 Jahren was in direktem Zusammenhang mit dem zunehmenden Zigarettenkonsum steht. Nach Angaben des Statistischen Bundesamts leben Krebspatienten heute im Schnitt ca. 2 Jahre länger als vor 30 Jahren. Hierbei spielen Prävention, Hygiene und angewandte Therapie eine große Rolle.

Eine Tumorzelle entsteht aus einer körpereigenen Zelle, die sich z.B. als Folge einer Mutation in den Regulationsgenen für den Zellzyklus häufiger und unkontrolliert teilt. Durch das veränderte Genom verändert sich auch das Proteinexpressionsprofil, was sich unter anderem in einer veränderten Expression spezifischer Proteine, sogenannte Tumorantigene, widerspiegelt. Unter normalen Umständen kann so eine entartete Zelle vom Immunsystem erkannt und eliminiert werden. Tumorzellen haben verschiedene Möglichkeiten, der Attacke durch das Immunsystem zu entgehen, sodass ein komplexes System von Wechselwirkungen zwischen Tumorzellen und dem Immunsystem entsteht. Durch die Analyse dieser Wechselwirkungen ist es in den letzten Jahren gelungen, verschiedenste neue Angriffspunkte für spezifische Therapien zu entdecken und diese als Ausgangspunkt von Arzneimittelentwicklung zu nutzen.

## 1.2 Immuntherapie

### 1.2.1 Die Immuntherapie und ihre historische Entwicklung

Das Hauptziel der Immuntherapie ist die Zerstörung eines Tumors durch das Immunsystem. Hierbei kommen in Abhängigkeit von der Erkrankung stimulierende, modulierende, supprimierende oder substituierende Verfahren zur Anwendung. Die Möglichkeit der verwendeten Mittel ist groß: Antikörper, immunstimulatorische Moleküle, Zytokine, adaptiver Zelltransfer und Vakzinierung. Im Gegensatz zur Chemo- oder Radiotherapie ist der große Vorteil der Immuntherapie die selektive Zerstörung entarteter Zellen ohne dabei das gesunde Gewebe an zu greifen.

Bereits vor über 100 Jahren gab es Berichte über an Krebs erkrankten Patienten, bei denen nach einer überstandenen Infektionskrankheit auch der Tumor verschwand. Der Würzburger Arzt Friedrich Fehleisen berichtete bereits 1882 über Tumorregressionen bei Krebspatienten nach einer induzierten Infektion durch *Streptokokkus pyogenes*<sup>1</sup>. Den ersten systematischen Ansatz, das Immunsystem zur Heilung von Krebserkrankungen zu manipulieren, wurde 1893 durch den New Yorker Arzt William Coley

publiziert<sup>2</sup> und ging als Coley's Toxin in die Geschichte der Immunologie ein. Die Erkenntnis, dass das Immunsystem nicht nur fremde Pathogene, sondern auch körpereigene, mutierte Tumorzellen erkennen und zerstören kann, wurde erstmalig 1909 von Paul Ehrlich<sup>3</sup> beschrieben und später von Burnet<sup>4</sup> (1957) und Thomas (1959) durch deren Theorie der Tumor-Überwachung erweitert<sup>5</sup>. Deren Hypothese besagt, dass die Entstehung eines Tumors mit einer genetischen Veränderung verbunden sei, die zur Expression veränderter Proteine führe. Wobei diese veränderten Proteine vom Immunsystem als „fremd“ erkannt und die entarteten Zellen zerstört werden. Demnach ließe sich die Existenz eines aggressiven Tumors auf einen Defekt des Immunsystems zurückführen. Der Fokus der Wissenschaft konzentrierte sich daraufhin jahrzehntelang auf den Nachweis dieser spezifischen Immunreaktion in Tumorpatienten sowie das Verständnis wie das eigene Immunsystem therapeutisch effektiver eingesetzt werden kann. Der erste Beweis von tumorspezifischen Antikörpern gelang Lloyd Old bereits Mitte der 60er Jahre<sup>6</sup>. Allerdings brachte den ersten wirklichen Durchbruch die Entwicklung neuer Technologien wie die Hybridomtechnik zur Herstellung monoklonaler Antikörper<sup>7</sup>.

Die erste systematische immunologische Therapie von Tumorerkrankungen geriet Mitte der 70er Jahre in den Fokus wissenschaftlichen Interesses. Grund war die Beschreibung eines immuntherapeutischen Ansatzes zur Heilung des Blasenkarzinoms. Hierbei wurde der eigentlich als Tuberkulose-Impfstoff bekannte BCG (*Bacillus Calmette-Guerin*) innerhalb der Harnblase installiert, was zu einer Verbesserung des Krankheitsverlaufes führte<sup>8</sup>. Auch heute noch wird dieses Verfahren standartmäßig zur Heilung des Blasenkarzinoms verwendet

Im Bereich der T-Zell Forschung wurden stabile *in vitro* Kulturbedingungen etabliert, die die Klonierung einzelner Lymphozyten ermöglichte. Weitere Fortschritte der Tumorummunologie führten dazu, dass tiefere Erkenntnisse über die genauere Morphologie der Tumorantigene gewonnen wurden. Untersuchungen belegten, dass sich gesunde und entartete Zellen nicht nur in der Antigenexpression unterscheiden, sondern die Zellmembranmoleküle als assoziierte oder spezifische Tumorantigene fungierten die in Form von Peptiden zur Zelloberfläche transportiert, von MHC-Molekülen präsentiert und von T-Zellen als fremd erkannt und zerstört werden. Bereits vor einigen Jahren wurde im murinen sowie humanen System diese Erkennung von Tumorantigenen durch T-Zellen belegt<sup>9,10</sup>. Eine Vielzahl der bereits bekannten Tumorantigene wurde durch Transfektion genomischer oder cDNA Banken gefunden. Die transfizierten Zellen trugen das geeignete Molekül, das für die Erkennung durch spezifische T-Zellen notwendig war<sup>11,12</sup>.

Mitte der 90er Jahre wurden Verfahren etabliert, die die Identifizierung von Tumorantigenen weitgehend automatisieren, hierbei sei vor allem SEREX (serologische Identifikation von Antigenen durch rekombinantes Expressionsklonieren) aus der onkologischen Arbeitsgruppe um Michael Pfreundschuh genannt<sup>13</sup>. Durch die im Rahmen des Humangenomprojektes gewonnen Erkenntnisse und mit Hilfe verbesserter analytischer Verfahren, hat sich in der letzten Dekade, speziell das NGS (**N**ext **G**eneration **S**equencing) als leistungsfähiges Hochdurchsatz Verfahren zur Identifizierung von Tumorantigenen etabliert.

### 1.2.2 Tumor Neo-Epitope und ihre Bedeutung für die Immuntherapie

Tumorzellen unterscheiden sich u.a. in ihrem Proteom erheblich von gesunden Zellen desselben Gewebes, sie haben eine individuelle „Mutations-Signatur“<sup>14</sup>. Bei dieser spezifischen Signatur handelt es sich um nicht-synonyme Mutationen, also Mutationen die die Aminosäuresequenz von Proteinen verändert. Hierdurch können mutierte Neo-Epitope entstehen, was wiederum dem Immunsystem theoretisch eine Möglichkeit bietet, Tumorzellen von gesunden Zellen zu unterscheiden und als „fremd“ zu erkennen.

Die Analyse der Neo-Antigene lässt eine grobe Klassifizierung nach Sequenz, Expression und Immunogenität zu<sup>15,16</sup>:

- **Tumor-assoziierte Antigene (TAA)**  
Hierbei handelt es sich um gewebsspezifisch überexprimierte Antigene, die auch im korrespondierenden Normalgewebe exprimiert werden. Im Vergleich zu Tumor-spezifischen Antigenen, haben assoziierte Antigene eine deutlich verringerte T-Zell Affinität, was vor allem auf immunologische Toleranzmechanismen zurück zu führen ist<sup>17</sup>. Zwei Vertreter sind hier die Antigene Trp2 und gp100 im Zusammenhang mit Melanozyten<sup>18</sup>.
- **„Cancer-germline“ Antigene (CGA)**  
Bei diesen Tumorantigenen handelt es sich um Antigene, die ausschließlich in einer Vielzahl von Tumoren und in Zellen der Keimbahn exprimiert werden<sup>19</sup>. Da Keimbahnzellen keine **Human Leukocyte Antigen Moleküle (HLA)** besitzen, stellen diese Kandidaten sehr gute Antigene für die Immuntherapie dar<sup>20</sup>. Als prominente Kandidaten seien hier die Proteine der MAGE-Familie und NY-ESO-1<sup>21</sup> genannt. Höchstwahrscheinlich ist die Demethylierung der Promotorregion verantwortlich für die Aktivierung dieser Gene in Tumorzellen<sup>22</sup>.
- **Tumor-spezifische Antigene (TSA)**  
Mutationen stellen Veränderungen in Genen dar, die zu einem anderen Proteinprodukt als dem des Wildtyps führen können und so zur Generierung neuer potentiell als „fremd“ anerkannte Antigene beitragen<sup>23,24</sup>. Sie kommen als Deletion, Insertion oder in den meisten Fällen als Punktmutationen vor.
  - **Punktmutationen:** Wird durch eine Punktmutation eine andere Aminosäure im Protein eingebaut, spricht man von einer nicht-synonymen Punktmutation. Als Beispiel sei hier das Fusionsprotein RUNX1 genannt, das von T-Zellen erkannt und die leukämischen Zellen angegriffen werden<sup>25</sup>.
  - **Deletion:** Hierbei handelt es sich um den Verlust einer Base. Die Nachfolgende Base rückt gegen die Leserichtung auf, was eine Frameshift-Mutation zur Folge hat. Prominentes Beispiel, aus dem ein Tumorantigen resultiert, ist eine Frameshift-Mutation im Tumorsuppressorgen CDKN2A<sup>26</sup>.
  - **Insertion:** Bei einer Insertion handelt es sich um den Zugewinn einer Base. Die Nachfolgende Base rückt entsprechend in die Leserichtung auf, was ebenfalls eine Frameshift-Mutation zur Folge hat<sup>27</sup>.

- **Virale Antigene**  
Es wurde gezeigt, dass ein viraler Ursprung für verschiedene humane Tumore wie das Leberzellkarzinom, Gebärmutterhalskrebs und adulte T-Zell-Leukämie verantwortlich ist. Aus Proteinen, die im Genom bestimmter onkogener Viren codiert sind können sehr immunogene Epitope hervorgehen, beispielhaft sind hier die Proteine E6 und E7 aus dem humanen Papilloma-Virus zu nennen<sup>28</sup>.
- **Überexprimierte Antigene**  
In Tumoren kann es durch Modifikationen im Promotorbereich und eine dadurch resultierende erhöhte Genexpression zur erhöhten Präsentation von Tumor relevanten Epitopen kommen. Prominente Beispiele hierfür ist das Tumorsuppressorprotein p53<sup>29</sup> sowie Vertreter der humanen EGFR (Epidermal-growth-factor-receptor) Familie<sup>30</sup>.

Der Umstand, dass es möglich ist aus verschiedene Tumorvarianten immunogene Tumorantigene zu isolieren, wirft die Frage auf, warum sich trotz spezifischer Expression solcher Neoantigene im Menschen überhaupt Tumore entwickeln und diese nicht schon zu einem frühen Zeitpunkt vom Immunsystem zerstört werden. Die Antwort ist komplex und bis heute nicht vollständig verstanden. Eine Erklärung für die ausbleibende Immunreaktion ist in der negativen Selektion im Thymus bzw. der peripheren Toleranz zur Verhinderung von Autoreaktivität zu suchen. Ein weitere wichtiger Mechanismus von Tumorzellen, der Erkennung von T-Zellen zu entgehen, sind sog. „*tumor-escape*“-Mechanismen.

### 1.2.3 Das suppressive Tumormikromilieu

Um den Angriffen des Immunsystems zu entgehen, entwickeln Tumore eine Vielzahl von Abwehrmechanismen (siehe Tab 1.1). Sie bedienen sich der gleichen Strategien, wie gesunde Zellen und Gewebe, deren ursprüngliche Aufgabe es ist, Autoimmunität und übermäßige Immunreaktion einzudämmen. Bereits eine frühe Erkennung von Tumorzellen durch das Immunsystem wird so unterdrückt. Die Expression von MHC-Molekülen sowie Tumorantigenen wird reduziert, so dass die mutierten Zellen von T-Zellen nicht erkannt werden und daher keine Abwehrreaktion induziert wird<sup>31,32</sup>.

Die Antigenpräsentation kann auch durch Defekte in der Antigen-Prozessierung verhindert werden. Mutationen oder reduzierte Expression beispielsweise von Untereinheiten des Proteasoms haben die Präsentation eines veränderten Peptidspektrums und damit häufig ein Ausfallen der tumorspezifischen T-Zellantwort zur Folge<sup>33</sup>. Weiter können Proteine wie TAP (Transporter assoziierte Antigen Prozessierung) mutiert oder defekt sein.

Kommt es trotzdem zu einer Erkennung und Aktivierung der T-Zellen, werden diese durch die Sekretion von suppressiven Zytokinen wie beispielsweise FasL<sup>34</sup> (Fas Ligand) und TGF- $\beta$ <sup>35</sup> (Tumor growth factor- $\beta$ ) inhibiert. TGF- $\beta$  hemmt die Proliferation sowie Differenzierung von Makrophagen und T-Zellen, zusätzlich bindet das von Tumorzellen sekretierte FasL an das Fas der T-Zellen und induziert deren Apoptose. T-Zellen, die das Tumorgewebe infiltriert haben, werden durch Faktoren des Mikromilieus in einen Zustand der Inaktivität gedrängt. Wenn die Expression kostimulatorischer Moleküle auf APCs (Antigen presenting cells), wie beispielsweise CD80/CD86, minimiert wird und dagegen vermehrt

inhibierende Liganden (**Programmed death-ligand1**; PD-L1 usw.) exprimiert werden, kann T-Zell Anergie induziert werden. Diese anergen T-Zellen sind inaktiv und zeigen keine Proliferation sowie Effektorfunktion mehr<sup>36</sup>.

Tumore, die im Gehirn oder im Auge wachsen, die als immunprivilegierte Bereiche gelten, werden vom Immunsystem oft nur eingeschränkt erkannt<sup>37</sup>.

**Tab. 1.1 Mechanismen der Immunevasion von Tumoren (modifiziert nach Whiteside<sup>38</sup>)**

Strategie	Mechanismus
Ignoranz	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Wachstum in immunprivilegierten Regionen</li> <li>• Fehlen von Tumorantigenen</li> <li>• Fehlen von Adhäsionsmolekülen</li> </ul>
Defekte Antigenpräsentation	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mutation / Abwesenheit von Tumorantigenen</li> <li>• Reduzierte Oberflächenexpression von HLA-Molekülen</li> <li>• Defekt in der Antigenprozessierung</li> <li>• Dysfunktion von Antigen-präsentierenden Zellen</li> </ul>
Expression von immunsuppressiven Moleküle/Liganden	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zytokine</li> <li>• Prostaglandine</li> <li>• PD-L1</li> </ul>
Induktion von Tolleranz	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fehlen von kostimulatorischen Molekülen</li> <li>• Immunabweichung</li> <li>• T-regs</li> <li>• MDSC</li> <li>• T-Zell-Deletion</li> </ul>
Escape des Tumores	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Expression von TGF-<math>\beta</math> / FasL</li> </ul>

Unabhängig von den verschiedenen Wirkungsweisen sind diese Mechanismen hauptverantwortlich, dass sich Tumorzellen im Organismus etablieren können ohne durch das Immunsystem erkannt und zerstört zu werden. Das Verstehen und Überwinden dieser Mechanismen gehört zu den zwingenden Schritten auf dem Weg zu einer klinisch relevanten Tumorthherapie.

#### 1.2.4 Tumor-Immuneditierung

Burnet und Thomas beschrieben die Fähigkeit des Immunsystems, entartete Zellen zu erkennen und zu zerstören als Tumor-Überwachung<sup>5</sup>. Dem zu folge kann es in einem gesunden Organismus nicht nur zu der Entstehung des Tumors, sondern auch zu der Abstoßung kommen. Dieser Theorie folgend

entwickelte Schreiber und Kollegen die These der Tumor-Immunoeditierung<sup>39</sup> die die folgenden drei Phasen beinhaltet:

- **Die Eliminierungsphase:** In ihr werden die ersten Tumorzellen vom Immunsystem erkannt und abgetötet.
- **Das Equilibrium:** In dieser Phase entwickeln die überlebenden Tumorzellen durch Mutation und andere Escape-Varianten Strategien, um den Angriffen des Immunsystems zu entgehen. Es entsteht ein Gleichgewicht in dem Tumorwachstum und Tumorerstörung sich die Waage halten.
- **Evasion:** In dieser Phase werden Tumorzellen durch das Immunsystem nicht mehr erkannt und können zu klinisch diagnostizierbaren Tumoren auswachsen. Eine Zusammenfassung der bisher bekannten Immunevasionsstrategien von Tumoren ist in Tabelle 1.1 dargestellt.

Um ihre Theorie in der Praxis zu beweisen, verwendeten Schreiber und Kollegen einen aus RAG2<sup>-/-</sup>-Mäusen isolierten Tumor. Da diese Mäuse immundefizient sind, unterlag das Tumorwachstum keinerlei Kontrolle des Immunsystems. Daher wurde von einer Vielzahl verschiedener Klone ausgegangen. Die aus dem Tumor entstandene Zelllinie wurde naiven WT (**Wild Typ**)-Mäusen gespritzt, worauf 80% der immunkompetenten Mäuse den Tumor abstießen. In 20% fand eine primäre Regression, gefolgt von einem starken Tumorwachstum statt. Wurden wiederum Tumorzellen dieser Escape-Varianten isoliert und naiven WT-Mäusen gespritzt, zeigte sich ein progressives Tumorwachstum in allen Mäusen<sup>5</sup>.

Neben der Tumor-Immunoeditierungshypothese wurde von Fuchs und Matzinger das „*danger-model*“ zur Beschreibung der Immunreaktion gegen das Tumorgewebe etabliert<sup>40</sup>. Dieses Modell definiert APCs als Wächter für Gewebeschäden. Die durch spezifische Signale aktivierten APCs stimulieren T-Zellen. Bei entarteten Zellen fehlt das für eine effektive Immunantwort nötige Signal, da das Tumorgewebe scheinbar keine direkte Gefahr darstellt. Der Tumor wird durch das Immunsystem ignoriert und nicht attackiert.

### 1.2.5 Immuntherapie von Tumorerkrankungen

Trotz aller Mechanismen der Tumorzellen, sich dem Immunsystem zu entziehen, sind in Patienten dennoch immer wieder spontanen Remissionen zu beobachten. So wurde von Bissell und Hines<sup>41</sup> anhand von pathologischen Gewebeproben gezeigt, dass bis zu 34% der verstorbenen Männer nicht an, sondern mit einem Prostata-Tumor starben. Dieses Phänomen belegt, dass es prinzipiell möglich ist, dass das Tumorgewebe vom eigenen Immunsystem kontrolliert werden kann. Da es ein Charakteristikum des Tumors ist, sich dieser Kontrolle zu entziehen, kann die Anforderung an eine Immuntherapie formuliert werden, eine Immunreaktion spezifisch gegen den Tumor zu induzieren, oder eine bereits vorhandene tumorspezifische Immunität verstärken, ohne den eigenen Körper weiter zu schädigen. Prinzipiell lässt sich die aktive Stimulierung des Immunsystems von der passiven Immunisierung unterscheiden.

Im Folgenden soll nur auf die aktive Immuntherapie in Form der Tumorzellimpfung eingegangen werden. Hierzu soll gegen tumorspezifische Epitope immunisiert werden, um T-Zellen zu generieren, welche den Tumor erkennen aber minimale Nebenwirkungen auslösen. Dass Epitope aus TSA in Form von Peptiden durch T-Zellen erkannt werden können, was letztlich zur Abtötung von Tumorzellen führte,

wurde erstmalig von van der Bruggen und Kollegen gezeigt<sup>9</sup>. Für die Generierung einer T-Zellantwort gegen den Tumor gibt es verschiedene Vakzinierungsstrategien, die in der folgenden Tabelle aufgelistet sind:

**Tab. 1.2 Vakzinierungsstrategien**

Strategie	Art des Antigens
Antigen (+/-Adjuvant)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Peptid</li> <li>• Protein</li> <li>• DNA, RNA oder rekombinantes Virus</li> </ul>
Beladene DCs	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Peptid</li> <li>• Tumorlysat</li> <li>• DNA, RNA</li> <li>• Protein</li> </ul>
Onkolytische Viren	<ul style="list-style-type: none"> <li>• direkt onkolytisch</li> <li>• immunogen</li> <li>• adaptiv (Bsp. Toxine)</li> </ul>

Nicht nur die Spezifität der Tumorantigene spielt eine wichtige Rolle, sondern auch das für die Vakzinierung verwendete Format. So wurde in den letzten zwei Dekaden vor allem auf Peptide und DNA als Vakzinierungsformat zurückgegriffen. Beide Formate gehen allerdings mit einigen Nachteilen einher. So kann es zum Einbau der eingebrachten DNA in die zelluläre DNA kommen, wodurch beispielsweise Onkogene aktiviert oder es zu Chromosomenbrüchen kommt<sup>42,43</sup>. Die Verwendung von Peptiden erfüllt zwar alle Sicherheitsstandards, die für die Herstellung einer Vakzine benötigt werden, sind aber durch folgende drei Punkte beschränkt: (i) Das genaue Epitop muss definiert sein. (ii) Für alle HLA Moleküle muss das passende Epitop verwendet werden. (iii) Es besteht die Gefahr, dass Peptide, nicht nur auf APCs geladen werden und es zur Toleranzentwicklung gegen das Epitop kommt.

Da *in vitro* translatierte mRNA nicht chromosomal integriert, die Möglichkeit bietet neben Epitopen auch Volllängeproteine zu kodieren und vielfältige Sequenzmodifikationen ermöglicht wurde sie als vielversprechendes Antigenformat entdeckt<sup>44</sup>.

### 1.2.6 RNA basierte Immuntherapie

Da es sich bei RNA um eine Nukleinsäure handelt, die nur transient in den eingebrachten Zellen translatiert wird, liegt die kodierte Information nicht dauerhaft in der Zelle vor. Ergo kann es zu keiner Integration in die Wirts-DNA, wie es bei DNA möglich ist, kommen. Die in das Zytoplasma eingebrachte RNA muss für die Transkription nicht wie DNA in den Nukleolus migrieren, um funktional zu sein. Ein weiterer Vorteil ist, dass die *in vitro* transkribierte RNA (IVT-RNA) schon unter natürlichen Umständen immunstimulierend ist und daher keine weiteren Adjuvantien benötigt. Boczkowski und Kollegen

zeigten bereits im Jahr 1996 die spezifische Induktion von T-Zellen durch mit mRNA transfizierte APC im Maus-Modell<sup>45</sup>.

Es gibt zwei auf RNA basierende Ansätze in der Immuntherapie: (i) Die RNA wird *ex vivo* in Zielzellen wie beispielsweise DCs (**D**endritische **Z**ellen) transferiert und diese danach adaptiv zurück in den Organismus überführt, wo das auf der RNA kodierte Epitop dann T-Zellen präsentiert wird. Dieser Ansatz hat den Nachteil, dass die Generierung der DCs im klinischen Setting aufwendig und kostenintensiv ist. Des Weiteren ist die Migrationseffizienz transformierter DCs in die Lymphknoten gering. (ii) Der Zweite Ansatz sieht vor, die RNA direkt in den Organismus zu administrieren. Für diesen Applikationsweg muss die Eigenschaft des schnellen Abbaus durch ubiquitär vorkommende RNAsen umgangen werden. Außerdem wird RNA bedingt durch ihre negative Ladung nicht durch passive Diffusion in die Zelle aufgenommen. Es wurde gezeigt, dass „nackte“ RNA in hohen Konzentrationen durch Endozytose von DCs internalisiert wird<sup>46</sup>. Hohe Konzentrationen in sekundären lymphatischen Organen können *in vivo* durch intravenöse Applikationen nicht erzielt werden, was zur schnellen Degradierung führt. Die Umgehung der Problematik des enzymatischen RNA Abbaus, sowie die effiziente Aufnahme der RNA in Zielzellen wurde mit der Entwicklung von Liposomen als Trägerstoff erreicht und bereits erfolgreich *in vivo* getestet<sup>47</sup>. Seit einigen Jahren werden synthetische kationische Lipide zur Herstellung von Liposomen verwendet. Sie zeichnen sich durch eine mono- oder polykationische Kopfgruppe aus, die über einen Spacer mit dem lipophilen Molekülteil verbunden ist. In wässrigen Medien und in Kombination mit sogenannten Neutrallipiden entstehen lamellare Strukturen, deren Oberfläche in der Summe positiv geladen ist. Durch die Formulierung mit negativ geladener RNA bilden sich sogenannte Lipoplexe, die sehr effizient, durch die forcierte negative Ladung, von DCs aufgenommen werden. Nach der Aufnahme in die Zelle ermöglichen die fusogenen Eigenschaften der Neutrallipide eine schnelle Freisetzung der RNA in das Zytoplasma.

Um die RNA vor Degradierung durch RNAsen zu schützen, wird sie normalerweise mit einer speziellen synthetischen Cap Struktur am 5'-Ende versehen<sup>48</sup>. Durch die chemische Optimierung der Cap Struktur ist es möglich, die Stabilität der RNA, drastisch zu erhöhen. Holtkamp und Kollgen belegten, dass ein antireverses Cap-Analog (ARCA) direkt mit einer stärkeren Translation und damit verbundenen stärkeren Immunantwort korreliert<sup>49</sup>. Neben der 5' Cap Struktur sorgt ein verlängerter Poly(A) Schwanz am 3' Ende der RNA für weitere Stabilität und Effizienz bei der Translation der RNA im Zytoplasma<sup>50</sup>.

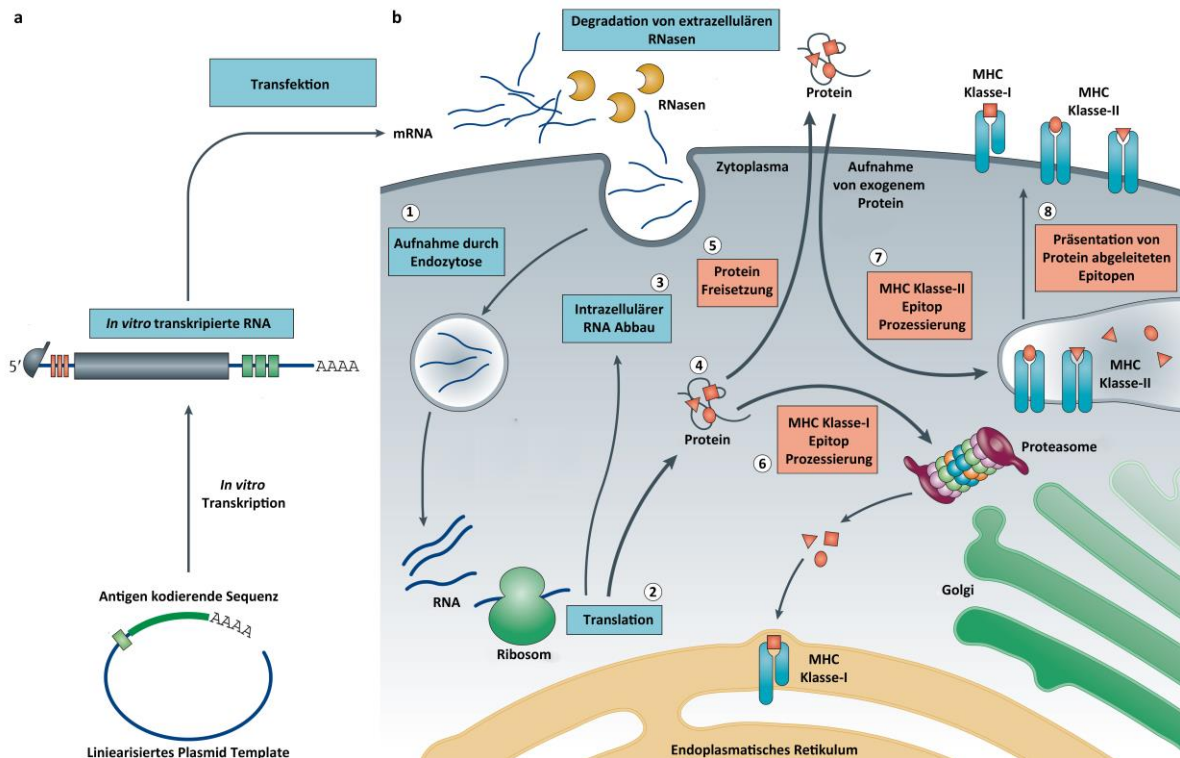
Neben der Immunogenität von RNA wurde *in vitro* eine starke Stimulierung der Toll-like Rezeptoren (TLR) TLR3, 7 und 8 beobachtet. Allgemein befinden sich diese Rezeptoren im endosomalen Kompartiment. Sie erkennen hoch konservierte Strukturen von pathogenen Mikroorganismen. Die Erkennung eines Liganden durch einen TLR resultiert in einer allgemeinen Aktivierung des Immunsystems. Dies beinhaltet die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen, Hochregulation von kostimulatorischen Molekülen und der Reifung sowie Migration von DCs. In Tabelle 1.3 ist eine Auflistung der drei genannten TLRs mit ihren Liganden.

**Tab. 1.3 RNA assoziierte Toll-like-Rezeptoren mit ihrer Lokalisation und ihren natürlich und synthetischen Liganden**

Rezeptor	Lokalisation	Liganden
TLR3	Endosom	Virale dsRNA <sup>51</sup>
TLR7 & TLR8	Endosom	Virale ssRNA <sup>52</sup>
		Imidazoquinoline <sup>53</sup>
		Synthetische RNA <sup>54</sup>
		RNA-Immunglobulin-Komplex <sup>55</sup>

Durch die Aktivierung der Toll-like-Rezeptoren wirkt die eingebrachte RNA als eigenes Adjuvans<sup>52</sup>.

Nach der Translation der RNA ist der weitere Weg des translatierten Proteins von auf der RNA kodierten Sequenzen, z.B. Signalpeptiden bestimmt. Dies kann durch die natürliche Proteinsequenz bestimmt werden, da viele Proteine eine Sekretions- oder Transmembrandomäne haben. Alternativ kann dem Protein über die RNA Sequenz künstlich ein Signalpeptid hinzugefügt werden um dessen Bestimmungsort zu beeinflussen. Für immuntherapeutische Ansätze ist es wichtig, dass Peptide aus dem Antigen, welches auf der RNA kodiert ist auf MHC Klasse-I und -II Molekülen präsentiert werden. Sahin *et al.* zeigte, dass dieses Ziel durch die Fusion des Antigens an eine MHC-I-Transmembran- und Zytosologische-Domäne erreicht werden kann. Abschließend ist auf Abb. 1.1 das Prinzip der RNA basierte Antigenpräsentation zusammengefasst<sup>56</sup>.

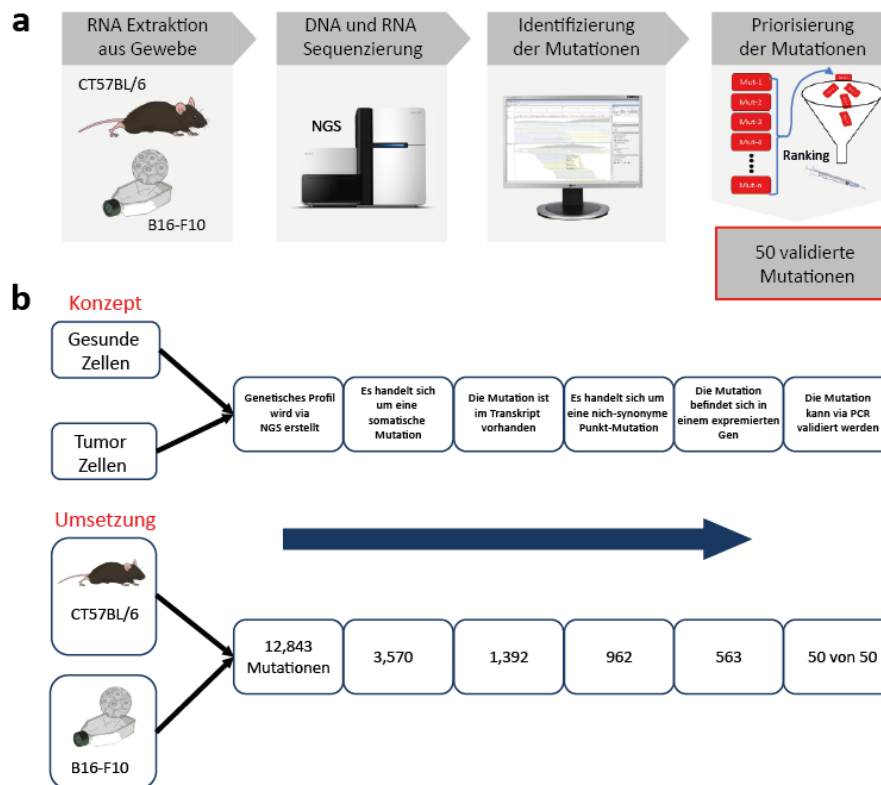


**Abb. 1.1 Prinzip der Antigen kodierenden mRNA Pharmacologie (modifiziert nach Sahin<sup>56</sup>).** (a) Für die *in vitro* Transkription wir linearisierte Plasmid-DNA verwendet. Die *in vitro* transkribierte mRNA beinhaltet die Cap Struktur sowie einen „Open reading frame“ und den Poly(A) Schwanz. Des Weiteren beinhaltet sie 5' und 3' untranslatierte Regionen (UTRs). (b) Schritt 1: Ein Teil der exogenen mRNA wird nicht von RNasen degradiert und wird durch Endozytose in die Zelle aufgenommen. Schritt 2: Translation der mRNA durch die natürliche Protein Synthese Maschinerie der Wirtszelle. Schritt 3: Nicht translatierte RNA wird durch Exonukleasen abgebaut. Schritt 4: Nach der Translation wird das Protein zellspezifisch post-translationale modifiziert und kann seinen Aufgaben innerhalb sowie außerhalb der Zelle nachgehen. Schritt 5: Alternativ kann das Proteinprodukt sekretiert werden und spezifisch autokrin, parakrin oder endokrin wirken. Schritt 6: Für die Immuntherapie von RNA muss das Proteinprodukt in Peptide degradiert werden. Diese Peptide werden dann über MHC Moleküle auf der Oberfläche der Zelle präsentiert. Zytoplasmatische Proteine werden durch das Proteosom degradiert und zum Endoplasmatischen Retikulum transportiert wo sie auf MHC Klasse-I Moleküle geladen werden um spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen präsentiert zu werden. Schritt 7: Damit spezifische CD4 reaktive Antigene den MHC Klasse-II Weg einschlagen, müssen entsprechende Signalpeptide auf der RNA kodiert sein. Es ist allerdings auch über einen Mechanismus, genannt „Cross-Priming“, auf natürlichem Weg möglich, dass das spezifische Peptid von MHC Klasse-II Molekülen präsentiert wird<sup>57</sup>. Schritt 8: Die prozessierten Antigene werden von MHC Klasse-I und Klasse-II Molekülen den spezifischen T-Zellen präsentiert.

### 1.3 Individualisierte Vakzine am Beispiel des malignen Melanoms

Trotz großer Fortschritte in der Behandlung von Tumorerkrankungen sind in vielen Tumorentitäten die Ansprechraten auf die konventionellen Therapien unzureichend. Das Ansprechen dieser Therapie variiert sehr oft zwischen den individuellen Patienten. Hier liegt die Herausforderung vor allem in der Heterogenität der Tumorzellen, den teilweise ausgeprägten Nebenwirkungen konventioneller Therapien, sowie deren mangelnde Wirksamkeit auf Mikrometastasen. Für die Ansprechrate sind die Krebs verursachenden Mutationen im Genom der Patienten, sowie Resistenzen und Escape-Mechanismen des Tumors hauptverantwortlich. Da eine Chemotherapie in den meisten Fällen mit schweren Nebenwirkungen und Zeitverlust einhergeht, ist es oft nicht möglich, verschiedene Therapien zu testen. Der von uns verfolgte sog. IVAC Ansatz sieht vor, eine aktiv personalisierte Impfstherapie zu entwickeln, welche der individuellen Mutationssignatur Rechnung trägt. Hierzu werden zunächst im Rahmen der Diagnostik ein individuelles genetisches Profil des Tumors via NGS erstellt und auf dessen Grundlage verschiedene mutierte Epitope identifiziert und validiert. Sahin und Kollegen zeigten bereits,

dass dieser Ansatz im präklinischen Model für das maligne Melanom (B16-F10) möglich ist<sup>58</sup>. Für die Identifizierung und Selektion der spezifischen Mutationen wurde wie in Abb. 1.2 dargestellt vorgegangen:



**Abb. 1.2 Experimenteller Aufbau des IVAC-Konzeptes** (a) Experimenteller Aufbau des IVAC-Konzeptes. (b) Selektions- und Validierungs-Prozess für das B16-F10 Mutanom.

Interessant bei diesem Ansatz war, dass viele der gefundenen Mutationen für Proteine kodieren die bereits bekannt und direkt mit Krebs in Verbindung gebracht wurden. Jede dieser individuellen im Tumor gefundenen und validierten Mutationen induziert potentiell ein ideales Ziel für eine Therapie, da sie als Neo-Epitope nicht den zentralen Toleranzmechanismen des Immunsystems unterliegen. Da diese tumor-spezifischen Epitope sich als gute Ziele eignen, wurde bereits in verschiedenen Studien gezeigt<sup>59,60</sup> und im Kapitel 1.2.2 näher eingegangen. Auf Grundlage dieser individuellen validierten Mutationen wird ein auf RNA basierender Impfstoff designt, der genau auf das genetische Profil des Tumors eines einzelnen Patienten zugeschnitten ist.

## 1.4 Aufgabenstellung

Vor dem Hintergrund des IVAC-Ansatzes und in der Vorstellung das die via NGS gefundenen und validierten spezifischen B16-F10 Mutationen sehr gute Neo-Epitope für einen auf RNA basierenden Vakzine-Ansatz sind, sollen in der vorliegenden Arbeit die drei folgenden Fragen beantwortet werden:

1. Können gegen nicht-synonyme Mutationen des murinen Melanoms B16-F10 antigenspezifische T-Zellen per Vakzinierung induziert werden und wie hoch ist die Frequenz dieser Mutationen? Die Untersuchung dieser Fragestellung soll grundsätzlich erstmals größere Datensätze zur Immunogenität von non-synonymen Mutationen bereitstellen und charakterisieren inwieweit diese von Eigenschaften der zugrundeliegenden Proteine abhängt.
2. Was ist die anti-tumorale Potenz von immunogenen mutierten Epitope im B16 Modell nach therapeutischer Vakzinierung? Studien zu dieser Frage sollen erstmals für ein Set immunogener Mutationen deren therapeutisches Potential charakterisieren. Für eine ausgewählte anti-tumoral wirksame Mutation ist geplant deren „mode of action“ näher zu charakterisieren.
3. Da es eine zentrale Idee des IVAC-Ansatzes ist, den individuellen Tumor mit gleich mehreren spezifischen Epitopen zu targetieren, ist die Hauptfragestellung des dritten Teils dieser Arbeit, ob es möglich ist, mehrere Epitope auf einer RNA zu kodieren und welchen Einfluss die Position innerhalb dieser RNA des individuellen Epitopes auf die Immunogenität hat. Im Sinne der Entwicklung eines personalisierten Vakzinekonzeptes und des Risikos von Escape-Mutanten ist die Testung des Konzeptes einer Multi-Epitopen Vakzine von hoher translationaler Relevanz.

## 2 Material & Methoden

### 2.1 Verwendetes Material

#### 2.1.1 Geräte

Brutschrank HERAcCell 240i	Thermo Scientific
ELISPOT Reader	CTL, USA
Durchflusszytometer Canto II	Becton Dickinson, Heidelberg
Durchflusszytometer Calibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Elektroporator, ECM 830	BTX Harvard Apparatus, USA
Lichtmikroskop Leica DMIL	Leica Microsystems, Heidelberg
MACS-Säulen	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Narkoseeinheit	Groppler, Deggendorf
Sterilbank, Biowizard Silverline	Kojair, Finland
Vortexer	IKA Labortechnik, Staufen
Wasserbad	Heraeus, Hanau
Zellzählgerät, Vi-Cell XR	Beckmann&Coulter, UK
Zentrifuge, 5810	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge, Biofuge pico	Heraeus, Hanau
Zentrifuge, Multifuge 3SR+	Heraeus, Hanau

#### 2.1.2 Plastikwaren

6-Well Platten	Nunc, Wiesbaden
96-Well Rundbodenplatten	Nunc, Wiesbaden
Zellkulturflaschen 175/75/25 cm <sup>2</sup>	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellsiebe, 70µm	Becton Dickinson, Heidelberg
Falcons 15/50 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen
Stabpipetten 5/10/25/50 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen
ELISPOT-Platten	Millipore, Darmstadt
FACS-Röhrchen, klein	Becton Dickinson, Heidelberg
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Spritzen 5/1/0,5 ml	Becton Dickinson, Heidelberg
Petrischalen 100x10mm	Greiner bio-one, Frickenhausen
Pippettenspitzen, 1250µl	Sarstedt, Nümbrecht
Pippettenspitzen, 200µl	Sarstedt, Nümbrecht
Pippettenspitzen, 0,1-10 µl	Eppendorf, Hamburg

Reaktionsgefäße 1,5/2/5 ml

Eppendorf, Hamburg

### 2.1.3 Reagenzien und Chemikalien

2-Propanol

Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Accutase Solution

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Frankfurt

Brefeldin A

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Frankfurt

Concanavalin A (ConA)

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Frankfurt

Destilliertes H<sub>2</sub>O (RNase frei)

Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Dimethyl sulfoxid (DMSO)

AppliChem GmbH, Darmstadt

D-Luciferin

Becton Dickinson, Heidelberg

Ethanol 98,8%

Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA /5M)

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Frankfurt

FACS-Clean

Becton Dickinson, Heidelberg

FACS-Flow

Becton Dickinson, Heidelberg

FACS-Rinse

Becton Dickinson, Heidelberg

Fetales Kälberserum (FCS)

PAA Laboratories, Österreich

Fixation-Buffer

Becton Dickinson, Heidelberg

HEPES (1M)

Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt

Ionomycin (Calcium-Salz)

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Frankfurt

Mercaptoethanol

Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt

Natrium Chlorid (NaCl)

Ambion, Life Technologies, Darmstadt

Natrium-Pyruvat

Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt

NEAA

Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt

PBS

Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt

Penicillin/Streptomycin

Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt

Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Frankfurt

Poly I:C

InvivoGen, Frankreich

RPMI 1640 ohne L-Glutamin

Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt

X-Vivo

Bio Whittaker Europe, Belgien

#### 2.1.4 Peptide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Peptide wurden kommerziell von der Firma JPT Peptide Technologies, Berlin bezogen (Appendix Tab. 6.1).

#### 2.1.5 RNA

Alle in dieser Arbeit verwendete RNA wurde von der BioNTech RNA Pharmaceuticals GmbH zur Verfügung gestellt

#### 2.1.6 Liposomen

Lipofectamine® RNAiMAX

Lifetechnologies

F12-Liposomen

BioNTech RNA Pharmaceuticals GmbH,  
Mainz

#### 2.1.7 Antikörper, Mikrobeads und Pentamere

##### 2.1.7.1 Fluoreszenz-markierte Antikörper

anti Maus CD45 V450	Becton Dickinson, Heidelberg
anti Maus CD45 PE	Becton Dickinson, Heidelberg
anti Maus CD4 APC-Cy7	Becton Dickinson, Heidelberg
anti Maus CD4 APC	Becton Dickinson, Heidelberg
anti Maus CD4 FITC	Becton Dickinson, Heidelberg
anti Maus CD4 PE	Becton Dickinson, Heidelberg
anti Maus CD8 APC	Becton Dickinson, Heidelberg
anti Maus CD8 FITC	eBiosciences, USA
anti Maus CD8 PE	Becton Dickinson, Heidelberg
anti Maus CD25 PECy7	Becton Dickinson, Heidelberg
Live/Dead AmCyan	BioLegend, USA
anti Maus Foxp3 PE	Becton Dickinson, Heidelberg
anti Maus F4/80 BV421	BioLegend, USA
anti Maus CD11b PerCPCy5.5	Becton Dickinson, Heidelberg
anti Maus CD86 FITC	Becton Dickinson, Heidelberg
anti Maus Class II APC	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
anti Maus H2-Ia <sup>b</sup> APC	Becton Dickinson, Heidelberg
anti Maus H2-K <sup>B</sup> APC	Becton Dickinson, Heidelberg
anti Maus IFN- $\gamma$ APC	Becton Dickinson, Heidelberg
anti Maus IFN- $\gamma$ PE	Becton Dickinson, Heidelberg

anti Maus TNF $\alpha$ PECy7	Becton Dickinson, Heidelberg
anti Maus IL-2 PerCP Cy5.5	Becton Dickinson, Heidelberg
SIINFEKL Tetramer APC	Beckmann&Coulter, UK
VSV-NP Tetramer APC	ProImmune, UK

### 2.1.7.2 Unmarkierte Antikörper für *In vivo* und *In vitro* Versuche

anti Maus CD4 (YTS191)	BioXCell, USA
anti Maus CD8 (YTS169.1)	BioXCell, USA
anti Maus NK1.1(PK136)	BioXCell, USA
anti Maus IFN- $\gamma$ (XMG1.2)	BioXCell, USA
anti Maus TNF $\alpha$ (XT3.11)	BioXCell, USA
anti Maus IL-2 (S4B6-1)	BioXCell, USA
anti Maus IL-2 (JES6-1A12)	BioXCell, USA
anti Maus CD4 isolation beads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
anti Maus CD8 isolation beads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
anti Maus IFN-g (AN18)	Mabtech, Schweden
anti Maus IFN-g (R4-642-Biotin)	Mabtech, Schweden

### 2.1.8 Kits

CD4+ T-Cell Isolation Kit II, mouse	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Foxp3 Staining Buffer Set	eBiosciences, USA
Mouse GrzB ELISPOT Kit	R&D Systems, USA

### 2.1.9 Medien und Puffer

#### 2.1.9.1 Basismedium

RPMI 1640 ohne L-Glutamin
10% hitzeinaktiviertes FCS
1% Natrium Pyruvat (100mM)
1% Non-essential amino acids (100x)
0.5% Penicillin (100U/ml)/ Streptomycin (100 $\mu$ g/ml)
0.1% Mercaptoethanol

#### 2.1.9.2 Einfriermedium

90% hitzeinaktiviertes FCS
10% DMSO

**2.1.9.3 Erythrozyten Lysepuffer 10x**

NH <sub>4</sub> Cl	8,25g
K <sub>2</sub> HCO <sub>3</sub>	1g
Na-EDTA	37g
H <sub>2</sub> O	auf 100 ml
pH	7,4

**2.1.9.4 FACS-Puffer**

5% hitzeinaktiviertes FCS

5mM EDTA

PBS

**2.1.9.5 MACS-Puffer**

0,5% Bovine Serum Albumin (BSA)

2mM EDTA

PBS

**2.1.9.6 ELISPOT-Puffer**

PBS

0,5% Bovine Serum Albumin (BSA)

**2.1.10 Software**

BD FACSDiva™	Becton Dickinson, Heidelberg
FlowJo	Treestar Inc, USA
GraphPad Prism 5	Graphpad Software Inc, USA
Microsoft Office 2010	Microsoft Redmond, USA

## 2.2 Zellkultur

### 2.2.1 Zellkulturtechniken

Alle Arbeiten zur Zellkultivierung wurden steril unter einer Werkbank mit laminarer Luftströmung durchgeführt. Diese wurde vor dem Arbeitsbeginn mit dem Flächen-Desinfektionsmittel Terralin® liquid desinfiziert, ebenso wie sämtliche Materialien, die in die Werkbank eingebracht wurden. Die Lagerung der in der Zellkultur eingesetzten Nährmedien, Puffer und Lösungen erfolgte bei 4-8°C. Vor ihrer Verwendung wurden die Materialien auf Raumtemperatur (22°C) gebracht. Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte in RPMI-Medium (2.1.9.1) im Brutschrank bei 37°C, gesättigter Wasserdampfatosphäre und bei 7,5% CO<sub>2</sub>.

### 2.2.2 Zellzahlbestimmung

Die Ermittlung der Zellzahl erfolgte mithilfe des elektrischen Zellzählgerätes Vi-Cell™ XR Cell Viability Analyzer (Beckman&Coulter). Das System beruht auf dem Prinzip einer automatisierten Neubauer-Zählkammer. Das System nimmt die Probe auf, versetzt sie mit Trypanblau und bestimmt mittels einer Kamera und eines Computers den Anteil vitaler und abgestorbener Zellen. Die Trypanblau-Färbung ist ein Vitalitätstest. Der Farbstoff wird lediglich von abgestorbenen Zellen aufgenommen und färbt diese dunkelblau, während vitale Zellen farblos bleiben. Die gewaschenen Zellen wurden je nach Größe des Zellpellets in einem Verhältnis von 1:5 (100µl Suspension + 400µl PBS) oder 1:10 (50µl Suspension + 450µl PBS) gemischt und gezählt.

### 2.2.3 Kultivierung der Melanomzelllinie B16-F10

Die in Flüssigstickstoff tiefgefrorenen Zellen wurden bei 37°C aufgetaut, sofort in 50 ml PBS (2.1.3) überführt und 5 Min bei 1600 rpm abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 1 ml frischem RPMI-Medium (2.1.9.1) aufgenommen und in eine Zellkulturflasche überführt. Die Adhärenz wachsenden Zellen wurden zur weiteren Passage durch Accutase®Solution abgelöst und im Verhältnis 1:10 verdünnt.

### 2.2.4 Kultivierung der transgenen Melanomzelllinie B16-Luc-eGFP-Cl2

Die transgene Melanomzelllinie B16-Luc-eGFP-Cl2 wurde freundlicherweise von Ute Schmitt (TRON, Mainz) transfiziert, kultiviert und für *in vivo* Experimente zur Verfügung gestellt

### 2.2.5 Einfrieren von Zellen

Zur längerfristigen Aufbewahrung von murinen Zellen in flüssigem Stickstoff wurden die Zellen in RPMI-Medium aufgenommen und 5 Min bei 1600 rpm abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Einfriermedium (FCS + 10% DMSO) aufgenommen, in Aliquots zu 1 ml ( $5 \times 10^6$ - $1 \times 10^7$  Zellen/ml) in Cryoröhrchen (2.1.2) portioniert und in vorgekühlte Einfriergefäße bei -80°C eingefroren. In diesen Einfriergefäßen wird ein langsames Einfrieren gewährleistet, wodurch das DMSO in der Lage ist, einer Eiskristallbildung in den Zellen vorzubeugen und somit eine Zerstörung zu verhindern. An den folgenden Tagen wurden die Aliquots in den Stickstoff überführt.

### **2.2.6 Zellvorbereitung für die subkutane Inokulation**

Am Tag der subkutanen Inokulation hatten die Zellen eine Konfluenz von ca. 80%. Nach entfernen des Nährmediums, wurden die adhärenen Zellen mittels Accutase® Solution abgelöst und zweimal mit PBS gewaschen und abzentrifugiert (5 Min bei 1600rpm). Nach dem Waschschrift wurden die Zellen in 2 ml PBS aufgenommen und gezählt (2.2.2). Die Zellen wurden nun zu jeder Zeit bis zur erfolgten Inokulation auf Eis gelagert. Nach Errechnen der Gesamtzellzahl wurden die Zellen in einer Konzentration von  $1 \times 10^5$  Zellen / 100µl für das subkutane Modell eingestellt.

### **2.2.7 Zellvorbereitung für die intravenöse Inokulation**

Die Vorbereitung der Zellen für die intravenöse Inokulation entspricht im Wesentlichen die zuvor beschriebene Präparation für das subkutane Modell (2.2.6). Nach Errechnen der Gesamtzellzahl wurden die Zellen in einer Konzentration von  $1,5 \times 10^5$  Zellen / 300µl für das subkutane Modell eingestellt.

## **2.3 Isolierung und Kultivierung von immunkompetenten Zellen**

### **2.3.1 Die Gewinnung muriner dendritischer Zellen aus dem Knochenmark (mBMDc)**

Die Generierung von DCs aus murinem Knochenmark erfolgte nach einem modifizierten Protokoll<sup>61</sup>. Dabei werden die Knochenmarkszellen, welche die DC-Progenitorzellen enthalten, über sieben Tage in RPMI-Medium unter Zusatz von GM-CSF Überstand (10%) inkubiert. Resultierend entstehen effektive DC. Nachdem die Mäuse durch zerebrale Dislokation getötet wurden, wurde das Fell mit Flächen-Desinfektionsmittel Terralin® liquid desinfiziert. Im Anschluss werden Fell und Haut an den Beinen im Bereich der Hüftknochen abgetrennt. Durch das Öffnen der Epiphyse kann das Knochenmark aus Femur und Tibiae mit sterilem PBS ausgespült werden. Nach Resuspension des gewonnenen Gewebes wird die Einzelzellsuspension nochmals über ein 70µm Sieb gerieben um eventuelle Knochenreste zu entfernen. Die Zellsuspension wird anschließend in 20 ml PBS aufgenommen und 5 Min bei 1600 rpm zentrifugiert. Danach schließt sich eine drei minütige Inkubation in 5 ml Erythrozyten Lysis Puffer an. Die Reaktion wird durch verdünnen mit 45 ml PBS abgebrochen. Nach einer weiteren Filtration durch ein 70µm Sieb und abermaliger Zentrifugation (5 Min / 1600rpm) wurde/wird die Suspension nach Zählen auf  $1 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt und in RPMI-Medium unter Zusatz von GM-CSF Überstand (10%) in T75 Flaschen (20ml Medium) kultiviert. Am dritten Tag der Kultur wird aus jeder Flasche 5 ml Überstand entnommen, verworfen und durch frisches Medium ersetzt. Am Tag 5 werden die nicht- adhärenen Zellen geerntet und in einem 50 ml Falcon für 6 Min bei 1600rpm zentrifugiert. Nach Einstellung der Zellkonzentration auf  $1,5 \times 10^6$  Zellen pro ml und abermaliger Zugabe von GM-CSF in gleicher Konzentration werden die Zellen weitere zwei Tage in T75 Flaschen kultiviert. Danach stehen die Zellen für Experimente zur Verfügung oder können weggefroren (2.2.5) werden.

### **2.3.2 Gewinnung muriner Milzzellen**

Die Gewinnung von einer Milzzellsuspension erfordert mehrere Schritte. Nachdem die Mäuse durch zerebrale Dislokation getötet wurden, wird das Fell mit Flächen-Desinfektionsmittel Terralin® liquid desinfiziert. Anschließend erfolgt die Inzision des Fells links seitlich der Wirbelsäule. Die präparierte Milz

wird in ein 70µm Sieb gegeben und mit dem Kolbenende einer 10 ml Einwegspritze wird die Pulpa aus dem Bindegewebe gerieben. Das Sieb wird mit 15 ml PBS gespült und die Zellsuspension für 6 Min bei 1600rpm zentrifugiert. Es folgt die Erythrozyten-Lysierung mittels drei minütiger Inkubation bei RT in der entsprechenden Pufferlösung (5 ml pro Milz), anschließend erfolgt die Aufhebung des osmotischen Drucks durch Zugabe von 20 ml PBS und nachfolgendem abermaligen Zentrifugieren. Größere Bestandteile wie z.B. Fettgewebe werden durch sieben (70 µm Sieb) entfernt. Nach folgender neuerlicher Zentrifugation und Resuspendierung in RPMI-Medium stehen die Milzzellen für weitere Experimente zur Verfügung.

### **2.3.3 Magnetische Zellsortierung (MACS)**

Bei dieser Trennmethode werden die Zellen über monoklonale Antikörper direkt oder indirekt mit superparamagnetischen Beads (100nm) markiert. Die Zellsuspension mit spezifischen markierten Zellen und unmarkierten Zellen wird über eine Trennsäule gegeben, die sich in einem Permanentmagnetfeld befindet. Die Trennsäule besitzt eine Matrix aus Metallkügelchen, so dass die unmarkierten Zellen die Säule durchlaufen und die markierten Zellen an der Trennsäule hängen bleiben und anschließend außerhalb des Magnetfeldes eluiert werden können. Die Isolation wurde gemäß den Herstellerprotokollen für die konjugierten Antikörper und MACS-Säulen (Miltenyi Biotec, Deutschland) durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden nur MS<sup>+</sup>-Säulen (Kapa.  $1 \times 10^7$  Zellen) verwendet.

### **2.3.4 Gewinnung muriner T-Lymphozyten aus Tumorgewebe**

Für die Gewinnung von T-Lymphozyten aus Tumorgewebe, wurden die Mäuse bei einer Tumorgöße von ca. 7x7 mm durch zerebrale Dislokation getötet und der Tumor frei präpariert. Für eine erste mechanische Zerkleinerung wird der Tumor mit einer Präparationsschere grob zerkleinert. Der so präparierte Tumor wird in ein 70µm Sieb gegeben und mit dem Kolbenende einer 10 ml Einwegspritze zu einer Zellsuspension gerieben. Das Sieb wird mit 25 ml PBS gespült und die Zellsuspension für 6 Min bei 1600rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wird für 20 Min bei 37°C in Verdauungslösung (2.1.9.3) inkubiert und darauffolgend ein weiteres Mal zentrifugiert (6 Min / 1600rpm) und das Pellet in 1 ml RPMI-Medium aufgenommen. Um die T-Lymphozyten von den lebenden B16-F10 Tumorzellen zu trennen, wurde die Zellsuspension in eine T75 Flasche + 20 ml RPMI-Medium überführt und über Nacht bei 37°C kultiviert. Am darauffolgenden Tag wird der Zellkulturüberstand abgenommen und zentrifugiert (6 Min/1600rpm). Da lebende B16-F10 Zellen adhärent sind, bleiben diese am Boden der Zellkulturflasche haften. Um tote von lebenden Zellen zu trennen, wurden das gewonnene Zellpellet über eine Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt und die so isolierten T-Lymphozyten wurden für weitere Experimente verwendet.

### **2.3.5 Gewinnung muriner T-Lymphozyten aus Blut**

Für die Gewinnung von T-Lymphozyten aus Blut, wurde den Mäusen intravenös ca. 200 µl Blut entnommen und 1:1 mit PBS verdünnt. Um ausreichend T-Lymphozyten zu isolieren wurden jeweils 5 Mäuse gepoolt. Weiter werden 2 ml Maus Ficoll (Ficoll-Paque Premium 1,084) in ein 5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß gegeben und vorsichtig mit dem Blut/PBS (insgesamt 2ml) Gemisch überschichtet. Anschließend werden die Zellen zentrifugiert (30 Min/ 400g/ RT/ ohne Bremse) und die Interphase

vorsichtig mit einer Pipette in ein neues 5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß transferiert. Nach Zugabe von 3 ml RPMI-Medium wird die Zellsuspension ein weiteres Mal Zentrifugiert (6 Min/1600rpm). Die so isolierten T-Lymphozyten können für weitere Experimente eingesetzt werden.

### **2.3.6 Transfektion von murinen Zellen mit RNA mittels Elektroporation**

Als Elektroporation bezeichnet man die Verwendung von kurzen elektrischen Impulsen zum Einbringen von RNA in Zellen. Dabei hängt die Effizienz der Elektroporation von verschiedenen Faktoren ab. Die Stärke des angelegten Feldes, die Dauer des elektrischen Impulses und die eingesetzte RNA Konzentration spielen hierbei eine Rolle. Um die Elektroporation durchzuführen, wurden die BMDCs zum beseitigen aller Serumreste, welche die Elektroporation negativ beeinflussen würden, dreimal mit serumfreien X-Vivo-Medium gewaschen (6 Min/1600rpm/4°C) und in einer Konzentration von  $1-2 \times 10^6$  Zellen/150µl in X-Vivo Medium aufgenommen. Die so eingestellte Zellsuspension wurde in die 4mm Küvette vorgelegt in welche dann 20-40 µg RNA pipettiert wurde. Nach Resuspension der Zellen wurde die Küvette in die Elektroporationsvorrichtung des Elektroporators geschoben. Nach Etablierung des Elektroporationsprotokolles wurden alle Zellen wenn nicht anders beschrieben bei 400V für 5ms elektroporiert. Anschließend wurden die Zellen aus der Küvette in eine 6 Well Platte überführt, in welche 5 ml RPMI-Medium vorgelegt wurde. Die Zellen wurden dann für 24h inkubiert und anschließend z.B. als Zielzellen eingesetzt.

## **2.4 Durchflusszytometrie**

Die Methode der Durchflusszytometrie basiert auf einer Laserstrahlerfassung von Fluoreszenzmarkierten Zellen (fluorescence-activated-cell-sorting; FACS). Dabei wird zum einen das Laserlicht gestreut und zum anderen die Fluoreszenzfarbstoffe angeregt, sodass sie Licht in einer bestimmten Wellenlänge emittieren. Bei dem gestreuten Licht handelt es sich einerseits um die nach vorne abgelenkten Strahlen, das sogenannte Vorwärtsstreulicht oder „forward scatter“ (FCS), welche eine Information über die relative Größe der gemessenen Zellen liefert. Zusätzlich wird das Laserlicht im 90° - Winkel abgelenkt und ergibt das Seitwärtsstreulicht oder „side scatter“ (SSC), welches Informationen über Zellgranularität liefert. Weiter können die zu messenden Zellen mit Fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt werden. Dabei unterscheiden sich die zu verwendeten Fluorochrome spezifisch in ihren Absorptions- und Emmissionsspektren.

### **2.4.1 Oberflächenfärbung**

Mit der Oberflächenfärbung werden Moleküle auf der Zelle angefärbt, die unterschiedliche Entwicklungsstadien oder Linien von Leukozyten repräsentieren oder distinkte Funktionen haben, weshalb sie ursprünglich als Differenzierungs-Ag bezeichnet wurden. Gruppen von Ak, die das gleiche Differenzierungs-Ag erkennen, definiert ein „cluster of differentiation“ (CD).

Für die Oberflächenfärbung wurden  $1-4 \times 10^6$  Zellen in FACS-Röhrchen gegeben und mit ca. 2 ml FACS-Puffer (2.1.9.4) aufgefüllt und Zentrifugiert (6 Min/1600rpm). Für die Färbung wurde das Zellpellet in 100µl FACS-Puffer aufgenommen und mit den entsprechenden Antikörpern gefärbt.

## 2.5 Intrazelluläre Färbung von Zytokinen

Die intrazelluläre Färbung fand Anwendung, um von den T-Zellen produzierte Zytokine detektieren zu können. Da fast keine T-Zellen spontan *ex vivo* Zytokine exprimieren, müssen die Zellen zuvor stimuliert werden.

Hierfür wurden die Zellen zu  $2 \times 10^7$ /ml in RPMI-Medium aufgenommen und mit dem entsprechenden Peptid ( $6 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) in Anwesenheit von Brefeldin A ( $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) für 5 Std. bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und Oberflächen-gefärbt. Damit die Oberflächenfärbung bzw. die Fluoreszenz der Lymphozyten in den weiteren Arbeitsschritten erhalten blieb, wurden die AK auf der Zelloberfläche fixiert. Zur Fixation wurde Cytofix/Cytoperm-Lösung (Becton&Dickison) eingesetzt. Das Zellpellet wurde in  $100 \mu\text{l}$  Cytofix/Cytoperm-Lösung resuspendiert und bei  $4^\circ\text{C}$  für 20 Min im Dunklen inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit Perm/Wash-Lösung gewaschen (3 Min/1800rpm). Die für die intrazelluläre Zytokinfärbung verwendeten monoklonalen Antikörper wurden in dem jeweiligen Verhältnis in Perm/Wash-Lösung ( $50 \mu\text{l}/\text{Well}$ ) angesetzt. Darauf folgte eine 30-minütige Inkubation bei  $4^\circ\text{C}$  im Dunkeln. Im Anschluss wurden die Proben zwei weitere Male gewaschen (3 Min/1800rpm) und in FACS-Puffer aufgenommen ( $200 \mu\text{l}/\text{Well}$ ). Als Positivkontrolle wurden Zellen zu  $2 \times 10^7$ /ml in RPMI-Medium aufgenommen, das zuvor mit 10 ng/ml Phorbol-myristat-Azetat(PMA) und 500 ng/ml Ionomycin angereichert wurde. Diese Zellen wurden weiter wie die zu untersuchenden Proben behandelt.

## 2.6 In Vivo Imaging

### 2.6.1 Nicht invasive Imaging Methode

Mit dieser Technologie ist es möglich, wiederholte Messungen des Tumorwachstums sowie die Lokalisation von Metastasen im zeitlichen Verlauf zu messen ohne das Tier zu töten. Das in den Versuchen verwendete Imaging-Gerät (Ivis<sup>TM</sup> 100 Imaging System, Xenogen) zählt zu den optischen Imagingverfahren und bietet die Möglichkeit sowohl fluoreszente als auch biolumineszente Reporter *in vitro* sowie *in vivo* zu erfassen. Das Enzym Luciferase aus dem Nord-Amerikanischen Leuchtkäfer (Lampyridae), das von den transgenen Tumorzellen (B16-Luc-eGFP-C12) exprimiert wird, katalysiert die Reaktion von Luciferin zu Licht. Das Biolumineszenz-Signal der Luciferase wird in einem Bereich von 500 bis 700 nm emittiert, bei einem Maximum von 612 nm bei  $37^\circ\text{C}$ . Durch seine optischen Eigenschaften, erlaubt es biologisches Gewebe, dass das Licht durch das Gewebe dringen kann. Die Photonenemission von Tumorzellen, die das Enzym Luciferase exprimieren und Lungenmetastasen gebildet haben, kann im Anschluss an die intraperitoneale Applikation des Substrates Luciferin, gemessen werden<sup>62</sup>.

Für die *in vivo* Messungen wurden die Mäuse mittels Inhalationsnarkose (2,5% Isofluran) anästhesiert und anschließend wurde eine Luciferin-Lösung (Material) intraperitoneal injiziert. 5 Minuten nach der Injektion wurde die Photonenemission mit dem Xenogen-System gemessen. Hierfür wurden fünf Mäuse dorsal auf einem elektronisch verstellbaren Probentisch in der Aufnahmekammer ( $37^\circ\text{C}$ ) platziert. Die Aufnahmezeit betrug jeweils 1 Sekunde bis 1 Minute bei Binning 4. Für jede Messung wurde zusätzlich zur Lumineszenzmessung ein photographisches Abbild erzeugt und als überlagernde Aufnahme

abgespeichert. Je nach Signalstärke wurden die Mäuse jeweils zwei Mal im wöchentlichen Rhythmus gemessen. Bei Anzeichen von Schmerzen oder Krankheit wurden die Mäuse abgetötet.

Die Auswertung der Bildaufnahmen und Biolumineszenz-Signale erfolgte mit der Analyse-Software „Living Image“. Die emittierte Lichtleistung (Photonen/s/cm<sup>2</sup>/sr) spezifischer Interessensbereiche (region of interest; ROI) wurde als relative Lichteinheit quantifiziert.

## 2.7 Molekularbiologische Methoden

Alle molekularbiologischen Arbeiten wurden freundlicher Weise von Dr. Steffanie Hubich, Dr. Christoph Hartmann, René Becker, Tobias Blödel und Kathrin Wrabetz (MbioC, TRON; Mainz) durchgeführt.

### 2.7.1 SDS-PAGE

Die Trennung von Proteinen gemäß ihres Molekulargewichtes erfolgt in der Molekularbiologie mit Hilfe der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Laemmli, 1970). Dabei wurden die Proteine in einem niederprozentigen großmaschigen Sammelgel (7,5%) fokussiert und anschließend in einem höherprozentigem engmaschigen Trenngel (15%) nach ihrem Molekulargewicht getrennt. Die Gele wurden in die Elektrophorese-Kammer (CTI GmbH, Idstein, D) eingespannt und die Pufferkammern wurden mit SDS Elektrophorese-Puffer befüllt. Vor dem Auftragen der Proben wurden diese mit 4x Probenpuffer, bzw. 10x Probenpuffer versetzt und bei 98 °C für 5 min gekocht. Das im Probenpuffer enthaltene SDS sorgt für eine negative Gesamtladung aller Proteine, wodurch eine Auftrennung rein nach dem Molekulargewicht ermöglicht wird. Zusätzlich wurde den Proben  $\beta$ -Mercaptoethanol zugesetzt, um Disulfidbrücken aufzubrechen. Die Elektrophorese erfolgte zunächst mit einer Stromstärke von 50 mA für 30 min. Nach dem Einlaufen der Proteine in das Trenngel lief die Elektrophorese bei 70 mA für zwei Stunden.

### 2.7.2 Western Blot

Zur Übertragung der aufgetrennten Proteine auf eine 0,1  $\mu$ m Nitrocellulosemembran wurde das semi-dry-, bzw. das wet-Elektrotransfer-Verfahren verwendet.

Für das semi-dry-Verfahren wurden 3 Whatman®-Papiere in Transferpuffer getränkt und luftblasenfrei auf die Anode gelegt (Blotting-Apparatur CTI GmbH). Darauf wurde die ebenfalls in Transferpuffer getränkte Nitrocellulosemembran gelegt, gefolgt vom SDS-Gel und weiteren 3 Whatman®-Papieren. Abschließend wurde die Kathode aufgelegt. Der Transfer erfolgte für 90 min bei 300 mA und RT.

Für das wet-Verfahren wurden 3 Whatman®-Papiere, eine Membran, das SDS-Gel und weitere 3 Whatman®-Papiere in Transferpuffer getränkt und in einen Kunststoffrahmen eingespannt, welcher in einer wet blot-Kammer (Bio-Rad, Hercules, USA) platziert wurde. Die Kammer wurde anschließend mit vorgekühltem Transferpuffer aufgefüllt. Der Transfer erfolgte für 2 Stunden bei 1000 mA und 4°C.

## 2.8 Verwendete Vakzine

### 2.8.1 Peptid-Formulierung

Wenn nicht explizit anders beschrieben setzte sich die für die Peptid-Immunisierung einer Maus verwendete Formulierung wie folgt zusammen:

- 100µg Peptid
- 50µg Poly I:C
- + PBS

Das Endvolumen bestand aus maximal 200µl pro Maus. Alle für die Versuche verwendeten Peptide und Poly I:C hatten eine Konzentration von 2µg/µl.

### 2.8.2 RNA-Formulierung (Liposomen)

Die für die RNA-Formulierungen verwendeten kationischen Liposomen wurden freundlicherweise von Dr. Heinrich Haas und Kollegen (BioNTech RNA Pharmaceuticals GmbH, D) zur Verfügung gestellt. Die Liposomen wurden durch Ethanolinjektion hergestellt und beinhalten das synthetische kationische Lipid DOTMA (Merck&Cie,D) und das zwitterionische Phospholipid DOPE (Corden Pharma GmbH,D). Zusammengefasst wird eine ethanolhaltige Lipidlösung sterilfiltriert und unter Rühren bei sterilen Bedingungen in eine wässrige Phase injiziert. Die so hergestellten Liposomen wurden filtriert (0,45µm) um größere Aggregate auszuschließen. Die so hergestellte Liposomenlösung wurde auf eine finale Konzentration von 3mM verdünnt und die Qualität via HPLC Analyse überprüft.

Alle Arbeiten zur RNA-Formulierung wurden steril unter einer Werkbank mit laminarer Luftströmung durchgeführt. Diese wurde vor dem Arbeitsbeginn mit dem RNaseZapp® -Liquid von RNAsen befreit, ebenso wie sämtliche Materialien, die in die Werkbank eingebracht wurden. Weiter wurde darauf geachtet, dass die verwendete RNA immer auf Eis gelagert wurde um die Aktivität von RNAsen weiter zu minimieren.

Für die RNA-Formulierung wurde die verwendete RNA auf 1 mg/ml mit H<sub>2</sub>O verdünnt und jeweils 40 µg pro Maus vorgelegt. Anschließend wurde die RNA mit H<sub>2</sub>O und 1.5 M NaCl so verdünnt, dass nach Liposomenzugabe eine Endkonzentration von 150 mM NaCl erreicht wurde. Liposomen wurden mit der RNA in einem Ladungsverhältnis (+):(-) von 1,30:2,00 gemischt und kurz gevortext. Für die daraus resultierenden RNA-Lipoplexe ergab sich folgende Zusammensetzung pro Maus:

**Tab. 2.1 RNA + Liposomen Formulierung**

Vol. RNA-Stock [ $\mu$ l]	40,0
Vol. H <sub>2</sub> O [ $\mu$ l]	103,0
Vol. 1.5 M NaCl Stock [ $\mu$ l]	20,0
Vol. 2,08 mM Liposomen [ $\mu$ l]	37,0
Finales Vol. [ $\mu$ l]	200,0

Nach dem Mischen der Komponenten verfärbte sich die angesetzte Formulierung leicht milchig, was als optische Qualitätskontrolle überprüft wurde. Nach einer 10 Minütigen Inkubationszeit, wurden die so angesetzte Formulierung für *in vivo* Experimente eingesetzt.

### 2.8.3 RNA-Formulierung (Lipofectamine® RNAiMAX, Lifetechnologies)

Da zum Anfang dieser Arbeit die hauseigenen Liposomen noch nicht zur Verfügung standen, wurde auf ein kommerziell erhältliches Produkt zurückgegriffen. Wie oben bereits beschrieben (2.8.2) wurde auch hier auf sterile, sowie RNase freie Bedingungen geachtet.

Für die RNA-Formulierung wurde die verwendete RNA auf 1 mg/ml mit H<sub>2</sub>O verdünnt und jeweils 20  $\mu$ g pro Maus vorgelegt. Anschließend wurde die RNA mit H<sub>2</sub>O und 10x PBS so verdünnt, dass nach Liposomenzugabe eine Endkonzentration von 1x PBS erreicht wurde. RNAiMAX-Liposomen wurden mit der RNA in einem Volumenverhältnis von 1:1 gemischt und kurz gevortext bevor die Formulierung nach zehnminütiger Inkubationszeit für *in vivo* Experimente eingesetzt wurde.

## 2.9 Tierexperimentelle-Methoden

### 2.9.1 Mäuse und Haltungsbedingungen

Alle in dieser Arbeit verwendeten Mäuse wurden von den Firmen Harlan Laboratories GmbH (N), Janvier Labs (Saint Berthevin Cedex, F) und der Zentralen Versuchstiereinrichtung (ZVTE) der Universität Mainz bezogen. Wenn nicht explizite beschrieben, handelt es sich um Mäuse des BALB/c- sowie des C57BL/6-Stammes mit einem Mindestalter von sechs Wochen. Alle Tierversuche wurden in der Tierhaltung der ZVTE Mainz durchgeführt (Geb. 905), wobei maximal fünf Mäuse je Käfig gehalten wurden. Alle Tierversuche waren vom Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz genehmigt und Unterlagen den Vorschriften des Tierschutzgesetzes.

### 2.9.2 Subkutane Tumorinduktion

Für subkutane Tumorversuche mit der B16-F10 Zelllinie wurden stets C57BL/6 Mäuse verwendet. Die zu inokulierenden B16-F10 Zellen wurden wie oben beschrieben vorbereitet (2.2.6). Jeder Maus wurde unter Kurzzeitbetäubung mit Isofluran, die rechte Flanke rasiert und stets  $1 \times 10^5$  Tumorzellen subkutan injiziert. Nach 7-10 Tagen waren die Tumore erstmals tastbar. Als Maß für die Tumorgöße wurde zweimal wöchentlich aus dem Produkt des längsten Tumordurchmessers und des darauf senkrechten

Durchmessers die TumorgroÙe in  $\text{mm}^3$  berechnet ( $a \cdot b^2/2$ ). Als Abbruchkriterium für einen Versuch galt das Erreichen oder Überschreiten einer TumorgroÙe von  $1500 \text{ mm}^3$ .

### **2.9.3 Intravenöse Tumorinduktion**

Für die intravenösen Tumorversuche mit der B16-Luc-eGFP-C12 Transfektante wurden stets C57BL/6-Albino Mäuse (B6N-Tyrc/BrCrCl) verwendet. Der Grund hierfür lag darin, dass das schwarze Fell der Wildtyp (WT) C57BL/6 Mäuse starken Background bei der Detektion der Photonen zeigt. Die Zellen wurden wie für die subkutane Inokulation kultiviert und vorbereitet (2.2.7). Allerdings beträgt die Dosis für das i.v. Modell  $1,5 \times 10^5$  Zellen in einem Volumen von  $300 \mu\text{l}$  PBS. Die C57BL/6-Albino Mäuse werden für ca. 5 Min unter einer Rotlichtlampe schonend erwärmt, sodass die Schwanzvene besser zu erkennen ist und die Tumorzellen durch eine Spritze mit Kanüle (29g) injiziert werden können. Das Experiment ist in etwa für 25 Tage ausgelegt, daher sind die Tiere im letzten Drittel des Versuches Täglich inspiziert worden. Atemprobleme oder andere Anzeichen von Schmerzen waren sofortige Abtötungskriterien.

### **2.9.4 Peptid-Immunisierung**

Für die Immunisierung mit Peptiden wurde jeder Maus unter Kurzzeitbetäubung mit Isofluran, die rechte Flanke rasiert und die Formulierung (2.8.1) aus  $100 \mu\text{g}$  Peptid und  $50 \mu\text{g}$  Poly I:C in einem Gesamtvolumen von  $200 \mu\text{l}$  subkutan injiziert. Diese Prozedur wurde im wöchentlichen Rhythmus wenn nicht anders beschrieben zweimalig wiederholt.

### **2.9.5 RNA-Immunisierung**

Für die Immunisierung mit RNA + Liposomen wurde jede Maus unter Kurzzeitbetäubung mit Isofluran durch einen Fixiergriff an der Nackenfalte fixiert und die RNA-Formulierung (2.8.2; 2.8.3) intravenös in den retro orbitalen Venenbulbus injiziert ( $200 \mu\text{l}$ /Maus). Wenn nicht explizite anders beschrieben, wurden die Tiere fünfmalig im wöchentlichen Rhythmus immunisiert, wobei darauf geachtet wurde, dass das jeweilige Auge für die Applikation wöchentlich gewechselt wurde.

## **2.10 Immunologische Methoden**

### **2.10.1 ELISPOT-Zytokinsekretionstest**

Die Besonderheit des ELISPOTS ist, z.B. im Vergleich zum klassischen ELISA, dass Effektor und Zielzellen direkt in, mit Primärantikörper beschichteten, 96Well Nitrozellulose-Mikrotiterplatten inkubiert werden. Jede einzelne Zytokin-seziernde Zelle kann so nach dem Test als Spot sichtbar gemacht werden.

Die 96Well-Mikrotiterplatten mit Nitrozellulose-Membranfilter wurden für maximal 1 Minute mit  $15 \mu\text{l}$  35% EtOH aktiviert, dreimal mit je  $200 \mu\text{l}$  PBS gewaschen und  $50 \mu\text{l}$  des bereits in PBS verdünnten IFN- $\gamma$  (Klon AN18,  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) bzw GrzB ( $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) Antikörpers beschichtet. Nach einer Inkubation über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  wurden die Platten dreimal mit je  $200 \mu\text{l}$  PBS gewaschen und daraufhin mit  $150 \mu\text{l}$  mDC-Medium für mindestens 20 min. geblockt.

Die für den ELISPOT verwendeten Effektor-Zellen ( $5 \times 10^5$  pro Well) wurden mit dem entsprechendem Target für ca. 15 Std. (IFN- $\gamma$ ) bzw 48 Std. (GrzB) bei 37°C inkubiert. Nach Inkubation der Zellen wurde die Platte dreimalig mit PBS gewaschen. Ein gegen IFN- $\gamma$  gerichteter mit Biotin gekoppelter Antikörper (R4-6A2-Biotin, 1mg/ml) wurde mit PBS/BSA 0,5% auf eine Konzentration von 2 $\mu$ g/ml verdünnt, davon 50  $\mu$ l pro Well zugegeben und für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Die Platten wurden erneut dreimalig mit jeweils 200 $\mu$ l PBS gewaschen. Anschließend wurden 100  $\mu$ l Enzymgemisch pro Well zugegeben, welches kurz zuvor angesetzt wurde und aus 10 ml PBS/BSA 0,5% + 10  $\mu$ l (1:1000) Streptavidin-Peroxidase bestand. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde wurden die Platten erneut dreimalig mit 200 $\mu$ l PBS gewaschen und pro Well 100 $\mu$ l Substrat welches fertig angesetzt war zugefügt. Die Substratlösung wurde für mindestens 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Sobald die ersten Spots zu erkennen waren, wurde die Reaktion durch waschen der Wells mit H<sub>2</sub>O abgebrochen. Zum Schluss wurden die Platten an der Luft getrocknet bevor sie am CTL EliSpot Reader eingelesen und ausgewertet wurden.

## **2.11 Immunhistologische Methoden**

Alle immunhistologischen Arbeiten wurden freundlicher weise von Dr. Fulvia Vascotto, Magdalena Brkic und René Becker (TRON; Mainz) durchgeführt.

### **2.11.1 Präparation von Geweben für immunhistologische Färbungen**

Nach dem Töten einer Maus wurde das gewünschte Organ entnommen, in Alufolie gewickelt und in Isopentan welches vorher in flüssigem Stickstoff herunter gekühlt wurde schockgefroren. Anschließend wurde das Gewebe bei -80°C gelagert. Zur histologischen Begutachtung wurden am Kryostat (Kammertemperatur -18°C) 8  $\mu$ m dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden auf Objektträger aufgezogen, getrocknet, fixiert und sofort gefärbt werden.

### **2.11.2 Immunfluoreszenz von Gewebeschnitten**

Neben der Immunhistochemie, mit deren Hilfe die ausgewählten Antigene via Lichtmikroskop erkannt werden, gibt es auch die Möglichkeit Antigene im Fluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen. Bei dieser Technik wird mit Antikörpern gearbeitet, an die ein Fluorochrom gekoppelt ist. Wie schon bei der Durchflusszytometrie beschrieben (2.4) sind Fluorochrome Moleküle, die nach Anregung Fluoreszenzlicht in einer charakteristischen Wellenlänge abgeben.

Die Färbung begann mit der Fixierung des Gewebeschnittes in PFA (4%) für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Danach wurde das PFA zweimalig mit PBS in einer Küvette gewaschen. Nach Absaugen und Waschen wurde das Gewebe für 30 Min. in Färbe- Medium geblockt (PBS/BSA 1%/ 5% mouse, 5% rat/Nonident 0,02%) und danach zweimalig mit PBS gewaschen. Nach diesem Waschschrift folgte die Inkubation der Gewebsschnitte mit den zuvor in Färbe-Medium verdünnten Antikörpern über Nacht. Danach wurden die Antikörper abgesaugt und das Gewebe zweimal mit PBS gewaschen. Zur Färbung der Zellkerne wurde das Gewebe mit Höchst Farbstoff 3 min gegengefärbt (1:20000 in TBS). Anschließend wurde das Gewebe wiederum zweimalig mit PBS gewaschen und danach mit Flourmount G Eindeckemedium eingedeckt. Danach wurden die Objektträger bei 4°C gelagert. Bei allen Immunfluoreszenzfärbungen musste darauf geachtet werden, dass die Objektträger während der

Inkubation mit Fluorochromen mit Alufolie abgedeckt wurden, um ein Ausbleichen der Fluorochrome zu verhindern.

### 2.11.3 Immunfluoreszenz von Zelllinien

Neben der Färbung von Gewebeschnitten bietet diese Technik auch die Möglichkeit Antigene in Zelllinien zu lokalisieren.

Gewebekulturschalen wurden mit geeignetem Volumen Basis-Medium gefüllt und sterile Deckgläschen mit einer Pinzette vorsichtig am Boden angedrückt. Anschließend wurden  $1 \times 10^7$  / Gewebekulturschale ausgesät und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die eigentliche Färbung begann mit der Fixierung der Zellen in Roti®-Histofix (4%) für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Danach wurde das Roti®-Histofix dreimalig mit PBS gewaschen. Es folgte die Permeabilisierung (0,5% TritonX-100 in PBS) der Zellen für eine Minute bei RT und ein weitere dreimaliger Waschschrift mit PBS. Nach Absaugen und Waschen wurde das Gewebe für 30 Min in Blocking-Medium geblockt (PBS /BSA 5%) und danach dreimalig mit PBS gewaschen. Nach diesem Waschschrift folgte die Inkubation der Zellen mit den zuvor in Farbe-Medium (PBS /BSA 1%) verdünnten ersten Antikörper für eine Stunde bei RT. Danach wurde der Antikörper abgesaugt und die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Auf den Waschschrift folgte die Färbung mit dem zuvor in Farbe-Medium verdünnten zweiten Antikörper für 30 Minuten bei RT. Anschließend wurden die Zellen wiederum dreimalig mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und danach mit Flourmount+DAPI Eindeckmedium eingedeckt. Die Objektträger wurden bei 2-8°C trocken gelagert.

### 2.11.4 Konfokale Lasermikroskopie

Durch konfokale Lasermikroskopie ist es möglich, das von Fluorochromen emittierte Licht in digitale Signale um zu wandeln, so dass ein Bild entsteht, in dem die zuvor mit Antikörper gefärbten Antigene farbig erscheinen. Die Verwendung verschiedener Fluorochrome setzt voraus, das diese in verschiedenen Wellenlängen angeregt werden so das die Möglichkeit besteht mehrere Antigenen gleichzeitig da zu stellen. Da aufgrund der im Mikroskop vorhandenen Lochblende immer nur emmittiertes Licht einer ganz bestimmten Ebene erfasst wird, bezeichnet man diese Form der Mikroskopie als konfokal.

## 2.12 Statistische Auswertung

Die statistische Berechnung der Signifikanzwerte in den verschiedenen Experimenten wurde mit Hilfe des Programms „GraphPad Prism 5“ durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde mit einem (p < 0,05), zwei (p < 0,01) und drei Sternchen (p < 0,001) gekennzeichnet. Nicht-signifikante Unterschiede wurden entweder als n/s markiert oder nicht extra dargestellt. Die folgenden statistischen Tests wurden angewendet:

- Der ungepaarte Student's t-test wurde verwendet, um zwei unabhängige Gruppen miteinander zu vergleichen.
- Der Log-Rank-Test berechnet die Unterschiede zwischen Kaplan-Meier Überlebenskurven.

### 3 Ergebnisse

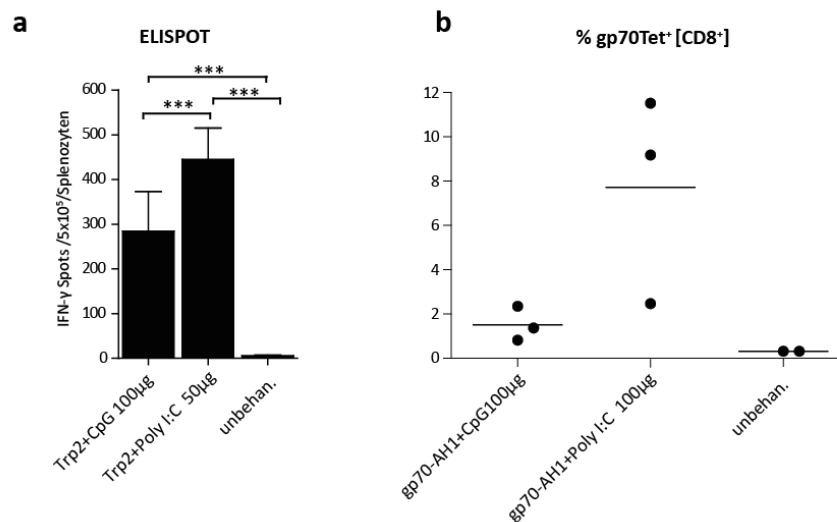
Im Melanom Model B16-F10 sollten in der vorliegenden Arbeit T-zellerkannte Tumor-spezifisches Neo-Epitope, basierend auf nicht-synonymen Punktmutationen, getestet und charakterisiert werden. In Vorarbeiten wurde das Genom von C57BL/6 Wildtyp Mäusen und der B16-F10 Zelllinie in Triplikaten sequenziert (1.3). Nach Analyse und Quantifizierung der Daten wurden 563 nicht-synonyme Punktmutationen, die in Genen exprimiert werden, identifiziert (Abb. 1.2b). Nach einem weiteren Selektionsschritt (basierend auf der IEDB Immune Epitope Database sollten Epitope, welche die Mutation enthalten, gute MHC-Binder sein) wurden 50 Mutationen herausgesucht und via Sanger-Sequenzierung validiert (Abb. 1.2b). Zunächst wurde die Immunogenität der Mutationen mittels Peptidimmunisierung getestet, später durch RNA-Immunsierung wiederholt und näher untersucht. Des Weiteren wurden anhand einer anti-tumoralen wirksamen Mutationsvaccine (Mut-30) die genauen Wirkmechanismen analysiert. Im letzten Abschnitt wird näher auf die Übertragung des Therapiekonzeptes in die Klinik eingegangen, indem die Möglichkeit einer Poly-Epitop Vaccine bestehend aus mehreren Mutationen ausgetestet wird. Für das immunologische Testsystem wurden 27mer Peptide mit der Punktmutation in der Mitte sowie die Wildtyp Variante designt. Lange Peptide haben den Vorteil, dass sie prozessiert und sowohl CD8<sup>+</sup> als auch CD4<sup>+</sup> Reaktivität erzeugen können<sup>63</sup>. Mit den 27mer Peptiden ist es möglich, alle potentiellen MHC I oder MHC II Epitope von 8mer bis 14mer Länge, die die Punkt-Mutation erhalten, zu prozessieren. Als Read-Out wurde der Zytokin-ELISPOT-Assay eingesetzt, da er sich zum Beispiel für die Untersuchung von T-Zellantworten gegen Tumorantigene in klinischen Studien als sensitiv und reproduzierbar erwiesen hatte<sup>64</sup>.

#### 3.1 Etablierung eines immunologischen Testsystems zur Identifizierung von Immunantworten gegen tumor-spezifische Punktmutationen

##### 3.1.1 Optimierte subkutane Peptidimmunisierung: Testung verschiedener Adjuvantien

Da Peptide per se sehr geringe immunogene Eigenschaften besitzen, werden sie für die Immunisierung mit Adjuvantien kombiniert, um die Immunantwort auf das verabreichte Peptid zu steigern. Das heißt, für die Stärke der Antwort, ist im Wesentlichen das Adjuvans verantwortlich. Es gibt verschiedene Substanzen, die als Adjuvans für die Peptid-Immunsierung in Frage kommen, wobei die Hauptgruppe unter den TLR-Liganden zu finden ist. Fokus des Experimentes war es, die TLR Liganden CpG-Dinukleotid (TLR9-L) und Polyinosinic-Polycytidylic-acid (Poly I:C) (TLR-3L) zu testen. Beim CpG-Dinukleotid handelt es sich um ein zwei Nukleinbasen langer Bereich in der DNA, der die Anteile Cytosin-Phosphat-Guanin enthält. Bei Vertebraten ist statistisch gesehen in der DNA jedes sechzigste Dinukleotid vom Typ CpG. Das Cytosin ist in meisten Fällen zusätzlich methyliert. In bakterieller DNA kommt dieser Typ von Nukleotid weit häufiger vor (statistisch jedes sechzehnte) und ist nicht methyliert. Dieses „Muster“ wird durch das angeborene Immunsystem der Vertebraten erkannt und eine entsprechende Immunreaktion ausgelöst. Diese Eigenschaft wird bei synthetischen CpG-Oligonukleotiden ausgenutzt, um eine adjuvante Wirkung zu erzielen. Poly I:C (Doppelstrang-RNA) wird normalerweise im Infektionszyklus bestimmter Viren gebildet und kommt in normalen Vertebraten Zellen nicht vor. Durch die Vakzinierung mit einer synthetischen Doppelstrang-RNA kann so eine Virusinfektion simuliert werden, welche eine starke unspezifische Immunantwort zur Folge hat. Genau wie bei CpG wird diese Eigenschaft ausgenutzt,

um eine adjuvante Wirkung zu erzielen. Als Model-Epitop wurde das MHC Klasse I Epitop aus dem Tumor-Antigen tyrosinase-related protein-2 (Trp2<sub>180-188</sub>) verwendet<sup>65</sup>. Als Model-Antigen für die FACS basierte Blut-Analyse wurde in einem 2. Experiment das gp70-AH1 Epitop verwendet, da für dieses Antigen bereits ein gut funktionierender Pentamer-Antikörper (ProImmune) etabliert wurde. Weibliche BALB/c bzw. C57BL/6Mäuse (n=3) wurden an den Tagen eins und sieben jeweils subkutan in die rechte Flanke mit Peptid (100µg) + Poly (I:C) (50µg) oder CpG (100µg) immunisiert. Das Read-Out fand 5 Tage (Tag 12) nach der letzten Immunisierung statt.

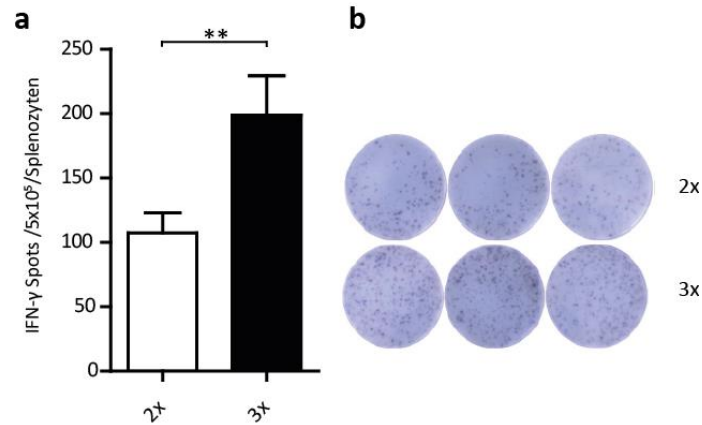


**Abb. 3.1 Poly I:C zeigt den stärksten Effekt.** (a) IFN- $\gamma$  ELISPOT nach Peptid (Trp2/100µg) Immunisierung von C57BL/6(n=3/Gruppe) mit zwei verschiedenen Adjuvantien (Poly I:C und CpG). Die Mäuse wurden im wöchentlichen Rhythmus jeweils zwei Mal subkutan immunisiert. Säulen repräsentieren den Mittelwert ( $\pm$ SEM) von drei Mäusen pro Gruppe. Sternchen indizieren einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Poly I:C und CpG (\*\*\*)  $t$ -test  $p < 0,001$ ). (b) FACS Analyse (Tag14) nach gp70-AH1 Peptidimmunisierung von BALB/c Mäusen (n=3/Gruppe) im zweimaligen wöchentlichen Rhythmus mit zwei verschiedenen Adjuvantien (Poly I:C und CpG). Jeder Punkt repräsentiert eine Maus (Triplikate).

Abb. 3.1 zeigt die Analysen nach der Immunisierung mit Trp2<sub>(180-188)</sub>- und gp70-AH1-Peptid mit zwei verschiedenen Adjuvantien. Das Ergebnis des Versuches zeigt, dass die Kombination von Peptid + Poly (I:C) die stärkste Immunantwort im IFN- $\gamma$  ELISPOT (Abb. 3.1a) wie auch die höchste spezifische T-Zell Frequenz im Blut (Abb. 3.1b) erzeugt hat. Die unbehandelten Mäuse zeigten in beiden Versuchen keine Reaktivität gegen das Peptid. Für alle weiteren auf Peptid basierten Immunisierungen wurde auf die Kombination von 100µg Peptid + 50µg Poly (I:C) zurückgegriffen.

### 3.1.2 Optimierte subkutane Peptidimmunisierung: Testung verschiedener Zeitpunkte

Die zentrale Fragestellung für das nächste Experiment war, ob nach zwei Immunisierungen gut detektierbare Immunantworten vorliegen. Hierfür wurde ein weiteres Mal Trp2<sub>(180-188)</sub> als Model-Epitop verwendet, da dieses natürlich in B16-F10 Zellen exprimiert wird. Für das Experiment wurden sechs bis acht Wochen alte C57Bl/6 Mäuse (n=3) jeweils zwei beziehungsweise drei Mal im wöchentlichen Rhythmus subkutan mit Peptid (100µg) + Poly (I:C) (50µg) immunisiert.



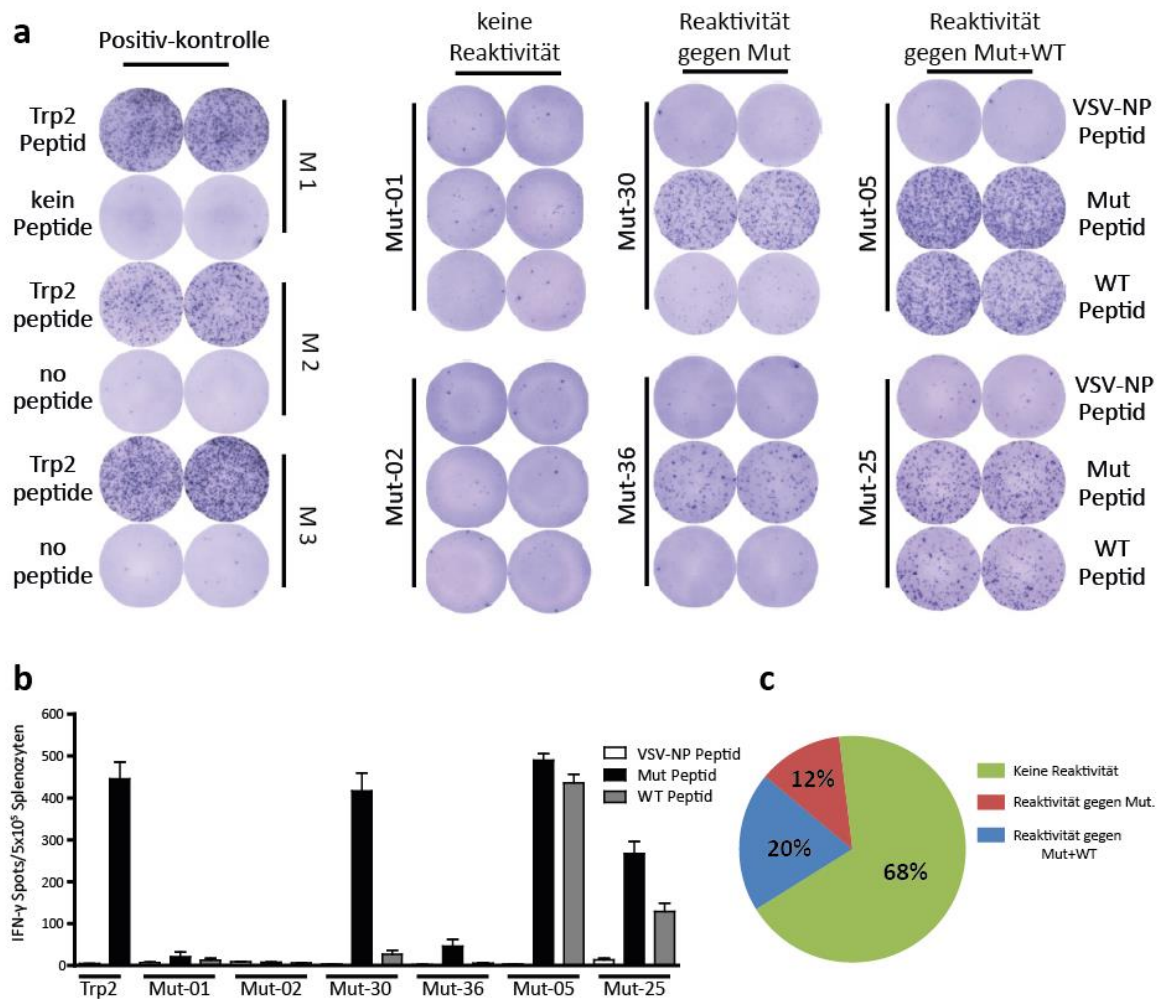
**Abb. 3.2 Optimierung der Peptidimmunisierung: 2 vs. 3.** (a) IFN- $\gamma$  ELISPOT nach zwei oder dreimaliger subkutaner Peptid (Trp2 /100 $\mu$ g) +Poly I:C (50 $\mu$ g) Immunisierung von C57BL/6Mäusen (n=3/Gruppe). Säulen repräsentieren den Mittelwert ( $\pm$ SEM) von drei Mäusen pro Gruppe. Sternchen indizieren einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen zwei und dreimaliger Immunisierung (\*\* $t$ -test,  $p < 0,01$ ). (b) Beispielhafte Darstellung der ELISPOT Triplikate nach zwei oder dreimaliger Peptidimmunisierung.

Zusammenfassend zeigt Abbildung Abb. 3.2a, dass eine dreimalige Immunisierung zur Induktion von signifikant mehr T-Zellen ( $t$ -test,  $p=0,0038$ , Abb. 3.2a) als nach zweimaliger Immunisierung führt. Da eine zweimalige Immunisierung bereits zu einer ausreichend starken T-Zell Induktion führt, wurde beschlossen, für den Screen die Mäuse zweimalig zu immunisieren.

### 3.2 *In vivo* Testung von identifizierten und validierten Punkt Mutationen

#### 3.2.1 Screen mit priorisierten Mutationen

Ziel des Screens war es, nach der Priorisierung und Validierung der 50 Punktmutationen<sup>58</sup>, zu testen, ob es möglich ist, eine mutationsspezifische T-Zell Antwort *in vivo* zu generieren. Pro Gruppe wurden jeweils 2 mutierte Epitope parallel getestet. Für die subkutane Immunisierung wurden die Mäuse jeweils auf der rechten und linken Flanke rasiert und 200 $\mu$ l der Vakzine (Mut-Peptid + Poly I:C) injiziert. Sechs bis acht Wochen alte C57Bl/6 Mäuse (n=5) wurden an Tag eins und sieben immunisiert, das Read Out fand am Tag 12 statt. Für das IFN- $\gamma$  ELISPOT Read-Out wurden als Stimulus BMDCs mit Peptid, welches für die mutierte (Mut) oder Wildtyp (WT) Sequenz kodiert, beladen.



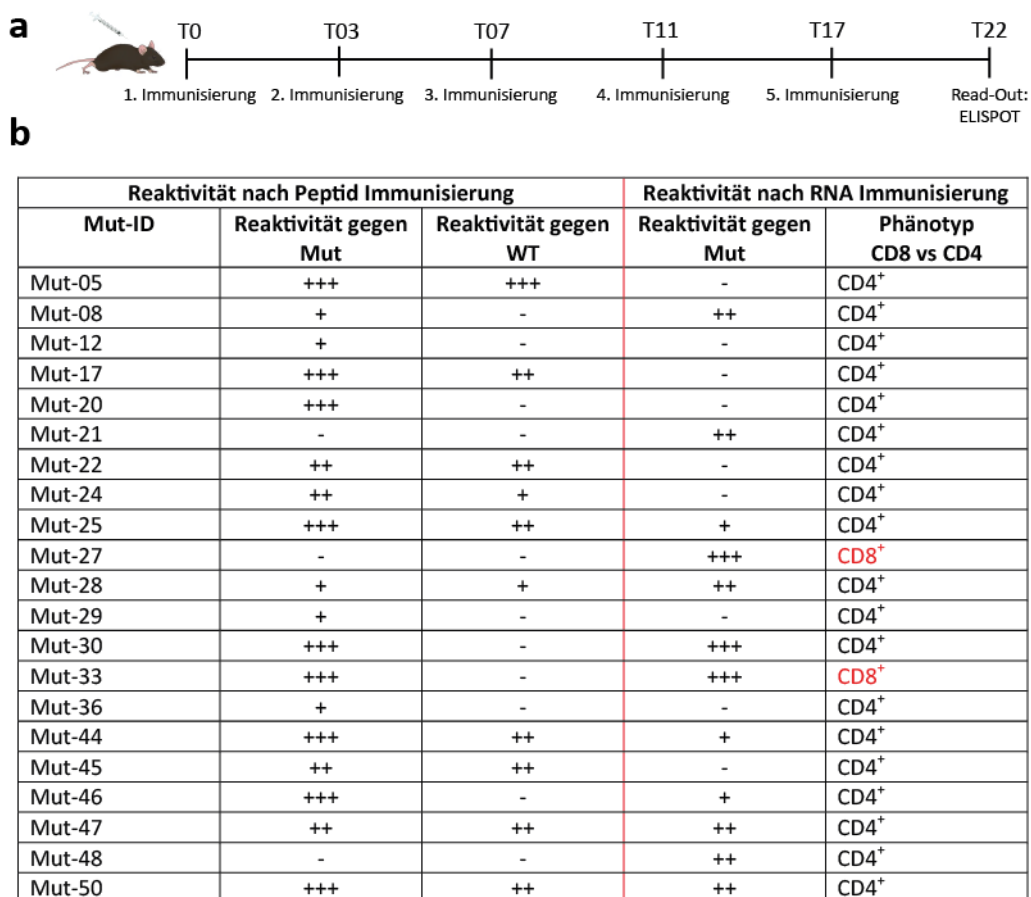
**Abb. 3.3 32% der mutierten Epitope induzieren eine Immunreaktion.** (a) Beispielhafte Darstellung der verschiedenen Reaktionstypen im IFN- $\gamma$  ELISPOT nach Peptid (100 $\mu$ g) + Poly I:C (50 $\mu$ g) Immunisierung. C57BL/6(n=5/Gruppe) wurden jeweils mit zwei unterschiedlichen für eine Mutation kodierendes Peptid parallel in die rechte und linke Flanke subkutan immunisiert. (b) Säulen repräsentieren den Mittelwert ( $\pm$ SEM) von fünf Mäusen pro Gruppe. Für den IFN- $\gamma$  ELISPOT wurden die Milzzellen der einzelnen Mäuse mit dem jeweils korrelierenden mutierten oder Wildtyp Peptid inkubiert. Als Kontrolle wurde VSV-NP<sub>(52-59)</sub> Peptid verwendet. (c) Kreisdiagramm der Verteilung der verschiedenen Reaktionstypen nach Abschluss des Peptid Screens.

Zusammenfassend zeigten 16 von 50 (32 %) für eine Mutation kodierende Peptide eine Immunreaktion (Abb. 3.3c). Die induzierten Immunantworten zeigten hierbei drei verschiedene Arten von Reaktionen (Abb. 3.3a). (i) Es induzierten 6 der 16 Peptide eine Immunantwort spezifisch gegen das mutierte Peptid (Abb. 3.3a+c). Der ELISPOT Read-Out zeigte keine Wildtyp- oder Kreuz-Reaktivität gegen das VSV-NP<sub>(52-59)</sub> Peptid. (ii) Die weiteren 10 immunogenen Peptide zeigten ähnlich starke Reaktivität gegen das mutierte sowie das Wildtyp Peptid (Abb. 3.3a+c). (iii) Mit der Mehrzahl der Peptide wurde keine signifikante Immunantwort induziert (Abb. 3.3a+c). Die Immunantwort der meisten selektierten und validierten Mutationen ist vergleichbar mit der Immunantwort (500 Spots/ $5 \times 10^5$  Milzzellen), die durch das murine Melanom assoziierte Antigen Trp2 (Abb. 3.3b) induziert wurde. Dies könnte ein Hinweis auf die immunologische Potenz der mutierten Epitope sein. Die Bestätigung der Immunantworten durch RNA Vakzinierung war der Fokus der folgenden Experimente.

### 3.2.2 RNA basierte *in vivo* Testung bestätigter Mutationen

Nach dem auf Peptid basierenden Screening der 50 mutierten Epitope (3.2.1), war es Ziel des Experimentes, den Screen auf Basis von RNA für alle Epitope zu wiederholen. Für alle Epitope wurden Plasmide für die *in vitro* Transkription von RNA designt.

Sechs bis acht Wochen alte C57Bl/6 Mäuse (n=3) wurden an den Tagen 0, 3, 7, 11 und 17 immunisiert (Abb. 3.4a). Das Read-Out fand 5 Tage nach der letzten Immunisierung (Tag 23) statt. Pro Maus wurden 20µg RNA für jede Immunisierung verwendet. Für diesen Screen wurde auf eine kommerzielle liposomale Formulierung (Lipofectamine® RNAiMAX, Lifetechnologies) als Träger für die RNA zurückgegriffen. Zum Testen der Immunreaktion wurde aus den zuvor immunisierten Mäusen die Milz präpariert, die Milzzellen mit den entsprechenden Peptiden (Mut-/WT-/Kontroll-Peptid) im IFN-γ ELISPOT restimuliert.



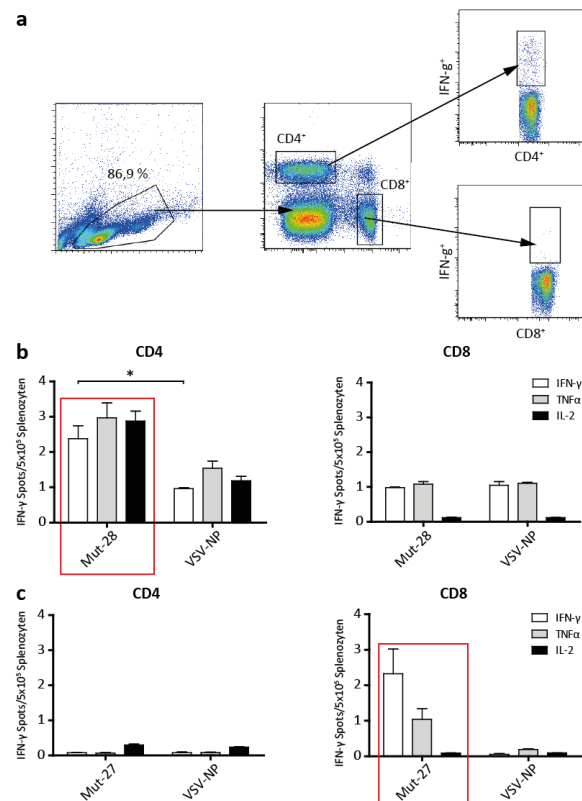
**Abb. 3.4 Übersicht über alle immunogenen Epitope.** (a) Schematische Darstellung des Experimental Aufbaus. C57BL/6 (n=3/Gruppe) wurden mit für die jeweilige Mutation kodierenden RNA (20µg/Maus) + Liposomen (Lipofectamine® RNAiMAX, Lifetechnologies) retro-orbital im wöchentlichen Rhythmus immunisiert. Der IFN-γ ELISPOT fand am Tag 22 statt. (b) Repräsentative Darstellung des IFN-γ ELISPOT aller Mutationen die eine Immunantwort nach der Peptid sowie RNA Vakzinierung induziert haben. Für die Statistische Analyse wurde ein Student *t*-test oder Mann-Whitney test angewendet. Immunantworten galten als Statistisch signifikant, wenn der p-Wert < 0,05 und die durchschnittliche Anzahl der IFN-γ Spots mehr als 30 Spots/5x10<sup>5</sup> Milzzellen zeigte. Die Reaktivität wurde anhand der Spot Anzahl bewertet: <30; +: >30; ++: >50; +++ >200 Spots/Well. Darstellung der T-Zell Reaktivität nach ICS Auswertung (schwarz; CD4<sup>+</sup>, rot; CD84<sup>+</sup>)

Abb. 3.4b fasst die Analyse des vorausgegangenen Peptid und des RNA Vakzine-Screens zusammen. 12 der getesteten RNAs induzierten eine Immunreaktion, wobei 5 auch eine Immunreaktion gegen das WT-Peptid zeigten (ca. 40 % im Vergleich zu 10/16  $\approx$  63 % aus dem Peptid Screen). Im Vergleich zu dem vorhergegangenen Peptid-Screen (3.2.1) wurden 7 Mutationen auf RNA Basis bestätigt (Abb. 3.1b). Neun weitere Peptide induzierte Reaktivitäten ließen sich nicht bestätigen. Interessanterweise zeigten 5 mutierte Epitope (Mut-08, Mut-21, Mut-27, Mut-33 und Mut-47) nur nach RNA Vakzinierung eine Immunreaktion (Abb. 3.4b).

### **3.2.3 Phänotypisierung der induzierten T-Zellen**

Um die im RNA Screen gefundenen (n=12) T-Zell Immunantworten gegen die Mutationen zu Phänotypisierung, wurden die T-Zellantwort für alle 12 immunogenen Mutationen durch intrazelluläre Zytokinfärbung nach RNA Immunisierung analysiert.

Sechs bis acht Wochen alte C57BL/6 Mäuse (n=3) wurden wie bereits in vorhergegangenen auf RNA + Liposomen (Lipofectamine® RNAiMAX, Lifetechnologies) basierenden Experimenten an den Tagen 0, 3, 7, 11 und 17 immunisiert (Abb. 3.4a), das Read-Out fand am Tag 22 statt. Die aufgearbeiteten Milzzellen wurden 5 Stunden mit dem korrelierenden mutierten Peptid oder der unspezifischen Kontrolle (VSV-NP) in Anwesenheit von Brefeldin A inkubiert. Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) und Ionomycin stimuliert.



**Abb. 3.5 Immunogene Epitope zeigen CD4<sup>+</sup> sowie CD8<sup>+</sup> Reaktivität.** (a) ICS Analyse für die Zytokine IFN- $\gamma$  TNF- $\alpha$  und IL-2 von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> reaktiven T-Zellen nach Immunisierung von C57BL/6 (n=3/Gruppe) mit für die Mutationen kodierender RNA+Liposomen (Lipofectamine® RNAiMAX, Lifetechnologies). Die Mäuse wurden im bereits beschriebenen Rhythmus intravenös immunisiert. Für die ICS Färbung wurden die Effektorzellen in Anwesenheit von Brefeldin A mit dem korrelierenden Peptid (2 $\mu$ g/ $\mu$ l) für 5 Std. inkubiert. (b) Repräsentative Darstellung einer CD4<sup>+</sup> reaktiven Mutation. Sternchen indizieren einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der IFN- $\gamma$  Ausschüttung von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> reaktiven T-Zellen (\*t-test, p < 0,05) (c) Repräsentative Darstellung einer CD8<sup>+</sup> reaktiven Mutation. Säulen repräsentieren den Mittelwert ( $\pm$ SEM) von drei Mäusen pro Gruppe.

Abb. 3.5a zeigt die Gating-Strategie, die bei der durchflusszytometrischen Analyse verwendet wurde. Intrazellulär wurde gegen die Zytokine IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-2 gefärbt, da diese Zytokine charakteristisch für zytotoxische CD8<sup>+</sup> und/oder T<sub>H</sub>1-CD4<sup>+</sup> T Zellen sind. Die Analyse (Abb. 3.5b) zeigt beispielhaft die ICS Analyse für Mutation-28. Nach Restimulierung mit Mut-28 Peptid, schütteten ca. 3 % aller CD4<sup>+</sup> T-Zellen antigenspezifisch IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-2 aus (Abb. 3.5b roter Kasten). Nach Restimulierung mit dem Kontrollpeptid kommt es zu einer unspezifischen Zytokinausschüttung in ca. 1 % aller CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten. Ein Beispiel für eine spezifische CD8<sup>+</sup> Reaktivität ist in Abb. 3.5c dargestellt. Nach Restimulierung mit Mut-27 Peptid, wurde eine IFN- $\gamma$  Ausschüttung (ca. 2 %) nur in der CD8<sup>+</sup> Population gemessen. Eine Übersicht der Reaktivitäten der 12 bestätigten mutierten Epitope ist in Abb. 3.4b (ganz rechts) dargestellt. Überraschenderweise zeigte sich, dass 2 der 12 mutierten Epitope (Mut-27; Mut-33  $\approx$  17 %) MHC Klasse-I restringiert, und die 10 übrigen (83 %) MHC Klasse-II restringiert sind.

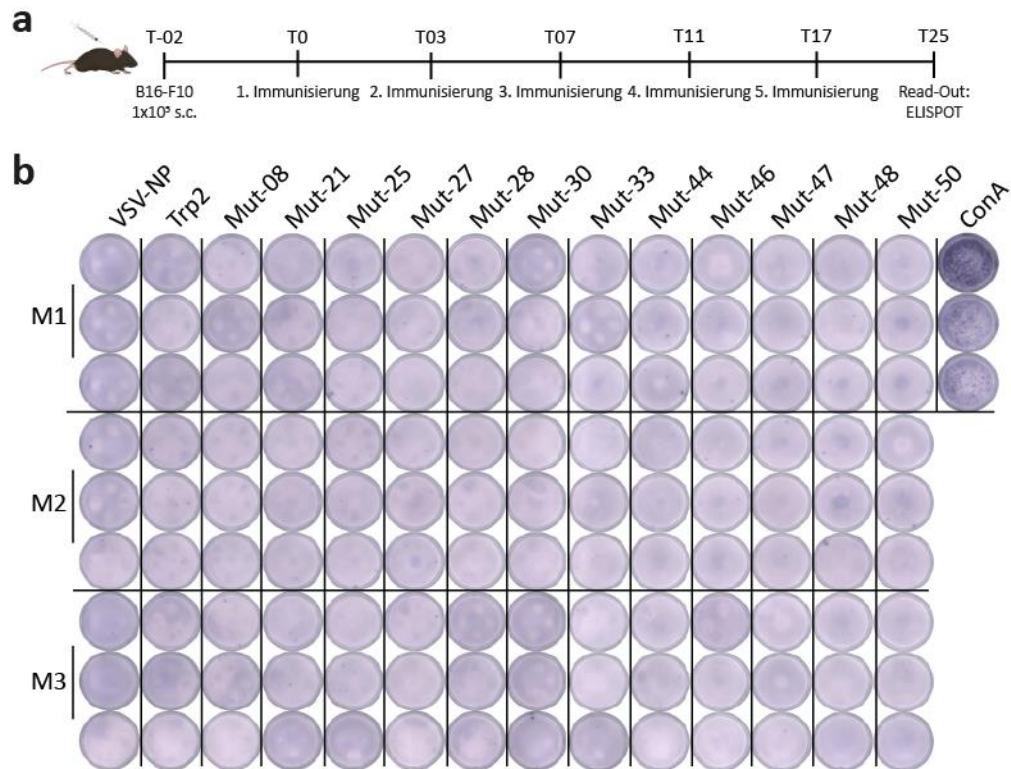
### 3.3 Analyse der anti-tumoralen Potenz von mutations-spezifischen Epitopen

In den vorausgegangenen Experimenten wurde belegt, dass mittels Epitopen die nicht-synonyme Punktmutationen aus B16-F10 enthalten eine mutations-spezifische Immunantwort induziert werden kann (siehe 3.1+3.2). Weiter sollte untersucht werden, ob die immunogenen Mutationen (Abb. 3.4) das Potenzial haben, einen therapeutischen Effekt im transplantierten Tumormodell zu erzeugen. Da unser primäres Ziel die klinische Translation der personalisierten RNA-Vakzine ist (1.2.6) wurden für den auf Peptid basierenden therapeutischen Ansatz lediglich auf zwei Kandidaten (Mut-30 und Mut-44), die eine starke mutationsspezifische Immunreaktion induzierten, zurückgegriffen. Als Goldstandard wurde das Trp2<sub>(180-188)</sub> Antigen verwendet.

#### 3.3.1 Analyse der spontanen Immunität in Wildtyp-Mäusen

In Vorbereitung sollte gezeigt werden, dass C57Bl/6 Mäuse keine spontane systemische T-Zell Immunität gegen mutierte Epitope entwickeln können. Hintergrund war, zu zeigen, dass der therapeutische Effekt auf das Priming naiver mutationsspezifischer T-Zellen und nicht auf eine spontane T-Zell Antwort gegen den Tumor (verstärkt durch den Adjuvanseffekt) per se zurückzuführen ist.

Für das Experimente wurden jeweils B16-F10 Zellen ( $1 \times 10^5$ ) in sechs bis acht Wochen alte C57Bl/6 Mäuse (n=3) in die Flanke subkutan transplantiert. Ein Tag nach Tumordinokulation wurden die Mäuse am Tag 0, 3, 7, 11 und 17 mit irrelevanter RNA (40µg/Maus) + Liposomen (DOTMA/DOPE) intravenös immunisiert (Abb. 3.6a). Bei einer Tumorgröße von ca. 500mm<sup>3</sup> (10x10mm) wurden die Milzzellen aus den tumortragenden Mäusen isoliert und als Effektoren ( $5 \times 10^5$ /Well) im IFN-γ ELISPOT eingesetzt. Als Targets wurde alle nach RNA Immunisierung (3.2.2) immunogenen mutierten Epitope (n=12) sowie das natürlich restringierte Trp2<sub>(180-188)</sub> Peptid verwendet. Als Negativkontrolle wurde VSV-NP<sub>(52-59)</sub> eingesetzt.

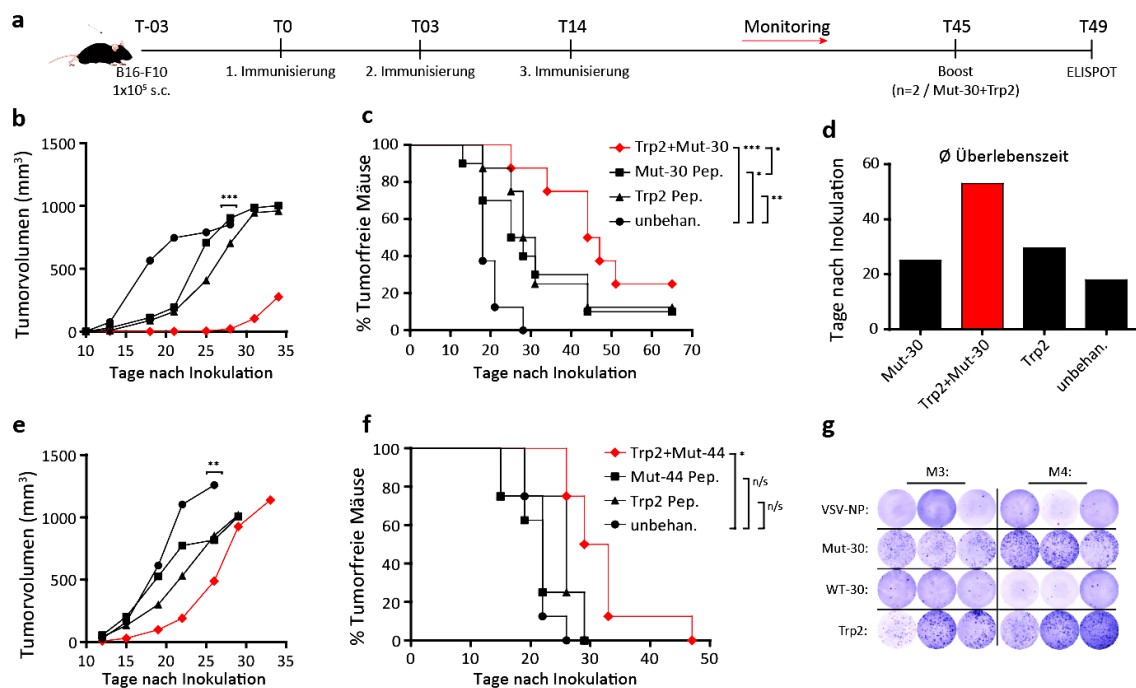


**Abb. 3.6 RNA induzieren keine spontane Immunität in B16-F10 tragenden C57BL/6 Mäusen.** (a) Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus. C57BL/6Mäuse ( $n=3$ ) wurden mit B16-F10 ( $1 \times 10^5$  /subkutan) inokuliert und im wöchentlichen Rhythmus fünf Mal mit irrelevanter RNA ( $40 \mu\text{g}$ ) + Liposomen (DOTMA/DOPE) i.v. immunisiert. (b) Repräsentative Darstellung des IFN- $\gamma$  ELISPOTS (Triplikate/Restimulation) von Milzzellen aus B16-F10 tragenden C57BL/6( $n=3$ ) Mäusen, die mit für alle nach RNA Immunisierung immunogenen Epitopen ( $2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) oder Trp2<sub>(180-188)</sub> Peptid ( $2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) *ex vivo* inkubiert wurden. Als Negativkontrollen wurde das VSV-NP Peptid verwendet. Die Positivkontrolle stellten das Lektin Concanavalin A (ConA) dar. Säulen repräsentieren den Mittelwert ( $\pm$ SEM) von drei Mäusen pro Gruppe. (b) Repräsentative Darstellung des IFN- $\gamma$  ELISPOTS (Duplikate/Restimulation).

Wie in Abb. 3.6b zu erkennen ist, wurde keine spontane Immunität von Wildtyp Mäusen nach irrelevanter RNA Immunisierung gegen immunogene mutierte Epitope oder das Trp2<sub>(180-188)</sub> Peptid nachgewiesen. Daher kann ein nach Vakzinierung beobachteter anti-tumoraler Effekt direkt auf durch die Vakzine expandierte spezifische T-Zellen zurückgeführt werden.

### 3.3.2 Therapeutischer Effekt nach Peptidimmunisierung

Für die Untersuchung therapeutischer Effekte nach Peptidimmunisierung wurden die Mutationen Mut-30 und Mut-44 selektiert. Beide Mutationen induzierten eine starke und mutationsspezifische Immunantwort (Abb. 3.4). Als Goldstandard wurde eine Gruppe ( $n=8$ ) mit Trp2<sub>(180-188)</sub> Peptid immunisiert, sowie Trp2 jeweils mit Mut-30 oder Mut-44 kombiniert, um einen möglichen synergetischen Effekt zu detektieren. Für die Analyse wurde die B16-F10 Zellen ( $1 \times 10^5$ ) subkutan in sechs bis acht Wochen alte C57Bl/6 Mäuse transplantiert. Die Mäuse wurden im Abstand von einer Woche insgesamt drei Mal mit Peptid + Poly I:C immunisiert (Abb. 3.7a). Zur Dokumentation des Tumorwachstums wurden drei Kriterien untersucht: (i) die Tastbarkeit des Tumors als Maß für das Einsetzen des Tumorwachstums (ca.  $1 \text{ mm } \varnothing$ ), (ii) die Wachstumskinetik des Tumors und (iii) der Zeitpunkt bei Erreichen eines Tumolvolumens von  $1500 \text{ mm}^3$ .



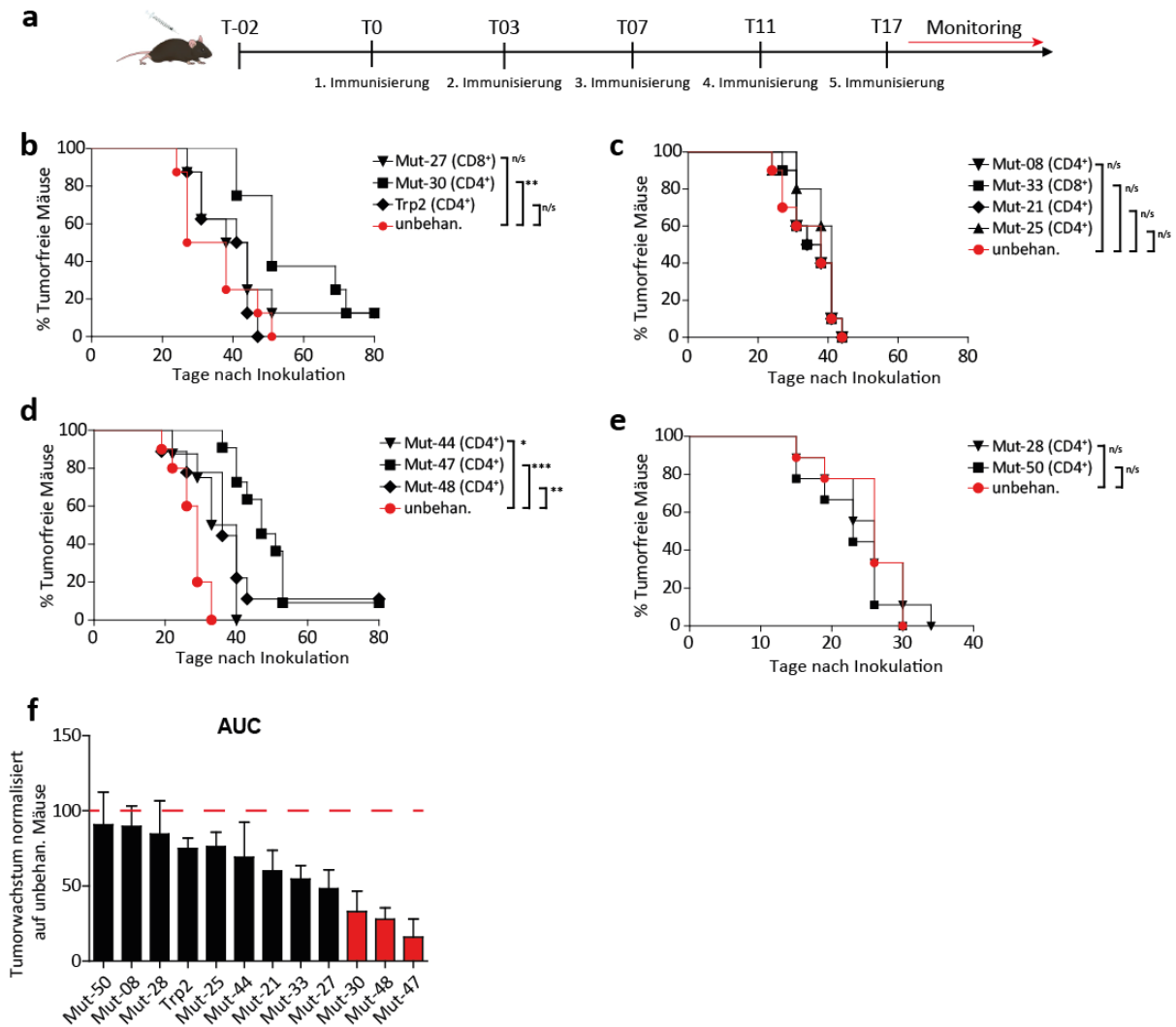
**Abb. 3.7 Neo-Epitope können anti-tumoralen Effekt erzeugen.** (a) Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus. C57BL/6Mäuse (n=8/Gruppe) wurden mit B16-F10 ( $1 \times 10^5$  / subkutan) inokuliert und im wöchentlichen Rhythmus drei Mal mit Peptid (100µg) + Poly I:C (50µg) subkutan immunisiert. Die überlebenden Mäuse wurden am Tag 45 geboostet, an Tag 49 fand der finale IFN- $\gamma$  ELISPOT mit dem jeweiligen korrelierenden Peptid (2µg/µl) als Restimulation statt. Als Kontrolle wurden unbehandelte Tiere verwendet. (b) Die Wachstumskinetiken sind als mittlere Tumorgröße ( $\pm$ SEM) in mm<sup>3</sup> dargestellt. Sternchen indizieren einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Trp2<sub>(180-188)</sub> + Mut-30 in Kombination und der unbehandelten Gruppe (\*\*\*t-test, p < 0,001). (c) Kaplan-Meier Überlebenskurve (Log-rank, \*p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\*p < 0,001). (d) Mittlere Überlebensrate der verschiedenen Gruppen. (e) Wachstumskinetiken nach Trp2 und Mut-44 Peptid Vakzinierung. Sternchen indizieren einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der Trp2 + Mut-44 in Kombination und der unbehandelten Gruppe (t-test, \*p < 0,05). (f) Kaplan-Meier Überlebenskurve (\*Log-rank, p < 0,05). (g) Repräsentative Darstellung des finalen IFN- $\gamma$  ELISPOTS (Tag 49) nach Restimulation mit Mut-30 oder Trp2<sub>(180-188)</sub> Peptid (2µg/µl).

Nach dem Kriterium der Tastbarkeit zeigte sich, dass bei den unbehandelten Mäusen die ersten Tumore zwischen Tag 5-7 tastbar waren, dagegen wurden die Tumore der behandelten Tiere erst zwischen Tag 8-10 ertastet werden. Die Tumore von mit Mut-30 Peptid behandelten Mäusen (Abb. 3.7b) zeigten ein gegenüber unbehandelten Mäusen verzögertes Tumorwachstum. Die Wachstumskinetik war mit der nach Trp2 Vakzinierung vergleichbar (Abb. 3.7b), sodass das Abbruchkriterium (Tumorvolumen 1500mm<sup>3</sup>) zu einem ähnlichen Zeitpunkt (zwischen Tag 45-50) erreicht wurde (Log-rank Test, p=0,034 Abb. 3.7c). Die Kombination von Mut-30+Trp2<sub>(180-188)</sub> Peptid zeigte einen synergistischen Effekt und verzögerte das Tumorwachstum im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (t-Test, p=0,0002 Abb. 3.7b). Durch die Kombination wurde auch das Überleben im Vergleich zur nur mit Mut-30 Peptid behandelten Gruppe signifikant verbessert (Log-rank Test, p=0,0132 Abb. 3.7c). Nach 48 Tagen wurden die zwei überlebenden Mäuse die mit der Kombination Mut-30+Trp2<sub>(180-188)</sub> behandelten wurden, ein weiteres Mal immunisiert, das Read-Out fand am Tag 52 statt. Beide Tiere zeigen eine starke Immunantwort (Abb. 3.7g) nach Restimulation mit Mut-30 sowie Trp2<sub>(180-188)</sub> Peptid. Das Ergebnis zeigt, dass Mut-30 spezifische Gedächtnis T-Zellen induziert wurden. Die Abb. 3.7e-f zeigt die Analyse des therapeutischen Tumormodells nach Mut-44 Peptid Vakzinierung. Der anti-tumorale Effekt von Mut-44 und Trp2 ist geringer ausgeprägt als nach Mut-30 Vakzinierung. Eine Ursache hierfür könnte sein, dass die

Immunisierungen nicht drei Tage, sondern fünf Tage nach der Tumorinokulation gestartet wurden. Die Kombination von Mut-44 und Trp2 zeigte einen signifikanten synergistischen Effekt in der Wachstumskinetik ( $t$ -test,  $p=0,0152$ , Abb. 3.7f) sowie dem Überleben der Mäuse (Log-rank Test;  $p=0,0106$ , Abb. 3.7g) verglichen mit der unbehandelten Gruppe. Das auf Peptiden basierende therapeutische Tumorexperiment war ein erster Hinweis auf das therapeutische Potenzial der Vakzinierung mit mutierten Epitopen.

### **3.3.3 Therapeutischer Effekt nach liposomaler RNA Vakzinierung**

Für die weitere Untersuchung, wurden 11 der 12 Mutationen, die nach RNA Immunisierung eine Immunreaktion zeigten (Abb. 3.4,  $n=12$ ), in einem therapeutischen Tumorexperiment getestet. Für die Analyse wurden 4 verschiedene therapeutische Tumorexperimente analysiert. Für die Experimente wurden jeweils B16-F10 Zellen ( $1 \times 10^5$ ) in sechs bis acht Wochen alte C57Bl/6 Mäuse ( $n=10$ ) in die Flanke subkutan transplantiert. Zwei Tage nach Tumorinokulation wurden die Mäuse am Tag 0, 3, 7, 11 und 17 mit RNA ( $40 \mu\text{g}/\text{Maus}$ ) + Liposomen (DOTMA/DOPE) intravenös immunisiert (Abb. 3.8a). Eine Zusammenfassung der Wachstums sowie Überlebenskurven ist auf Abb. 3.8b-e dargestellt.



**Abb. 3.8 Auch die auf RNA basierende Vakzine zeigt anti-tumoralen Effekt.** (a) Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus. C57BL/6Mäuse ( $n=10$  /Gruppe) wurden mit B16-F10 ( $1 \times 10^5$  /subkutan) inokuliert und im wöchentlichen Rhythmus fünf Mal mit RNA ( $40 \mu\text{g}$ ) + Liposomen (DOTMA/DOPE) i.v. immunisiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Mäuse. Signifikanz wurde mit dem  $t$ -test berechnet. (b) Kaplan-Meier Kurve nach Immunisierung mit Mut-27, Mut-30 und Trp2 RNA + Liposomen. Sternchen indizieren einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Trp2 und Mut-30 verglichen mit der unbehandelten Gruppe (\*\*Log-Rank,  $p < 0,01$ ). (c) Kaplan-Meier Kurve nach Immunisierung mit Mut-08, Mut-33, Mut-21 und Mut-25 RNA + Liposomen. (d) Kaplan-Meier Kurve nach Immunisierung mit Mut-44, Mut-47 und Mut-48 RNA + Liposomen. Sternchen indizieren einen statistisch signifikanten Unterschied im Überleben verglichen mit der unbehandelten Gruppe (Log-Rank, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ). (e) Kaplan-Meier Kurve nach Immunisierung mit Mut-28 und Mut-50. (f) Die AUC wurde für jede einzelne Maus berechnet und gegen die unbehandelte Gruppe des jeweiligen Experimentes normalisiert. Die AUC wurde aus vier verschiedenen Experimenten zusammengestellt. Rote Säulen indizieren einen signifikanten Unterschied zwischen Trp2 und einem mutierten Epitop (\* $t$ -test,  $p < 0,05$ ).

Wie schon von Kreiter *et al.* für Modelantigene gezeigt wurde<sup>46</sup>, wurde auch in diesen Experimenten das anti-tumorale Potenzial der RNA Vakzinierung bestätigt. Die Gruppe, die mit Mut-30 ( $\text{CD4}^+$ ) RNA immunisiert wurde, zeigt ein signifikant ( $t$ -test,  $p=0,0045$  Abb. 3.8b) verlangsamtes Tumorwachstum sowie eine niedrigere Mortalitätsrate (Log-rank Test,  $p=0,003$  Abb. 3.8b), verglichen mit Trp2 vakzinieren oder der unbehandelten Gruppe. Weiter zeigten auch die Mutationen Mut-44 ( $\text{CD4}^+$ , Log-rank Test,  $p=0,0101$ , Abb. 3.8d), Mut-47 ( $\text{CD4}^+$ , Log-rank Test,  $p=0,0001$ , Abb. 3.8d) und Mut-48 ( $\text{CD4}^+$ , Log-rank Test,  $p=0,0029$ , Abb. 3.8d) ein signifikant verlangsamtes Melanomwachstum und eine verringerte Sterblichkeitsrate (Abb. 3.8d). Mut-27 ( $\text{CD8}^+$ ) Vakzinierung induziert zwar ein verlangsamtes

Tumorstadium (Daten nicht gezeigt), jedoch keine verringerte Mortalität (Log-rank Test,  $p=0,3013$ , Abb. 3.8c) der Mäuse.

Die Gruppen die mit Mut-08 (CD4<sup>+</sup>, Log-rank Test,  $p=0,7673$  Abb. 3.8c), Mut-33 (CD8<sup>+</sup>, Log-rank Test,  $p=0,9111$  Abb. 3.8c), Mut-21 (CD4<sup>+</sup>, Log-rank Test,  $p=0,8338$ , Abb. 3.8c) sowie Mut-25 (CD4<sup>+</sup>, Log-rank Test,  $p=0,4513$ , Abb. 3.8c) immunisiert wurden zeigten ein leicht verlangsamtes Tumorstadium (Daten nicht gezeigt) jedoch keinen Effekt auf die Mortalität im direkten Vergleich zur unbehandelten Gruppe (Abb. 3.8d). Die Mutationen Mut-28 und Mut-50 zeigten weder einen positiven Effekt auf das Wachstum noch auf das Überleben der Mäuse (Abb. 3.8e).

Des Weiteren wurden die Tumorstadiumsdaten mittels der „area under the curve“ Methode zusammengefasst und analysiert (Abb. 3.8f; AUC). Hierbei wird die Fläche unter der Wachstumskurve jeder einzelnen Maus gemessen und zum Schluss auf die Gesamtfläche der unbehandelten Mäuse normalisiert<sup>66</sup>.

Zusammenfassend haben die auf RNA basierende therapeutische Tumorexperimente die Daten des auf Peptid basierenden Experimentes bestätigt. Die Mutationen Mut-30, Mut-47 und Mut-48 stachen hierbei als besonders effektiv gegen das Melanomwachstum hervor (Abb. 3.8b +d).

### **3.4 MoA Analyse der antitumoralen Wirkung eines mutierten Epitopes**

#### **3.4.1 Das MHC-II restringierte Epitop Mut-30 zeigt ein starkes anti-tumorales Potenzial**

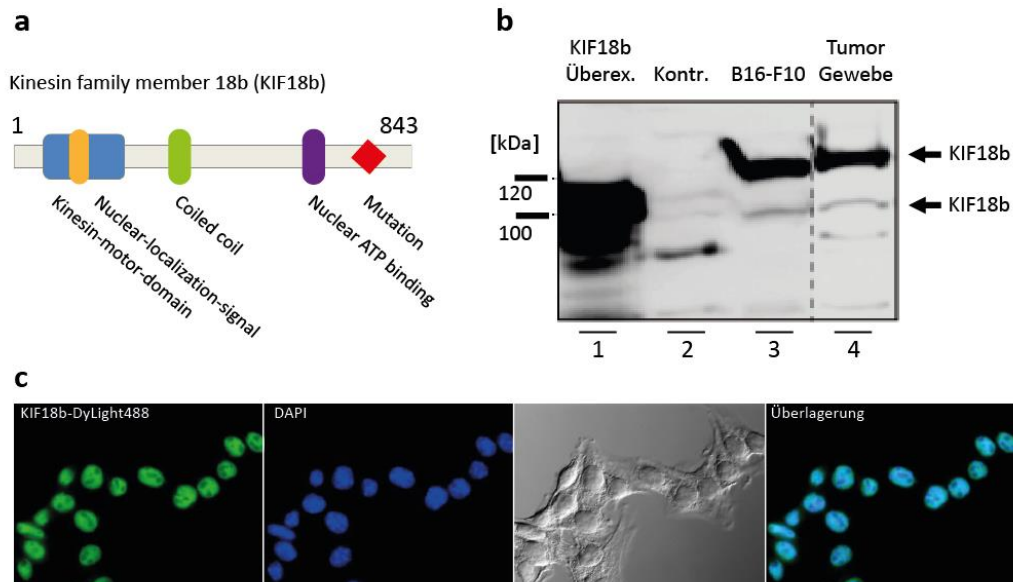
Für die weitere Untersuchung des anti-tumoralen Wirkungsmechanismus einer Mutation wurde Mut-30 ausgewählt. Die Mutation erfüllt wichtige Kriterien: (i) Mut-30 induziert nach Peptid sowie RNA Vakzinierung eine mit Trp2 vergleichbare spezifische Immunantwort (Abb. 3.3). (ii) Die gewählte Mutation zeigt im auf Peptid (Abb. 3.7) sowie RNA (Abb. 3.8) basierenden Tumorexperiment eine starke therapeutische Wirkung. (iii) Mut-30 RNA Immunisierung induziert (Abb. 3.3) Gedächtniszellen (Abb. 3.7d).

#### **3.4.2 Mut-30 ist eine Punktmutation in einem Gen welches für KIF18b kodiert**

Die DNA Sequenz an der Position p.K739 ist komplett homogen im gesundem Referenzgewebe (C57BL/6 Maus), dagegen zeigen die RNA Reads aus der B16-F10 Probe/Sequenzierung eine heterogene Sequenz an der gleichen Stelle, was auf eine somatische Punkt-Mutation (1.1.1) hinweist<sup>58</sup>. Die Punktmutation befindet sich in einem Gen, das für das Protein Kinesin family member 18B (KIF18b) kodiert und ist nicht in einer funktionellen oder konservierten Domäne lokalisiert (Abb. 3.9a). Dieser Umstand könnte darauf hinweisen, dass es sich um eine „passenger“-Mutation handelt, also laut Definition eine Mutation die keinen direkten Effekt auf die Funktionalität des Proteins hat und der Tumorzelle keinen proliferativen Vorteil gibt<sup>58,67</sup>.

KIF18b gehört zur Familie der Kinesin Superfamilie Proteine welche ca. 650 Mitglieder hat und aufgrund von Sequenzhomologien in 14 Unterfamilien unterteilt ist. Die jeweiligen Unterfamilien werden als Mitose-Kinesine, welche an der Zellteilung beteiligt sind und Nicht-Mitose-Kinesine, die am intrazellulären Transport von Molekülen beteiligt sind unterschieden<sup>68</sup>. KIF18b gehört zu den Mitose-Kinesinen, hat also einen direkten Einfluss auf die Zellteilung. In bioinformatischen Analysen von über

2100 Tumortranskriptomen wurde das KIF18b Gen direkt als eines der „Driver Gens“ in verschiedenen Tumoren identifiziert. Andere Mitglieder dieser Familie wie KIF11 (EG5) werden bereits erfolgreich als Zielstrukturen für anti-mitotische Medikamente in Klinischen Studien der Phase I und II eingesetzt<sup>69,70,71</sup>. Um zu analysieren, ob das KIF18b Protein von B16 Tumorzellen nach Mut-30 Vakzinierung im Sinne einer „Escape-Mutante“ herunterreguliert wird, wurde eine Westernblot-Analyse durchgeführt.

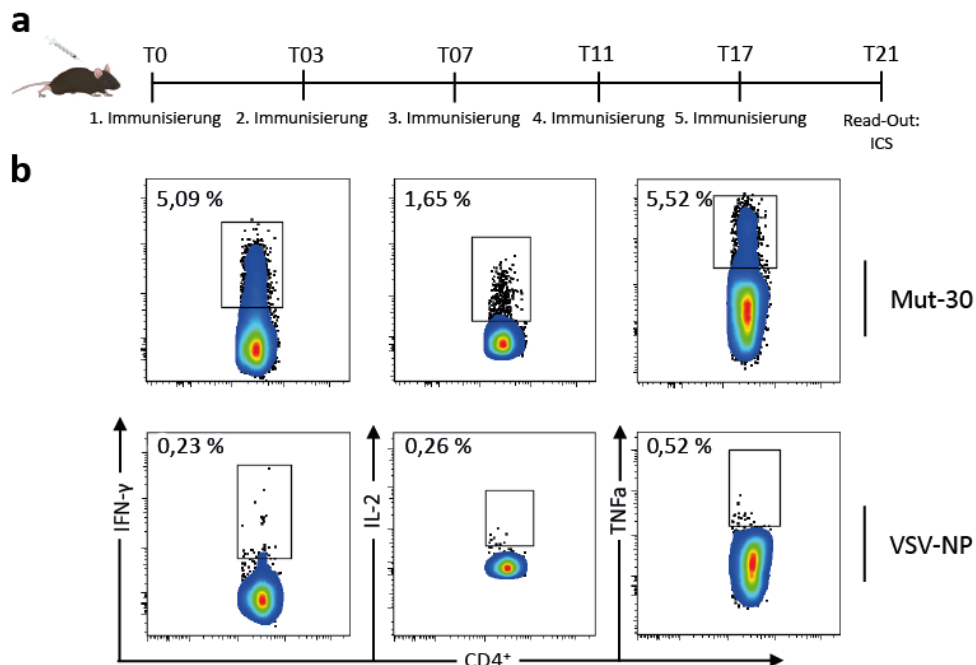


**Abb. 3.9 Kinesin family member 18B (KIF18b).** (a) Schematische Darstellung des Kif18b Proteins. Die Punktmutation (rote Raute) befindet sich nicht in einer konservierten oder funktionellen Domäne. (b) Western blot Analyse des KIF18b Proteins. Spur 1: Transiente Überexpression von Kif18b in Hek293t Zellen (Positivkontrolle). Spur 2: Hek293t Zellen mit Leervektor (Negativkontrolle). Spur 3: Total Zelllysate von B16-F10 Zellen (*in vitro* Kultur). Spur 4 Total Zelllysate von Tumorgewebe (*ex vivo*) nach Mut-30 RNA Vakzinierung. (c) Immunfluoreszenzfärbungen gegen KIF18b in B16-F10 Zellen. KIF18b (KIF18b-DyLight488), Zellkern (DAPI).

Die Analyse zeigt, dass das KIF18b *in vitro* (Abb. 3.9; Line 3) sowie *ex vivo* (Abb. 3.9; Linie 4 / Tumorklysate, 5 Tage nach der letzten Vakzinierung mit Mut-30 RNA (Tag 30) noch stark exprimiert wird (Abb. 3.9b/ 120 kD). Weiterhin wurden bei der Western-blot Analyse zwei spezifische Banden identifiziert. Diese Beobachtung deckt sich mit der Analyse von Lee und Kollegen die ebenfalls zwei Isoformen des KIF18b Proteins identifiziert und beschrieben haben<sup>72</sup>. Anhand eines IF-Stainings der B16-F10 Zelllinie wurde belegt, dass das KIF18b Protein hauptsächlich im Nucleolus der Zellen lokalisiert ist (Abb. 3.9c). Diese Beobachtung deckt sich ebenfalls mit den von Lee und Kollegen gemachten Untersuchungen<sup>72</sup>.

### 3.4.2 Phänotypisierung der Mut-30 spezifischen Immunantwort

Im Versuch 3.3.3 wurde gezeigt, dass es nach der Vakzinierung mit Mut-30 RNA zu einer signifikanten Verlangsamung des Tumorwachstums *in vivo* kommt. Da durch die Vakzinierung mit Mut-30 RNA spezifische  $CD4^+$  T-Zellen induziert werden, stellte sich die Frage welcher T-Zellphänotyp vorliegt. Naive  $CD4^+$  T-Zellen können sich nach Aktivierung entweder zu einer  $T_H1$  oder zu einer  $T_H2$  Zelle entwickeln, die unterschiedliche Zytokine sezernieren, und sich daher phänotypisch unterscheiden<sup>73</sup>. Ziel dieses Experimentes war es, den induzierten Phänotyp der spezifischen T-Zellen näher zu charakterisieren um weiter der Frage nachzugehen, welche Zytokine für den anti-tumoralen Effekt verantwortlich sind. Hierfür wurden C57BL/6 Mäuse (n=3) mit Mut-30 RNA + Liposomen (DOTMA/DOPE) intravenös immunisiert (Abb. 3.11a), die Milz am Tag 21 präpariert und nach einer Ruhephase (ü.N) als Effektorzellen im ICS eingesetzt.

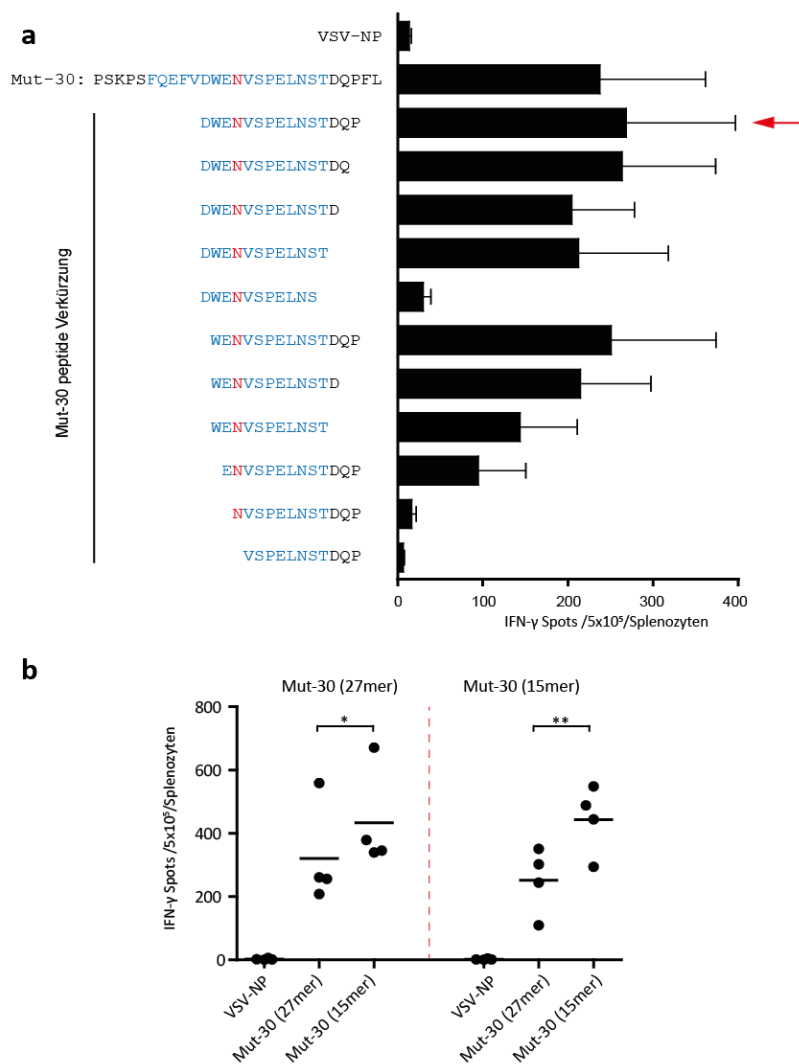


**Abb. 3.10 Mut-30 induziert  $CD4^+$  spezifische T-Zellen.** (a) Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus. C57BL/6(n=3/Gruppe) wurden mit für Mut-30 kodierender RNA (40 $\mu$ g/Maus) + Liposomen (DOTMA/DOPE) retro-orbital im wöchentlichen Rhythmus immunisiert. (b) Repräsentative Darstellung der ICS Analyse von  $CD4^+$  T-Zellen für die Zytokine IFN- $\gamma$  TNF- $\alpha$  und IL-2 nach Restimulation mit Mut-30 Peptid (6 $\mu$ g/ $\mu$ l).

In Abb. 3.10b ist exemplarisch die Zytokinausschüttung der  $CD4^+$  T-Zellen nach Immunisierung mit Mut-30 RNA dargestellt. Von ca. 5% der  $CD4^+$  T Zellen wird IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und von ca. 1,5 % wird das Zytokin IL-2 ausgeschüttet. Diese Zytokine werden typischerweise von  $T_H1$ -Effektorzellen sezerniert. Hingegen produzierten  $CD8^+$  T-Zellen keine Zytokine nach Restimulierung mit Mut-30 Peptid (Daten nicht gezeigt). Wie beschrieben zeichnen sich  $T_H1$  T-Zellen durch die Ausschüttung von IFN- $\gamma$  aus, was einerseits einen direkten anti-tumoralen Einfluss auf das Tumorgewebe hat<sup>74</sup> und andererseits dafür sorgt, dass weitere Zellen des adaptiven Immunsystems aktiviert werden.

### 3.4.3 Definition des Mut-30 Minimalepitops

Da für alle Vakzinierungsexperimente die 27mer Version von Mut-30 verwendet wurde, gab es keine Information über das Minimal-Epitop welches die spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen erkennen. Zur weiteren immunologischen Charakterisierung wurde das Minimal-Epitop für Mut-30 charakterisiert. Für das Experiment wurden C57BL/6 (n=5) am Tag 0, 3, 7, 11 und 17 mit Mut-30 RNA (40µg/Maus) liposomal intravenös immunisiert. Das Read-Out fand am Tag 21 statt. Um das Minimal-Epitop zu bestimmen wurden 11 Peptide in verschiedener Länge, die jeweils am N- und C-Terminus um eine Aminosäure verkürzt sind als Effektoren verwendet.



**Abb. 3.11 Das Minimalepitop von Mut-30 umfasst 11 Aminosäuren.** (a) IFN- $\gamma$  ELISPOT nach Immunisierung von C57BL/6(n=5/Gruppe) mit Mut-30 RNA (40µg) + Liposomen (DOTMA/DOPE). Säulen repräsentieren den Mittelwert ( $\pm$ SEM) von fünf Mäusen pro Gruppe. Für das Read-Out wurde die Milzzellen mit den jeweiligen am N- und C- Terminus verkürzten Peptiden (6µg/µl) inkubiert. Dargestellt sind nur Epitope die eine Immunreaktion induziert haben. Die Rote Säule repräsentiert das Minimalepitop. Das für weitere Read-Outs verwendete Peptid wurde mit einem roten Pfeil markiert. (b) IFN- $\gamma$  ELISPOT nach dreimaliger Immunisierung von C57BL/6(n=5/Gruppe) mit dem 27 oder 15mer Peptid (roter Pfeil; 100µg/Maus)+ Poly I:C (50µg/Maus). Für das Read-Out wurden jeweils beide Versionen für die Restimulation der Effektoren verwendet. Jeder Punkt repräsentiert eine Maus (Triplikate). Sternchen indizieren einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der 27 und 15mer Version des Mut-30 Epitopes ( $t$ -test, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).

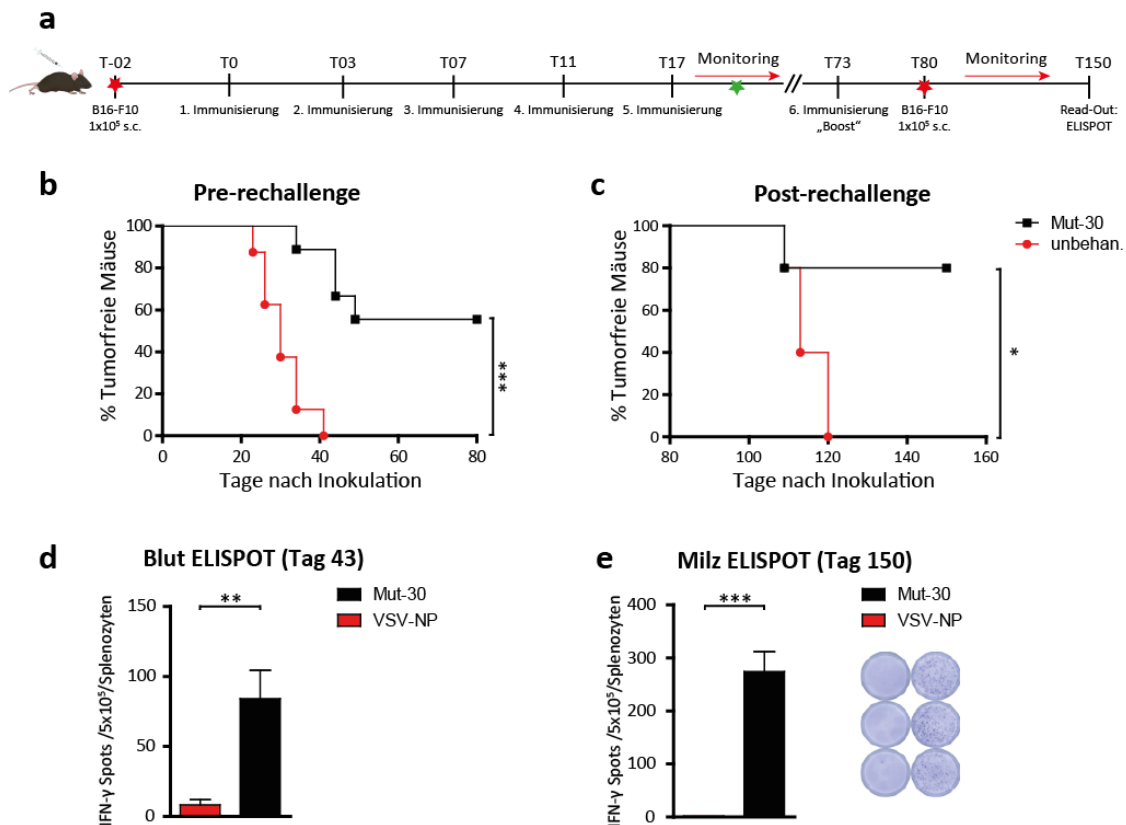
Die Analyse zeigt, dass mindestens 11 Aminosäuren nötig sind (Abb. 3.11 rote Säule) um eine Immunreaktion zu stimulieren, sie zeigt weiter, dass mit zunehmender Verkürzung der C-Terminalen Aminosäuren zu einer deutlichen Abschwächung der Immunreaktion kommt. Interessanterweise scheint die Verkürzung der drei ersten N-Terminalen Aminosäuren keinen Einfluss auf die Reaktivität zu haben. Eine Erkenntnis der Analyse ist, dass ohne die Punktmutation keine Erkennung erfolgt, was eine weitere Bestätigung für die Spezifität der Reaktion ist.

Um zu untersuchen, ob durch die Immunisierung bzw. die Verwendung eines verkürzten Epitopes, es auch zu einer verbesserten Induktion von T-Zellen kommt, wurden in einem unabhängigen Experiment, C57BL/6 (n=5) an den Tagen 0, 11, 17 mit dem Mut-30 (27mer) Peptid (100µg) oder der verkürzten Version (15mer /Abb. 3.11a roter Pfeil) + Poly (I:C) (50µg) immunisiert. Am Tag 23 wurden die Milzzellen präpariert und als Effektoren im IFN- $\gamma$  ELISPOT eingesetzt. Die Abb. 3.11b bestätigt die Vermutung, dass es nach der Immunisierung mit dem verkürzten Epitop zu keiner signifikanten Verbesserung der Immunantwort kommt.

### **3.5 Analyse des anti-tumoralen Effekt nach liposomaler Mut-30 RNA Vakzinierung**

#### **3.5.1 Induktion von Mut-30 spezifischen Gedächtniszellen**

Für die Wirkung eines Impfstoffes ist es wichtig, dass eine starke immunologische Gedächtnisantwort induziert wird. Einen ersten Hinweis auf spezifische CD4<sup>+</sup> Gedächtniszellen gab das Experiment 3.3.2. Bei diesem auf Peptid basierenden therapeutischen Tumorexperiment zeigten zwei der mit Mut-30 + Trp2<sub>(180-188)</sub> Peptid vakzinierten Mäuse nach 50 Tagen ein spezifisches Signal im IFN- $\gamma$  ELISPOT (Abb. 3.7e). Für das folgende Experiment stellte sich nun die Frage, ob diese Gedächtnisantwort ausreicht, um Mäuse vor dem B16-F10 Melanom zu schützen. Zur Klärung dieser Fragestellung wurden C57BL/6 (n=10) Mäuse subkutan mit B16-F10 Zellen ( $1 \times 10^5$ ) inokuliert (Abb. 3.12a, roter Stern). Einen Tag später wurden die Mäuse nach dem bereits bekannten Schema mit Mut-30 RNA (40µg) + Liposomen vakziniert (Abb. 3.12a). Als Kontrolle wurden unbehandelte Mäuse verwendet. Am Tag 43 wurde fünf Mäusen der behandelten Gruppe ca. 200µl Blut entnommen und gepoolt (Abb. 3.12a, grüner Stern). Aus dem Blut wurden die Lymphozyten isoliert und als Effektoren im IFN- $\gamma$  ELISPOT eingesetzt. Die überlebenden Mäusen wurde am Tag 73 „geboosted“ und am Tag 80 wurde ihnen zum zweites Mal B16-F10 Zellen ( $1 \times 10^5$ ) subkutan injiziert (Abb. 3.12a, roter Stern). Als Kontrolle dienten erneut unbehandelte Mäuse, die in Gewicht und Alter angepasst wurden. Am Tag 150 wurde ein finaler IFN- $\gamma$  ELISPOT mit Milzzellen als Effektoren durchgeführt.

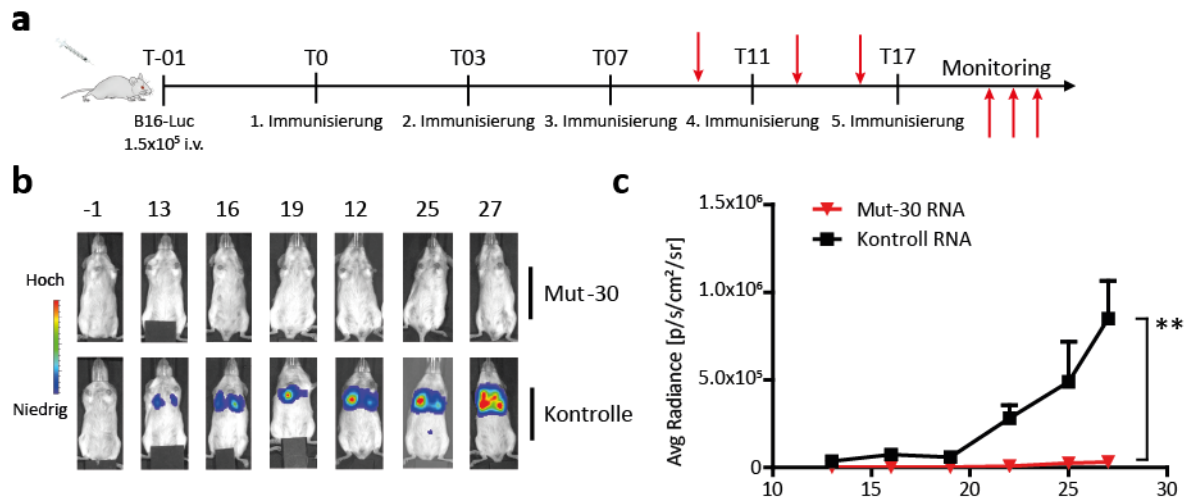


**Abb. 3.12 Mut-30 spezifische T-Zellen induzieren einen starken Memory-Effekt.** (a) Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus. C57BL/6 Mäuse ( $n=10$ /Gruppe) wurden mit B16-F10 ( $1 \times 10^5$ /subkutan) inokuliert und im wöchentlichen Rhythmus mit Mut-30 RNA ( $40 \mu\text{g}$ /Maus) + Liposomen (DOTMA/DOPE) immunisiert. Am Tag 43 wurde von fünf der behandelten Mäuse Blut i.v. entnommen, die Lymphozyten isoliert und als Effektoren im IFN- $\gamma$  ELISPOT eingesetzt. Am Tag 73 wurden die überlebenden Tiere ( $n=5$ ) ein weiteres Mal mit Mut-30 RNA + Liposomen „geboostet“ und eine Woche später (Tag 80) ein zweites Mal mit B16-F10 Zellen subkutan inokuliert. Als Kontrolle wurden unbehandelte Mäuse verwendet. Der finale IFN- $\gamma$  ELISPOT fand am Tag 150 statt. (b) Kaplan-Meier Kurve nach Immunisierung mit Mut-30 RNA + Liposomen. (c) Kaplan-Meier Kurve nach subkutaner Rechallenge der überlebenden Tiere mit B16-F10 Zellen. Sternchen indizieren einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Mut-30 und der unbehandelten Gruppe (\*\*\*) (Log-Rank,  $p=0,0001$ ; \*Log-Rank,  $p=0,0353$ ). (d) IFN- $\gamma$  ELISPOT aus Blut Lymphozyten. Säulen repräsentieren den Mittelwert ( $\pm$ SEM) von fünf Mäusen pro Gruppe. (e) Finaler IFN- $\gamma$  ELISPOT der überlebenden Mäuse. Säulen repräsentieren den Mittelwert ( $\pm$ SEM) von vier Mäusen pro Gruppe. Sternchen indizieren einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Mut-30 und VSV-NP ( $t$ -test, \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ )

Wie auf Abbildung 3.16b zu erkennen ist, haben 50% der mit Mut-30 RNA vakzinieren Mäuse den Tumor abgestoßen (Log-rank,  $p=0,0001$ , Abb. 3.12b). Ein ELISPOT aus peripherem Blut (Abb. 3.12d) zeigt, dass 43 Tage nach der letzten Vakzinierung immer noch eine hohe Frequenz Mut-30 spezifische  $\text{CD4}^+$  T-Zellen im peripheren Blut zu finden ist. Dies weist auf eine effiziente Etablierung einer „Gedächtnis“ T-Zellantwort hin. Wie oben beschrieben, wurden die überlebenden Mäuse am Tag 80 erneut mit B16-F10 inokuliert. Die Überlebenskurve auf Abbildung 3.16c zeigt, dass ein weiteres Mal 80% der Initial mit Mut-30 RNA behandelten Mäuse überlebten (Log-rank,  $p=0,0353$ , Abb. 3.12c). Ein überraschendes Ergebnis brachte auch die Analyse des finalen IFN- $\gamma$  ELISPOTS (Abb. 3.12e). In allen vier überlebenden Mäusen wurde 77 Tage nach der letzten Immunisierung ein sehr starkes Mut-30 spezifisches IFN- $\gamma$  Signal gemessen. Das Experiment hat eindrücklich belegt, dass es möglich ist, mit Mut-30 spezifischer RNA Vakzinierung eine dauerhafte Gedächtnisantwort gegen das B16-F10 Melanom aufzubauen.

### 3.5.2 Therapeutisches Lungen Model

In zwei unabhängigen subkutanen therapeutischen Tumorexperimenten (3.3.2 + 3.3.3) wurde eine Verlangsamung des Tumorwachstums sowie ein signifikanter Überlebensvorteil der Mäuse nach Mut-30 RNA Vakzinierung gezeigt. Das subkutane Tumormodell hat zwei pragmatische Vorteile: (i) subkutane Tumore können sehr einfach durch Injektion unter die Haut inokuliert werden und (ii) die Messung des Tumors kann durch Ertasten bzw. später durch Ausmessen mit Hilfe eines Mess-Schiebers genau dokumentiert werden (siehe auch 3.3.2). Ein wesentlicher Nachteil des subkutanen Modells ist, dass B16-F10 Zellen nach subkutaner Injektion keine Metastasen ausbilden<sup>75</sup>. Ein zentraler Parameter für den Erfolg einer klinischen anti-tumoralen Therapie ist jedoch der Einfluss auf das Wachstum der Metastasen. Der Fokus des folgenden Experimentes war es, den Effekt von Mut-30<sup>+</sup> spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen in einem Metastasen Modell zu analysieren. Um die Metastasierung von B16-F10 Zellen zu imitieren, besteht die Möglichkeit, die Melanomzellen intravenös zu injizieren, da diese im Kappilarbett der Lunge Metastasen ausbilden<sup>75</sup>. Im klassischen Lungenmodell werden B16-F10 Zellen intravenös über die Schwanzvene injiziert und nach einem festgelegten Zeitraum abgetötet, die Lungen präpariert und die Metastasen gezählt bzw. die Lungen gewogen. Ein kontinuierliches Monitoring des Tumorwachstums ist nicht möglich. Um eine Wachstumskinetik über die Zeit zu ermöglichen, wurde eine B16 Zell Linie generiert die transgen für Luziferase sowie eGFP Protein ist. Durch die transgene B16-Luc-eGFP-Cl2 (B16-Luc) Zelllinie ist es über eine Biolumineszenzreaktion (2.9.3) möglich, ein nicht invasives Monitoring mittels Bildgebung (Ivis<sup>TM</sup> 100 Imaging System, Xenogen) durch Messung des Luziferase Signals in den Lungen durchzuführen. Da C57BL/6Mäuse ein schwarzes Fell haben und dies zu Messfehlern führt, wurde für dieses Experiment auf C57BL/6Albino-Mäuse (B6N-Tyrc/BrCrCrI) zurückgegriffen. Den Mäusen (n=8) wurden B16-Luc Zellen ( $1,5 \times 10^5$ /300 $\mu$ l/PBS) intravenös injiziert. Einen Tag später wurden die Mäuse nach dem beschriebenen RNA Vakzinierungsschema immunisiert (Abb. 3.13a) und im wöchentlichen Rhythmus das Luciferase Signal gemessen (Abb. 3.13a, rote Pfeile). Um einen unspezifischen Effekt der RNA auszuschließen, wurden Tiere mit irrelevanter RNA immunisiert, wobei kein signifikanter Effekt auf das Luziferasesignal beobachtet wurde.



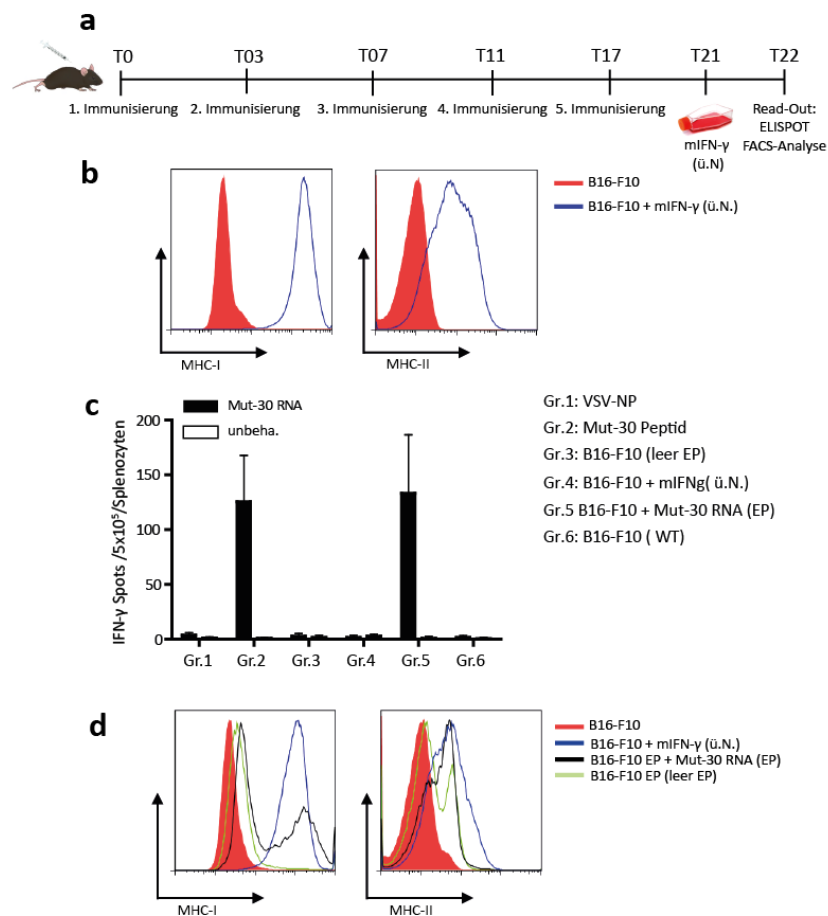
**Abb. 3.13** Das anti-tumorale Potenzial von Mut-30 kann im therapeutischen Lungenmodell bestätigt werden. (a) Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus. C57BL/6-Albino Mäuse (n=8/Gruppe) wurden mit B16-Luc ( $1,5 \times 10^5$ /intravenös) inkuliert und im wöchentlichen Rhythmus mit Mut-30 RNA ( $40 \mu\text{g}/\text{Maus}$ ) + Liposomen (DOTMA/DOPE) immunisiert. Als Kontrolle dienten mit Mock RNA behandelte Tiere. Im zweimaligen wöchentlichen Rhythmus wurde das Lungensignal gemessen (rote Pfeile). (b) Repräsentative Darstellung des *In vivo* Biolumineszenz Signals der Lungenmetastasen nach RNA Vakzinierung. (c) Die Wachstumskinetik ist als Mittelwert des Biolumineszenz Signals ( $\pm$ SEM) der einzelnen Gruppen dargestellt. Sternchen indizieren einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Mut-30 und der mit Mock RNA behandelten Gruppe (\*\**t*-test,  $p < 0,01$ ).

In Abbildung Abb. 3.13b ist exemplarisch die Metastasierung und das progressive Wachstum der B16-Luc Zellen über den Zeitraum von 27 Tagen gezeigt. Analog zum subkutanen Modell zeigt die Mut-30 vakzinierter Gruppe eine deutliche Verzögerung des Tumorwachstums (*t*-test,  $p=0,0022$ , Abb. 3.13c). In der mit Mut-30 RNA behandelten Gruppe zeigte nur eine von acht Mäusen (12%) nach 16 Tagen ein messbares Luziferase Signal. In der Kontrollgruppe sind in allen Mäusen die Tumore angewachsen, wobei die Tiere am Tag 27 starke Anzeichen von Krankheit zeigten (struppiges Fell/Hecheln). Der stärkere therapeutische Effekt im Vergleich zu dem subkutanen Modell, ist einerseits darauf zurückzuführen, dass nur einen Tag nach der Tumorinokulation mit der Therapie begonnen wurde, und andererseits darauf, dass das Lungengewebe, aus der natürlichen Anatomie heraus deutlich zugänglicher für das Immunsystem ist (direkte Barriere zur Außenwelt). Das Experiment hat deutlich gemacht, dass es durch Mut-30 RNA Vakzinierungen möglich ist, auch in einem Metastasierungsmodell einen massiven therapeutischen Effekt zu erreichen.

### 3.5.3 *In vitro* Analyse von Mut-30 spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen

Im vorausgegangenen Abschnitt (3.3.2, 1.1) wurde gezeigt, dass Mut-30 spezifische T-Zellen nach Restimulierung mit Mut-30 Peptid, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ , jedoch kein GrzB sezernieren. IFN- $\gamma$  induziert die Expression von verschiedenen Proteinen wie beispielsweise iNOS<sup>76</sup> oder sorgt für die Aktivierung von NK-Zellen in normalem sowie Tumorgewebe. Des Weiteren sorgt das Zytokin für eine Hochregulierung der MHC-I und -II Moleküle auf der Zelloberfläche von B16-F10 Tumorzellen<sup>77</sup>. Da B16-F10 in Ruhe nur sehr wenige MHC Moleküle auf der Oberfläche präsentieren, war die zentrale Fragestellung dieses Experimentes, ob eine IFN- $\gamma$  vermittelte Hochregulierung der MHC-Moleküle eine direkte Erkennung der Tumorzellen durch spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen *in vitro* ermöglichen würde. In einem Vorexperiment wurde

gezeigt, dass die Inkubation (ü. N.) von B16-F10 mit mIFN- $\gamma$  (50ng/ml) eine starke Hochregulierung von MHC-I und -II Molekülen auf der Oberfläche von B16-F10 Zellen auslöst (Abb. 3.14b). Für das Experiment wurden C57BL/6Mäuse (n=5) mit Mut-30 RNA (40 $\mu$ g/Maus/Injektion) nach dem bekannten Schema immunisiert (siehe Abb. 3.14a) und die aufgearbeiteten Milzzellen als Effektoren (5x10<sup>5</sup>/100 $\mu$ l/Well) im IFN- $\gamma$  ELISPOT verwendet. Als Negativkontrolle wurden nicht behandelte Mäuse eingesetzt. Als Zielzellen wurden B16-F10 (1x10<sup>4</sup> /100  $\mu$ l/ Well), mit mIFN- $\gamma$  ü. N. inkubiert und verwendet. Weiter wurden B16-F10 sowie B16-F10 Zellen nach Mut-30 RNA Elektroporation (220V/950 $\mu$ F) als „Targets“ eingesetzt. Parallel zum IFN- $\gamma$  ELISPOT wurde die MHC Expression der verschiedenen „Targets“ via Durchflusszytometrie analysiert.



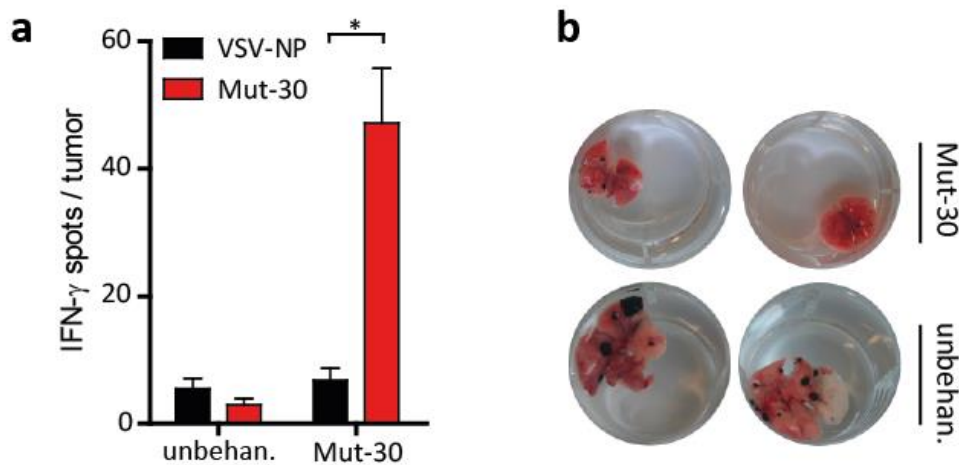
**Abb. 3.14 Mut-30 spezifische T-Zellen sind nicht in der Lage B16-F10 Zellen *in vitro* zu erkennen.** (a) Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus. C57BL/6 Mäuse (n=5) wurden im wöchentlichen Rhythmus mit Mut-30 RNA (40 $\mu$ g/Maus) + Liposomen (DOTMA/DOPE) immunisiert. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Mäuse. (b) FACS-Analyse der MHC Expression von B16-F10 Zellen nach *in vitro* ü.N. Kultivierung <sup>+</sup>. mIFN- $\gamma$  (50ng/ml). (c) IFN- $\gamma$  ELISPOT nach Restimulation mit verschiedenen Zielzellen. Säulen repräsentieren den Mittelwert ( $\pm$ SEM) von fünf Mäusen pro Gruppe. (d) FACS-Analyse der MHC Expression verschiedenen im IFN- $\gamma$  ELISPOT eingesetzten Targets.

Die Analyse des IFN- $\gamma$  ELISPOTS zeigte (Abb. 3.14c), dass die Positivkontrolle (Abb. 3.14c /Gr.2) gut funktioniert hat (Negativkontrolle Gr.1 VSV-NP Peptid). Unbehandelte B16-F10 Zellen (Abb. 3.14c/Gr.6) wurden von den Lymphozyten nicht erkannt, da B16-F10 Zellen nur sehr schwach immunogen sind. Obwohl die Qualitätskontrolle (Abb. 3.14d blauer Peak) zeigt, dass es nach der Inkubation mit mIFN- $\gamma$  zu einer Hochregulierung von MHC-I und -II Molekülen kommt, wurden keine Spots im IFN- $\gamma$  ELISPOT

detektiert (Abb. 3.14c/Gr.4). Ein Grund hierfür könnte sein, dass die Antigenprozessierung in B16-F10 Zellen ineffektiv war. Im zweiten Teil des Experimentes wurde Mut-30 RNA via Elektroporation in B16-F10 Zellen transferiert und als Targets im IFN- $\gamma$  ELISPOT eingesetzt. Das Ergebnis des Experimentes zeigt, dass, nach starker endogener Expression in B16-F10 das Mut-30 Epitop von spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen erkannt (Abb. 3.14c/Gr.5) und IFN- $\gamma$  sezerniert wird. Die Qualitätskontrolle (Abb. 3.14d/schwarzer Peak) zeigt weiter, dass es nach der Elektroporation von Mut-30 RNA zu einer Hochregulierung von MHC-I und -II Molekülen kommt, und korreliert mit den Ergebnissen des ELISPOTS. Um auszuschließen, dass dieser Effekt ein Artefakt der Elektroporation ist, wurden B16-F10 Zellen ohne RNA (Abb. 3.14c/Gr.3) sowie mit eGFP-RNA elektroporiert (Daten nicht gezeigt). In beiden Fällen wurden keine IFN- $\gamma$  Spots detektiert. Die FACS-Analyse zeigt auch, dass es nach Elektroporation von irrelevanter RNA zu einer Hochregulierung der MHC-Moleküle kommt. Des Weiteren bestätigt die Analyse, dass es nach Elektroporation ohne RNA nur eine leichte Hochregulierung der MHC Moleküle gab .

#### **3.5.4 TIL-ELISPOT nach liposomaler Mut-30 RNA Vakzinierung**

Da nicht gezeigt wurde , dass Mut-30 spezifische T-Zellen B16-F10 Zellen *in vitro* erkennen, leitete sich daraus die Fragestellung ab, ob es sich bei den gezeigten anti-tumoralen Effekten um einen spezifischen oder unspezifischen Effekt handelt. Um diese Frage zu klären, war es Ziel dieses Experimentes, zu untersuchen, ob Mut-30 spezifische T-Zellen das Tumorgewebe infiltrieren. Hierzu sollten Tumor infiltrierende Lymphozyten (TILs) isoliert und als Effektoren im IFN- $\gamma$  ELISPOT eingesetzt werden. Hierfür wurden C57BL/6 Albino-Mäuse (n=5) mit B16-Luc Zellen (1,5x10<sup>5</sup>/Maus) i.v. inokuliert und die Mäuse nach dem bekannten Schema mit RNA immunisiert. Als Negativkontrolle sind unbehandelte Mäuse verwendet worden. Am Tag 27 wurden die Lungen entnommen und mit PBS perfundiert, um das Lungengewebe von peripherem Blut zu reinigen. Danach wurden die Metastasen präpariert, zu einer Zellsuspension verarbeitet und ü. N. in Zellkulturflaschen kultiviert. Bei B16-F10 handelt es sich um eine adhärenzte Zelllinie, daher wurden, durch die ü. N. Kultivierung lebende B16-Luc Zellen von den restlichen Zellen des Tumors separiert. Da sich nach der ü. N. Kultivierung noch abgestorbene Zellen im Überstand befanden, wurde eine Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt, die Interphase isoliert und komplett als Effektorpopulation im IFN- $\gamma$  ELISPOT eingesetzt. Für die Restimulation wurde jeweils Mut-30 sowie VSV-NP<sub>(52-59)</sub> Peptid verwendet.



**Abb. 3.15 Mut-30 spezifische T-Zellen infiltrieren das Tumorgewebe.** (a) IFN- $\gamma$  ELISPOT nach Isolierung und Verwendung von TILs als Effektoren. Lungenmetastasen von mit Mut-30 RNA + Liposomen (DOTMA/DOPE) vakzinieren C57BL/6-Albino Mäusen (n=5) wurden präpariert und ü. N. *in vitro* kultiviert. Aus dem Überstand wurden die T-Lymphozyten mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation isoliert und als Effektoren eingesetzt. Als Kontrolle dienten die Metastasen von unbehandelten Tieren. Säulen repräsentieren den Mittelwert ( $\pm$ SEM) von vier Mäusen pro Gruppe. Sternchen indizieren einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Mut-30 und VSV-NP (\*t-test,  $p < 0,05$ ). (b) Repräsentative Darstellung der Metastasierung des Lungengewebes.

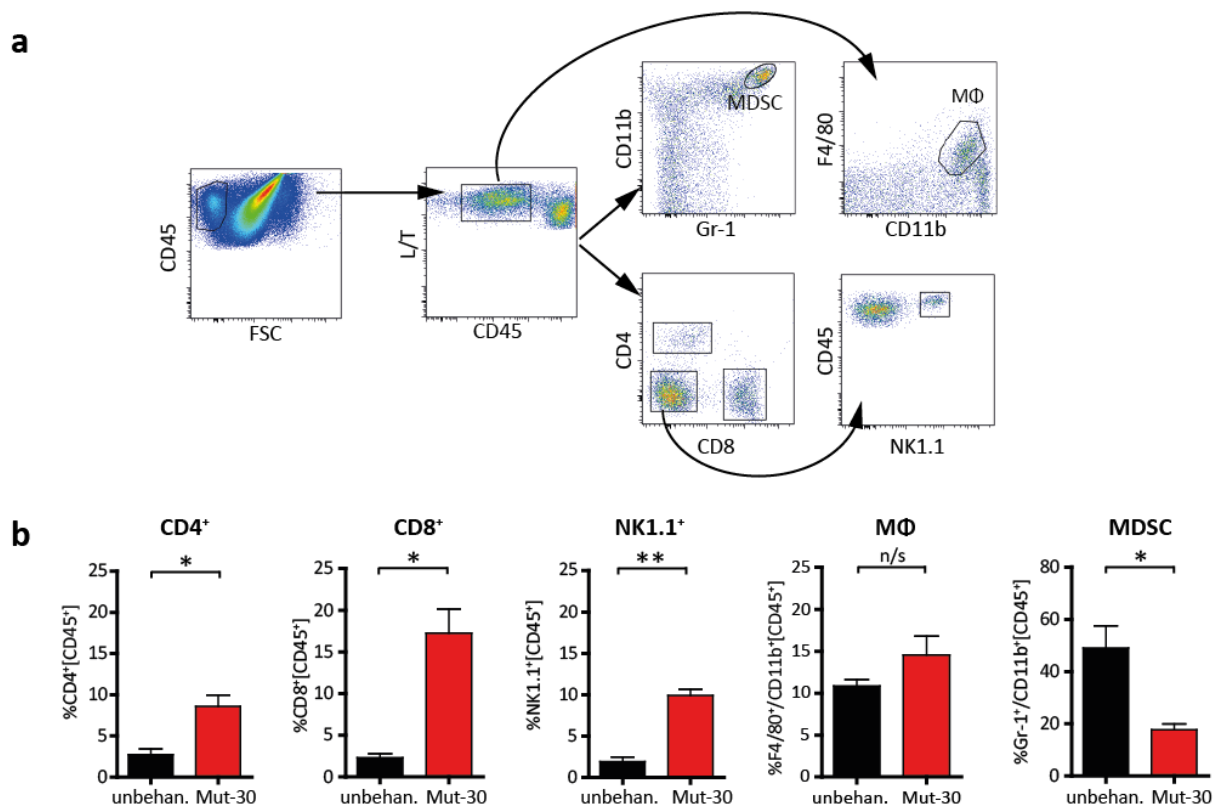
Zusammengefasst zeigt Abb. 3.15a, dass nach Restimulierung der Tumor infiltrierenden Lymphozyten mit Mut-30 Peptid, eine Mut-30 spezifische Immunantwort (t-test,  $p = 0,0372$  Abb. 3.15a) im IFN- $\gamma$  ELISPOT nachweisbar war. Da die Lungen vor der Präparation mit PBS perfundiert wurden, ist davon auszugehen, dass es sich um Tumor infiltrierende und nicht periphere Mut-30<sup>+</sup> spezifische CD4<sup>+</sup> T Zellen handelt. Der Background gegen das unspezifische Peptid ist auf die hohe Voraktivierung der T- und NK-Zellen im Tumorgewebe nach Vakzinierung zurückzuführen. Beispielhaft zeigt Abbildung Abb. 3.15b die unterschiedliche Metastasierung der behandelten (Abb. 3.15b, oben) und unbehandelten (Abb. 3.15b unten) Gruppen. Während in der mit Mut-30 RNA behandelten Gruppe nur vereinzelt sehr kleine Metastasen zu sehen sind, zeigten sich in der unbehandelten Gruppe deutlich mehr und größere Metastasen. Mit diesem Experiment wurde belegt, dass der therapeutische Effekt der Mut-30 RNA Vakzinierung (siehe Lungen) direkt mit der Tumordinfiltration von Mut-30 spezifischen T-Zellen korreliert. Um diese Korrelation näher zu charakterisieren, wird sich das folgende Kapitel mit den verschiedenen T-Zell Subpopulationen, die das Tumorgewebe infiltrieren, befassen.

### 3.6 Analysen der tumorinfiltrierenden T-Lymphozyten

#### 3.6.1 T-Lymphozyten Infiltration im Rahmen der liposomalen RNA Vakzinierung

Der Umstand, dass T-Zellen solide Tumore, wie das B16-F10 Melanom, infiltrieren können, ist die Voraussetzung für einen anti-tumoralen Effekt. In verschiedenen präklinischen und klinischen Studien wurde eine Korrelation von tumorinfiltrierenden T-Lymphozyten mit einer verbesserten Prognose beobachtet. Nachdem in den vorhergegangenen Experimenten gezeigt wurde, dass es sich bei Mut-30 spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen nicht um CTLs handelt, diese aber in den Tumor einwandern und IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  sowie IL-2 sekretieren, sollte im Folgenden der Einfluss von Mut-30 spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen auf

andere T-Zell Subpopulationen im Tumor analysiert werden. Dazu sollten tumorinfiltrierende T-Lymphozyten durchflusszytometrisch analysiert werden. C57BL/6 Mäusen (n=3) wurden Melanomzellen ( $1 \times 10^5$ /Maus) subkutan injiziert und ab Tag +1 nach dem etablierten Schema (Abb. 3.12a) immunisiert. Als die Tumore eine Größe von ca.  $7 \times 7 \text{ mm}$  ( $200 \text{ mm}^3$ ) hatten, wurden die Mäuse abgetötet der Tumor präpariert und zu einer Zellsuspension aufgearbeitet. Der Fokus der FACS Analyse lag bei diesem Versuch auf  $\text{CD4}^+$ ,  $\text{CD8}^+$ ,  $\text{NK}^+$  Zellen sowie Makrophagen und myeloiden Supressorzellen (Myeloid-derived supressor cells; MDSC). Die Tumorzellen wurden anhand ihrer Größe und Granularität identifiziert.



**Abb. 3.16 Mut-30-Vakzinierung führt zu signifikant erhöhter Lymphozyteninfiltration.** (a) FACS-Analyse der TILs. Repräsentative Abbildung der Gating-Strategie. Tumore (ca.  $7 \times 7 \text{ mm}$ ) von mit Mut-30 RNA + Liposomen (DOTMA/DOPE) vakzinieren C57BL/6 Mäusen (n=5/Gruppe) wurden präpariert und zu einer Einzelzell-Suspension aufgearbeitet und gefärbt. Als Negativkontrolle wurden unbehandelte Mäuse verwendet. Für die Analyse wurden  $4 \times 10^6$  Tumorzellen/Maus gefärbt. (b) FACS-Analyse der verschiedenen T-Zell Subpopulationen. Säulen repräsentieren den Mittelwert ( $\pm$ SEM) von drei Mäusen pro Gruppe. Sternchen indizieren einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Mut-30 und der unbehandelten Gruppe (t-test, \*p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\*p < 0,001).

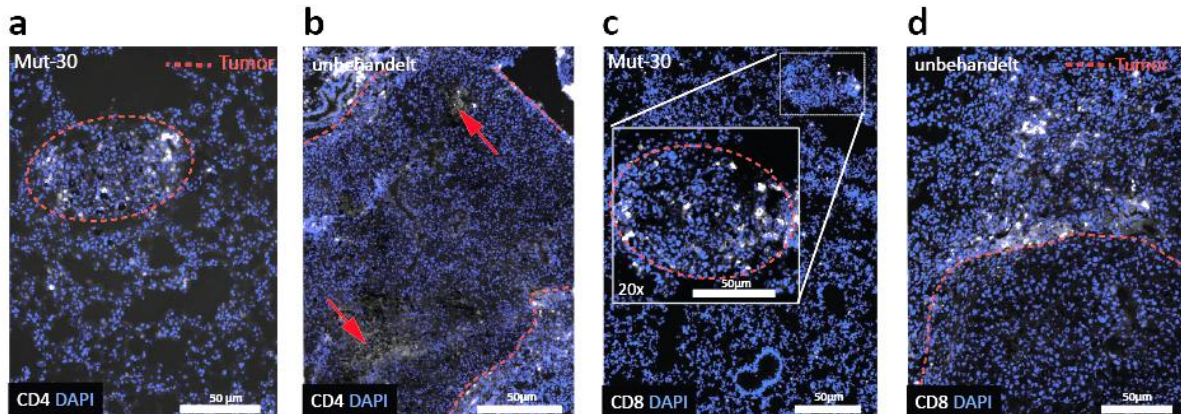
In Abb. 3.16a ist ein repräsentatives Beispiel einer Färbung mit der Gating-Strategie gezeigt. Insgesamt, zeigt die Analyse (Abb. 3.16a) eine deutliche Infiltrierung des Tumorgewebes durch Lymphozyten. Die Abb. 3.16b stellt den prozentuellen Anteil der verschiedenen T-Zell Subpopulation von Lymphozyten dar. In der mit Mut-30 RNA behandelten Gruppe wird das Tumorgewebe, im Vergleich zur unbehandelten Gruppe, von signifikant mehr  $\text{CD4}^+$  sowie  $\text{CD8}^+$  T-Zellen infiltriert ( $\text{CD4}/t\text{-test}$ ,  $p=0,0492$ ;  $\text{CD8}/t\text{-test}$ ,  $p=0,0273$  Abb. 3.16b). Dies lässt auf eine spezifische Tumorantwort schließen. Ob diese Infiltration direkt auf einen antigenspezifischen Mechanismus oder die Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen durch Mut-30 spezifischen T-Zellen zurückzuführen ist, wurde in diesem Experiment nicht geklärt. Weiter zeigt die Analyse eine starke Infiltrierung von NK-Zellen nach Vakzinierung ( $t\text{-test}$ ,  $p=0,0048$ ; Abb. 3.16b), was auf eine zusätzliche unspezifische Immunabwehr gegen

den Tumor hinweist. Hypothetisch war dies zu erwarten, da die geringe MHC Klasse I und II Expression, wie sie auf B16-F10 Zellen zu finden ist, die Erkennung des Tumors durch NK-Zellen fördert<sup>78</sup>. Des Weiteren könnte die Infiltration von NK-Zellen auf die Zytokinausschüttung (IL-2) von spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen zurückzuführen sein. In Anbetracht der Tatsache, dass sie neben T-Zellen die zweiten entscheidenden IFN- $\gamma$  und auch GrzB produzierenden Zellpopulationen darstellen, wird ihre Beteiligung an dem anti-tumoralen Effekt nach RNA Vakzinierung weiter untersucht werden. Neben T- und Nk-Zellen zeigte die FACS-Analyse eine nicht signifikant unterschiedliche Infiltration von Makrophagen (M $\Phi$ ) in das Tumorgewebe

Eine weitere interessante Beobachtung der FACS-Analyse ist die vergleichsweise geringe Infiltration von MDSCs (*t*-test, *p*= 0,0206; Abb. 3.16b) in das Tumorgewebe bei mit Mut-30 RNA behandelten Mäusen. MDSCs zeichnen sich durch ihre immunsupprimierenden Eigenschaften, vor allem gegenüber der Aktivität von T-Zellen aus<sup>79</sup>. In Mäusen werden MDSCs durch die Differenzierungsmarker der myeloischen Zellreihe Gr-1 (granulocyte-differentiation antigen1) und CD11b definiert (Gating; Abb. 3.16a). Da MDSCs normalerweise für T-Zell Anergie und eine schlechte Prognose verantwortlich sind, spricht die verminderte MDSC Infiltration, für einen weiteren therapeutischen Erfolg der Mut-30 RNA Vakzine.

### 3.6.1.1 Immunfluoreszenzfärbung von Lungenmetastasen

Eine weitere Methode um eine Aussage zur Verteilung der infiltrierenden T-Lymphozyten zu treffen, ist die indirekte Immunfluoreszenzfärbung (2.11.2), wobei sowohl CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen analysiert werden können. Die Zellkerne wurden mit DAPI sichtbar gemacht. Da die Infiltration von Metastasen untersucht werden sollte wurden den C57BL/6 Albino Mäusen (*n*=5) B16-Luc Zellen ( $1,5 \times 10^5$ /300 $\mu$ l/PBS) intravenös injiziert. Einen Tag später wurden die Mäuse nach dem bekannten RNA Vakzinierungsschema immunisiert (Abb. 3.12a) und im wöchentlichen Rhythmus das Luziferase Signal gemessen. Als Kontrolle dienten unbehandelte Mäuse. Am Tag 27 wurden die Mäuse abgetötet und die Lunge präpariert. Für die IF wurde jeweils ein Lungenflügel separiert und in Isopentan (Methylbutan) kryokonserviert. Die IF und Analyse der Lungenmetastasen wurde von Fulvia Vascotto und Magdalena Brkic durchgeführt und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

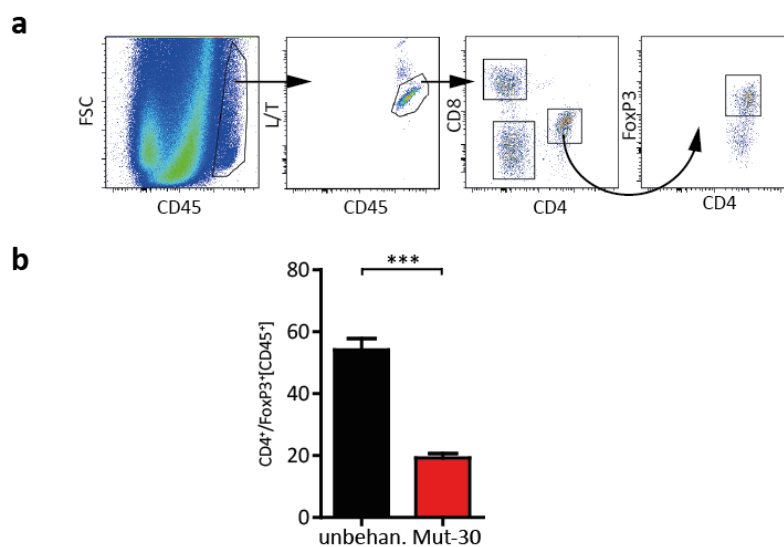


**Abb. 3.17** Die erhöhte Infiltration von  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen kann in der IF Analyse bestätigt werden. (a) Immunfluoreszenzfärbungen (Überlagerungsbilder) von  $CD4^+$  T-Zellen (weiß) und Zellkernen (DAPI) in B16-F10 Metastasen (rot gestrichelte Linie) im Lungengewebe nach Mut-30 RNA Vakzinierung. (b) Immunfluoreszenzfärbungen (Überlagerungsbilder) von  $CD4^+$  T-Zellen (weiß) und Zellkernen (DAPI) in B16-F10 Metastasen (rot gestrichelte Linie) im Lungengewebe in der unbehandelten Gruppe. (c) Immunfluoreszenzfärbungen (Überlagerungsbilder) von  $CD8^+$  T-Zellen (weiß) und Zellkernen (DAPI) in B16-F10 Metastasen (rot gestrichelte Linie) im Lungengewebe nach Mut-30RNA Vakzinierung. (d) Immunfluoreszenzfärbungen (Überlagerungsbilder) von  $CD8^+$  T-Zellen (weiß) und Zellkernen (DAPI) in B16-F10 Metastasen (rot gestrichelte Linie) im Lungengewebe in der unbehandelten Gruppe.

Wie schon in Experiment 3.5.2 waren die Metastasen in der mit Mut-30 RNA behandelten Gruppe deutlich kleiner und die Anzahl geringer als die Metastasen in der unbehandelten Gruppe (Bilder nicht gezeigt). In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung fanden sich in den histologischen Schnitten deutlich kleinere Metastasen in der behandelten Gruppe (Abb. 3.17a + 3.23c). Bei der Sichtung der Schnitte fiel auf, dass die Zellkerne des Tumors der unbehandelten Gruppe (Beispiel Abb. 3.17b; DAPI innerhalb der rot gestrichelten Linie) wesentlich kleiner sind und das Tumorgewebe dadurch deutlich kompakter erscheint als das Tumorgewebe der behandelten Gruppe (Abb. 3.17a; DAPI innerhalb der rot gestrichelten Linie). Der exemplarisch gezeigte Tumor aus der unbehandelten Gruppe zeigte zudem nekrotische Stellen im Zentrum (Abb. 3.23b; rote Pfeile). Die dargestellte Metastase aus der mit Mut-30 RNA behandelten Gruppe weist eine deutliche Infiltrierung von  $CD4^+$  Zellen in das Tumorgewebe (Abb. 3.17a) auf, während das Tumorgewebe der unbehandelten Gruppe im Vergleich nur sehr wenige  $CD4^+$  T-Zellen enthält (Abb. 3.17b). Die  $CD4^+$  T-Zellen finden sich vorwiegend in der Peripherie des unbehandelten Tumors. Eine ähnliche Beobachtung wie für die Infiltration von  $CD4^+$  T-Zellen, zeigt sich auch für  $CD8^+$  T Zellen. Die behandelte Gruppe zeigt eine starke Infiltrierung von  $CD8^+$  T-Zellen (Abb. 3.17c) im Vergleich mit der unbehandelten Gruppe (Abb. 3.17d). Auch hier sind die  $CD8^+$  T Zellen in der Peripherie lokalisiert und scheinen den Tumor nicht infiltrieren zu können. Das Experiment unterstützt die Vermutung, dass es sich beim anti-tumoralen Effekt nach Mut-30 RNA Vakzinierung, um einen durch Mut30 spezifische tumorinfiltrierende  $CD4^+$  T-Zellen vermittelten Effekt handelt. In diesem Kapitel wurde gezeigt, dass Mut-30 spezifische  $CD4^+$  T-Zellen das Tumorgewebe infiltrieren und dass es zu einer signifikanten Anreicherung von weiteren Lymphozyten kommt. Die in der Durchflusszytometrie gemachten Beobachtungen wurden durch IF-Analysen bestätigt. Das nächste Kapitel richtet seinen Fokus auf den direkten Einfluss von T-Lymphozyten und Zytokinen auf das Tumorstadium nach RNA Vakzinierung.

### 3.6.2 Analyse der regulatorischen T-Zellen

Neben  $T_H1$ - und  $T_H2$ -Zellen, gehen aus naiven  $CD4^+$  T-Zellen auch regulatorische T-Zellen (T-regs) hervor. Kurzgefasst ist die Funktion der T-regs, Immunantworten zu unterdrücken, z.B. nach Erkennung von körpereigenen Antigenen. Sakaguchi charakterisierte 1995  $CD4^+ CD25^+$  T-Zellen als T-regs. Da aber auch zytotoxische T-Zellen zu einem kleinen Teil  $CD25^+$  sind, wurde ein weitere T-reg Marker (**Forkhead box protein 3**; FoxP3) hinzugefügt. T-regs machen ca. 10% der  $CD4^+$  T-Zell Population im gesunden Körper aus. T-regs spielen im Zusammenhang mit dem Tumormikromilieu eine besondere Rolle, da sie die effektiven anti-tumoralen Immunantworten durch suppressive Zytokine oder direkten Zell-Zell Kontakt inhibieren. Klages und Kollegen zeigten bereits, dass allein die Depletion von T-regs ausreicht, um einen signifikanten therapeutischen Effekt gegen das B16 Melanom zu erzielen<sup>80</sup>. Zielsetzung des Experimentes war es, die Infiltration von regulatorischen T-Zellen analysieren. Hierfür wurden wie im vorausgegangenen Versuch (3.6.1) 6-8 Wochen alte C57BL/6 (n=3) mit B16-F10 Zellen subkutan inokuliert und einen Tag später mit der RNA Immunisierung nach dem bekannten Schema begonnen (Abb. 3.13a). Als Kontrolle dienten unbehandelte C57BL/6Mäuse (n=3).

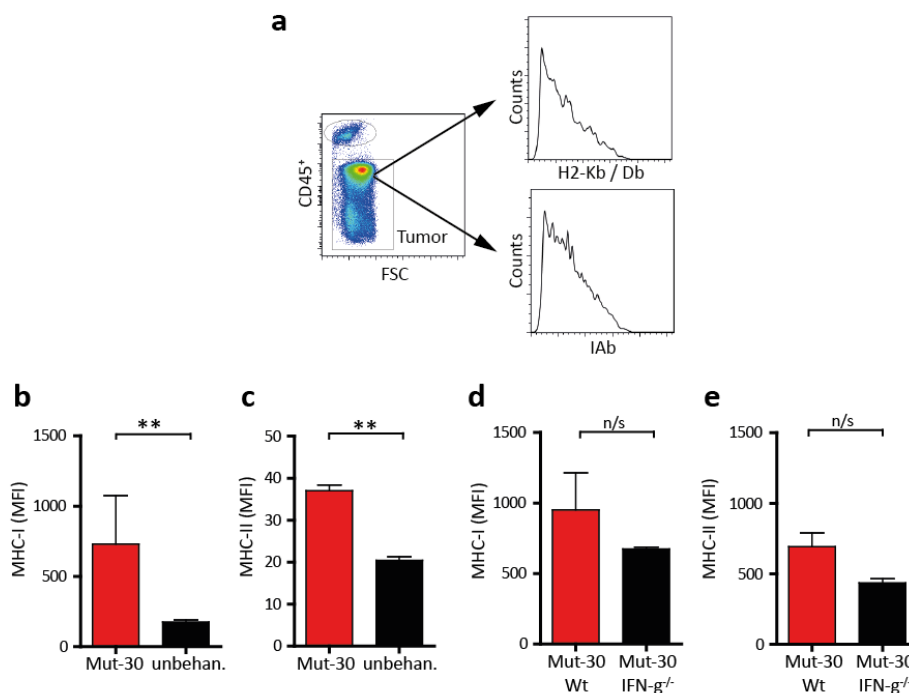


**Abb. 3.18** In Mut-30 RNA behandelten Tieren finden sich signifikant weniger  $CD4^+$  FoxP3<sup>+</sup> T-Zellen im Tumor. (a) Repräsentative Abbildung der Gating-Strategie. (b) FACS-Analyse der FoxP3<sup>+</sup> /CD4<sup>+</sup> doppelpositiven T-Zellen. Tumore (ca. 7x7mm) von mit Mut-30 RNA liposomal vakzinieren C57BL/6 Mäusen (n=3/Gruppe) wurden präpariert und zu einer Einzelzell-Suspension aufgearbeitet und gefärbt. Als Negativkontrolle wurden unbehandelte Mäuse verwendet. Für die Analyse wurden  $4 \times 10^6$  Tumorzellen/Maus gefärbt. Sternchen indizieren einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Mut-30 und der unbehandelten Gruppe (\*\*\*) *t*-test,  $p < 0,001$ ).

Die Abb. 3.18a zeigt beispielhaft die Gating Strategie des Experimentes. Zusammenfassend zeigte das Experiment, dass sich nach der Immunisierung mit Mut-30 RNA verglichen mit den Kontrollgruppen signifikant (*t*-test,  $p=0,0009$  Abb. 3.18b) weniger T-regs im Tumor befanden (Abb. 3.18b).

### 3.6.3 MHC Expression von Tumorzellen nach liposomaler Mut-30 RNA Vakzinierung

Die Expression von MHC Molekülen macht Tumorzellen für T-Zellen visibel. *In vitro* zeigen unbehandelte B16-F10 nur eine sehr geringe Expression antigenpräsentierender MHC Klasse I Moleküle sowie das Fehlen von MHC Klasse II Molekülen<sup>81</sup>. Durch die *in vitro* Behandlung mit mIFN- $\gamma$  kann die Expression von MHC Klasse I gesteigert und von MHC Klasse II neu induziert werden (Abb. 3.14). In diesem Experiment sollte die *in vivo* Expression von MHC Klasse I und II auf Tumorzellen nach der Vakzinierung mit Mut-30 RNA untersucht werden. Weiter sollte untersucht werden, in wie weit das von spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen ausgeschüttete IFN- $\gamma$  für diese Hochregulierung der MHC Moleküle mitverantwortlich ist. Wie in der vorausgegangenen TIL Analyse (3.6.1) wurden die C57BL/6 Mäuse (n=3) mit B16-F10 Zellen (1x10<sup>5</sup>) inokuliert und mit Mut-30 RNA nach dem bekannten Schema vakziniert. Bei der Größe von ca. 7x7mm wurden die Tumore präpariert und zu einer Einzelzellsuspension aufgearbeitet, danach via Durchflusszytometrie analysiert. Um den Einfluss von IFN- $\gamma$  auf die MHC Expression der Tumorzellen zu untersuchen wurden in einem unabhängigen Experiment ebenso mit 10 Wochen alte C57BL/6 oder IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> K.O. Mäuse verfahren.



**Abb. 3.19 Tumore zeigen erhöhte Expression von MHC Molekülen nach Mut-30 Vakzinierung.** (a) FACS-Analyse der MHC Moleküle von *ex vivo* B16-F10 Zellen nach Mut-30 RNA Vakzinierung. Repräsentative Abbildung der Gating-Strategie. Tumore (ca. 7x7mm) von mit Mut-30 RNA + Liposomen (DOTMA/DOPE) vakzinierten C57BL/6 oder IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> K.O. Mäuse (n=3/Gruppe) wurden präpariert und zu einer Einzelzell-Suspension aufgearbeitet und gefärbt. Als Negativkontrolle wurden unbehandelte Mäuse verwendet. (b) MFI der MHC Klasse I Moleküle. Sternchen indizieren einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Mut-30 und der unbehandelten Gruppe (\*\*t-test, p < 0,01). (c) MFI der MHC Klasse II Moleküle. Sternchen indizieren einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Mut-30 und der unbehandelten Gruppe (\*\*t-test, p < 0,01). (d) FACS-Analyse der MHC Moleküle von *ex vivo* B16-F10 Zellen (Wt oder IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> K.O. Mäuse) nach Mut-30 RNA Vakzinierung. Repräsentative Abbildung der Gating-Strategie. MFI der MHC Klasse I Moleküle. (f) MFI der MHC Klasse I Moleküle. Säulen repräsentieren den Mittelwert ( $\pm$ SEM) von drei Mäusen pro Gruppe.

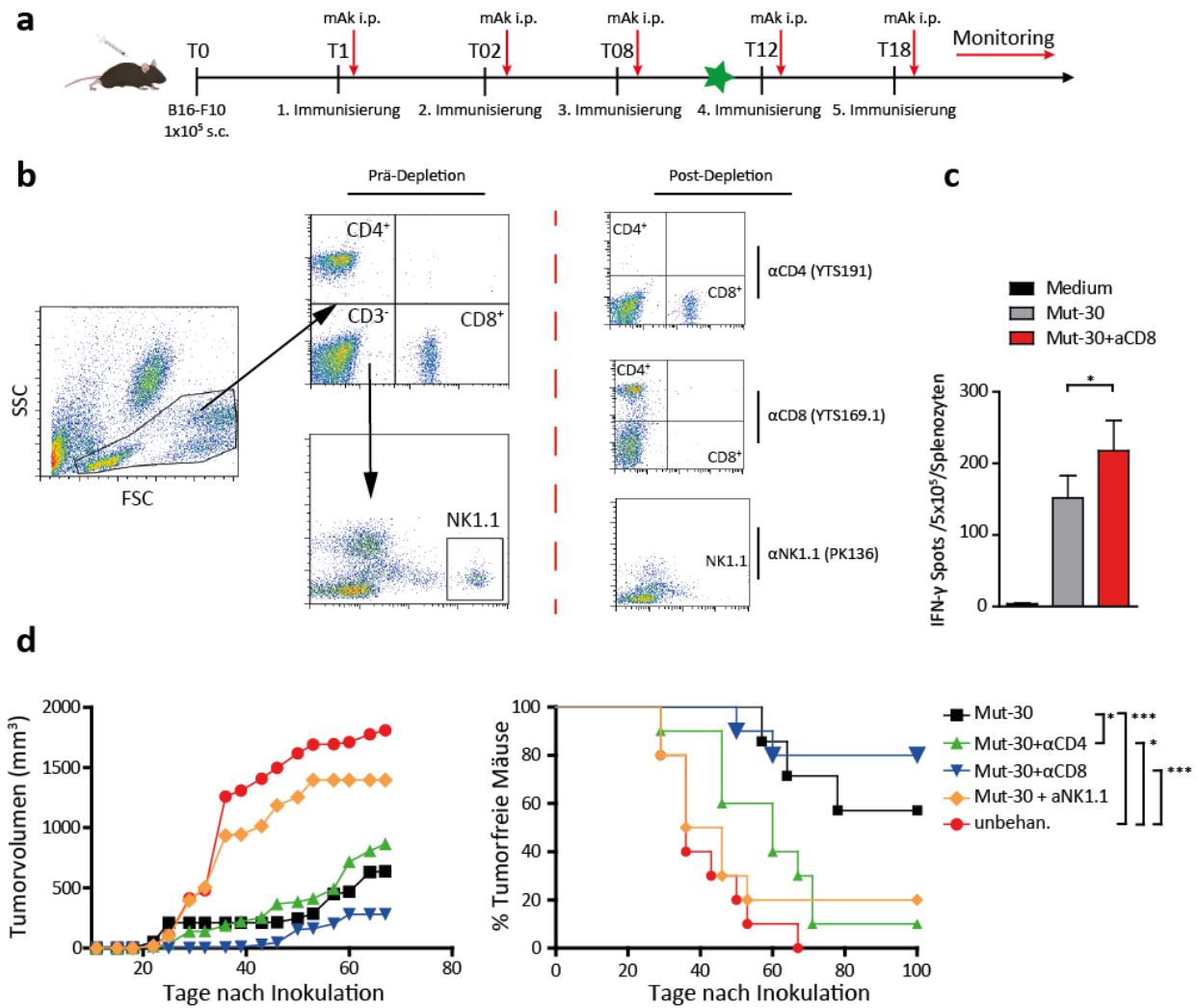
Die Abbildung Abb. 3.19a zeigt beispielhaft die Gating Strategie des Experimentes. Durch Gating der Lymphozyten mit dem CD45 Marker war eine gute Separierung der Tumorzellen möglich. Zusammengefasst zeigt die Abb. 3.19b+c eine signifikante Erhöhung der Expression von MHC Klasse-I ( $t$ -test,  $p=0,00043$ ; Abb. 3.19b) und MHC Klasse-II Molekülen ( $t$ -test,  $p= 0,0030$ ; Abb. 3.19c) auf der Oberfläche der Tumorzellen nach RNA Vakzinierung im Vergleich zur unbehandelten Gruppe. Die vorliegenden Ergebnisse stimmen mit den *in vitro* gezeigten Daten (3.5.2) überein und liefern eine mögliche Erklärung für die erhöhte Expression der MHC Moleküle: Mut-30 spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen infiltrieren das Tumorgewebe (Abb.3.20) und sezernieren IFN- $\gamma$  sowie TNF- $\alpha$ , was wiederum zu einer Wachstumshemmung sowie Hochregulierung der MHC Moleküle zur Folge hat. Dieser Effekt wurde bereits von Böhm und Kollegen beobachtet und beschrieben<sup>74</sup>. Die These, das IFN- $\gamma$  für die Hochregulierung der MHC Moleküle mitverantwortlich ist, wird weiter durch die TIL Analyse der aus IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> K.O. Mäuse stammenden Tumore gestützt. Das Ergebnis (Abb.3.22d+e) zeigt, dass die Hochregulierung der MHC Moleküle in IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> K.O. Mäuse weitgehend verloren geht. Die Hochregulierung der MHC Moleküle kann dazu führen, dass Tumorzellen durch weitere spezifische T-Zellen des adaptiven Immunsystems erkannt und attackiert werden können.

### 3.7 Analyse der anti-tumoralen Effektorpopulation

In den vorausgegangenen Kapiteln wurde der Effekt sowie die Infiltration von Mut-30 spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen in das Tumorgewebe gezeigt. Weiter wurde die Sekretion von IFN- $\gamma$  TNF- $\alpha$  und IL-2 durch spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Restimulation mit Mut-30 Peptid nachgewiesen. Dass die Zytokine IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  einen anti-tumoralen Effekt auf das B16 Melanom ausüben, ist bekannt und publiziert<sup>82</sup>. Uns hat die Frage interessiert, ob Mut-30 spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen alleine für den anti-tumoralen Effekt verantwortlich sind oder ob weitere Lymphozyten wie beispielweise NK-Zellen oder CD8<sup>+</sup> T-Zellen, Einfluss darauf nehmen<sup>83</sup>.

#### 3.7.1 Frühe Depletion von Lymphozyten

Um die Relevanz der verschiedenen Lymphozyten (CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> und NK Zellen) für den anti-tumoralen Effekt zu untersuchen sollten im therapeutischen Setting die verschiedenen Subpopulationen mit Hilfe von murinen Antikörpern (2.1.7.2) depletiert werden. Im Verlauf sollte der Effekt auf das Tumorstadium sowie das Überleben der Mäuse analysiert werden. Für das Experiment wurde den C57Bl/6 Mäusen ( $n=10$ ) B16-F10 Zellen ( $1 \times 10^5$  /Maus) subkutan injiziert und einen Tag später mit der i.v. Verabreichung der Mut-30 RNA ( $40 \mu\text{g}/\text{Maus}$ ) begonnen (Abb. 3.20a). Parallel zur RNA Gabe bekamen die Mäuse die verschiedenen mAK ( $200 \mu\text{g}/\text{Maus}$ ) intraperitoneal injiziert (Abb. 3.20a, roter Pfeil). Am Tag 9 des Experimentes (Abb. 3.20a, grüner Stern) wurde den Mäusen Blut entnommen um via FACS-Analyse die Qualität der Depletion zu kontrollieren. (Abb. 3.20b). Wie in Abb. 3.20b links beispielhaft dargestellt, wurde mithilfe der mAK ca. 95% der jeweiligen T-Lymphozytenpopulation depletiert.



**Abb. 3.20 NK-Zellen spielen in der frühen Phase eine entscheidende Rolle.** (a) Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus. C57BL/6Mäuse ( $n=10$  /Gruppe) wurden mit B16-F10 ( $1 \times 10^5$ /s.k.) inokuliert und im wöchentlichen Rhythmus mit Mut-30 RNA ( $40 \mu\text{g}/\text{Maus}$ ) + Liposomen (DOTMA/DOPE) immunisiert. Parallel zur RNA Vakzinierung wurde den Mäusen die Depletionsantikörper ( $200 \mu\text{g}/\text{Maus}$ ) i.p. verabreicht. Eine Qualitätskontrolle der Depletion fand am Tag 9 via FACS-Analyse statt (grüner Stern). (b) Beispielhafte Darstellung der Gating-Strategie und Qualitätskontrolle. (c) IFN- $\gamma$  ELISPOT nach Immunisierung mit Mut-30 RNA  $\pm$   $\alpha$ CD8 Antikörper. Säulen repräsentieren den Mittelwert ( $\pm$ SEM) von drei Mäusen pro Gruppe. Sternchen indizieren einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Mut-30 und der mit Mut-30+ $\alpha$ CD8 behandelten Gruppe (\*t-test,  $p < 0,05$ ). (d) Wachstumskinetik + Kaplan-Meier Kurve nach Immunisierung mit Mut-30 RNA + verschiedenen Depletionsantikörpern. Als Negativkontrolle wurden unbehandelte Tiere verwendet. Sternchen indizieren einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den behandelten und unbehandelten Gruppen (Log-Rank, \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ )

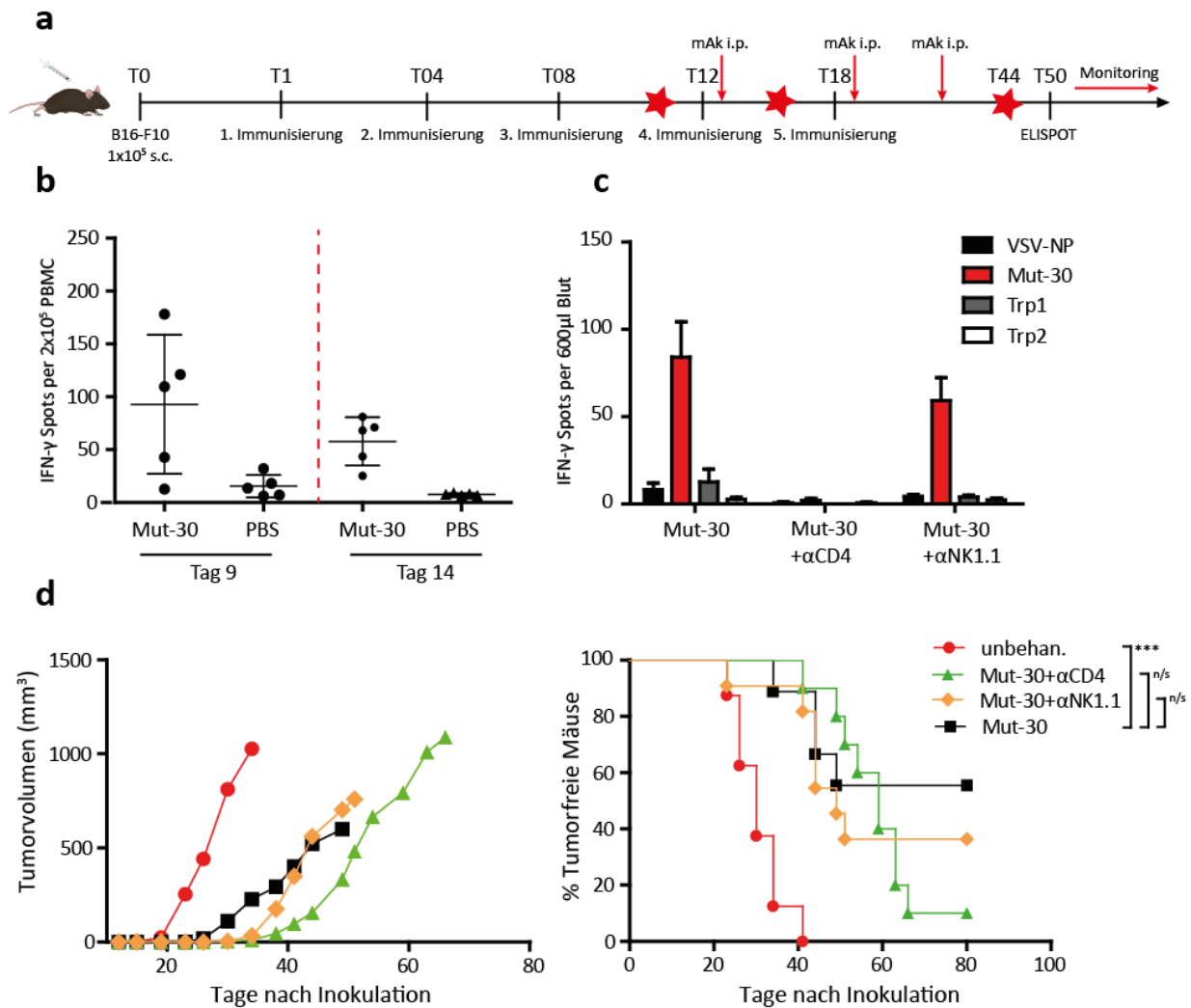
Die FACS-QC (Abb. 3.20b) zeigte, dass nach der Depletion von CD8<sup>+</sup> Zellen die Frequenz der Mut-30 spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen deutlich erhöht war. Nach Depletion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen zeigte sich keine Proliferation der CD8<sup>+</sup> Population. Durch den frühen Therapiebeginn wurde ein starker antitumoraler Effekt durch Mut-30 RNA Vakzinierung erreicht. So zeigt sich nach Vakzinierung mit Mut-30 RNA ohne Depletionsantikörper (Abb. 3.20d/schwarze Linie) ein stark verlangsamtes Tumorstadium sowie ein Überleben von 50 % der therapierten Mäuse (Log-rank Test,  $p=0,0009$ ; Abb. 3.20d) im Vergleich zur unbehandelten Gruppe (Abb. 3.20c/rote Linie). Obwohl erwartungsgemäß die Depletion der CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu einer deutlichen verminderten Überlebensrate führte, war überraschenderweise das Tumorstadium nur tendenziell beschleunigt (Abb. 3.20d/grüne Linie) Allerdings zeigt der direkte

Vergleich zwischen der Gruppe die mit  $\alpha$ -CD4 Antikörper+Mut-30 RNA (Abb. 3.20d/grüne Linie) und der Gruppe die nur Mut-30 RNA (Abb. 3.20d/schwarze Linie) behandelt wurden ein signifikant beschleunigtes Absterben der Mäuse (Log-Rank Test,  $p=0,0303$ ; Abb. 3.20d). Durch die Depletion von  $CD8^+$  T-Zellen (Abb. 3.20c/blau Linie) wurde die Wachstumsinhibition nach Mut-30 Vakzinierung überraschenderweise sogar verstärkt werden. So waren nach 100 Tagen noch 8 Mäuse tumorfrei (Log-rank Test,  $p=0,0001$ ; Abb. 3.20c). Wie bereits beschrieben zeigte die FACS-Analyse, dass nach der Depletion von  $CD8^+$  T Zellen ca. doppelt so viele  $CD4^+$  T Zellen in den Mäusen zirkulieren (Daten nicht gezeigt). Daher besteht die Möglichkeit, dass Mut-30 spezifische  $CD4^+$  T-Zellen besser proliferieren, mehr spezifische  $CD4^+$  T-Zellen den Tumor infiltriert haben und der therapeutische Effekt dadurch verstärkt wurde. Um zu überprüfen, ob es nach der Depletion der  $CD8$  T-Zell Population auch zu einer Proliferation von Mut-30 spezifischen  $CD4^+$  T-Zellen kommt, wurden sechs C57BL/6Mäuse mit Mut-30 RNA nach dem bekannten Schema immunisiert, wobei drei Mäusen zusätzlich der  $\alpha$ CD8 Ab injiziert wurde. Am Tag 23 fand der  $IFN-\gamma$  Read-Out statt. Auf Abbildung 3.23c ist das Ergebnis des  $IFN-\gamma$  ELISPOTS dargestellt. Wie zu erwarten war, sind nach Depletion von  $CD8^+$  T-Zellen auch signifikant mehr spezifische  $CD4^+$  T-Zellen vorhanden. Diese Analyse stützt die Vermutung, dass es auch beim therapeutischen Depletionsexperiment zu einer Verstärkung des Mut-30 Effekts gekommen ist.

Eine weitere Überraschung des Experimentes war, dass der anti-tumorale Effekt fast völlig verloren ging, nachdem  $NK1.1^+$  Lymphozyten depletiert wurden (Abb. 3.20c/orange Linie). Die ersten Tumore wurden bereits am Tag 14 ertastet, also sogar früher als in der unbehandelten Gruppe.

### 3.7.2 Verzögerte Depletion von Lymphozyten

Im vorausgegangenen Experiment wurde gezeigt, dass NK-Zellen in der frühen Wachstumsphase eine wichtige Rolle in der Kontrolle des Tumors einnehmen und neben den  $CD4^+$  T-Zellen relevante Effektoren der antitumoralen Antwort sind. Um zu untersuchen welche Effektorpopulation im weiteren Verlauf der Therapie für die anti-tumorale Wirkung verantwortlich ist, sollte diese Frage durch eine spätere Depletion der  $NK1.1^+$  sowie  $CD4^+$  T-Zellen beantwortet werden. In einem Vorexperiment sollte geklärt werden, wie lange Mut-30 spezifische T-Zellen für ihre Expansion nach RNA Vakzinierung brauchen. Hierfür wurde C57BL/6 ( $n=5$ ) mit Mut-30 RNA nach dem bereits etablierten Schema immunisiert. An den Tagen 9 und 14 wurde den Tieren Blut entnommen (Abb. 3.21a, roter Stern). Aus dem Blut wurden die T-Lymphozyten via Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation isoliert und als Effektoren im  $IFN-\gamma$  ELISPOT eingesetzt.



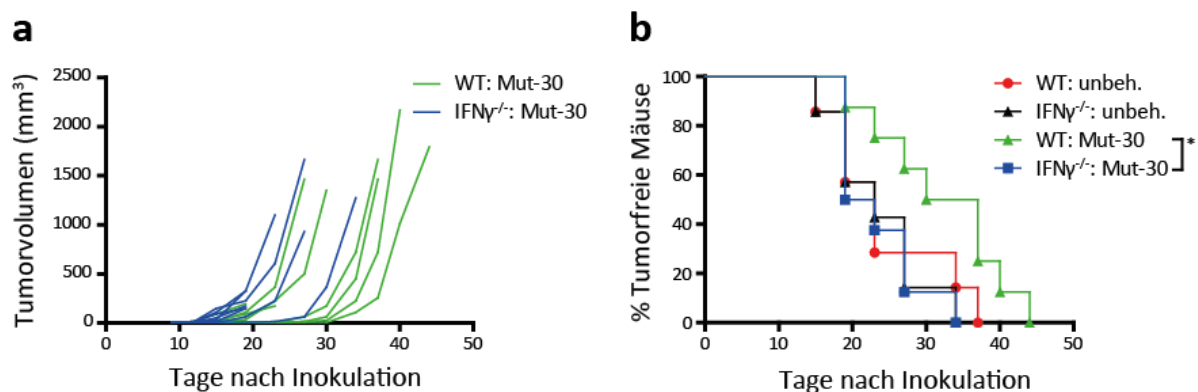
**Abb. 3.21** In der späten Phase der Therapie verschwindet der NK-Zell Effekt. (a) Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus. C57BL/6 Mäuse (n=10/Gruppe) wurden mit B16-F10 (1x10<sup>5</sup>/s.k.) inokuliert und im wöchentlichen Rhythmus mit Mut-30 RNA (40μg/Maus) + Liposomen (DOTMA/DOPE) immunisiert. Parallel zur RNA Vakzinierung wurde den Mäusen ab Tag 11 (roter Pfeil) die Depletionsantikörper (200μg/Maus) i.p. verabreicht. An den Tagen 9, 14 und 43 wurden den Mäusen Blut entnommen und die Lymphozyten isoliert. (b) IFN-γ ELISPOT aus peripheren Lymphozyten (Tag 9 und 14). Jeder Punkt repräsentiert eine Maus (Triplikate). (c) IFN-γ ELISPOT aus peripheren Lymphozyten (Tag 43). Lymphozyten wurden jeweils mit Mut-30, Trp1 und Trp2<sub>(180-188)</sub> Peptid restimuliert (6μg/μl). Als Kontrolle wurde VSV-NP verwendet. Säulen repräsentieren den Mittelwert (±SEM) von drei Mäusen pro Gruppe. (d) Wachstumskinetik + Kaplan-Meier Kurve nach Immunisierung mit Mut-30 RNA + verschiedenen Depletionsantikörpern zu einem späteren Zeitpunkt (Tag11). Als Negativkontrolle wurden unbehandelte Tiere verwendet. Sternchen indizieren einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der mit Mut-30 RNA behandelten und der unbehandelte Gruppe (\*\*\*) (Log-Rank, p < 0,001).

Wie in der ELISPOT Analyse zu erkennen ist, wurden schon nach 9 Tagen Mut-30 spezifische T-Zellen nachgewiesen (Abb. 3.21b), wobei sich die Reaktivität der T-Zellen am Tag 14 eingependelt hat (Abb. 3.21b). Für das therapeutische Experiment wurden die C57BL/6 (n=10) wie in dem vorausgegangenen Experiment mit B16-F10 Zellen (1x10<sup>5</sup>/Maus) inokuliert und im bekannten Schema mit Mut-30 RNA + Liposomen vakziniert (Abb. 3.21a). Um den späteren Einfluss der NK- sowie CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu untersuchen, wurden die Depletionsantikörper (200μg/Maus) ab Tag 11 im wöchentlichen Rhythmus verabreicht (Abb. 3.21a/roter Pfeil). Die Qualitätskontrolle der mAK wurde via FACS-Analyse am Tag 21 durchgeführt. Die Mäuse, die mit Mut-30 RNA behandelt wurden (Abb. 3.21d/schwarze Linie), zeigten die bereits beobachtete deutliche Verzögerung des Tumorwachstums und signifikant erhöhte

Überlebensrate von 50% (Log-rank Test,  $p=0,0003$  Abb. 3.21d). Ebenfalls bestätigt wurde, dass sich nach der Depletion von  $CD4^+$  T-Zellen (Abb. 3.21d/grüne Linie) ein verlangsamtes Wachstum und eine tendenzielle Verschlechterung der Überlebensrate einstellt. Nach der späten Depletion der NK1.1 spezifischen Zellen, war die Regression der Wachstumskurve (Abb. 3.21d/orange Linie) völlig verschwunden und direkt mit der nicht depletierten Gruppe (Abb. 3.21d/schwarze Linie) vergleichbar. Es ist also davon auszugehen, dass NK Zellen zu diesem Zeitpunkt (Tag 11) keinen großen Einfluss mehr auf das Tumorstadium haben. Mit diesem Experiment, wurde die Vermutung bestätigt, dass NK-Zellen in der frühen initialen Phase der Therapie eine Rolle spielen, der eigentliche anti-tumorale Effekt jedoch später durch Mut-30 spezifische  $CD4^+$  T Zellen induziert wird. Um die systemische *in vivo* Reaktivität der spezifischen T-Zelle zu analysieren, wurde den Mäusen (3 pro Gruppe) am Tag 50 der Therapie Blut entnommen und die isolierten Lymphozyten als Effektoren eingesetzt. Da die TIL Analyse zeigt (3.6.1), dass das Tumorgewebe nicht nur von  $CD4^+$ , sondern auch von  $CD8^+$  T Zellen infiltriert wird, wurde für die Restimulierung der Effektorzellen die Tumorantigene Trp1 (MHC-I) und Trp2 (MHC-I) mit in die Analyse aufgenommen. Die Idee dahinter war, dass die  $CD8$  T-Zellinfiltration auf ein mögliches „epitop spreading“ hinweisen könnte. Beim „epitop spreading“ richtet sich die Immunantwort nicht mehr nur gegen das spezifische Epitop, das ursprünglich die Immunantwort ausgelöst hat, sondern auch gegen andere Epitope<sup>84</sup>. Epitop Spreading wird dadurch hervorgerufen, dass während der Zerstörung des Tumorgewebes neue kryptische Epitope den infiltrierenden Zellen des Immunsystems präsentiert werden. Da die Tumorantigene Trp1 und Trp2 sehr stark von B16-F10 Zellen exprimiert werden, war die Wahrscheinlichkeit am höchsten, reaktive T-Zellen gegen diese Epitope zu finden. Auf Abb. 3.21c ist die Analyse des  $IFN-\gamma$  ELISPOTS abgebildet. Zusammengefasst, zeigt die Analyse: (i) dass 26 Tage nach der letzten Immunisierung weiterhin Mut-30 spezifische T-Zellen in der Peripherie zu finden sind (Abb. 3.21c/links), (ii) diese T-Zellen  $CD4$  positiv sind, da nach der Depletion von  $CD4$  Zellen keine Reaktivität mehr zu finden ist (Abb. 3.21c/Mitte). (iii) NK-Zellen keinen Einfluss auf die Induktion der spezifischen  $CD4^+$  T-Zellen haben (Abb. 3.21c/rechts). (iv) Es wurde keine Reaktivität gegen Trp1 oder Trp2 gezeigt, was das Epitop Spreading aber nicht gänzlich ausschließt, da die Frequenz von spezifischen T Zellen im Blut zu gering sein kann. Dieses und das vorausgegangene Experiment (3.7.1) geben einen ersten Einblick in den Mechanismus der für den anti-tumoralen Effekt nach der Immunisierung mit Mut-30 RNA verantwortlich ist. So machen NK-Zellen in der Anfangsphase der Therapie auch durch RNA vermittelte Aktivierung den initialen Schritt, indem sie die inokulierten B16-F10 Zellen angreifen und abtöten. Teile der bereits abgetöteten Tumorzellen werden von DC oder Makrophagen aufgenommen und die entsprechenden Epitope präsentiert, was wiederum dafür sorgt, das Mut-30 spezifische  $CD4^+$  T-Zellen das Tumorgewebe infiltrieren und anfangen,  $IFN-\gamma$ ,  $IL-2$  und  $TNF-\alpha$  zu sezernieren. Im Western Blot wurde gezeigt, dass der Tumor das natürliche Kif18b Protein während der Therapie nicht herunterreguliert (Abb. 3.9b), was die therapeutische Relevanz von Impfstoffinduzierten  $CD4^+$  T-Zellen über den gesamten Zeitraum der Experimente gewährleistet. In einem weiteren Depletionsexperiment soll der Einfluss der von Mut-30 spezifischen  $CD4^+$  T-Zellen sezernierten Zytokine näher untersucht werden.

### 3.7.3 Therapeutisches Tumorexperiment in $\text{IFN-}\gamma^{-/-}$ K.O. Mäusen

Tumorimmuntherapien verdanken ihren Erfolg nicht nur zytotoxischen  $\text{CD8}^+$  T-Zellen, die die Tumorzellen direkt erkennen und zerstören, sondern auch  $\text{T}_\text{H}1\text{-CD4}^+$  T-Zellen, die das Tumorgewebe infiltrieren und durch die Sekretion von Zytokinen für eine Verlangsamung des Tumorwachstums sorgen<sup>85</sup>. Die von  $\text{T}_\text{H}1\text{-CD4}^+$  T-Zellen sekretierten Interferone gehören neben Interleukinen und Chemokinen zu den Hauptakteuren dieser Immunabwehr. Da auch Mut-30 spezifische  $\text{CD4}^+$  T-Zellen dieses Zytokin ausschütten, war es der Fokus dieses Experimentes, durch die Verwendung von  $\text{IFN-}\gamma$  defizienten Mäusen (B6.129S7- $\text{Ifng}^{\text{tm}1\text{Ts}}$ ; <sup>86</sup>) den Einfluss von  $\text{IFN-}\gamma$  im therapeutischen Tumorexperiment zu untersuchen. Für den Versuch wurden jeweils 10 Wochen alte C57BL/6 oder  $\text{IFN-}\gamma^{-/-}$  K.O. Mäuse mit B16-F10 ( $1 \times 10^5$ ) subkutan inokuliert und zwei Tage später mit Mut-30 RNA nach dem bekannten Rhythmus vakziniert. Als Kontrolle dienten jeweils unbehandelte Tiere.



**Abb. 3.22** In  $\text{IFN-}\gamma^{-/-}$  K.O. Mäusen verschwindet der Mut-30 Effekt. (a)  $\text{IFN-}\gamma$  K.O. sowie C57BL/6 Mäuse ( $n=7-8$  /Gruppe) wurden mit B16-F10 ( $1 \times 10^5$  /s.k.) inokuliert und im wöchentlichen Rhythmus mit Mut-30 RNA ( $40 \mu\text{g}/\text{Maus}$ ) + Liposomen (DOTMA/DOPE) immunisiert. Als Negativkontrolle wurden jeweils unbehandelte Tiere verwendet. Dargestellte Wachstumskinetik ist die der mit Mut-30 RNA behandelten Tiere. (b) Kaplan-Meier Überlebenskurve. Sternchen indizieren einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der mit Mut-30 RNA behandelten WT und  $\text{IFN-}\gamma$  K.O. Gruppe (\*Log-Rank Test,  $p < 0,05$ ).

Die erste Beobachtung ist auf Abb. 3.22a dargestellt. So zeigte sich im Verlauf des Experimentes, dass die Tumore in den  $\text{IFN-}\gamma^{-/-}$  K.O. Mäuse deutlich früher anfangen zu wachsen (Abb. 3.22a/blau Linie). Des Weiteren verstarben sechs von zehn Mäusen schon bei kleinen Tumolvolumen ( $< 500 \text{mm}^3$ ). Bei den mit Mut-30 RNA behandelten Wildtypmäußen trat das Tumorwachstum ca. 10 Tage später ein und auch der Kaplan-Meier Plot zeigt sich eine signifikante Verzögerung der Überlebensrate (Log-rank Test,  $p=0,0330$  Abb. 3.22b). Das Überleben der mit Mut-30 RNA behandelten  $\text{IFN-}\gamma^{-/-}$  K.O. Mäuse ist identisch mit dem der unbehandelten Gruppen. Das Experiment unterstützt die Hypothese, dass  $\text{IFN-}\gamma$  ein essentielles Zytokin bei der Verzögerung des Tumorwachstums nach Mut-30 RNA Vakzinierung ist.

### 3.8 Etablierung eines RNA Polytop Formates

Mit der erweiterten Kenntnis der essentiellen Rolle des Immunsystems in der Kontrolle von maligner Entartung, molekularen Interaktionen zwischen Tumor- und Immunzellen sowie Kenntnissen der Antigenprozessierung und -präsentation stellen Impfstoffe in der Immuntherapie ein Werkzeug mit großem Potential dar. Eine Vakzine sollte dabei idealerweise folgende Kriterien erfüllen: (i) Der Impfstoff sollte in einem einfachen und wenig zeitaufwendigen Herstellungsprozess zu moderaten Kosten

generiert werden. (ii) Der Impfstoff sollte möglichst einfach zu lagern bzw. zu transportieren sein. (iii) Der Impfstoff sollte eine sichere und nebenwirkungsarme Anwendung gewährleisten. (iv) Zu guter Letzt sollte der Impfstoff eine lange anhaltende immunologische Reaktion (Memory-effekt) gegen die Tumorzellen hervorrufen und individuell tumorspezifisch einsetzbar sein.

Die Information über das spezifische Tumorantigen wird DNA- oder RNA-Vakzinen über einen genetischen Vektor vermittelt. Auf Grundlage dieser Information wird in transfizierten Zellen das Antigen translatiert, auf dessen Basis die spezifische Immunantwort induziert wird<sup>87</sup>. Ein wesentlicher Vorteil von genetischen Impfstoffen, wie DNA oder RNA besteht darin, dass verschiedene tumorspezifische Antigene im Patienten HLA-unabhängig adressiert werden können<sup>88</sup>.

Die zentrale Idee des IVAC Projektes ist es, spezifische Punktmutationen via Next Generation Sequencing zu finden und mittels PCR Technologie zu validieren. Basierend auf diesem *in silico* Ansatz wurden spezifische Punktmutationen herausgefiltert und auf Immunogenität (3.2) bzw. anti-tumoralen Potenz getestet (3.3). Es wurde gezeigt, dass es bereits mit einem mutierten Epitop möglich ist, einen signifikanten anti-tumoralen Effekt zu erzeugen (3.3.3). Das IVAC Konzept sieht vor, nicht nur mit einem mutations-spezifischen Epitop, sondern mit 5 oder mehr Mutationen, die auf einer RNA kodiert sind (genannt Pentatop), Patienten zu vakzinieren. Ein essenzieller Vorteil des Pentatop Ansatzes ist es, dass, wenn die RNA von APCs aufgenommen wird, nicht nur ein, sondern fünf Epitope von einer APC präsentiert werden, daher wird durch wenig RNA ein größerer Effekt geschaffen.

Die Strukturelemente der IVAC Pentatop RNA sind grundsätzlich in zwei Gruppen aufgeteilt (Abb. 3.23b):

1. Konstante Elemente, die alle Teile der untranslatierten Region beinhalten (z.B hAg-Kozak, UTR und der Poly A Schwanz) sowie eine Sekretions (SK)- und Transmembran-Domäne (TM).
2. Variable Elemente, die die spezifische Pentatop-Kassette beinhaltet. Die Kassette besteht jeweils aus fünf Epitopen die für 27 Aminosäuren codieren, mit der tumor-spezifischen Punktmutation jeweils in der Mitte. Die verschiedenen Epitope werden durch kurze Glycin (G) und Serin (S) reiche Linker separiert, wie sie auch in anderen Fusionsproteinen verwendet werden.

Abschließend wurde im Rahmen dieser Dissertation das Format der RNA Pentatope charakterisiert.

### 3.8.1 Testung von drei verschiedenen Model-Pentatop Varianten

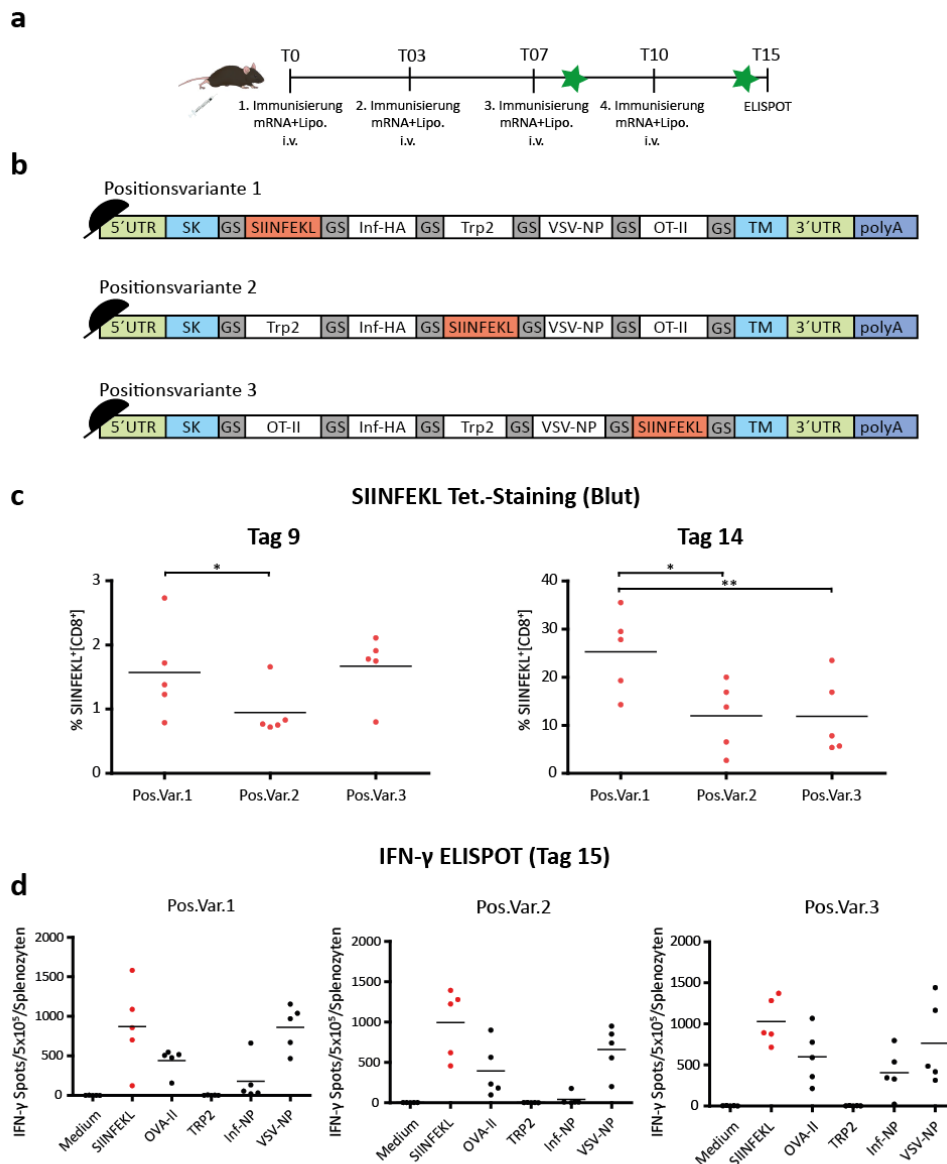
Die Verwendung von RNA zu Zwecken der Immunisierung setzt voraus, dass die entsprechenden Moleküle *in vivo* von Zielzellen (DCs) aufgenommen anschließend in Proteine translatiert und prozessiert werden. Da es nur Erfahrung mit der Herstellung und Verabreichung von Monotop-RNA gab, also RNA die für ein Antigen kodiert, war eine der ersten Fragestellungen, inwieweit die Position des einzelnen Epitopes innerhalb eines Pentatopes Einfluss auf die Immunogenität des Antigens hat. Zum Beantworten dieser Frage wurden drei verschiedene Pentatop Varianten (Abb. 3.23b), die jeweils 5 Modelantigene enthalten, designt und in den pST1 Vektor<sup>49</sup> kloniert. Innerhalb der drei Positionsvarianten wechselt das aus dem Ovalbumin stammende SIINFEKL-Antigen vom 5´Ende (Pos.Var.1/Abb. 3.23b) über die Position in der Mitte (Pos.Var.2/Abb.3.28b) an das 3´Ende des Pentatopes (Pos.Var.3/Abb. 3.23b). Das OVA-I Antigen (SIINFEKL<sub>(257-264)</sub>) wurde als stark immunogenes Epitop ausgewählt, um die Immunogenität der alternierenden Positionen systemisch zu untersuchen und direkt zu vergleichen. Bei den vier restlichen

Modellepitopen handelt es sich um: Inf-NP, VSV-NP, Trp2 und OVA-II (Tab. 3.1). Die Modelantigene sind analog zu den späteren IVAC-Antigene 27 Aminosäuren lang, mit dem jeweiligen Minimal-Epitop (Tab. 3.1/rot markiert) in der Mitte.

Tab. 3.1 Sequenz der verwendeten Model-Antigene für Pentatop-Design

Antigen	Sequenz	Swissprot ID
<b>OVA</b> <sub>251-270</sub>	SMLVLLPDEVSGLEQLE <b>SIINFEK</b> LTEWTSSNVMEERKIKVYLP	P01012
<b>Inf-NP</b> <sub>366-374</sub>	KVSPRGKLSTRGVQI <b>ASNENMDAM</b> ESSTLELRSRYWAIRT	Q6XTA
<b>Trp2</b> <sub>180-88</sub>	LLGPNGTQPQFANCS <b>SVYDFFVWL</b> HYYSVRDILLGPGRPYR	Q09GT4
<b>VSV-NP</b> <sub>52-59</sub>	KEIPLYINTTKSLSDL <b>RGVYVYQGL</b> KSGNVSIIHVNSYLYG	P03521
<b>OVA-II</b> <sub>329-337</sub>	DVFSSSANLSGISSAESLKISQAVH <b>AAHAEINEA</b> GREVVGSAEAGVDAAS	P01012

Für das Experiment wurden C57BL/6 (n=5) Mäuse vier Mal mit für die jeweilige Positionsvariante kodierender RNA (40µg/Maus) + Liposomen immunisiert (Abb. 3.1a). An den Tagen 7 und 14 wurde eine FACS-Analyse des Blutes durchgeführt (Abb. 3.23a/Stern). Am Tag 15 wurden die Milzen entnommen und ein IFN-γ ELISPOT mit den Peptiden, die für die jeweiligen Model-Antigene kodieren, als Restimulation (2µg/µl) durchgeführt ( )



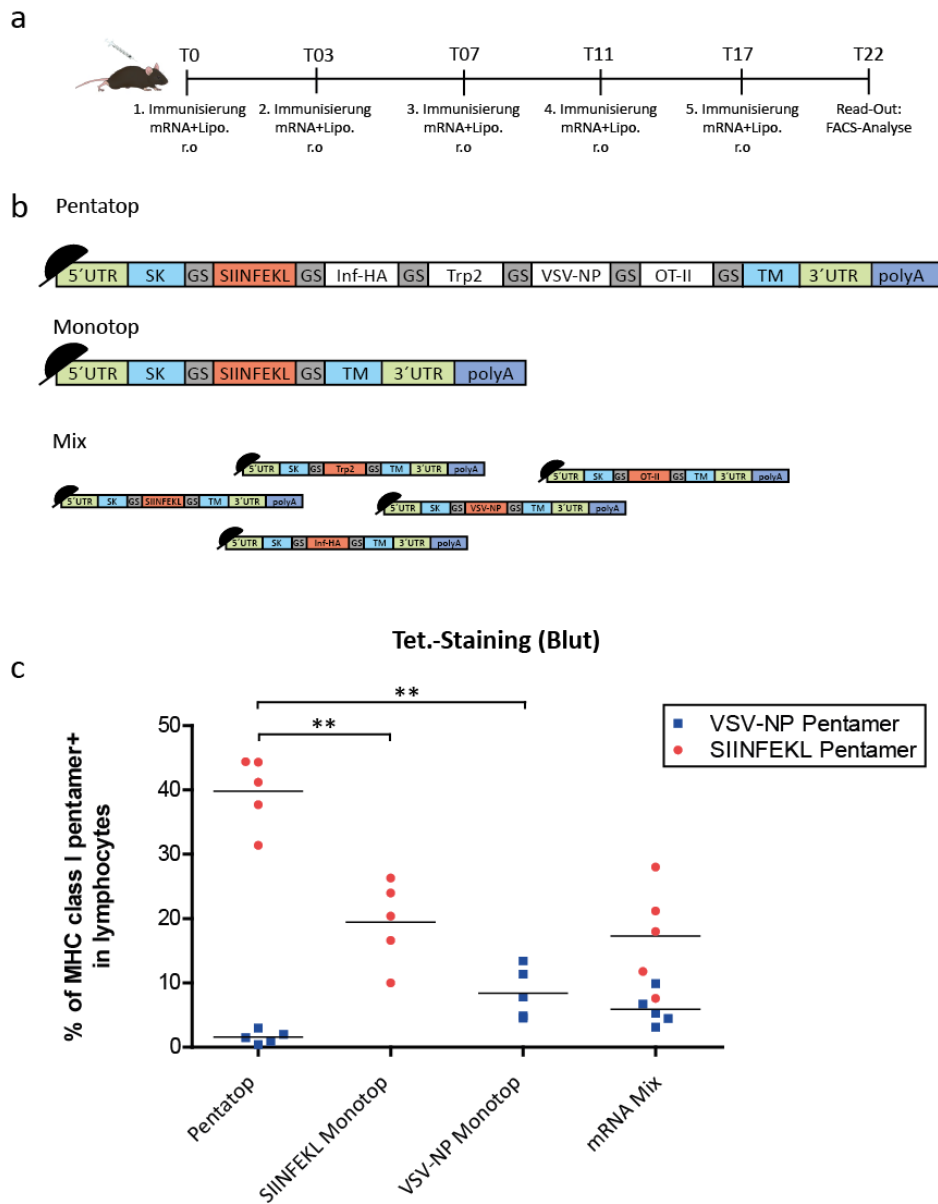
**Abb. 3.23 Die Position innerhalb des Pentatopes hat direkten Einfluss auf die Immunogenität des Epitopes.** (a) Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus. C57BL/6 Mäuse ( $n=5$  /Gruppe) wurden im wöchentlichen Rhythmus mit Pentatop RNA ( $40\mu\text{g}/\text{Maus}$ ) + Liposomen (DOTMA/DOPE) immunisiert. An den Tagen 7 und 14 wurde die spezifische SIINFEKL CD8 T-Zell frequenz via FACS-Analyse gemessen. Finaler IFN- $\gamma$  ELISPOT am Tag 15. (b) Schematischer Überblick über die verschiedenen Model-Positionsvarianten. UTR – Untranslatierte Region; SK – Sekretorische Domäne; GS – Glycin-Serin Linker Sequenz; TM – Transmembrandomäne eines HLA-Moleküls; polyA – Poly Adenyliert. (c) FACS-Analyse (SIINFEKL-Tetramer) von spezifischen CD8 $^+$  T-Zellen. Punkte repräsentieren eine Maus. Sternchen indizieren einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Pentatopvarianten ( $t$ -test, \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ). (d) IFN- $\gamma$  ELISPOT Analyse. Milzzellen ( $5 \times 10^5$ /well) von mit den verschiedenen Positionsvarianten immunisierten Tieren wurden mit den korrelierenden Peptiden ( $6\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) inkubiert. Jeder Punkt repräsentiert eine Maus ( $\emptyset$  Triplikaten).

Die FACS-Analyse des Blutes (Abb. 3.23c) zeigt, dass es nach drei Immunisierungen zu einer Induktion von OVA-I spezifischen CD8 $^+$  T-Zellen kam. Die frühe Analyse zeigt bereits einen signifikanten Unterschied zwischen der Positionsvariante eins und zwei ( $t$ -test,  $p=0,0338$ , Abb. 3.23c/Tag 9). In allen drei Gruppen wurde die spezifische T-Zell Frequenz nach vier Immunisierungen deutlich verstärkt werden (Abb. 3.23c/rechts), wobei sich auch der signifikante Unterschied deutlich verändert hat. So zeigt die Blutanalyse, dass die Positionsvariante 1 fast doppelt so viele spezifische CD8 $^+$  T-Zellen im

Vergleich zu den zwei anderen Positionsvarianten induziert hat (\**t*-test,  $p=0,0354$ ; \*\**t*-test,  $p=0,0037$ , Abb. 3.23c/Tag15). Der finale IFN- $\gamma$  ELISPOT (Abb. 3.23d) zeigte keinen signifikanten Unterschied für die fünf verschiedenen auf den Pentatopen kodierten Antigenen.

### **3.8.2 Pentatop v.s. Monotop v.s. Mix**

Im vorausgegangenen Experiment (3.8.1) wurde gezeigt, dass unabhängig von der Position auf dem Pentatop, eine Immunantwort gegen ein Antigen induziert werden kann. Weiter stellte sich nun die Frage, ob eine durch ein Pentatop induzierte Immunantwort vergleichbar ist mit der Immunantwort, die durch ein Monotop bzw. das Mischen der fünf Monotope induziert wird. Das Experiment sah vor C57BL/6 ( $n=5$ ) Mäuse mit der Pentatop Variante 1 (Abb. 3.24b), dem SIINFEKL Monotop oder die fünf auf dem Pentatop kodierten Modellepitope zu mischen. Da molekular gesehen 40 $\mu$ g Pentop-RNA weniger Moleküle enthalten als 40 $\mu$ g Monotop RNA wurde um ein äquimolares Verhältnis in den Gruppen zu schaffen, die Pentatop bzw die Monotop RNA jeweils mit irrelevanter eGFP RNA „aufgefüllt“. Die Tiere wurden jeweils fünf Mal i.v. immunisiert und am Tag 22 Blut für eine FACS Analyse entnommen (Abb. 3.24a). Zum Zeitpunkt der Analyse standen funktionierende fluoreszenzmarkierten Pentamer-Antikörper für die Epitope SIINFEKL und VSV-NP zur Verfügung, daher wurde sich auf diese Epitope im Read-Out beschränkt.



**Abb. 3.24 Pentatop vs. Monotop. Vs. Mix.** (a) Schematische Darstellung des Experimentalen Aufbaus. C57BL/6Mäuse (n=5 /Gruppe) wurden im wöchentlichen Rhythmus mit RNA (40µg/Maus) + Liposomen (DOTMA/DOPE) immunisiert. Hierbei wurde das molare Verhältnis durch „Auffüllen“ mit eGFP RNA angepasst. (b) Schematischer Überblick über die verschiedene RNA Formate. (c) FACS-Analyse (SIINFEKL-, VSV-NP-Tetramer) von spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Punkte repräsentieren T-Zell Frequenz einer Maus. Sternchen indizieren einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den RNA Formaten (*t*-test, \**p* < 0,05; \*\**p* < 0,01; \*\*\**p* < 0,001).

Für das immundominante SIINFEKL Epitop zeigt sich nach der Pentatop-RNA Vakzinierung eine fast doppelt so hohe Frequenz von T-Zellen als nach der Immunisierung mit Monotop- (*t*-test, *p*=0,0021 Abb. 3.24c) oder Mix-RNA. Ein weiterer interessanter Aspekt war die Beobachtung, dass es nach 22 Tagen noch einmal zu einer Verstärkung der spezifischen T-Zell Frequenz kommt verglichen mit der FACS-Analyse vom Tag 14 (Abb. 3.24c). Für das deutlich schwächere VSV-NP Epitop stellt sich dagegen ein anderes Bild dar. Hier zeigt die Vakzinierung mit der Monotop- bzw. der Mix-RNA das bessere Ergebnis (*t*-test, *p*=0,0011 Abb. 3.24c). Eine Imbalance des Modell-Pentatops ist die Immundominanz des SIINFEKL Epitopes. Es besteht die Möglichkeit, dass aufgrund der hohen Affinität dieses Epitopes es zur

klonalen Konkurrenz der T-Zellen kommt. Daher bildet das hier verwendete Pentatop möglicherweise nicht die klinische Situation ab und es ist davon auszugehen, dass es bei Verwendung natürlicher mutierter Epitope zu einer homogenen Immunantwort kommen wird. Experimente die nach der Beendigung der hier präsentierten Arbeit durchgeführt wurden, zeigen, dass mittels dieses Antigenformats Immunantworten gegen fünf von fünf kodierten mutierten Epitopen induziert werden können (Daten nicht gezeigt). Zusammengefasst haben die Experimente gezeigt, dass es möglich ist, unabhängig von der Position auf dem Pentatop eine Immunantwort gegen ein Antigen zu induzieren. Weiter wurde belegt, dass die induzierte T-Zellfrequenz durch ein Pentatop signifikant gesteigert werden kann (Abb. 3.24c).

## 4 Diskussion

Hauptziel der vorliegenden Arbeit war es im Tiermodell zu untersuchen, ob es möglich ist, auf Grundlage von individuellen nicht-synonymen Punktmutationen, die durch NGS Sequenzierung im B16-F10 Genom gefunden wurden, eine auf RNA basierende individuelle Vakzine zu designen, die anti-tumorale Wirkung hat. Um dieser Frage nach zu gehen, wurde die vorliegende Arbeit in drei Hauptteile strukturiert:

1. Erstes Ziel war es, unsere Hypothese zu untersuchen, dass die via NGS gefundenen individuellen Punktmutationen einen Pool an Antigenen darstellen, die vom Immunsystem erkannt und zu T-Zell Expansion führen können.
2. Aufbauend auf den gefundenen Daten sollte an dem Beispiel einer anti-tumoral wirksamen Mutation der immunologische Mechanismus untersucht werden der für den therapeutischen Erfolg verantwortlich ist.
3. Der dritte Teil beschäftigte sich mit der Fragestellung, ob im Sinne eines polytopen Impfstoffes die Kombination mehrerer Antigene auf einer RNA möglich ist.

Den untersuchten Hypothesen liegt zugrunde, dass das individuelle Immunsystem prinzipiell in der Lage ist Tumorzellen zu erkennen und zu zerstören. Diese Grundhypothese wird durch drei Beobachtungen gestützt. Zum einen ist das Risiko einer Tumorerkrankung bei immunsupprimierten Menschen signifikant erhöht<sup>89,90</sup>. Es kann, wenn auch äußerst selten, zu spontan Remission von Primärtumoren durch das Immunsystem kommen<sup>91</sup> und letztlich wurde mit Hilfe adaptiver T-Zell Transfers und anderen Immuntherapien komplette Remission bei Melanompatienten erreicht<sup>92,93</sup>. Für die vorliegende Arbeit wurde auf das B16-F10 Melanom als Tumormodell zurückgegriffen, da es unter den vielen etablierten Tumorzelllinien durch seine geringe Immunogenität, sowie das aggressive Wachstum parallelen zur klinischen Realität solider Tumoren im Menschen aufweist.

Die B16 Melanom Zelllinie stammt ursprünglich aus einem spontanen aus Melanozyten entstanden Hauttumor der Mauslinie C57Bl/6 und wurde 1956 isoliert werden. Eine *in vitro* Kultivierung resultierte in einem stark metastasierenden Tochterklon, der B16-F10 Zelllinie<sup>94</sup>. Die B16-F10 Zelllinie gehört heute zu den meist verwendeten, sowie zitierten Zelllinien in der T-Zellimmunologie. Mutations-Analysen von B16-F10 Zellen fokussieren sich vor allem auf klassische Onko- bzw. Tumorsuppressorgene die z.B. zeigen, dass *Cdkn2a* homozygot depletiert ist oder dass weder aktivierende Mutationen in *Braf* noch inaktivierende Mutationen in *Trp53* häufig vorkommen<sup>95</sup>. Obwohl B16F-10 einerseits zu den am häufigsten in der präklinischen Forschung verwendeten Zelllinien gehört, herrscht andererseits noch größtenteils Unwissen über ihre genomischen Alterationen und das Repertoire an T-Zell Antigenen.

Somatische, nicht-synonyme Mutationen, welche die Aminosäuresequenz von Proteinen verändern stellen die Antigenquelle der in dieser Arbeit beschriebenen Vakzine dar. Sie ermöglichen eine selektive Targetierung von Tumorzellen durch mutationsspezifische T-Zellen. In verschiedenen klinischen Studien wurde bereits belegt, dass nicht-synonyme Mutationen gute Angriffspunkte für eine Tumor Vakzine darstellen, da die induzierten Immunantworten sehr spezifisch und langanhaltend sein können<sup>96</sup>. Konzeptionell sind mutierte Epitope attraktive Zielstrukturen für eine Krebsvakzinetherapie, da sie keiner zentralen Toleranzinduktion unterliegen und daher die Expansion spezifischer T-Zellen erleichtern. Die Herausforderung jeder tumorspezifischen Immuntherapie besteht in der Fähigkeit von Tumoren sich dem Angriff des Immunsystems zu entziehen. Hierbei spielen sog. „Tumor-Escape“

Mechanismen (1.2.5) eine wichtige Rolle. Die verringerte Expression unterschiedlicher Komponenten der Antigen-Prozessierungs-Maschinerie kann beispielweise die Anzahl immunogener Peptide, die auf Tumorzellen präsentiert werden herabsetzen und so ein Erkennen durch spezifische T-Zellen verhindern<sup>97</sup>. Andere Mechanismen beeinflussen dagegen die Sensitivität der Tumorzellen gegenüber verschiedener Apoptose-signalen<sup>53</sup>. Um diese Problematik zu umgehen, ist eine grundlegende Idee des IVAC-Ansatzes, mit einer Vakzine mehrere potentielle spezifische Neo-Epitope anzusprechen und so die Möglichkeiten eines „Tumor-Escape“ zu verringern. Mit dieser Anforderung, war es ein Ziel dieser Arbeit, zu testen ob es möglich ist Immunogenität via Multi-Epitop Vakzin zu induzieren.

#### 4.1 Analyse der Immunogenität von identifizierten und validierten nicht-synonymen Punktmutationen

##### 4.1.1 Das B16-F10 Mutanom

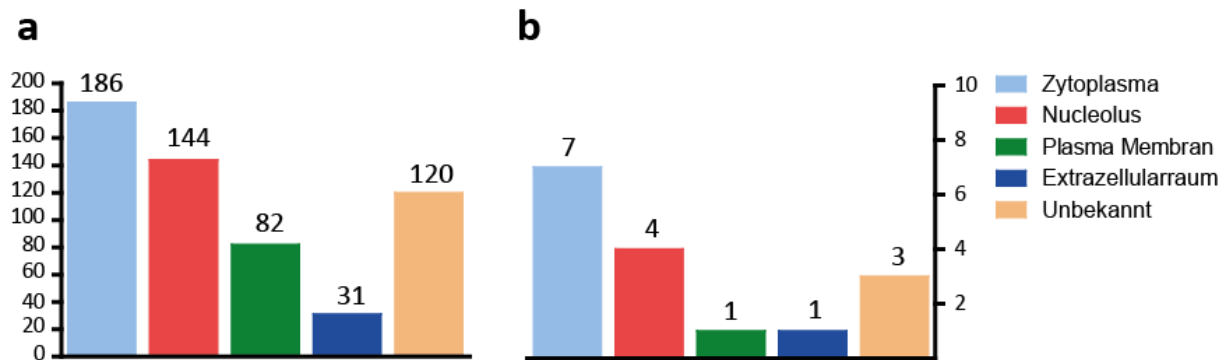
Um dieses Potential an mutierten Neo-Epitope auszuschöpfen wurde das gesamte Genom via NGS sequenziert und mit bioinformatischen Ansätzen analysiert<sup>98</sup>. Die verwendeten Algorithmen um die nicht-synonymen Mutation zu identifizieren befinden sich weiterhin in der Entwicklung, wobei aktuelle Studien zeigen, dass es sich nur bei bis zu 54% der gefunden Mutationen um reale, also nicht falsch/positive Mutationen handelt<sup>99</sup>. Um sicher zu gehen, dass es sich bei den selektierten Mutationen nicht um Sequenzierungsartefakte handelt wurden daher alle 50 selektierten nicht-synonymen Punktmutationen auf DNA/PCR Basis validiert. Verglichen mit soliden humanen Tumoren, bei denen im Schnitt zwischen 16 und 302 nicht-synonyme Mutationen gefunden werden<sup>100</sup>, wurden bei der Sequenzierung des B16-F10 Genoms mit 962 Mutationen deutlich mehr Mutationen gefunden<sup>58</sup>. Ein Hauptgrund für die Vielzahl der gefunden Mutationen, liegt wohl in dem Umstand, dass die B16-F10 Zelllinie, ausgehend vom ersten Klon, schon fast 50 Jahre Zeit hatte weitere Mutationen „anzuhäufen“. Interessanterweise wurden bei der Sequenzierung des B16-F10 Genoms Mutationen in verschiedenen Genen gefunden, die bereits mit unterschiedlichen Tumor-Phänotypen in Verbindung gebracht wurden. So wurden unter anderem Punktmutationen in den folgenden Onkogenen gefunden:

- **p16 (cyclin dependend kinase inhibitor 2A; Cdkn2a)**: In 10-20% des malignen Melanoms tritt eine Veränderung von diesem Tumorsuppressor -Gen auf.
- **Trp53 (Tumorsupressorgen 53)**: Zu den am häufigsten mutierten Genen in humanen Tumoren gehört das Trp53 Gen. Die Hauptfunktion des Trp53 Gens ist die Induktion der Apoptose nach Schädigung der DNA, um die Ausbreitung von Mutationen zu stoppen. Der Verlust der p53-Funktion ist mit genomischer Instabilität assoziiert, was wiederum ein Charakteristikum des malignen Melanoms ist.
- **Brca2 (Breast Cancer 2)**: Auch das Brca2 Gen gehört zu den Tumorsupressorgene.

Weitere Mutationen in bekannten Onkogenen wie *Braf*<sup>101</sup>, *c-Kid*, *K-ras*<sup>102</sup> oder *N-ras*<sup>103</sup> wurden nicht gefunden.

Ein Resultat der Sequenzierung war, dass die am häufigsten gefundene Punktmutation eine Transversion, also der Austausch einer Pyrimidinbase (Cytosin > Thymin) gegen eine Purinbase (Guanin >

Adenin) ist. Diese Art von Substitution gehört zu der am meisten durch UV-Licht verursachten Mutation<sup>104</sup>.



**Abb. 4.1 Subzelluläre Lokalisationen des Mutanoms.** (a) Lokalisation aller exprimierten Mutationen. (b) Lokalisation aller auf Peptidbasis immunogener Mutationen

Auch unter immunologischen Gesichtspunkten ist die Frage relevant ob der untersuchte Tumor hinsichtlich der nicht-synonymen Mutationen Ungleichgewichte hinsichtlich der zellulären Lokalisation aufweist. Wie in Abb.4.1a zu erkennen ist, war die subzelluläre Lokalisation aller exprimierter Mutationen heterogen verteilt. Auch in der näheren Betrachtung wurde keine Korrelation zwischen der Lokalisation und der Immunogenität der Mutation beobachtet (Abb.4.1b).

#### 4.1.2 Frequenz immunogener Mutationen

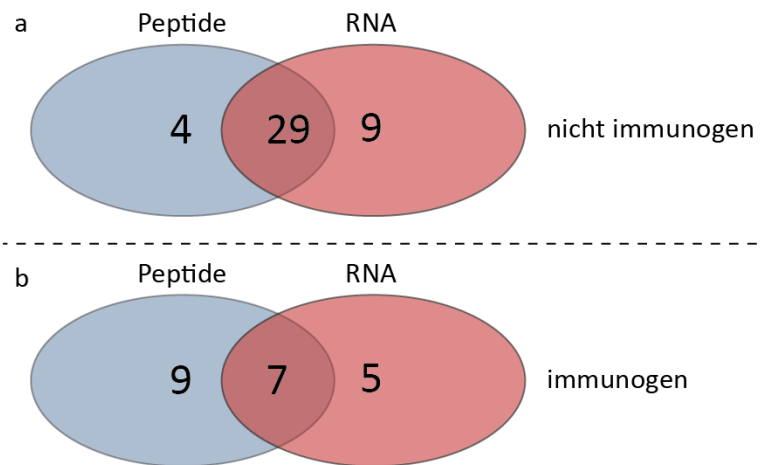
Nach der Etablierung des immunologischen Setups war es die Hauptfragestellung des ersten Teiles dieser Arbeit, durch NGS gefundene und durch *in silico* Methoden selektierte nicht-synonyme Punktmutationen in einem *in vivo* Ansatz systematisch auf Immunogenität zu testen. Für den Screen der 50 validierten mutierten Antigene wurde auf ein 27mer Format zurückgegriffen. Da es keine Informationen bezüglich der Epitope welche die Punktmutationen bildeten gab, hatten lange Peptide den Vorteil, sowohl MHC Klasse I (8-10mer) als auch Klasse II (bis 20mer) restringierte Epitope abzubilden. Ein möglicher Nachteil dieser langen Peptide verbirgt sich hinter dem molekularen Aufbau der MHC Klasse II Bindungsgrube. Murine und humane MHC Moleküle sind wie bereits beschrieben (0) durch eine Peptidbindungsgrube gekennzeichnet. MHC Bindungsstellen der Klasse I sind insofern geschlossen, dass die Peptidtermini in den Enden der Grube festgehalten werden<sup>105</sup>. Im Gegensatz dazu, sind die Bindungsgruben der MHC Klasse II Moleküle an beiden Enden offen. Dieser Umstand erlaubt es den Peptiden sich aus dem tatsächlichen Bindungsbereich herauszustrecken, wodurch sie an beiden Enden „überhängen“<sup>106</sup>. MHC Moleküle der Klasse II können daher Peptidliganden variabler Länge im Bereich von 9 bis mehr als 20 Aminosäurereste binden. In dieser Variabilität verbirgt sich auch eine Problematik der verwendeten langen Peptide. Es besteht die Möglichkeit, dass sich Peptide unspezifisch in MHC Klasse II Moleküle einlagern ohne endogen prozessiert worden zu sein. Die induzierte Immunreaktion wäre dann also nicht gegen ein spezifisches natürlich prozessiertes Epitop sondern vielmehr gegen eine artifizielle Sequenz gerichtet. Eine Möglichkeit falsch positive Immunreaktionen auszuschließen ist die Elektroporation von RNA, die für die korrelierende Peptid-Sequenz kodiert, in murine BMDCs die als Zielzellen im ELISPOT eingesetzt werden. Da die RNA zellulär translatiert und das

kodierte Protein vor der Präsentation auf den MHC Molekülen, endogen prozessiert werden muss, kann eine Präsentation artifizieller Epitope ausgeschlossen werden. Die unterschiedlichen Charakteristika der MHC Moleküle sind für spezifische Probleme verantwortlich, die mit der Vorhersage potentieller T-Zell Epitope im Zusammenhang stehen. Wie zuvor diskutiert, binden Moleküle der Klasse I kurze Peptide, die gut definierte Muster aufweisen. Das hat zu verschiedenen Vorhersagemodellen geführt, die auf statistischen Präferenzen für bestimmte Aminosäuren an spezifischen Positionen in dem Peptid basieren. Obwohl schon viele Jahre an diesen Modellen geforscht wird, beschränken Unsicherheiten, die mit den nicht-konservierten Positionen zusammenhängen, ihre Genauigkeit.

Vorhersagemodelle für MHC Klasse II Moleküle folgen im Wesentlichen der gleichen Strategie wie Klasse I Moleküle, mit der zusätzlichen Schwierigkeit, dass die Bindungstaschen offen sind. Somit ist es komplizierter, das eigentliche 9 bis 14 Aminosäuren lange Segment zu ermitteln, das tatsächlich für die Bindung verantwortlich ist. Für die Vorhersage der mutierten IVAC Epitope, wurde sich auf Klasse I Epitope beschränkt, da es ein Hauptziel war, spezifische zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu induzieren. Um eine Vorhersage zu treffen, ob es sich um MHC Klasse I oder II Epitope handelt wurden Mutationen, die auf DNA Ebene via Sanger-Sequenzierung bestätigt wurden, über drei verschiedenen Vorhersage-Algorithmen priorisiert. Als erstes wurde die MHC Bindungsaffinität über den Web basierten Algorithmus IEDB<sup>107</sup> vorhergesagt und darauf folgend wurden die Algorithmen SIFT<sup>108</sup> und POLYPHEN-2<sup>109</sup> (beide Algorithmen dienen der Vorhersage, ob eine Punktmutation die Funktion eines Proteins beeinflusst) angewendet um eine finale Priorisierung der Mutationen zu erlangen. Auf diese Weise entstand eine Liste mit 50 priorisierte Mutationen. Wie bereits erläutert zeigten 16 der 50 priorisierten Mutationen eine Immunreaktion (entspricht 34%), wobei sich die Immunogenität heterogen über die 50 Mutationen verteilt (3.2.1). Ein Hauptproblem, dem man sich in diesem Gebiet gegenüber sieht, ist die Leistung der Vorhersagealgorithmen hinsichtlich der MHC-Allele für experimentell bestimmte Daten. Die Quellen für Bindungsinformationen sind meistens Elution- und Sammel-Sequenzierungen von Peptiden, die natürlich an MHC Moleküle innerhalb von Zellen gebunden sind<sup>110</sup> oder aus Datensätzen, die aus der Literatur zusammengefasst wurden<sup>111,112</sup>. Daher existieren noch zu wenig experimentelle *ex vivo* Informationen um programmierte Verfahren zur Vorhersage der Affinität eines Peptids für MHC Moleküle zu validieren. Darüber hinaus ist die MHC Bindung eine notwendige aber nicht hinreichende Bedingung für die Induktion einer Immunantwort. Weitere Faktoren wie z.B. das native TCR Repertoire, die Stärke der TCR Interaktion und die Quantität der auf den MHC Molekülen präsentierten Peptiden sind von großer Relevanz. Diese Faktoren sind einer computationalen Prädiktion bisher nur unzureichend zugänglich.

#### **4.1.3 RNA basierte *in vivo* Testung bestätigter Mutationen**

Eine Grundidee des IVAC-Ansatzes ist es, einen auf RNA basierenden Impfstoff zu designen, daher wurden in einem unabhängigen Ansatz alle 50 mutierten Epitope auf liposomaler RNA Basis getestet (3.2.2). Das Ergebnis zeigte, dass 7 von 9 der mit Peptid als immunogen gefundenen Sequenzen sich durch RNA Vakzinierung bestätigen ließen. Dass 2 Peptide nicht bestätigt wurden, unterstützt die Hypothese, dass es durch die Immunisierung mit 27mer Peptiden zu falsch positiven Immunantworten kommen kann.



**Abb. 4.2 Venn-Diagramme, die die Frequenz des Peptid- und RNA-Screens in Beziehung setzen.** (a) Mutierte Epitope die keine Immunantwort induzieren. (b) Mutierte Epitope die eine Immunantwort induzieren.

Interessanterweise wurden auf der anderen Seite 5 weitere immunogene Epitope gefunden, die keine Immunreaktion im Peptid-Screen zeigten, was die gleiche Ursache, also eine fehlende korrekte endogene Prozessierung haben könnte. Hierbei kann auch die frühzeitige Degradierung von Peptiden bei mangelnder Serumstabilität eine zusätzliche Rolle spielen<sup>113</sup>.

Die Phänotypisierung der auf RNA Basis induzierten T-Zellen (3.2.3) zeigte, dass es sich bei zwei um MHC-Klasse I (17%) und zehn weiteren um MHC-Klasse II (83%) restringierte Epitope handelt<sup>114</sup>. Auf den ersten Blick war dies ein sehr überraschendes Ergebnis, da durch die angewandte Prädiktion, eine höhere Frequenz von MHC-Klasse I Epitopen erwartet worden war. Auf den zweiten Blick ist das gezeigte Ergebnis nur die logische Konsequenz der verwendeten 27mer Vakzine. So zeigen Literaturrecherchen, dass auch andere Arbeitsgruppen ähnliche Frequenzen von immunogenen mutierten MHC-I Epitopen in unterschiedlichen Tumormodellen finden, aber durch die ausschließliche Verwendung von Minimalepitopen (max. 10mer) als Vakzine im immunologischen Read-Out, wird in diesen Studien keine Aussage über die Frequenz MHC-Klasse II restringierter mutierter Epitope gemacht<sup>115,116</sup>. Ein weiterer Grund für die fehlende Detektion von MHC-II restringierten mutierten Epitopen ist auch in den verwendeten Prädiktionsalgorithmen zu suchen. Schreiber und Kollegen verwenden zusätzlich zu denen in dieser Arbeit angewendeten Algorithmen, einen Algorithmus (NetChop) der eine Aussage darüber trifft, wie hoch die Wahrscheinlichkeit ist, dass ein MHC-I Epitop vom Immunoproteosom prozessiert wird<sup>116</sup>. Durch die Verwendung des NetChop Algorithmus (max. 10 Aminosäuren) wird eine Prozessierung von MHC-II restringierten Epitopen so gut wie ausgeschlossen, daher ist auch die Wahrscheinlichkeit ein MHC-II reaktives Epitop zu identifizieren zusätzlich verringert.

Bei der Entwicklung von Strategien für die Nutzung nicht-synonymer Mutationen in der Immuntherapie werden unter anderem zwei Richtungen verfolgt: (i) die auch in dieser Arbeit angewendete Vorhersage und Induktion von Tumor spezifischen Neo-Epitope durch eine Vakzine (z.B. RNA) und (ii) die Isolation, Identifizierung und Expansion von natürlich vorhandenen Tumor-infiltrierenden Lymphozyten. Ein interessanter Aspekt hierbei ist, dass es sich bei den isolierten, identifizierten und klinisch relevanten Lymphozyten welche von Robbins und Kollegen identifizieren wurden ebenfalls um MHC-II reaktive CD4<sup>+</sup> T-Zellen handelt. Der Vergleich zeigt, dass auch im Menschen durch CD4<sup>+</sup> mutationsspezifische T-Zellen

therapeutische Effekte erzielt werden können und es zu einer Anreicherung im Tumorgewebe kommt<sup>117,118</sup>.

#### 4.1.4 Antigenität korreliert nicht mit onkogener Relevanz

Wie bereits beschrieben wurden für diesen Ansatz 50 Mutationen, die via PCR bestätigt und auf DNA Ebene stark exprimiert wurden selektiert. Für den immunologischen Screen wurden 27mer lange Peptide entworfen mit der Punktmutation jeweils in der Mitte, so dass eine natürliche Antigenprozessierung möglich ist und sowohl MHC Klasse I und II Epitope präsentiert werden können<sup>119</sup>. Es zeigte nur ein Teil (34%) der selektierten B16-Mutationen eine Immunreaktion (3.2.1), wobei es keine direkte Korrelation zwischen der Immunogenität und der potentiellen onkologischen Relevanz der kodierten Proteine gab. So induzierte z.B. das Peptid, das für eine Punktmutation im Trp53 Gen kodiert (Mut-07) keine Immunreaktion. Weiter wurde auch keine Verbindung der Immunogenität zu zellulären Lokalisationen der kodierten Proteine festgestellt.

Alle von uns bestätigten mutierten Epitope werden von Haushaltsgenen kodiert, also von Genen die für Proteine des Grundstoffwechsels der Zelle kodieren und unabhängig von Zelltyp, Zellstadium und äußeren Einflüssen exprimiert werden. Haushaltsgene sind typischerweise Gene für die Strukturmoleküle und Enzyme kodieren. So befindet sich Mutation-30 in einem Gen, das unter natürlichen Umständen für das Protein „*Kinesin family member 18B*“ kodiert und in der Zellteilung involviert ist. Diese Tatsache bestätigt einerseits, dass es bei dieser Proteinklasse (Haushaltsgenen) zu einer erhöhten Mutationsrate im malignen Melanom kommt und stellt andererseits ein gutes Ziel für eine Immuntherapie dar, da die veränderten Zellen diese Proteine unter anderem für die Zellteilung benötigen und aller Voraussicht nur bedingt herunterregulieren können.

Bei den selektierten immunogenen Mutationen handelt es sich um neu gefundene nicht-synonyme Punktmutationen, die noch mit keinem malignen Phänotyp in Verbindung gebracht wurden. Interessanterweise wurden aber für einzelne der in der Maus mutierten Proteine auch immunogene Mutationen im menschlichen Ortholog gefunden. So wurde z.B. eine Punktmutation im humanen Ortholog der selektierten Mutation 46 (Actn4) im Zusammenhang mit einem großzelligen Lungenkarzinom beschrieben. Die Punktmutation generiert für ein HLA-A02 Epitop, und wird von mutations-spezifischen T-Zellen erkannt und angegriffen<sup>120</sup>. An diesem Beispiel wird verdeutlicht, dass nicht nur prominente Onkogene sondern auch individuelle Neo-Epitope eine gute Zielstruktur für die Immuntherapien darstellen können.

#### 4.1.5 Neo-Epitope induzieren eine starke sowie spezifische Immunantwort

Der größte Teil der induzierten Immunreaktion (70%) zeigte ein für die Mutation spezifisches Signal, das quantitativ mit der Immunreaktion gegen Trp2 nach Immunisierung vergleichbar ist. Da das Melanom assoziierte Antigen Trp2 neben gp100 zu einem der am meisten verwendeten Epitope gehört und bereits erfolgreich als therapeutisches Vakzin im humanen sowie im murinen System eingesetzt wird<sup>121</sup>, war dies ein erster Hinweis auf das therapeutische Potential immunogener Mutationen.

Eine weitere Beobachtung war, dass 10 der 17 (59%) auf Peptidbasis und 5 der 12 (41%) auf RNA Basis bestätigten Mutationen, nach Immunisierung, Kreuz-Reaktivität gegen das Wildtyp-Epitop zeigten. Diese

Beobachtung rückt die Frage möglicher Toxizitäten im Rahmen einer klinischen Testung in den Fokus. Obwohl keine detaillierte mikroskopische Analyse vorgenommen wurde zeigte zumindest keine der Mäuse, die auch über einen längeren Zeitraum mit Peptiden oder RNA immunisiert wurden offensichtliche Autoimmunreaktionen. Trotz dessen ist für die klinische IVAC Studie vorgesehen, dass die Expression des Wildtyp-Gens in gesundem Gewebe vor der Behandlung überprüft wird. In der Literatur wird beschrieben, dass in der Therapie des humanen Melanoms bis zu einem gewissen Grad Autoimmunphänomene tolerierbar und sogar mit klinischem Ansprechen korreliert sind. So wurde gezeigt, dass Tyrosinase spezifische, autoreaktive CD8<sup>+</sup> T-Zellen und die damit induzierte Vitiligo für einen signifikanten positiven klinischen Effekt verantwortlich sind<sup>122,123</sup>. Darüber hinaus kann angenommen werden, dass bei einer breiten Expression des Wildtypproteins in verschiedenen Geweben die Mechanismen der peripheren Toleranz zu einem verminderten Risiko schwerer Autoimmunphänomene führen.

#### **4.1.6 Die induzierte Immunantwort zeigt antitumorale Wirksamkeit**

Die Verwendung der vorhergesagten Epitope in therapeutischen Vakzinierungsstudien bestätigte die Vermutung das mutierte Neo-Epitope potentielle Zielstrukturen für spezifische T-Zellen darstellen. So wurde gezeigt, das auf Basis von Peptiden eins von zwei und auf Basis von RNA sogar neun von 12 Epitopen einen antitumoralen Effekt zeigten (3.3.3), wobei dieser bei fünf von neun Mutationen statistisch signifikant Effekt war. Grundsätzlich stellt sich die Frage, warum nicht alle immunogenen Mutationen auch einen anti-tumoralen Effekt induzieren? Im Folgenden sollen hier drei möglich Hypothesen diskutiert werden: (i) Die erste und favorisierte Ursache ist eine geringe Expression des Antigens im Tumor. Es hat sich gezeigt, dass vier von fünf Epitopen die keinen anti-tumoralen Effekt gezeigt haben auch nur sehr schwach im B16 Melanom exprimiert waren (Daten nicht gezeigt). In diesem Fall kann angenommen werden das unter einem Schwellenwert die Anzahl der präsentierten Peptide zu niedrig ist, so dass keine effiziente Erkennung der Zielzellen mehr erfolgt. (ii) Eine weitere Möglichkeit ist, dass das Epitop zwar korrekt prozessiert und in Kombination mit MHC-Molekülen präsentiert wird, dass allerdings die gegen dieses Epitope gerichteten T-Zellen, beispielsweise durch Selektionsmechanismen gegen ein Epitop ähnlicher Struktur (z.B. Wildtypsequenz) im Thymus, eine geringe MHC Avidität gegen das Epitop haben. (iii) Die dritte Möglichkeit besteht darin, dass die Expression des Antigens heterogen im Tumorgewebe verteilt ist. Hierbei werden zwar die exprimierenden Zellen erkannt, aber der Tumor aufgrund der mehrheitlich fehlenden Expression in seiner Gänze nicht effektiv attackiert. Dabei ist zu erwähnen dass wir in unseren Studien nicht zwischen einer generell sehr niedrigen Expression in allen Zellen oder einer Expression in einem kleinen Bruchteil aller Zellen unterscheiden.

Grundsätzlich ist überraschend, dass die beobachteten signifikanten antitumoralen Effekte von MHC Klasse II restringierten Epitopen erzielt wurden und nicht, wie erwartet, von CD8<sup>+</sup> reaktiven T-Zellen. Dies ist umso überraschender da B16-F10 Zellen *in vitro* keine MHC-Klasse II Moleküle exprimieren. Diese Beobachtung für mutierte Epitope reiht sich in bekannte Daten ein, welche vorwiegend mit Modell- und Differenzierungs-Antigenen erhoben wurden. In der Vergangenheit wurden die essentielle Bedeutung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei der Eliminierung von MHC negativen Tumoren bereits gezeigt<sup>124,125,126</sup>, jedoch handelte es sich bei den verwendeten Tumorzellen nicht um das aggressive, sowie schnell

wachsende Melanom, sondern um Zelllinien die eine deutlich langsameres Wachstum und eine geringere Mortalitätsrate haben. Normalerweise sind  $T_H1$ -Effektorzellen im Wesentlichen für eine effiziente Aktivierung und die Induktion antigenspezifischer  $CD8^+$  T-Zellen mitverantwortlich<sup>127</sup>. Tumorregressionen wurde aber auch in völliger Abwesenheit von  $CD8^+$  T-Zellen gezeigt<sup>124</sup>. Diese Beobachtung beruht hauptsächlich auf direkten Effekten der  $CD4^+$  T-Zellen auf die Tumorzellen, bedingt durch die Sekretion von Zytokinen wie  $IFN-\gamma$ ,  $TNF-\alpha$  und die Expression von FasL<sup>126,128</sup>. Teilweise kommt es auch zur vermittelten Aktivierung von anderen Effektoren wie Makrophagen, die den Tumor direkt attackieren und zerstören<sup>129</sup>.

In einer aktuellen Studie wurde von Ton Schumacher und Kollegen auch im humanen malignen Melanom Infiltration und Erkennung der Tumorzellen durch spezifische  $CD4^+$  T-Zellen gezeigt, welche mutierte Neo-Epitope erkennen. Nach *ex vivo* Expansion und adaptiven Transfer der spezifischen  $CD4^+$  T-Zellen zeigten vier von fünf Patienten ein positives Ansprechen auf die Therapie<sup>130</sup>. Da spezifische  $CD4^+$  T-Zellen im humanen System eine zentrale Rolle zu spielen scheinen, war es ein Hauptaugenmerk des Zweiten Teils dieser Arbeit, anhand eines Beispiels zu untersuchen, welchen mechanistischen Einfluss spezifische  $CD4^+$  T-Zellen auf das murine Melanom haben.

## 4.2 Charakterisierungen eines immundominanten Neo-Epitopes

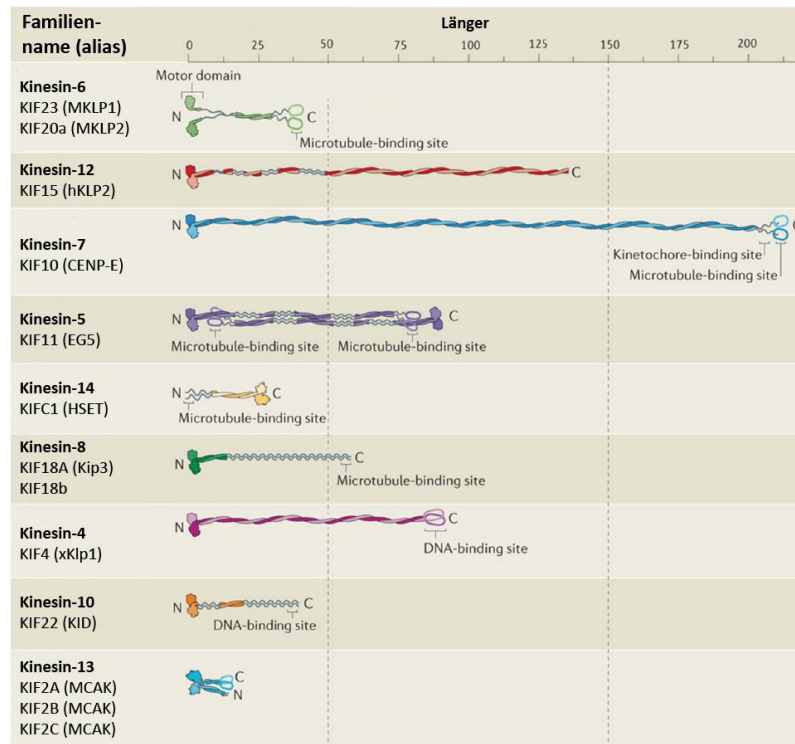
### 4.2.1 Mut-30 ist eine Punktmutation in einem Gen welches das Protein KIF18b kodiert.

Ein wesentlicher Ansatz, Tumorwachstum zu bekämpfen, ist die Hemmung der Zellteilung (Mitose). In der Vergangenheit erwies sich der Spindelapparat als ein erfolgreich genutztes Ziel für verschiedene anti-mitotisch wirksame Chemotherapeutika<sup>131</sup>. Prominente Beispiele hierfür sind Paclitaxel sowie Docetaxel für die Behandlung von metastasierenden Brustkrebs sowie Lungen- und Eierstockkarzinomen. Der Nachteil den Spindelapparat direkt als Angriffspunkt zu Nutzen liegt in der dynamischen heterodimer-Struktur der Mikrotubuli. So kommt es bedingt durch Mutationen in den  $\beta$ -Tubulin Molekülen schnell zu multiplen Resistenzen gegen die verwendeten Chemotherapeutika, so dass das Gleichgewicht, zwischen Effekt und Toxizität aus der Balance gerät und es zu schweren Nebenwirkung kommt<sup>132,133</sup>. Ein relativ junger Forschungsbereich beschäftigt sich mit der Untersuchung von Mikrotubuli-basierten Motorproteinen. Zu diesen zählen vor allem die Kinesine, deren Hauptaufgabe vor allem im intrazellulären Transport von biologischen Lasten besteht<sup>134</sup>.

Wie bereits beschrieben, handelt es sich bei der Mutation-30 um eine somatische Punktmutation, die sich in einem Gen befindet, dass unter natürlichen Umständen für das Protein „*Kinesin family member 18B*“ kodiert. KIF18b gehört zur Familie der Kinesine, die durch eine hochkonservative ca. 360 Aminosäure umfassende Motordomäne definiert wird und die in 14 Unterfamilien unterteilt ist (Abb. 4.3). Die hochdivergenten Domänen außerhalb der Motordomäne bestimmen die Zugehörigkeit zu der jeweiligen Unterfamilie und spiegelt die unterschiedliche Funktionen der Kinesine wieder, die vom Transport von Zellorganellen, Proteinkomplexen synaptischen Vesikeln und mRNAs bis zur Chromosomensegregation während der Mitose und Meiose reichen<sup>69,135,136</sup>.

Grundsätzlich werden die jeweiligen Unterfamilien in Mitose-Kinesine, welche an Transportfunktionen während der Zellteilung beteiligt sind und nicht Mitose-Kinesine, die am intrazellulären Transport von

Molekülen beteiligt sind unterschieden. Das Motorprotein *KIF18b* gehört zu den Mitose-Kinesinen der Familie 8 und ist während der Mitose mitverantwortlich für Ausbildung der astralen Mikrotubuli, hat also einen direkten Einfluss auf die Zellteilung<sup>137,138</sup>.



**Abb. 4.3 Gliederung der Kinesine in 14 Familien (adaptiert Cross 2014)**. Anhand phylogenetischer Untersuchungen werden die Kinesine in der Maus in 14 Familien unterteilt. Beispielhafte Darstellung des Verschiedenen Subtypen mit dem jeweiligen humanen ortholog (Name in Klammer)

In bioinformatischen Analysen von über 2100 Tumortranskriptomen wurde das *KIF18b* Gen direkt als ein „Driver-Gen“ in verschiedenen Tumoren identifiziert. Weiter wurde von Zhang und Kollegen eine Überexpression des homologes *KIF18A* in direkten Zusammenhang mit einer schlechten Prognose bei humanen Brustkrebspatienten beschrieben<sup>139</sup>. Andere Mitglieder der Kinesine wie *KIF11* (EG5) werden bereits erfolgreich als Zielstrukturen für anti-mitotische Medikamente in Klinischen Studien der Phase I und II eingesetzt<sup>69,70,71</sup>.

#### 4.2.2 Nach therapeutischer Vakzinierung wird *KIF18b* nicht herunter reguliert

In Mäusen hat ein Knockdown des *KIF18b* Gens schwere Defekte im Spindelapparat der Zellen zufolge<sup>138</sup>, was ein Hinweis darauf sein könnte, warum die Tumorzellen dieses Protein auch unter immunologischem Druck nach Vakzinierung nicht herunter regulieren können (Abb. 3.9). Wie bereits erläutert, ist die Punktmutation in keiner funktionellen oder konservierten Domäne lokalisiert, was ein Hinweis darauf sein könnte, dass es sich um eine „passenger“-Mutation handelt, also laut Definition eine Mutation, welche die Funktion des kodierten Proteins nicht verändert und somit auch keinen direkten pro-tumoralen Effekt auf das Tumorstadium hat<sup>58,67</sup>. Die von uns gemachte Beobachtung deckt sich mit der Hypothese von Ton Schumacher. So handelt es sich laut seiner Hypothese um eine für

die Tumorzelle essentielle „passenger“-Mutation, also um eine Mutation in einem Haushaltsgen dessen Protein überlebenswichtig für die Tumorzelle ist. Es ist der Tumorzelle nur unter großen Schwierigkeiten (beispielweise durch den Verlust der Mutation) möglich diese Gene herunter zu regulieren, wodurch sich die Möglichkeit für einen „Tumor-Escape“ deutlich verringert<sup>140</sup>.

#### 4.2.3 Phänotypisierung der Mut-30 spezifischen Immunantwort

Die Definition des Minimalepitopes zeigte, dass mindestens 11 Aminosäuren und die Punktmutation benötigt werden, um eine Immunreaktion zu induzieren. Die signifikante Steigerung der Immunantwort nach Immunisierung mit dem Minimalepitop, sowie die signifikante Verstärkung des IFN- $\gamma$  Signals nach Verwendung als Restimulanz ist unter anderem damit zu erklären, dass das verwendete Minimalepitop nicht mehr endogen prozessiert werden muss und es dadurch zu einer erhöhten Verfügbarkeit innerhalb der Zelle kommt.

Durch die Punktmutation kommt es auf Proteinebene zur Substitution einer Aminosäure. So ist die Aminosäure Lysin (Wildtyp) gegen Asparagin (B16-F10) ausgetauscht. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, zeichnen sich MHC-I Liganden durch ca. 10 Aminosäuren Länge und charakteristische Ankeraminoacids aus. Mit Hilfe von im Internet verfügbaren Vorhersageprogrammen wie z.B. SYFPEITHI ([www.syfpeithi.de](http://www.syfpeithi.de)) können Liganden auf ihre Übereinstimmung mit Epitopmotiven überprüft werden. Durch die offenen Bindungsgruben der MHC-II Moleküle ist diese Vorhersagemethode für entsprechende MHC-II Liganden nur im geringen Maße möglich, daher wurde kein Bindungsmotiv, das die mutierte oder Wildtypsequenz enthält präzisiert.

Die weitere phänotypische Charakterisierung der durch Mut-30 RNA induzierten T-Zellen zeigte, dass es sich um antigenspezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen vom T<sub>H</sub>1-Typ handelt (Ausschüttung von IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-2). Ein typisches Charakteristikum von T<sub>H</sub>1-CD4<sup>+</sup> T-Zellen ist unter anderem die zellvermittelte Aktivierung von Makrophagen und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten, dieser Umstand, liefert eine mögliche Erklärung für die signifikant erhöhte Infiltrierung von Makrophagen und CD8<sup>+</sup> T-Zellen in das Tumorgewebe nach liposomaler Mut-30 RNA Vakzinierung (3.6.1).

Die Ergebnisse machen deutlich, dass es durch die Vakzinierung mit dem Mut-30 Epitop (Peptid/RNA) zur Induktion von Gedächtniszellen und dadurch zu einer signifikanten Protektion gegen das maligne Melanom kommt. Überraschend hierbei war, dass Milzzellen tumorfreier Mäuse 73 Tage nach der letzten Vakzinierung und nach zweiter Tumorinokulation nach *in vitro* Restimulation mit Mut-30 Peptid weiterhin eine hohe Frequenz Mut-30 reaktiver T-Zellen aufweisen (Abb. 3.12). Eine Erklärung könnte in der homöostatischen Proliferation von spezifischen Gedächtnis T-Zellen gefunden werden: So zeigte sich, dass Gedächtnis- im Gegensatz zu naiven T-Zellen auch ohne weitere Restimulierung proliferieren und auf diese Weise die Existenz ihres Klons sichern<sup>141, 142</sup>. In der Literatur wurde dieser Effekt oft der Wirkung von IL-2 und IL-15 zugesprochen, dessen Zusammenwirken über das weitere Überleben oder Absterben der spezifischen T-Zellen entschied<sup>143</sup>. Ein weiterer Effekt der für T-Gedächtniszellen beschrieben ist, ist die Eigenschaft, dass sie nicht unmittelbar von kostimulatorischen Signalen abhängig sind<sup>144</sup>, daher können Tumorzellen welche keine kostimulatorischen Signale, aber tumorspezifische Antigene präsentieren Gedächtniszellen aktivieren<sup>145</sup>.

#### 4.2.4 Mut-30 spezifische T-Zellen vermitteln potente anti-tumorale Wirkung

Der anti-tumorale Effekt von Mut-30 wurde sowohl in einem subkutanen, als auch in einem unabhängigen therapeutischen Lungenmetastasen Modell bestätigt (3.5.2), bei dem am Ende des Experimentes (Tag 27) nur eine von acht mit Mut-30 RNA behandelten Mäusen ein messbares Luziferasesignal zeigte. Hingegen musste die Kontrollgruppe (Kontroll-RNA) aufgrund von starken Krankheitszeichen frühzeitig abgetötet werden. Der im Gegensatz zum subkutanen Modell (3.3.3) noch einmal verstärkte anti-tumorale Effekt, ist mit der anatomisch bedingten besseren Zugänglichkeit der Lunge für das Immunsystem zu erklären. Verglichen mit der Epidermis besitzt die Lunge bereits unter natürlichen Umständen einen im Verhältnis hohen Anteil an Gewebe residenten Immunzellen, wie alveolare NK-Zellen und Makrophagen. Eine wichtige Fragestellung ist daher wie  $CD4^+$  Mut-30 reaktive T-Zellen ihre potente anti-tumorale Aktivität vermitteln. Die verwendete B16-Luc-eGFP-CL2 Zelllinie ist transgen für die Reportergene eGFP und Luziferase. In diesem Umstand liegt auch eine weitere hypothetische Erklärung für die verbesserte anti-tumorale Wirkung der Vakzine: Tote Tumorzellen werden phagozytiert und die Xeno-Antigene anschließend von der phagozytierenden Zelle präsentiert. Es kommt zum Epitop-Spreading. Da dieser Umstand bei der Verwendung von Kontroll-RNA in diesem Experiment nicht beobachtet wurde, ist davon auszugehen, dass die Inokulation des B16-LUC-eGFP-CL2 alleine nicht ausreicht um einen anti-tumoralen Effekt zu erzielen. Das Kontra dieser Hypothese liegt in dem Fakt, dass wir keinen Verlust der therapeutischen Wirkung nach Depletion der  $CD8^+$  T-Zellen beobachtet haben. Auch in früheren Studien wurde kein direkter Zusammenhang zwischen Luziferase-Expression und einem anti-tumoralen Effekt gefunden werden<sup>146</sup>. Da eine direkte Lyse oder Erkennung von B16-F10 Zellen durch spezifische Mut-30 T-Zellen *in vitro* bis dato nicht gezeigt wurde, es sich bei Mut-30 spezifischen T-Zellen um  $T_H1$ -Effektorzellen handelt und es trotzdem zu einem anti-tumoralen Effekt *in vivo* kommt, sollten folgende drei Hypothesen diskutiert werden: (i) Der durch die Mut-30 RNA Vakzinierung induzierte anti-tumorale Effekt ist unspezifisch, daher sind andere lymphozytäre Subpopulationen (wie NK Zellen) an der Erkennung der Tumorzellen beteiligt. (ii) Mut-30 spezifische T-Zellen wandern in den Tumor ein und der beobachtete antitumorale Effekt ist auf Effekte sekretierter Zytokine zurückzuführen. (iii) Die Einwanderung spezifischer  $T_H1$ -Effektorzellen verändert das Tumormilieu (z.B durch die Verringerung von MDSC oder Tregs) zugunsten der anti-tumoralen Antwort des Immunsystems. Im Folgenden werden die verschiedenen Erklärungsansätze diskutiert.

#### 4.2.5 NK-Zellen spielen in der frühen Phase der Therapie eine entscheidende Rolle

Die Analyse des Tumorgewebes ergab eine, signifikant erhöhte Frequenz von NK- sowie  $CD8^+$  T-Zellen in den liposomal mit Mut-30 RNA behandelten Tieren (3.6.1). Demnach könnte postuliert werden, dass vor allem NK-Zellen für eine unspezifische Tumorantwort verantwortlich sind. In der Literatur gibt es bereits einige Untersuchungen bezüglich der Rolle von NK-Zellen in verschiedenen Vakzinierungsmodellen. In einer Studie von Lampe und Kollegen wurde Antigen exprimierendes act-mOVA (membrangebundenes Ovalbumin mit Aktinpromotor) in einem murinen Vakzinierungsmodell getestet<sup>147</sup>. Dabei wurde gezeigt, dass NK-Zellen das Antigen eliminieren und sie durch die  $IFN-\gamma$  Produktion eine starke adaptive T-Zellantwort befördern. Mit der gleichen Fragestellung beschäftigte sich auch die Gruppe um Martin-Fonoteca die beobachteten, dass NK-Zellen nach Stimulation aus dem peripheren Blut in die

Lymphknoten rekrutiert, sowie dort aktiviert wurden und daraufhin IFN- $\gamma$  produzierten. Hierbei korrelierte die Rekrutierung der NK-Zellen mit der Induktion einer T<sub>H</sub>1-Antwort<sup>148</sup>.

In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass das durch NK-Zellen produzierte IFN- $\gamma$  die DC-Reifung fördert, welche wiederum aktivierend auf die T-Zellantwort wirkt<sup>149</sup>. Schenkt man diesen drei unabhängigen Studien Glauben, könnte es also sein, dass NK-Zellen einen initialen Effekt auf das Tumorstadium sowie die Induktion von T-Zellen haben.

Um die These zu überprüfen ob NK-Zellen einen initialen Einfluss auf das B16-F10 Wachstum haben, wurden in einem therapeutischen Tumorexperiment (3.7.1) direkt mit Beginn der ersten Vakzinierung parallel NK-Zellen depletiert. Das Ergebnis zeigt, dass nach der Depletion der therapeutische Effekt von Mut-30 RNA fast völlig verloren geht (Abb. 3.20d) und untermauert die These, dass NK-Zellen bei dem gezeigten Effekt eine zentrale Rolle spielen.

Es ist bereits beschrieben, dass NK-Zellen eine Schlüsselrolle in der natürlichen frühen angeborenen Immunabwehr gegen den B16-F10 Tumor einnehmen<sup>150</sup>. NK-Zellen haben einen MHC Klasse-I spezifischen Rezeptor und verlieren ihr inhibitorisches Signal, wenn sie auf MHC Klasse-I defiziente Zellen treffen, die sie erkennen und zerstören<sup>151,152</sup>. Aktivierte NK-Zellen gehören in der frühen, unspezifischen Phase der Tumorerkennung, zu den Hauptproduzenten von IFN- $\gamma$ , was wiederum zu einer Aktivierung von DCs führt. Diese wiederum produzieren IL-12, um T-Zellen zu stimulieren und im Zusammenspiel mit der Antigenpräsentation eine spezifische anti-tumorale adaptive Immunantwort induzieren. Es wurde bereits *in vivo* (Abb. 3.14b) sowie *in vitro* (Abb. 3.19) gezeigt, dass es nach IFN- $\gamma$  Behandlung zu einer Hochregulierung der MHC Klasse I Moleküle auf den B16-F10 Zellen kommt, was wiederum dazu führt, dass die Tumorzellen nicht mehr unspezifisch von NK Zellen erkannt und zerstört werden können.

Um zu beweisen, dass der gezeigte anti-tumorale Effekt der Mut-30 Vakzinierung nicht primär unspezifisch ist, sondern dass NK-Zellen vielmehr nur einen initialen Einfluss haben, wurde das therapeutische Experiment in einem neuen Setting wiederholt (3.7.2). Hierbei wird davon ausgegangen, dass der eigentliche therapeutische Effekt auf die induzierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen zurückzuführen ist. Um der adaptiven Immunantwort Zeit zu geben wurde der depletierende Antikörper erst mit der dritten Vakzinierung (Tag 11) verabreicht. Dies ermöglichte zu analysieren welchen Einfluss NK-Zellen zu einem späteren Zeitpunkt auf das Tumorstadium und den therapeutischen Effekt der RNA Vakzinierung haben. Das Ergebnis zeigte, dass im fortgeschrittenen Tumor die NK Zellen keinen relevanten Beitrag mehr zum anti-tumoralen Effekt der RNA Vakzinierung leisten. Dieser Befund steht im Einklang mit der Rolle der „innate immunity“ als erste schnelle Verteidigung des Organismus gegenüber Infektion oder maligner Entartung. Die Analyse der beiden Experimente beweist, dass NK-Zellen im frühen Stadium der Therapie eine wesentliche Rolle spielen, hingegen der langfristige antitumorale Effekt durch mutations-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen induziert wird.

#### 4.2.6 RNA aktiviert NK-Zellen via DCs

Im Ergebnissteil dieser Arbeit wurde bereits diskutiert, welchen Einfluss die von uns verwendete RNA auf NK-Zellen hat. So wurde von Lena Kranz bereits gezeigt, dass es zu einer unspezifischen Aktivierung von NK-Zellen nach Immunisierung mit RNA kommt (Kranz *et al.*, in Arbeit). Die Gruppe um Bourquin

belegte, dass dieser Aktivierung durch DCs vermittelt wird. Die Zytokine IL-12 und IFN- $\alpha$  spielen hier eine zentrale Rolle. Bourquin zeigte, dass vor allem IL-12 unverzichtbar für die Aktivierung von NK-Zellen ist<sup>54</sup>. Das auch IFN- $\alpha$  direkt aktivierend auf NK-Zellen wirkt wurde bereits in der Vergangenheit publiziert<sup>153</sup>. Auch die Proliferation, sowie das „Cross-priming“ von dendritischen Zellen wird durch IFN- $\alpha$  unterstützt<sup>154, 155</sup>. Die Verwendung von RNA fördert gewissermaßen den schon natürlichen Effekt von NK-Zellen auf das Tumorgewebe. Wie genau IFN- $\alpha$  auf NK-Zellen wirkt bleibt noch zu klären.

Ein weiterer Punkt über den nur spekulativ diskutiert werden kann ist die Rolle von APCs bei den gezeigten Effekten. Wie dargelegt, wurde in einigen Arbeiten, bereits festgestellt, dass es bei der initialen Immunabwehr von MHC-I supprimierten Tumorzellen zu einer Kaskade kommt, bei der NK-Zellen am Ausgangspunkt stehen<sup>156</sup>. Dort wurde ein Mechanismus beschrieben, durch den angeborenes und adaptives Immunsystem miteinander verbunden sind und dieser Mechanismus ebenfalls zur Induktion tumorspezifischer T-Zellen führt. Nach Verabreichung von MHC-I supprimierten Tumorzellen werden NK-Zellen aktiviert und fangen an IFN- $\gamma$  zu sezernieren. Infolgedessen wurden endogene APCs durch die aktivierten NK-Zellen zur Synthese von IL-12 angeregt, wodurch zytotoxische T-Zellen gebildet und ein immunologisches Langzeitgedächtnis induziert wurde<sup>157,158</sup>. Da eine APC Aktivierung bereits in einem sehr frühen Stadium der immunologischen Tumorantwort stattfindet, wurde in den von uns analysierten durchflusszytometrischen Daten von Tumoren, keine Unterschiede bezüglich der APC-Aktivierung zwischen der unbehandelten und der mit Mut-30 RNA behandelten Gruppe beobachtet. Auch ein IL-12 spezifischer ELISA aus Tumorlysat brachte keine weitere Information (Daten nicht gezeigt). Zur Klärung der Frage einer möglichen Interaktion zwischen RNA Vakzinierung und NK Zellen sind weitere Studien notwendig, in welchen z.B. gezielt DC depletiert werden um den Einfluss auf den Funktionszustand der NK Zellen zu studieren.

#### **4.2.7 Mut-30 spezifische T-Zellen invadieren den Tumor**

In vielen humanen soliden Tumoren ist die Infiltration von T-Zellen ein positiver Prognosefaktor für die Überlebensdauer der Patienten. So zeigten Untersuchungen von Melanom- und CRC- (Colorectal Cancer) Patienten eine gesteigerte 5-Jahres Überlebensrate, wenn sich eine erhöhte Anzahl an T-Zellen im Gewebe des Tumors fand<sup>159,160</sup>.

Durch die Isolierung von Lymphozyten aus dem Tumorgewebe und deren Einsatz als Effektorzellen im IFN- $\gamma$  ELISPOT wurde nachgewiesen, dass Mut-30 spezifische T-Zellen das Tumorgewebe infiltrieren und dort IFN- $\gamma$  sekretieren (3.5.4). Die Anreicherung antigenspezifischer T-Zellen im Tumor kann entweder durch antigeninduzierte Proliferation oder durch eine verlängerte Retentionszeit der T-Zellen erklärt werden. Die infiltrierenden T-Zellen verzögerten das Tumorstadium zwar signifikant, jedoch wurde es nicht kontrolliert. Möglicherweise war die Frequenz der infiltrierenden T-Zellen zu gering um das Tumorstadium aufzuhalten. Bei einem Vergleich zwischen der Immunreaktion der Mut-30 spezifischen T-Zellen aus der Milz (3.5.1) mit der Immunreaktion der isolierten Lymphozyten aus dem Tumorgewebe (3.5.1), fällt auf, dass die Frequenz der spezifischen TILs bei allen Tieren quantitativ schwächer ausfällt. Scheinbar ist die antigenspezifische Aktivierung von T-Zellen nicht nur die Voraussetzung für die Proliferation sondern auch für das Migrationsverhalten von T-Zellen. Ein Zusammenhang von verringerter Migration und der Präsenz von antigenspezifischen T-Zellen wurde

bereits nachgewiesen<sup>161</sup>. Andererseits wurde auch beobachtet, dass es nach Antigenkontakt zu einer starken Migration von T-Zellen in den peripheren Lymphknoten kommt<sup>162</sup>. Der Kontakt zu einem Antigen in sekundären lymphischen Organen führt nach lokaler Expansion zu einer Migration der T-Zellen in die peripheren Organe, aber nicht notwendigerweise zu einer starken Infiltration des Tumorgewebes. Hier liegt eine der Herausforderungen zur Weiterentwicklung des therapeutischen Konzeptes. Ein von uns verfolgter Ansatz zur Erhöhung der Frequenz antigenspezifischer T-Zellen im Tumor ist die Nutzung oligotoper Mutanomimpfstoffe. Darüber hinaus wird in zukünftigen Studien die Möglichkeit der Kombination mit Immunmodulatoren wie z.B. anti-PD1 Antikörpern zu untersuchen sein.

#### 4.2.8 IFN- $\gamma$ spielt eine zentrale Rolle für den gezeigten anti-tumoralen Effekt

Die durchflußzytomtrische Analyse der MHC Expression auf explantierten B16-F10 Tumoren ergab, dass es nach Mut-30 RNA Vakzinierung zu einer signifikanten Erhöhung der MHC-Klasse I und II Expression im Vergleich zur unbehandelten Gruppe kommt (Abb. 3.19b+c). Die gezeigten Ergebnisse stimmen mit den *in vitro* Studien (3.5.3) überein, in denen beobachtet wurde, dass B16-F10 Zellen nach Inkubation mit rekombinanten IFN- $\gamma$  ihre MHC Moleküle hochregulieren. Eine mögliche Erklärung ist, dass Mut-30 spezifische T-Zellen das Tumorgewebe infiltrieren und nach Kontakt mit dem passenden Epitop IFN- $\gamma$ , sowie TNF- $\alpha$  sezernieren, was wiederum zu einer Wachstumshemmung und einer Hochregulierung der MHC Expression führt. Um diese These zu stützen wurden Tumore von IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> K.O., sowie C57BL/6 Wildtyp Mäuse nach Mut-30 Vakzinierung *ex vivo* analysiert (Abb. 3.18). Das Ergebnis zeigt, dass bei IFN- $\gamma$ -defizienten Mäusen deutlich weniger MHC Moleküle bei gleicher Mut-30 RNA Vakzinierung exprimiert werden und ist somit ein weiteres Indiz für die These, dass der beobachtete anti-tumorale Effekt auf IFN- $\gamma$  und letztlich auf spezifische tumorinfiltrierende T-Zellen zurückzuführen ist. Um die Annahme weiter zu belegen wurde ein therapeutisches Tumorexperiment mit IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> K.O., sowie C57BL/6 Wildtyp Mäusen durchgeführt (3.7.3). Die Analyse zeigt, eine signifikante Verschlechterung des anti-tumoralen Effektes nach Mut-30 Vakzinierungen in IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> K.O. Mäusen. Eine weitere Beobachtung die aus diesem Experiment hervorging, war, dass die Tumore in den IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> K.O. Mäuse deutlich früher anfangen zu wachsen. Diese Fakten sprechen für eine therapeutische Rolle von IFN- $\gamma$  in der Tumorkontrolle.

Wie in verschiedenen Studien bereits zusammengefasst wurde, sind die Effekt von IFN- $\gamma$  auf das Tumormikromilieu und den Tumor selbst vielfältig<sup>163,164</sup>. So werden beispielsweise Makrophagen aktiviert, die Expression verschiedener Oberflächenmarker, wie z.B. MHC-Moleküle oder FasL (Fas ligand bzw CD95L) auf den Tumorzellen erhöht und die Differenzierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu T<sub>H</sub>1-Lymphozyten induziert. Die Vielfalt der Effekte von IFN- $\gamma$  verdeutlicht, dass es über mehrere Signalketten antitumorale Effekte induzieren kann.

Eine mögliche Erklärung für das frühe sterben der IFN- $\gamma$  defizienten Tiere liegt darin, dass das Wachstum von Tumoren entscheidend von ihrer Durchblutung abhängig ist. So wurde nachgewiesen, dass es zur Nekrose innerhalb des Tumors kommt, wenn ein zu schwach ausgebildetes Gefäßsystem bestand. In den entsprechenden Experimenten wurde an verschiedener Stelle gezeigt, dass IFN- $\gamma$ <sup>165,166,128</sup> einen entscheidenden Einfluss auf die Vaskularisierung des Tumorgewebes hat.

Die bis hierhin diskutierten Ergebnisse kommen zum dem Schluss, dass Mut-30 spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen das Tumorgewebe infiltrieren und es unter anderem durch die spezifische Ausschüttung von IFN- $\gamma$  zu einer signifikanten Verzögerung im Tumorwachstum, sowie einer höheren Überlebensrate der Mäuse kommt. Die gezeigten und diskutierten Ergebnisse beinhalteten hauptsächlich *in vivo* gemachte Beobachtungen. Eine direkte Erkennung von B16-F10 Zellen durch Mut-30 spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurde in den durchgeführten Experimenten nicht beobachtet (Abb. 3.14c). Auch nach der Inkubation der B16-F10 Zellen mit rekombinantem mIFN- $\gamma$ , das eine deutlich messbare Hochregulierung der MHC Moleküle zu Folge hat, wurde keine direkte Erkennung der Tumorzellen nachgewiesen. Auch bei ausreichender Expression von MHC-II Molekülen erfolgt also keine Erkennung der Tumorzellen. Es stellt sich daher die Frage ob B16F10 entweder nicht über eine ausreichende Expression von Kif18b verfügt, oder ob die Zelllinie nicht in der Lage ist das Epitop zu prozessieren und daher die Hochregulation der MHC-II Moleküle wirkungslos blieb. Da es nach der Elektroporation des Mut-30 Antigens in B16-F10 Zellen zu einer starken Immunreaktion kommt, kann die Hypothese der fehlenden korrekten Prozessierung ausgeschlossen werden. Momentan bleibt daher die Annahme der niedrigen Expression als Ursache für die fehlende *in vitro* Erkennung. Milzzellen von Mäusen, die mit dem Minitop *TYRP1* (Tyrosinase-related protein 1) immunisiert wurden, sind in der Lage B16-F10 Zellen *in vitro* zu erkennen (Daten nicht gezeigt). Das TYRP1 Epitop zeigt eine Expression von durchschnittlich 1672 RPKM (Reads per kilobase per million Reads, Methode zur Quantifizierung von Transkriptomdaten<sup>167</sup>), KIF18b weist hier nur eine geringe Expression von durchschnittlich 9 RPKM auf.

Die diskutierten Befunde legen nahe dass der beobachtete anti-tumorale Effekt nicht über eine direkte Erkennung der Tumorzellen induziert wird sondern durch die Epitoppräsentation von APC im Tumor, welche das mutierte Kif18b sekundär aufnehmen.

#### 4.2.9 Mut-30 spezifische T-Zellen beeinflussen das Tumormikromillieu

Um der Frage nachzugehen, welchen Einfluss die Mut-30 spezifischen T-Zellen auf das Tumormikromillieu haben, wurden Tumore von behandelten, sowie unbehandelten Mäusen durchflusszytometrisch untersucht (3.6.1). Die Analyse der Tumore verdeutlicht die enorme Heterogenität des B16-F10 Melanoms. Der Anteil an CD45<sup>+</sup> Zellen lag im Mittel bei ca. 10% wobei es hier starke Schwankungen zwischen den einzelnen Tumoren gab. Die weitere Analyse ergab, dass sich im Tumorgewebe von mit Mut-30 RNA behandelten Tieren signifikant mehr CD4<sup>+</sup>, sowie CD8<sup>+</sup> T-Zellen befanden. Diese Beobachtung lässt den Rückschluss zu, dass es sich um eine spezifische Immunreaktion gegen den Tumor handelt. Das Einwandern von signifikant mehr CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Tumoren mit Mut-30 RNA behandelten Tieren lässt die Vermutung zu, dass es nach der Vakzinierung zu einem möglichen „epitop spreading“ kommt. Es gibt aber keinen Hinweis für eine therapeutische Relevanz von CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach der Vakzinierung mit Mut-30 RNA. Letztlich kann die starke Infiltration auch dadurch erklärt werden, dass es durch die von den spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen sekretierten Zytokine und dem so ausgelösten Entzündungsprozess bzw. während der primären Abstoßungsphase infolge der Zerstörung von Tumorzellen zu einer weiteren Rekrutierung von Effektoren der adaptiven Immunantwort kommt.

#### 4.2.10 Spezifischer Einfluss auf T-regs

Von uns wurde nachgewiesen, dass sich nach liposomaler Mut-30 Behandlung signifikant weniger regulatorische T-Zellen im Tumor befanden (Abb. 3.17b). In humanen Tumoren wurde bereits gezeigt, dass die Infiltration von T-regs in den meisten Fällen mit einer schlechten Prognose korreliert<sup>168</sup>. Ergebnisse von Suttmüller *et al.* zeigen, dass die Depletion von CD4<sup>+</sup> / CD25<sup>+</sup> T-Zellen auch im murinen B16 Melanommodell zu reduziertem Tumorwachstum führt, was in deren Arbeit auf eine verstärkte Aktivierung von Antigen spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen zurück geführt wurde<sup>169</sup>. Des Weiteren ist bekannt, dass die Depletion von T-regs mittels  $\alpha$ -CD25 Antikörper<sup>170</sup> und auch die spezifische Depletion von Foxp3<sup>+</sup> T-Zellen<sup>171, 80</sup> das progressive Melanomwachstum verhindern kann.

Eine mögliche Erklärung für die verringerte Infiltration von T-regs liefert die ebenfalls beobachtete verringerte Infiltration von MDSC in das Tumorgewebe. Interessanterweise zeigte Schlecker *et al.* eine direkte Korrelation der Infiltration von T-regs verbunden mit der Anzahl von MDSC im Tumor<sup>172</sup>. Sie führen diese Korrelation direkt auf das von MDSC ausgeschüttete Chemokin CCR5 zurück. Diese These unterstützt die oft diskutierten regulatorischen Eigenschaften von MDSC und könnte eine mögliche Erklärung für den beobachteten Effekt sein.

Eine weitere Theorie besagt, dass T-regs nicht im eigentlichen Sinne „rekrutiert“ werden, sondern „naive“ T-regs erst im Tumor ihren supprimierenden Phänotyp erlangen. Welcher Phänotyp sich schlussendlich entwickelt, ist abhängig von den Zytokinen in der unmittelbaren Umgebung der Zelle. Hierbei spielen die antiinflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor  $\beta$ ) eine zentrale Rolle<sup>173</sup>. Spezifische T<sub>H</sub>1-CD4<sup>+</sup> T-Zellen sezernieren Zytokine wie IL-2, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  und sorgen mit dieser Kombination aus Zytokine dafür, dass naive CD4<sup>+</sup> Zellen nicht zu T-regs sondern zu T<sub>H</sub>-Effektorzellen differenziert werden. Dieser These folgend, ergibt sich eine mögliche Theorie warum wir nach liposomaler Mut-30 Behandlung signifikant weniger regulatorische T-Zellen im Tumor finden.

#### 4.2.11 Spezifische CD4<sup>+</sup> T-zellen fördern Makrophagen und hemmen MDSC im Tumor

Die Analyse der tumorinfiltrierenden Lymphozyten zeigte, dass sich im Tumor von Mut-30 RNA behandelten Tieren signifikant weniger MDSCs befinden als in Tumoren nach Behandlung mit Kontroll-RNA. Es stellt sich daher die Frage ob es einen Zusammenhang zwischen der Induktion Mut-30 spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen und der verminderten Frequenz an MDSC gibt. Hierfür gibt es unterschiedliche in der Literatur diskutierte Erklärungsansätze: Verschieden Studien haben gezeigt, dass humane sowie murine MDSCs die Rekrutierung, Differenzierung und Expansion von T-regs fördern. Abhängig vom jeweiligen Tumortyp war die Induktion TGF- $\beta$  und IL-10 abhängig<sup>174</sup> sowie beeinflusst von der CD40 Expression<sup>175</sup> auf MDSCs. Auch Schlecker *et al.* zeigte in verschiedenen Tumormodellen, dass eine Infiltration von T-regs direkt mit der Anzahl von MDSC im Tumor korreliert<sup>172</sup>. Zahlreiche weitere Studien belegen eine Interaktion beider suppressiver Zellpopulation, wenn auch der Mechanismus gegenseitiger Induktion bisher nicht vollständig aufgeklärt ist.

Eine mögliche Erklärung für die geringe Infiltration von MDSC in das Tumorgewebe nach Mut-30 RNA Vakzinierung könnte also in der ebenfalls beobachteten und diskutierten niedrigen Frequenz von T-regs liegen. Literaturrecherchen belegen, dass es zwischen T-regs und MDSC zum sogenannten „crosstalk“ also zu einer Interaktion zwischen den zwei Zelltypen kommt und eine Anreicherung des jeweiligen

Zelltypen zur Rekrutierung des anderen führt<sup>172,176</sup>. Wie auch bei anderen Zelltypen erfolgt die Rekrutierung, Aktivierung und Expansion von MDSC mitunter über Zytokine, die so vielfältig sind wie die Mechanismen, über die MDSC eine Immunreaktion bewirken können<sup>177</sup>.

Bei der weiteren Analyse stellte sich heraus, dass die Zahl infiltrierender Makrophagen nach Mut-30 RNA Vakzinierung im Vergleich zur Wildtypkontrolle erhöht war. Es wäre möglich, dass es infolge des Erkennens der B16-F10 Tumorzellen durch spezifische Mut-30 T-Zellen zur vermehrten Synthese chemotaktischer Zytokine wie beispielsweise MIP-1a oder -1 $\beta$  (macrophagen inflammatory protein-1a und 1 $\beta$ ) im Tumorgewebe kam, wodurch die Infiltration zu erklären wäre<sup>178</sup>. Es kann spekuliert werden, dass die Makrophagen auf der einen Seite selbst anti-tumoral wirken, demnach als Effektorzellen fungieren<sup>179</sup> aber auf der anderen Seite jedoch regulatorische Funktionen ausüben, in dem sie infolge direkter Zellkontakte mit einwandernden T-Zellen z.B. IL-12 sezernieren, das wiederum die Synthese von IFN- $\gamma$  durch T-/ oder NK-Zellen fördert<sup>180</sup>.

#### **4.2.12 Mut-30 spezifische T-Lymphozyten migrieren in das Zentrum der Tumore**

Die Immunfluoreszenzfärbung des Tumorgewebes bestätigte die Infiltration der CD4<sup>+</sup>, sowie CD8<sup>+</sup> T-Zellen in das Tumorgewebe (3.6.1.1). Die eigentliche interessante Beobachtung hierbei ist, dass die T-Zellen in den unbehandelten Tieren in der Peripherie des Tumors zu „stecken“ scheinen, diesen also nicht infiltrieren können, während in der behandelten Gruppe eine homogene Infiltration vorliegt. Das Fehlen einer deutlichen und bis in den Kern des Tumors vordringenden Lymphozyteninfiltration in den Kontrolltieren ist im sogenannten metabolischen Mikromillieu der Tumore zu suchen. Ein Charakteristikum für einen schnell wachsenden soliden Tumor ist intratumorale Hypoxie, sowie Nährstoffarmut bedingt durch absterbende bzw. tote Zellen und den erhöhten Sauerstoffverbrauch durch lebende Tumorzellen<sup>181,182</sup>. Ein weiterer Grund ist die Unterversorgung mit Blutgefäßen die aufgrund des schnell wachsenden Tumors noch nicht gebildet wurden. In den Arbeiten von Jerome Galon zum Immunoscore (klinisches Bewertungssystem zu Prognose von Krebs) wird ein vordringen der T-Zell bis in den „Kern“ des Tumores mit einer positiven Prognose für den Patienten assoziiert<sup>183</sup>. In der Zusammenschau kann daher geschlossen werden das mutationsspezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen trotz des immunsuppressiven Tumormikromillieus in der Lage sind den Tumor effektiv zu invadieren und dort ihre Effektorfunktionen auszuüben.

#### **4.2.13 CD4<sup>+</sup> T-Zellen als Effektoren**

Da es sich bei dem Mut-30 Antigen um ein MHC Klasse II restringiertes Epitop handelt, wurde erwartet, dass eine Depletion der CD4<sup>+</sup> Population einen drastischen Effekt auf den positiven Verlauf des Tumorwachstums hat. Überraschenderweise zeigte sich kein Effekt in dem Wachstumsverhalten verglichen mit der nur mit Mut-30 RNA behandelten Gruppe die keinen Depletionsantikörper enthielt (Abb. 3.20d). Eine signifikante Verschlechterung durch CD4<sup>+</sup> Depletion stellte sich allerdings bei der Auswertung der Überlebenskurve heraus (Abb. 3.20d). Die Depletion zu einem späteren Zeitpunkt zeigte in etwa das gleiche Ergebnis (Abb. 3.21d). Eine Erklärung für die ausbleibende Verschlechterung des Tumorwachstums liegt in der Verwendung des  $\alpha$ -CD4 Antikörpers (YTS191). Durch die Depletion werden alle spezifischen- aber auch alle supprimierenden T-Helfer Zellen (T-regs) eliminiert, was alleine schon ausreicht, um einen signifikanten therapeutischen Effekt gegen das maligne Melanom zu erzielen<sup>80</sup>.

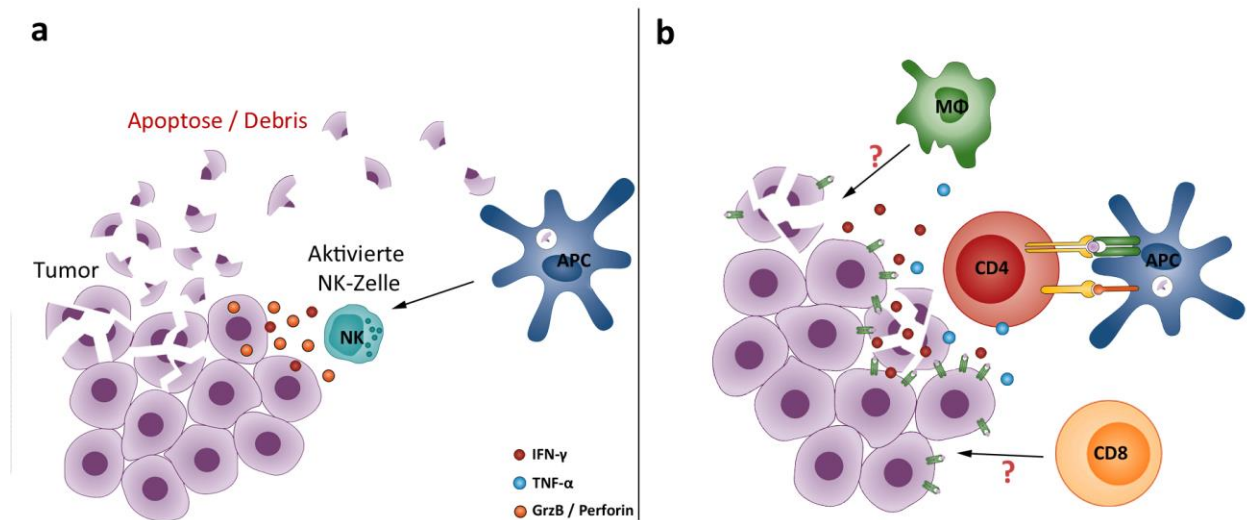
Interessant ist jedoch, dass sich der negative Effekt in der Überlebenskurve der Tiere zu zeigen scheint. So überlebte in beiden unabhängigen therapeutischen Depletionsexperimenten jeweils nur ein Tier in den mit dem  $\alpha$ -CD4 Antikörper behandelten Gruppen verglichen mit jeweils 5 überlebenden Tieren in der mit ausschließlich Mut-30 RNA behandelten Gruppe. Es zeigt, dass die Mut-30 spezifischen T-Zellen nicht nur als „Helfer“ gegen supprimierende T-regs sondern längerfristig als Effektorzellen via IFN- $\gamma$  benötigt werden. Kline *et al.* beobachtet diesen Effekt ebenfalls. Deren Versuchsansatz sah vor, CD25<sup>+</sup> T-Zellen jeweils von C57BL/6 oder IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> K.O. Mäusen in tumortragende (B16.SIY) immundefiziente Mäuse (RAG<sup>-/-</sup>) zu transferieren. So zeigten die IFN- $\gamma$  defizienten Zellen nur noch einen schwachen Effekt auf das Tumorwachstum. Als Hauptproduzenten wurden auch hier CD4<sup>+</sup> T-Zellen identifiziert<sup>184</sup>.

#### 4.2.14 Einfluss von CD8<sup>+</sup> T-Zellen

Als dritte tumorinfiltrierende Lymphozytenpopulation wurden CD8<sup>+</sup> T-Zellen depletiert. Die Analyse ergab, dass acht von zehn Tieren das Tumorexperiment überlebten. Auf den ersten Blick scheint das Ergebnis kontrovers zu sein, weil erwartet wurde, dass die Depletion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu einer Verschlechterung der therapeutischen Wirksamkeit führen würde. Gemäß der Hypothese des „epitope spreadings“ wäre eine Abhängigkeit des therapeutischen Effektes von der CD8<sup>+</sup> T-Zellpopulation zu fordern. Demzufolge kann momentan für den durch Mut-30 vermittelten therapeutischen Effekt nicht von einem „epitope spreading“ für MHC-I restringierte Epitope, als dominanter anti-tumoraler Mechanismus, ausgegangen werden. Ob CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach „epitope spreading“ zumindest einen subdominanten therapeutischen Effekt haben kann momentan nicht geklärt werden. Dies ist in dem Phänomen begründet, dass es nach der Depletion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu einer starken Proliferation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen kam. In den meisten Tieren kam es zu einer Verdoppelung der absoluten CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Darauf aufbauend, wurde die These verfasst, dass es nach der CD8<sup>+</sup> Depletion auch zu einer Vermehrung von Mut-30 spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen kommt und diese wiederum für den positiven Effekt auf das Tumorwachstum sowie das Überleben der Mäuse verantwortlich sind. Um die These zu stützen wurden Wildtypmäuse mit Mut-30 RNA behandelt, wobei eine Gruppe zusätzlich den  $\alpha$ -CD8 Antikörper verabreicht bekam. Das ELISPOT Ergebnis zeigte, dass es in den mit Antikörper behandelten Tieren auch signifikant mehr spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen gab (Abb. 3.20c). Die gezeigte Verbesserung des antitumoralen Effektes nach  $\alpha$ -CD8 Antikörpergabe kann also auf die verstärkte Proliferation von spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen zurückgeführt werden.

#### 4.2.15 NK und spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen wirken in einem zwei Phasenmodell

Zusammenfassend lässt sich aus eigenen Ergebnissen und Literatur folgendes zwei Phasenmodell bezüglich der Rolle von Mut-30 spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Tumorummunität erstellen:



**Abb. 4.4** Zwei-Phasen-Modell der Tumorummunität *in vivo* (a) Frühe Phase: Tumorzellen werden von NK-Zellen erkannt und lysiert. Anschließend erfolgt die Aufnahme der apoptotischen Tumorzellen durch unreife APCs, welche nun matriieren und spezifische T-Zellen aktivieren. (b) Späte Phase: Die spezifisch proliferierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen migrieren in das Tumorgewebe und sezernieren IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  was zu einer Verlangsamung des Tumorwachstums sowie zu einer erhöhten Expression von MHC Molekülen auf dem Tumor führt. Durch die entstandene Entzündung migrieren weitere Zellen des adaptiven Immunsystems in den Tumor.

T-Zellen können den Tumor primär nicht ohne vorherige Aktivierung erkennen und bekämpfen. Dazu bedarf es Zellen des angeborenen Immunsystems, wie z.B. NK-Zellen, welche den MHC defizienten Tumor direkt initial lysieren können und dadurch Antigene im Tumor freisetzen. Dieser bereits natürlich vorhandene Mechanismus wird durch den aktivierenden Effekt von IFN- $\alpha$  noch einmal verstärkt. Die durch die Lyse freigesetzten Tumorbestandteile werden von unreifen APCs aufgenommen, prozessiert und nach Maturierung der DCs auf MHC Molekülen den T-Zellen präsentiert. Diese werden aktiviert und tumorspezifische Mut-30 T-Zellklone werden zur Proliferation angeregt, wodurch diese Zellen wiederum in das Tumorgewebe infiltrieren und nach Erkennung des spezifischen Antigens anfangen IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-2 zu sezernieren. Die ausgeschütteten Zytokine haben einen direkten Effekt auf den Tumor und hemmen beispielsweise durch IFN- $\gamma$  das progressive Tumorwachstum und sorgen zudem für eine Hochregulierung der MHC Moleküle, wodurch der Tumor wiederum zugänglicher wird für weitere Zellen des adaptiven Immunsystems. Da es sich bei Mut-30 restringierten Zellen um spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen handelt wirken diese im Sinne des „DC licensing“ Modells einer Suppression der Immunantwort durch MDSC oder T-regs entgegen.

Dieser Mechanismus reicht allerdings nicht aus, um einen bereits etablierten Tumor zu vernichten und zeigt, dass weitere T-Zellen nötig sind. Die Idee des IVAC Ansatzes sieht vor einen polyklonalen Impfstoff zu verabreichen und bietet die Möglichkeit an den hier untersuchten Effekten anzuknüpfen. Es ist denkbar, dass z.B. eine Kombination aus Mut-30<sup>+</sup> spezifischen T-Zellen mit weiteren für den Tumor

spezifischen zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu einem noch stärkeren Effekt führt und eine Zerstörung von einem bereits etablierten Tumor möglich ist.

### 4.3 Etablierung eines RNA Polytop Formates zur Vakzinierung mehrerer Tumor spezifischer Antigene

Wie bereits beschrieben hat die Gruppe um Prof. Ugur Sahin in den letzten Jahren ein stetiges Interesse an der Optimierung eines rationalen RNA Impfstoffdesigns gehabt<sup>185,186,49</sup>. Die Bemühungen eine funktionierende, auf RNA basierende Vakzine zu entwickeln setzt voraus, dass alle Schritte der Antigenprozessierung und Antigenpräsentation ausgenutzt und optimiert werden. (i) Alle immunogenen intrazellulären Moleküle werden durch einen komplexen Metabolismus zu Peptidfragmenten degradiert. Dies passiert mit allen Proteinen die von der Zelle selbst synthetisiert werden, aber ebenso mit Proteinen aus dem Extrazellularraum die von der Zelle aufgenommen werden. Beide, also der „endogene“ sowie der „exogene“ Weg teilen sich viele Gemeinsamkeiten, sind jedoch an verschiedenen Schlüsselstellen verschieden. Wichtig ist, dass beide Wege schlussendlich zur Degradierung von Proteinen in Peptide führen. (ii) Die gebildeten Peptidfragmente binden an spezifische MHC Moleküle und (iii) wenn dieser Peptid-MHC-Komplex geformt ist, wird er an die Zelloberfläche transportiert wo er von spezifischen TCRs erkannt und gebunden wird<sup>187,56</sup>. Das Ziel der IVAC-Studie ist es, eine Multi-Epitop Vakzine zu designen, die alle eben beschriebenen Schritte nutzt, um eine bestmögliche Präsentation der kodierten Epitope zu gewährleisten. Die Durchführbarkeit wurde bereits für verschiedene Pathogene und Viren auf Basis von DNA beschrieben<sup>188,189,190,191</sup>.

Auch im murinen Modellsystem wurde bereits gezeigt, dass das Ansprechen multipler zytotoxischer T-Zellen mittels einer DNA möglich ist<sup>192</sup>. Demnach können Multi-Epitop Vakzine, die mehrere MHC-Klasse-I und -II Epitope enthalten entwickelt und gezeigt werden, dass die Präsentation und Erkennung für alle Epitope erhalten blieben.

Es gibt Untersuchungen, die zeigen, dass allein die Anordnung der Epitop-Sequenz in einem Multi-Epitop Effekte auf die *in vivo* Immunität des Multi-Epitops hat<sup>193</sup>. Um zu überprüfen, inwiefern die Position des einzelnen Epitops im Multi-Epitop Einfluss auf die Immunogenität hat, wurden drei verschiedene Pentatop-Konstrukte kloniert mit dem immundominanten SIINFEKL-Epitop jeweils positionsalternierend (Abb. 3.23). Das Ergebnis der Tetramer Blutanalyse an den Tagen 7 und 14 zeigt, dass die N-Terminale Position des Epitops eine signifikante Verbesserung der Immunantwort zur Folge hat. Eine mögliche spekulative Erklärung für den beobachteten Unterschied liefert der Abstand des Antigens zur Sekretionsdomäne. Weitere Untersuchungen müssen klären ob die Induktion von spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch einen polytopen RNA Impfstoff direkt mit der Entfernung zur Sekretionsdomäne zu korrelieren.

Um die Möglichkeit auszuschließen, dass sich sogenannte Verknüpfungsepitope („Junctional Epitopes“) also Überlappungsfehler der Epitopbereiche bilden, wurden Linker-Sequenzen eingefügt. Die Entstehung von Verknüpfungsepitopen stellt aus folgendem Grund ein Problem für die Entwicklung einer Multi-Epitop Vakzine dar. Die Erzeugung von „neuen“ unbeabsichtigten Epitopen kann eine nicht vorhersehbare T-Zell Spezifität im Vakzine Empfänger auslösen, die jedoch nicht gegen den Tumor

gerichtet ist, sondern möglicherweise gesunde Zellen angreift. Die schon erwähnten Linker-Sequenzen verhindern durch abwechselnde Glycin/Serin-Sequenzen eine Bindung unerwünschter Sequenzen auf den MHC-Molekülen. In einem unabhängigen Experiment wurde gezeigt, dass keine Immunität gegen die Linker-Sequenzen induziert wird (Daten nicht gezeigt). Da die Linker Sequenz ziemlich stabil gegenüber Proteasen ist, sorgt die Verwendung der Glycin/Serin-Sequenzen dafür, dass das Proteasom nur innerhalb der 27mer Epitopsequenzen schneidet.

Die Gruppe um Livingston zeigte in ihren auf DNA basierenden Experimenten eine deutliche Verstärkung der Immunantwort durch die Verwendung von Glycin/Prolin Linker erzeugen<sup>193</sup>. Inwiefern die Verwendung dieser Linker Kombinationen auch in dem hier angewandten Rahmen eine Verbesserung bringt, sollte Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein. Allerdings ist anzumerken, dass Livingston ausschließlich Minimalepitope in sein Multi-Epitop Vakzine eingebaut hat, es ist also nicht darauf angewiesen, dass das Proteasom innerhalb der Epitopsequenz schneidet.

In praktisch allen Veröffentlichungen werden die Epitope von Multi-Epitop-Konstrukten entweder auf eine MHC-I oder eine MHC-II basierende Immunität ausgelegt. In dem hier untersuchten auf RNA basierenden Impfstoff sollte eine MHC-I, sowie –II Antwort möglich sein. So wurde in die bereits beschriebenen Modellvarianten jeweils ein MHC Klasse II restringiertes Epitop (OVA-II) eingebaut. Da keine Tetramer Ab vorlagen, wurde die Immunogenität via ELISPOT überprüft. Das Ergebnis zeigt (3.8.1), dass es für das OVA-II Epitop zu einer identisch starken Immunreaktion in allen drei Positionsvarianten kommt. Immundominanzeffekte, die zur Ausbildung einer Hierarchie in der Stärke der induzierten zellulären Immunantwort führen, sind bei Immunisierungen mit mehreren Antigenen ein häufig auftretendes Problem. Eine Ursache für diesen Effekt liegt in der aktiven Suppression subdominanter CD8<sup>+</sup> T-Zell Antworten<sup>194</sup>. Daher besteht die Möglichkeit, dass für die ausbleibende Immunreaktion von Trp2 (H2-Kb) das SIINFEKL (H2-Kb) Epitop verantwortlich ist. Dass es sich bei SIINFEKL um ein immundominantes Epitop handelt wurde in einem Folgeexperiment gezeigt (3.8.2). Der Vergleich zwischen Monotop und Pentatop zeigt auch für das CD8<sup>+</sup> restringierte VSV-NP (H2-Kb) Epitop eine signifikante Verbesserung, wenn es als Monotop verwendet wird. Auch dieses Ergebnis ist auf die sehr starke Immundominanz (40% CD8<sup>+</sup>) von SIINFEKL zurückzuführen. Gegenstand zukünftiger Experimente sollte sein, dieses Experiment unter Verwendung eines weniger immundominanten Epitops wie beispielsweise Trp1 zu wiederholen um zu überprüfen, ob das Ausbleiben der Immunreaktion auf das SIINFEKL Epitop zurückzuführen ist. Da davon auszugehen ist, dass bei den für die IVAC Studie verwendeten mutierten Epitope kein immundominantes Epitop (vergleichbar mit SIINFEKL) dabei sind, ist die Möglichkeit eines Immundominanzeffektes vermutlich sehr gering.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass es möglich ist verschiedene MHC-I und –II Epitope auf einer RNA zusammen zu fassen und daraus eine Vakzine zu generieren, welche die Möglichkeit bietet gleichzeitig mehrere Tumorassoziierte Antigen anzusprechen. Es kann dabei die Chance genutzt werden, die Vorzüge von T<sub>H</sub>1 Zellen, wie beispielsweise die von Mut-30 spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu nutzen. Diese sorgen dafür, dass sich das Tumormikromillieu zu Gunsten einer anti-tumoralen Wirksamkeit des adaptiven Immunsystems verschiebt. Auch spezifische CD8<sup>+</sup> Zellen können hierbei eine zusätzliche Zytotoxizität bewirken, wodurch der Tumor von Effektorzellen verschiedener Spezifität bekämpft wird und die Risiken einer „escape Variante“ oder eines „immunoediting Effekts“ minimiert werden. Die Sicherheit

---

und Wirksamkeit des hier dargelegten Konzeptes zur Krebsimmuntherapie wird derzeit in einer „first in concept“ Phase I Studie bei Melanompatienten erprobt (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02035956).

## 5 Literaturverzeichnis

1. Friedrich Fehleisen. Über die Züchtung der Erysipelkokken auf künstlichem Nährboden und ihre Übertragbarkeit auf den Menschen. *Dtsch. Medizinische Wochenschrift* **8**, 553–554 (1882).
2. Coley, W. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas: with a report of ten original cases. *Am. J. Med. Sci.* **105**, 487–511 (1893).
3. Ehrlich, P. Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung. *Ned Tijdschr Geneeskd* **5**, 273–90 (1909).
4. Ada, G. L. & Nossal, G. The clonal-selection theory. *Sci. Am.* **257**, 62–9 (1987).
5. Schreiber, R. D., Old, L. J. & Smyth, M. J. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* **331**, 1565–70 (2011).
6. Old, L. J. Cancer immunology: the search for specificity--G. H. A. Clowes Memorial lecture. *Cancer Res.* **41**, 361–75 (1981).
7. Köhler, G. & Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**, 495–7 (1975).
8. Morales, A., Eidinger, D. & Bruce, A. W. Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors. *J. Urol.* **116**, 180–3 (1976).
9. Van der Bruggen, P. *et al.* A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* **254**, 1643–7 (1991).
10. Boon, T., Cerottini, J. C., Van den Eynde, B., van der Bruggen, P. & Van Pel, A. Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* **12**, 337–65 (1994).
11. Boon, T. Tumor antigens recognized by cytolytic T lymphocytes: present perspectives for specific immunotherapy. *Int. J. Cancer* **54**, 177–80 (1993).
12. Rosenberg, S. A. Development of cancer immunotherapies based on identification of the genes encoding cancer regression antigens. *J. Natl. Cancer Inst.* **88**, 1635–44 (1996).
13. Sahin, U. *et al.* Human Neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 11810–3 (1995).
14. Wood, L. D. *et al.* The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science* **318**, 1108–13 (2007).
15. Coulie, P. G., Van den Eynde, B. J., van der Bruggen, P. & Boon, T. Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **14**, 135–46 (2014).

16. Gubin, M. M., Artyomov, M. N., Mardis, E. R. & Schreiber, R. D. Tumor Neoantigens: building a framework for personalized cancer immunotherapy. *J. Clin. Invest.* **125**, 1–9 (2015).
17. Stone, J. D., Harris, D. T. & Kranz, D. M. TCR affinity for p/MHC formed by tumor antigens that are self-proteins: impact on efficacy and toxicity. *Curr. Opin. Immunol.* **33**, 16–22 (2015).
18. Wölfel, T. *et al.* Two tyrosinase nonapeptides recognized on HLA-A2 melanomas by autologous cytolytic T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* **24**, 759–64 (1994).
19. Simpson, A. J. G., Caballero, O. L., Jungbluth, A., Chen, Y.-T. & Old, L. J. Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 615–25 (2005).
20. Scanlan, M. J., Gure, A. O., Jungbluth, A. A., Old, L. J. & Chen, Y.-T. Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy. *Immunol. Rev.* **188**, 22–32 (2002).
21. Chen, Y. T. *et al.* A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 1914–8 (1997).
22. Weber, J. *et al.* Expression of the MAGE-1 tumor antigen is up-regulated by the demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Res.* **54**, 1766–71 (1994).
23. Heemskerk, B., Kvistborg, P. & Schumacher, T. N. M. The cancer antigenome. *EMBO J.* **32**, 194–203 (2013).
24. Schumacher, T. N. & Schreiber, R. D. Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science (80-)*. **348**, 69–74 (2015).
25. Bosch, G. J., Joosten, A. M., Kessler, J. H., Melief, C. J. & Leeksa, O. C. Recognition of BCR-ABL positive leukemic blasts by human CD4+ T cells elicited by primary in vitro immunization with a BCR-ABL breakpoint peptide. *Blood* **88**, 3522–7 (1996).
26. Huang, J. *et al.* T cells associated with tumor regression recognize frameshifted products of the CDKN2A tumor suppressor gene locus and a mutated HLA class I gene product. *J. Immunol.* **172**, 6057–64 (2004).
27. Schwitalle, Y., Linnebacher, M., Ripberger, E., Gebert, J. & von Knebel Doeberitz, M. Immunogenic peptides generated by frameshift mutations in DNA mismatch repair-deficient cancer cells. *Cancer Immun.* **4**, 14 (2004).
28. Van der Burg, S. H. & Melief, C. J. M. Therapeutic vaccination against human papilloma virus induced malignancies. *Curr. Opin. Immunol.* **23**, 252–7 (2011).
29. Greenblatt, M. S., Bennett, W. P., Hollstein, M. & Harris, C. C. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res.* **54**, 4855–78 (1994).

30. Fisk, B. *et al.* Changes in an HER-2 peptide upregulating HLA-A2 expression affect both conformational epitopes and CTL recognition: implications for optimization of antigen presentation and tumor-specific CTL induction. *J. Immunother. Emphasis Tumor Immunol.* **18**, 197–209 (1995).
31. Byrne, W. L., Mills, K. H. G., Lederer, J. A. & O'Sullivan, G. C. Targeting regulatory T cells in cancer. *Cancer Res.* **71**, 6915–20 (2011).
32. Lindau, D., Gielen, P., Kroesen, M., Wesseling, P. & Adema, G. J. The immunosuppressive tumour network: myeloid-derived suppressor cells, regulatory T cells and natural killer T cells. *Immunology* **138**, 105–15 (2013).
33. Restifo, N. P. *et al.* Identification of human cancers deficient in antigen processing. *J. Exp. Med.* **177**, 265–72 (1993).
34. Strand, S. *et al.* Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand-expressing tumor cells--a mechanism of immune evasion? *Nat. Med.* **2**, 1361–6 (1996).
35. Ranges, G. E., Figari, I. S., Espevik, T. & Palladino, M. A. Inhibition of cytotoxic T cell development by transforming growth factor beta and reversal by recombinant tumor necrosis factor alpha. *J. Exp. Med.* **166**, 991–8 (1987).
36. Pardoll, D. M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 252–264 (2012).
37. Ochsenbein, A. F. *et al.* Roles of tumour localization, second signals and cross priming in cytotoxic T-cell induction. *Nature* **411**, 1058–64 (2001).
38. Whiteside, T. L. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene* **27**, 5904–12 (2008).
39. Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J. & Schreiber, R. D. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.* **3**, 991–8 (2002).
40. Fuchs, E. J. & Matzinger, P. Is cancer dangerous to the immune system? *Semin. Immunol.* **8**, 271–80 (1996).
41. Bissell, M. J. & Hines, W. C. Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. *Nat. Med.* **17**, 320–9 (2011).
42. Gore, M. E. Adverse effects of gene therapy: Gene therapy can cause leukaemia: no shock, mild horror but a probe. *Gene Ther.* **10**, 4–4 (2003).
43. Hacein-Bey-Abina, S. *et al.* Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J. Clin. Invest.* **118**, 3132–42 (2008).
44. Rabinovich, P. M. *et al.* Synthetic messenger RNA as a tool for gene therapy. *Hum. Gene Ther.* **17**, 1027–35 (2006).

45. Boczkowski, D., Nair, S. K., Snyder, D. & Gilboa, E. Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells in vitro and in vivo. *J. Exp. Med.* **184**, 465–72 (1996).
46. Kreiter, S. *et al.* Intranodal vaccination with naked antigen-encoding RNA elicits potent prophylactic and therapeutic antitumoral immunity. *Cancer Res.* **70**, 9031–40 (2010).
47. Mockey, M. *et al.* mRNA-based cancer vaccine: prevention of B16 melanoma progression and metastasis by systemic injection of MART1 mRNA histidylated lipopolyplexes. *Cancer Gene Ther.* **14**, 802–14 (2007).
48. Kowalska, J. *et al.* Synthesis and characterization of mRNA cap analogs containing phosphorothioate substitutions that bind tightly to eIF4E and are resistant to the decapping pyrophosphatase DcpS. *RNA* **14**, 1119–31 (2008).
49. Holtkamp, S. *et al.* Modification of antigen-encoding RNA increases stability, translational efficacy, and T-cell stimulatory capacity of dendritic cells. *Blood* **108**, 4009–17 (2006).
50. Gallie, D. R. The cap and poly(A) tail function synergistically to regulate mRNA translational efficiency. *Genes Dev.* **5**, 2108–16 (1991).
51. Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R. & Flavell, R. A. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* **413**, 732–8 (2001).
52. Diebold, S. S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S. & Reis e Sousa, C. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* **303**, 1529–31 (2004).
53. Hemmi, H. *et al.* Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat. Immunol.* **3**, 196–200 (2002).
54. Bourquin, C. *et al.* Immunostimulatory RNA oligonucleotides induce an effective antitumoral NK cell response through the TLR7. *J. Immunol.* **183**, 6078–86 (2009).
55. Vollmer, J. *et al.* Immune stimulation mediated by autoantigen binding sites within small nuclear RNAs involves Toll-like receptors 7 and 8. *J. Exp. Med.* **202**, 1575–85 (2005).
56. Sahin, U., Karikó, K. & Türeci, Ö. mRNA-based therapeutics — developing a new class of drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* (2014). doi:10.1038/nrd4278
57. Bevan, M. J. Cross-priming. *Nat. Immunol.* **7**, 363–5 (2006).
58. Castle, J. C. *et al.* Exploiting the Mutanome for Tumor Vaccination. *Cancer Res.* **72**, 1081–1091 (2012).
59. Lennerz, V. *et al.* The response of autologous T cells to a human melanoma is dominated by mutated Neoantigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 16013–8 (2005).
60. Rahma, O. E. *et al.* A pilot clinical trial testing mutant von Hippel-Lindau peptide as a novel immune therapy in metastatic renal cell carcinoma. *J. Transl. Med.* **8**, 8 (2010).

61. Inaba, K. *et al.* Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.* **176**, 1693–702 (1992).
62. Sadikot, R. T. & Blackwell, T. S. Bioluminescence imaging. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **2**, 537–40, 511–2 (2005).
63. Melief, C. J. M. & van der Burg, S. H. Immunotherapy of established (pre)malignant disease by synthetic long peptide vaccines. *Nat. Rev. Cancer* **8**, 351–360 (2008).
64. Malyguine, A. M., Strobl, S., Dunham, K., Shurin, M. R. & Sayers, T. J. ELISPOT Assay for Monitoring Cytotoxic T Lymphocytes (CTL) Activity in Cancer Vaccine Clinical Trials. *Cells* **1**, 111–26 (2012).
65. Bloom, M. B. *et al.* Identification of tyrosinase-related protein 2 as a tumor rejection antigen for the B16 melanoma. *J. Exp. Med.* **185**, 453–459 (1997).
66. Duan, F. *et al.* Area under the curve as a tool to measure kinetics of tumor growth in experimental animals. *J. Immunol. Methods* **382**, 224–8 (2012).
67. Stratton, M. R., Campbell, P. J. & Futreal, P. A. The cancer genome. *Nature* **458**, 719–24 (2009).
68. Rath, O. & Kozielski, F. Kinesins and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 527–39 (2012).
69. Miki, H., Setou, M., Kaneshiro, K. & Hirokawa, N. All kinesin superfamily protein, KIF, genes in mouse and human. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 7004–7011 (2001).
70. Infante, J. R. *et al.* A Phase I study to assess the safety, tolerability, and pharmacokinetics of AZD4877, an intravenous Eg5 inhibitor in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **69**, 165–72 (2012).
71. Burris, H. A. *et al.* A phase I study of ispinesib, a kinesin spindle protein inhibitor, administered weekly for three consecutive weeks of a 28-day cycle in patients with solid tumors. *Invest. New Drugs* **29**, 467–72 (2011).
72. Lee, Y. M. *et al.* Cell cycle-regulated expression and subcellular localization of a kinesin-8 member human KIF18B. *Gene* **466**, 16–25 (2010).
73. McKnight, A. J., Zimmer, G. J., Fogelman, I., Wolf, S. F. & Abbas, A. K. Effects of IL-12 on helper T cell-dependent immune responses in vivo. *J. Immunol.* **152**, 2172–9 (1994).
74. Böhm, W. *et al.* T Cell-Mediated, IFN- $\gamma$ -Facilitated Rejection of Murine B16 Melanomas. *J. Immunol.* **161**, 897–908 (1998).
75. Fidler, I. J. Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival in vivo. *Cancer Res.* **35**, 218–24 (1975).

76. Riquelme, P. *et al.* IFN- $\gamma$ -induced iNOS expression in mouse regulatory macrophages prolongs allograft survival in fully immunocompetent recipients. *Mol. Ther.* **21**, 409–22 (2013).
77. Review, M. Interferon- Alfons Billiau in *Autoimmunity*. **7**, 25–34 (1996).
78. Street, S. E., Cretney, E. & Smyth, M. J. Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. *Blood* **97**, 192–7 (2001).
79. Bronte, V. *et al.* Identification of a CD11b(+)/Gr-1(+)/CD31(+) myeloid progenitor capable of activating or suppressing CD8(+) T cells. *Blood* **96**, 3838–46 (2000).
80. Klages, K. *et al.* Selective depletion of Foxp3+ regulatory T cells improves effective therapeutic vaccination against established melanoma. *Cancer Res.* **70**, 7788–99 (2010).
81. Böhm, W. *et al.* T cell-mediated, IFN-gamma-facilitated rejection of murine B16 melanomas. *J. Immunol.* **161**, 897–908 (1998).
82. Braumüller, H. *et al.* T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence. *Nature* **494**, 361–5 (2013).
83. Ni, J., Miller, M., Stojanovic, A., Garbi, N. & Cerwenka, A. Sustained effector function of IL-12/15/18-preactivated NK cells against established tumors. *J. Exp. Med.* **209**, 2351–65 (2012).
84. Powell, A. M. & Black, M. M. Epitope spreading: protection from pathogens, but propagation of autoimmunity? *Clin. Exp. Dermatol.* **26**, 427–33 (2001).
85. Hodi, F. S. *et al.* Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N. Engl. J. Med.* **363**, 711–23 (2010).
86. Dalton, D. K. *et al.* Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes. *Science* **259**, 1739–42 (1993).
87. Hoerr, I., Obst, R., Rammensee, H. G. & Jung, G. In vivo application of RNA leads to induction of specific cytotoxic T lymphocytes and antibodies. *Eur. J. Immunol.* **30**, 1–7 (2000).
88. Heiser, A. *et al.* Human dendritic cells transfected with RNA encoding prostate-specific antigen stimulate prostate-specific CTL responses in vitro. *J. Immunol.* **164**, 5508–14 (2000).
89. Stewart, T., Tsai, S. C., Grayson, H., Henderson, R. & Opelz, G. Incidence of de-novo breast cancer in women chronically immunosuppressed after organ transplantation. *Lancet* **346**, 796–8 (1995).
90. Rama, I. & Grinyó, J. M. Malignancy after renal transplantation: the role of immunosuppression. *Nat. Rev. Nephrol.* **6**, 511–9 (2010).

91. Kalialis, L. V., Drzewiecki, K. T. & Klyver, H. Spontaneous regression of metastases from melanoma: review of the literature. *Melanoma Res.* **19**, 275–82 (2009).
92. Maker, A. V *et al.* Tumor regression and autoimmunity in patients treated with cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and interleukin 2: a phase I/II study. *Ann. Surg. Oncol.* **12**, 1005–16 (2005).
93. Rosenberg, S. A. *et al.* Durable Complete Responses in Heavily Pretreated Patients with Metastatic Melanoma Using T-Cell Transfer Immunotherapy. *Clin. Cancer Res.* **17**, 4550–4557 (2011).
94. Fidler, I. J. Selection of successive tumour lines for metastasis. *Nat. New Biol.* **242**, 148–9 (1973).
95. Melnikova, V. O., Bolshakov, S. V, Walker, C. & Ananthaswamy, H. N. Genomic alterations in spontaneous and carcinogen-induced murine melanoma cell lines. *Oncogene* **23**, 2347–56 (2004).
96. Robbins, P. F. *et al.* NIH Public Access. **19**, 747–752 (2013).
97. Marincola, F. M., Jaffee, E. M., Hicklin, D. J. & Ferrone, S. Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Adv. Immunol.* **74**, 181–273 (2000).
98. Castle, J. C. *et al.* Exploiting the mutanome for tumor vaccination. *Cancer Res.* **72**, 1081–91 (2012).
99. Yoshida, K. *et al.* Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature* **478**, 64–9 (2011).
100. Vogelstein, B. *et al.* Cancer genome landscapes. *Science* **339**, 1546–58 (2013).
101. Sharkey, M. S., Lizée, G., Gonzales, M. I., Patel, S. & Topalian, S. L. CD4(+) T-cell recognition of mutated B-RAF in melanoma patients harboring the V599E mutation. *Cancer Res.* **64**, 1595–9 (2004).
102. Gjertsen, M. K., Bjorheim, J., Saeterdal, I., Myklebust, J. & Gaudernack, G. Cytotoxic CD4+ and CD8+ T lymphocytes, generated by mutant p21-ras (12Val) peptide vaccination of a patient, recognize 12Val-dependent nested epitopes present within the vaccine peptide and kill autologous tumour cells carrying this mutation. *Int. J. Cancer* **72**, 784–90 (1997).
103. Linard, B. *et al.* A ras-mutated peptide targeted by CTL infiltrating a human melanoma lesion. *J. Immunol.* **168**, 4802–8 (2002).
104. Hodis, E. *et al.* A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell* **150**, 251–63 (2012).
105. Madden, D. R., Gorga, J. C., Strominger, J. L. & Wiley, D. C. The three-dimensional structure of HLA-B27 at 2.1 Å resolution suggests a general mechanism for tight peptide binding to MHC. *Cell* **70**, 1035–48 (1992).

106. Nauss, J. L., Reid, R. H. & Sadegh-Nasseri, S. Accuracy of a structural homology model for a class II histocompatibility protein, HLA-DR1: comparison to the crystal structure. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **12**, 1213–33 (1995).
107. Lundegaard, C. *et al.* NetMHC-3.0: accurate web accessible predictions of human, mouse and monkey MHC class I affinities for peptides of length 8-11. *Nucleic Acids Res.* **36**, W509–12 (2008).
108. Kumar, P., Henikoff, S. & Ng, P. C. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat. Protoc.* **4**, 1073–81 (2009).
109. Adzhubei, I. A. *et al.* A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat. Methods* **7**, 248–9 (2010).
110. Falk, K., Rötzschke, O., Stevanović, S., Jung, G. & Rammensee, H. G. Pool sequencing of natural HLA-DR, DQ, and DP ligands reveals detailed peptide motifs, constraints of processing, and general rules. *Immunogenetics* **39**, 230–42 (1994).
111. Brusic, V., Rudy, G. & Harrison, L. C. MHCPEP, a database of MHC-binding peptides: update 1997. *Nucleic Acids Res.* **26**, 368–71 (1998).
112. Rammensee, H., Bachmann, J., Emmerich, N. P., Bachor, O. A. & Stevanović, S. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* **50**, 213–9 (1999).
113. Palm, C., Jayamanne, M., Kjellander, M. & Hällbrink, M. Peptide degradation is a critical determinant for cell-penetrating peptide uptake. *Biochim. Biophys. Acta* **1768**, 1769–76 (2007).
114. Kreiter, S. *et al.* Mutant MHC class II epitopes drive therapeutic immune responses to cancer. *Nature* **520**, 692–6 (2015).
115. Duan, F. *et al.* Genomic and bioinformatic profiling of mutational Neoepitopes reveals new rules to predict anticancer immunogenicity. *J. Exp. Med.* **211**, 2231–48 (2014).
116. Gubin, M. M. *et al.* Checkpoint blockade cancer immunotherapy targets tumour-specific mutant antigens. *Nature* **515**, 577–581 (2014).
117. Robbins, P. F. *et al.* Mining exomic sequencing data to identify mutated antigens recognized by adoptively transferred tumor-reactive T cells. *Nat. Med.* **19**, 747–52 (2013).
118. Schumacher, T. *et al.* A vaccine targeting mutant IDH1 induces antitumour immunity. *Nature* **512**, 324–7 (2014).
119. Bijker, M. S. *et al.* CD8+ CTL priming by exact peptide epitopes in incomplete Freund's adjuvant induces a vanishing CTL response, whereas long peptides induce sustained CTL reactivity. *J. Immunol.* **179**, 5033–40 (2007).

120. Echchakir, H. *et al.* A point mutation in the alpha-actinin-4 gene generates an antigenic peptide recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human lung carcinoma. *Cancer Res.* **61**, 4078–83 (2001).
121. Zeh, H. J., Perry-Lalley, D., Dudley, M. E., Rosenberg, S. A. & Yang, J. C. High avidity CTLs for two self-antigens demonstrate superior in vitro and in vivo antitumor efficacy. *J. Immunol.* **162**, 989–94 (1999).
122. Das, P. K., van den Wijngaard, R. M., Wankowicz-Kalinska, A. & Le Poole, I. C. A symbiotic concept of autoimmunity and tumour immunity: lessons from vitiligo. *Trends Immunol.* **22**, 130–6 (2001).
123. Lengagne, R. *et al.* Spontaneous vitiligo in an animal model for human melanoma: role of tumor-specific CD8+ T cells. *Cancer Res.* **64**, 1496–501 (2004).
124. Casadei, R., Ferraro, A., Ferruzzi, A., Biagini, R. & Ruggieri, P. Bone tumors of the foot: epidemiology and diagnosis. *Chir. Organi Mov.* **76**, 47–62
125. Ossendorp, F., Menedé, E., Camps, M., Filius, R. & Melief, C. J. Specific T helper cell requirement for optimal induction of cytotoxic T lymphocytes against major histocompatibility complex class II negative tumors. *J. Exp. Med.* **187**, 693–702 (1998).
126. Mumberg, D. *et al.* CD4(+) T cells eliminate MHC class II-negative cancer cells in vivo by indirect effects of IFN-gamma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 8633–8 (1999).
127. Toes, R. E., Ossendorp, F., Offringa, R. & Melief, C. J. CD4 T cells and their role in antitumor immune responses. *J. Exp. Med.* **189**, 753–6 (1999).
128. Qin, Z. & Blankenstein, T. CD4+ T cell--mediated tumor rejection involves inhibition of angiogenesis that is dependent on IFN gamma receptor expression by nonhematopoietic cells. *Immunity* **12**, 677–86 (2000).
129. Hung, K. *et al.* The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response. *J. Exp. Med.* **188**, 2357–68 (1998).
130. Linnemann, C. *et al.* High-throughput epitope discovery reveals frequent recognition of Neo-antigens by CD4+ T cells in human melanoma. *Nat. Med.* **21**, 81–85 (2014).
131. Jordan, M. A. & Wilson, L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 253–65 (2004).
132. Quasthoff, S. & Hartung, H. P. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *J. Neurol.* **249**, 9–17 (2002).
133. Kavallaris, M. Microtubules and resistance to tubulin-binding agents. *Nat. Rev. Cancer* **10**, 194–204 (2010).
134. Yildiz, A. & Selvin, P. R. Kinesin: walking, crawling or sliding along? *Trends Cell Biol.* **15**, 112–20 (2005).

135. Vale, R. D. & Milligan, R. A. The way things move: looking under the hood of molecular motor proteins. *Science* **288**, 88–95 (2000).
136. Cross, R. A. & McAinsh, A. Prime movers: the mechanochemistry of mitotic kinesins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 257–71 (2014).
137. Miki, H., Okada, Y. & Hirokawa, N. Analysis of the kinesin superfamily: insights into structure and function. *Trends Cell Biol.* **15**, 467–76 (2005).
138. Stout, J. R. *et al.* Kif18B interacts with EB1 and controls astral microtubule length during mitosis. *Mol. Biol. Cell* **22**, 3070–80 (2011).
139. Lee, W. *et al.* The mutation spectrum revealed by paired genome sequences from a lung cancer patient. *Nature* **465**, 473–7 (2010).
140. Kvistborg, P., van Buuren, M. M. & Schumacher, T. N. Human cancer regression antigens. *Curr. Opin. Immunol.* **25**, 284–290 (2013).
141. Mackay, C. R., Marston, W. L. & Dudler, L. Naive and memory T cells show distinct pathways of lymphocyte recirculation. *J. Exp. Med.* **171**, 801–17 (1990).
142. Tough, D. F. & Sprent, J. Turnover of naive- and memory-phenotype T cells. *J. Exp. Med.* **179**, 1127–35 (1994).
143. Li, X. C. *et al.* IL-15 and IL-2: a matter of life and death for T cells in vivo. *Nat. Med.* **7**, 114–8 (2001).
144. Schmidt, C. S. & Mescher, M. F. Peptide antigen priming of naive, but not memory, CD8 T cells requires a third signal that can be provided by IL-12. *J. Immunol.* **168**, 5521–9 (2002).
145. Beckhove, P. *et al.* Specifically activated memory T cell subsets from cancer patients recognize and reject xenotransplanted autologous tumors. *J. Clin. Invest.* **114**, 67–76 (2004).
146. Tiffen, J. C., Bailey, C. G., Ng, C., Rasko, J. E. J. & Holst, J. Luciferase expression and bioluminescence does not affect tumor cell growth in vitro or in vivo. *Mol. Cancer* **9**, 299 (2010).
147. Krebs, P. *et al.* NK-cell-mediated killing of target cells triggers robust antigen-specific T-cell-mediated and humoral responses. *Blood* **113**, 6593–602 (2009).
148. Martín-Fontecha, A. *et al.* Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN- $\gamma$  for T(H)1 priming. *Nat. Immunol.* **5**, 1260–5 (2004).
149. Robbins, S. H. *et al.* Natural killer cells promote early CD8 T cell responses against cytomegalovirus. *PLoS Pathog.* **3**, e123 (2007).

150. Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T. & Ugolini, S. Functions of natural killer cells. *Nat. Immunol.* **9**, 503–510 (2008).
151. Kärre, K., Ljunggren, H. G., Piontek, G. & Kiessling, R. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* **319**, 675–8
152. Parham, P. MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 201–14 (2005).
153. Biron, C. A. Activation and function of natural killer cell responses during viral infections. *Curr. Opin. Immunol.* **9**, 24–34 (1997).
154. Le Bon, A. *et al.* Cross-priming of CD8+ T cells stimulated by virus-induced type I interferon. *Nat. Immunol.* **4**, 1009–15 (2003).
155. Montoya, M. *et al.* Type I interferons produced by dendritic cells promote their phenotypic and functional activation. *Blood* **99**, 3263–71 (2002).
156. Mocikat, R. *et al.* Natural killer cells activated by MHC class I(low) targets prime dendritic cells to induce protective CD8 T cell responses. *Immunity* **19**, 561–9 (2003).
157. Lanier, L. L. NK cell receptors. *Annu. Rev. Immunol.* **16**, 359–93 (1998).
158. Ravetch, J. V & Lanier, L. L. Immune inhibitory receptors. *Science* **290**, 84–9 (2000).
159. Couzin, J. Cancer. T cells a boon for colon cancer prognosis. *Science* **313**, 1868–9 (2006).
160. Galon, J. *et al.* Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* **313**, 1960–4 (2006).
161. Boissonnas, A., Fetler, L., Zeelenberg, I. S., Hugues, S. & Amigorena, S. In vivo imaging of cytotoxic T cell infiltration and elimination of a solid tumor. *J. Exp. Med.* **204**, 345–56 (2007).
162. Stoll, S., Delon, J., Brotz, T. M. & Germain, R. N. Dynamic imaging of T cell-dendritic cell interactions in lymph nodes. *Science* **296**, 1873–6 (2002).
163. Billiau, A. Interferon-gamma: biology and role in pathogenesis. *Adv. Immunol.* **62**, 61–130 (1996).
164. Boehm, U., Klamp, T., Groot, M. & Howard, J. C. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 749–95 (1997).
165. Beatty, G. & Paterson, Y. IFN-gamma-dependent inhibition of tumor angiogenesis by tumor-infiltrating CD4+ T cells requires tumor responsiveness to IFN-gamma. *J. Immunol.* **166**, 2276–82 (2001).

166. Fathallah-Shaykh, H. M., Zhao, L. J., Kafrouni, A. I., Smith, G. M. & Forman, J. Gene transfer of IFN-gamma into established brain tumors represses growth by antiangiogenesis. *J. Immunol.* **164**, 217–22 (2000).
167. Mortazavi, A., Williams, B. A., McCue, K., Schaeffer, L. & Wold, B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat. Methods* **5**, 621–8 (2008).
168. Bates, G. J. *et al.* Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *J. Clin. Oncol.* **24**, 5373–80 (2006).
169. Suttmüller, R. P. *et al.* Synergism of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and depletion of CD25(+) regulatory T cells in antitumor therapy reveals alternative pathways for suppression of autoreactive cytotoxic T lymphocyte responses. *J. Exp. Med.* **194**, 823–32 (2001).
170. Onizuka, S. *et al.* Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. *Cancer Res.* **59**, 3128–33 (1999).
171. Hansen, W. *et al.* Neuropilin 1 deficiency on CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells impairs mouse melanoma growth. *J. Exp. Med.* **209**, 2001–16 (2012).
172. Schlecker, E. *et al.* Tumor-infiltrating monocytic myeloid-derived suppressor cells mediate CCR5-dependent recruitment of regulatory T cells favoring tumor growth. *J. Immunol.* **189**, 5602–11 (2012).
173. Chen, W. *et al.* Conversion of peripheral CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> naive T cells to CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J. Exp. Med.* **198**, 1875–86 (2003).
174. Huang, B. *et al.* Gr-1<sup>+</sup>CD115<sup>+</sup> immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer Res.* **66**, 1123–31 (2006).
175. Pan, P.-Y. *et al.* Immune stimulatory receptor CD40 is required for T-cell suppression and T regulatory cell activation mediated by myeloid-derived suppressor cells in cancer. *Cancer Res.* **70**, 99–108 (2010).
176. Fujimura, T., Kambayashi, Y. & Aiba, S. Crosstalk between regulatory T cells (Tregs) and myeloid derived suppressor cells (MDSCs) during melanoma growth. *Oncoimmunology* **1**, 1433–1434 (2012).
177. Gabrilovich, D. I. & Nagaraj, S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 162–74 (2009).
178. Cook, D. N. The role of MIP-1 alpha in inflammation and hematopoiesis. *J. Leukoc. Biol.* **59**, 61–6 (1996).
179. Mantovani, A., Bottazzi, B., Colotta, F., Sozzani, S. & Ruco, L. The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunol. Today* **13**, 265–70 (1992).

180. Okamura, H., Kashiwamura, S., Tsutsui, H., Yoshimoto, T. & Nakanishi, K. Regulation of interferon-gamma production by IL-12 and IL-18. *Curr. Opin. Immunol.* **10**, 259–64 (1998).
181. Höckel, M. & Vaupel, P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J. Natl. Cancer Inst.* **93**, 266–76 (2001).
182. Vaupel, P., Kelleher, D. K. & Höckel, M. Oxygen status of malignant tumors: pathogenesis of hypoxia and significance for tumor therapy. *Semin. Oncol.* **28**, 29–35 (2001).
183. Fridman, W. H., Pagès, F., Sautès-Fridman, C. & Galon, J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 298–306 (2012).
184. Kline, J. P., Zhang, L., Cohen, K. & Gajewski, T. F. Abstract 778: Cellular and molecular requirements for rejection of B16 melanoma in the setting of regulatory T cell depletion and homeostatic proliferation. *Cancer Res.* **71**, 778–778 (2011).
185. Diken, M. *et al.* mTOR inhibition improves antitumor effects of vaccination with antigen-encoding RNA. *Cancer Immunol. Res.* **1**, 386–92 (2013).
186. Kreiter, S., Diken, M., Selmi, A., Türeci, Ö. & Sahin, U. Tumor vaccination using messenger RNA: prospects of a future therapy. *Curr. Opin. Immunol.* **23**, 399–406 (2011).
187. Hickling, J. K. Measuring human T-lymphocyte function. **44**, 1–20 (1998).
188. Ishioka, G. Y. *et al.* Utilization of MHC class I transgenic mice for development of minigene DNA vaccines encoding multiple HLA-restricted CTL epitopes. *J. Immunol.* **162**, 3915–25 (1999).
189. An, L. L. & Whitton, J. L. A multivalent minigene vaccine, containing B-cell, cytotoxic T-lymphocyte, and Th epitopes from several microbes, induces appropriate responses in vivo and confers protection against more than one pathogen. *J. Virol.* **71**, 2292–302 (1997).
190. Hanke, T. *et al.* Effective induction of HIV-specific CTL by multi-epitope using gene gun in a combined vaccination regime. *Vaccine* **17**, 589–96 (1999).
191. Hanke, T., Schneider, J., Gilbert, S. C., Hill, A. V & McMichael, A. DNA multi-CTL epitope vaccines for HIV and Plasmodium falciparum: immunogenicity in mice. *Vaccine* **16**, 426–35 (1998).
192. Thomson, S. A. *et al.* Delivery of multiple CD8 cytotoxic T cell epitopes by DNA vaccination. *J. Immunol.* **160**, 1717–23 (1998).
193. Livingston, B. *et al.* A rational strategy to design multiepitope immunogens based on multiple Th lymphocyte epitopes. *J. Immunol.* **168**, 5499–506 (2002).

- 
194. Rodriguez, F., Harkins, S., Slifka, M. K. & Whitton, J. L. Immunodominance in virus-induced CD8(+) T-cell responses is dramatically modified by DNA immunization and is regulated by gamma interferon. *J. Virol.* **76**, 4251–9 (2002).

## 6 Appendix

**Tab. 6.1** Tabelle aller Peptide die für B16-F10 Mutationen kodieren. Alle Peptide wurden von der Firma JPT Peptide Technologies GmbH (Berlin, D) synthetisiert.

Name	Sequenz	Batch.No
MUT-01	SGCYFMVAVAHVAAFLLEDRAVCVERF	300111A6
WT-01	SGCYFMVAVAHVAGFLLEDRAVCVERF	280111C11
MUT-02	QGAENVEQVLVTIISQGAVDYPDPIAQK	271210K1-52
WT-02	QGAENVEQVLVTIIQGAVDYPDPIAQK	271210K1-76
MUT-03	MTESEFKKKFEECQHNI IKLQNGHTSLA	310111B3
WT-03	MTESEFKKKFEECQQNI IKLQNGHTSLA	271210K1-77
MUT-04	PRVSALIESLNQKTQSTGDHPQPTDIT	271210K1-54
WT-04	PRVSALIESLNQKPOSTGDHPQPTDIT	271210K1-78
MUT-05	FVVKAYLPVNESFAFTADLRSTGGQA	271210K1-55
WT-05	FVVKAYLPVNESFGFTADLRSTGGQA	271210K1-79
MUT-06	PDVHTLLEITEESGAVLVDKSDSD	271210K2-03
WT-06	PDVHTLLEITEESDAVLVDKSDSD	271210K2-04
MUT-07	TAKSVMCTYSPPLDKLFCQLAKTCPVQ	270111C5
WT-07	TAKSVMCTYSPPLNKLFCQLAKTCPVQ	280111C12
MUT-08	ANFESGKHKYRQTAMFTATMPPAVERL	271210K1-57
WT-08	ANFESGKHKYRQTMFTATMPPAVERL	271210K1-81
MUT-09	QRAAAPSAASSPADVQSLKKAMSSLQN	271210K1-58
WT-09	QRAAAPSAASSPAEVQSLKKAMSSLQN	271210k1-82
MUT-10	RGQSQLFSLNPRGRSLVTAGRIDREEL	271210K1-59
WT-10	RGQSQLFSLNPRGGSLVTAGRIDREEL	271210K1-83
MUT-11	ASSSLARGPLSEAGLALFDPYSKEEST	271210K1-60
WT-11	ASSSLARGPLSEAEALALFDPYSKEEST	271210k1-84
MUT-12	TPPPEEAMPFEFNGPAQGDHSQPPLQV	271210K1-61
WT-12	TPPPEEAMPFEFNEPAQGDHSQPPLQV	271210K1-85
MUT-13	KFRLTASNMEGKSWPSEVLVCTTSPDR	270111C6
WT-13	KFRLTASNMEGKSCPSEVLVCTTSPDR	310111C5
MUT-14	AVTYAAQQHETFLTNGDRAGFLIGDGA	271210K1-63
WT-14	AVTYAAQQHETFLPNGDRAGFLIGDGA	271210K1-87
MUT-15	WLPQAKVPFSEETQNLILPYISDMNFV	271210k1-54
WT-15	WLPQAKVPFSEETRNLILPYISDMNFV	271210K1-88
MUT-16	RVTCNRAGEKHCFSNEAARDFGGAIQ	271210K1-65
WT-16	RVTCNRAGEKHCFTSNEAARDFGGAIQ	271210K1-89
MUT-17	VVDRNPQFLDPVLAAYLMKGLCEKPLAS	270111C7
WT-17	VVDRNPQFLDPVLGYLMKGLCEKPLAS	110111V-16
MUT-18	VETLECEERGKQEAKLLAERSRFEDEKQ	271210K1-67
WT-18	VETLECEERGKQEAQLLAERSRFEDEKQ	271210K1-91
MUT-19	NEVAPLEWLRYFDKKELELMLCGMQEI	271210K1-68
WT-19	NEVAPLEWLRYFDEKELELMLCGMQEI	271210K1-92
MUT-20	FRRKAFLHWYTGEAMDEMEFTEAESNM	050811R-02

WT-20	FRRKAFHLHWYTGEGMDEMEFTEAESNM	271210K1-93
MUT-21	SSPDEVALVEGVQSLGFTYLRLKDNYM	271210K1-70
WT-21	SSPDEVALVEGVQRLGFTYLRLKDNYM	271210k1-94
MUT-22	PKPDFSQLQRNILPSNPRVTRFHINWD	271210K1-71
WT-22	PKPDFSQLQRNILASNPRVTRFHINWD	271210k1-95
MUT-23	LILISTNGSFIRLLDAFKGVVMHTFGG	110111V-12
WT-23	LILISTNGSFIRLIDAFKGVVMHTFGG	110111V-17
MUT-24	TAVITPPTTTTKKARVSTPKPATPSTD	271210K1-73
WT-24	TAVITPPTTTTKKPRVSTPKPATPSTD	271210K2-01
MUT-25	STANYNTSHLNNDVWQIFENPVDWKEK	271210K1-74
WT-25	STANYNTSHLNNDFWQIFENPVDWKEK	271210K2-02
MUT-26	RVDQKTLHNLLRKVVPFSFAEIERLNQ	271210K1-01
WT-26	RVDQKTLHNLLRKFVVPFSFAEIERLNQ	271210K1-26
MUT-27	REGVELCPGNKYEMRRHGTTTHSLVIHD	270111C1
WT-27	REGVELCPGNKYETRRHGTTTHSLVIHD	271210K1-27
MUT-28	NIEGIDKLTQLKKPFLVNNKINKIENI	271210K1-03
WT-28	NIEGIDKLTQLKKLFLVNNKINKIENI	271210K1-28
MUT-29	IPSGTTILNCFHDVLSGKLSGGSPGVP	271210K1-04
WT-29	IPSGTTILNCFHDFLSGKLSGGSPGVP	271210K1-29
MUT-30	PSKPSFQEFVDWENVSPELNSTDQPFL	271210K1-05
WT-30	PSKPSFQEFVDWEKVSPELNSTDQPFL	271210K1-30
MUT-31	DNIPALVEEYLERGNFVANDLDWLLAL	271210K1-06
WT-31	DNIPALVEEYLERANFVANDLDWLLAL	271210K1-31
MUT-32	EATELKACKPNGKRNPYCEVSMGSQSY	271210K1-07
WT-32	EATELKACKPNGKSNPYCEVSMGSQSY	271210K1-32
MUT-33	DSGSPFPAAVILRDALHMARGLYLHQ	271210K1-08
WT-33	DSGSPFPAAVILRVALHMARGLYLHQ	271210K1-33
MUT-34	HLTQQLDTYILKNVVAFSRTDKYRQLP	271210K1-09
WT-34	HLTQQLDTYILKNFVAFSRTDKYRQLP	271210K1-34
MUT-35	LVLSFVGQTRVLMINGEEVEETELMGF	271210K1-10
WT-35	LVLSFVGQTRVLMINGEEVEETELMGF	030211A3a
MUT-36	CGTAFFINFIAIYHHSRAIPFGTMVA	110211A5
WT-36	CGTAFFINFIAIYHASRAIPFGTMVA	310111A5a
MUT-37	GPDGLALPNNYCDVCLGDSKINKKTGQ	271210K1-12
WT-37	GPDGLALPNNYCDFCLGDSKINKKTGQ	271210K1-37
MUT-38	SCTEGQISIAKYENCPKDNPMYYCNKK	270111C2
WT-38	SCTEGQISIAKYESCPKDNPMYYCNKK	270111C4
MUT-39	ELINFKRKRVAAFQKNLIEMSELEIKH	271210K1-14
WT-39	ELINFKRKRVAAFRKNLIEMSELEIKH	271210K1-39
MUT-40	NREKMKGELGMMLILQNVIQKTTTPGE	270111C3
WT-40	NREKMKGELGMMLSLQNVIQKTTTPGE	110111V-05
MUT-41	HLSIECKGIDKEINESKNTHLDIPRI	271210K1-16
WT-41	HLSIECKGIDKELNESKNTHLDIPRI	271210K1-41
MUT-42	TLTELEAAIETVVCFTFFTFAGREGRKG	240111B1
WT-42	TLTELEAAIETVVSTFFTFAGREGRKG	240111B2
MUT-43	LSPSLSHREREQMKATLNYEDHCFSGH	110111V-02

WT-43	LSPSLSHREREQMEATLNYEDHCFSGH	110111V-07
MUT-44	EFKHIKAFDRTFANNPGPMVVFATPGM	271210K1-19
WT-44	EFKHIKAFDRTFADNPGPMVVFATPGM	271210K1-44
MUT-45	ECRITSNFVIPSEYWVEEKEEKQKLIQ	271210K1-20
WT-45	ECRITSNFVIPSENWVEEKEEKQKLIQ	271210K1-45
MUT-46	NHSGLVTFQAFIDVMSRETTDTDTADQ	271210K1-23
WT-46	NHSGLVTFQAFIDFMSRETTDTDTADQ	271210K1-46
MUT-47	GRGHLLGRLAAIVGKQVLLGRKVVVVR	110111V-03
WT-47	GRGHLLGRLAAIVAKQVLLGRKVVVVR	271210K1-47
MUT-48	SHCHWNDLAVIPAGVVHNWDFEPRKVS	271210K1-23
WT-48	SHCHWNDLAVIPARVVHNWDFEPRKVS	271210K1-48
MUT-49	EKFSMDHKTGTIAMQNTTQLRSRYELT	271210K1-24
WT-49	EKFSMDHKTGTIAIQNTTQLRSRYELT	271210K1-49
MUT-50	GFSQPLRRLVLHVVSAAQAERLARAEE	271210K1-25
WT-50	GFSQPLRRLVLHVL SAAQAERLARAEE	271210K1-50

## 7 Abkürzungen

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	<i>Mikroliter</i>
Abb	Abbildung
Ag	Antigen
Ak	Antikörpern
APCs	<i>antigenpräsentierenden Zellen</i>
ARCA	<i>antireverses Cap-Analog</i>
BMDCs	<i>bone-marrow derived dendritic cell</i>
B-Zell-	<i>B-Zell-Rezeptors</i>
ca.	<i>circa</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CpG	<i>cytosine phosphate guanosine</i>
CTL	<i>Effektor-T-Zellen</i>
CTLA-4	<i>cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4</i>
DCs	<i>Dendritic Cells</i>
DMSO	<i>Dimethylsulfoxid</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
EDTA	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
eGFP	<i>enhanced green fluorescence protein</i>
EGFR	<i>epidermal-growth-factor-receptor</i>
ELISPOT	<i>enzyme linked immuno spot assay</i>
FasL	<i>Fas ligand</i>
FCS	<i>forward scatter</i>
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony</i>
gp100	<i>glycoprotein 100</i>
Grz	<i>Granzyme</i>
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
i.v.	<i>intravenös</i>
IF	<i>Immunfluoreszens</i>
IFN	<i>Interferon</i>
IL	<i>Interleukin</i>
ILT	<i>immunoglobulin like transcript</i>
Inf-NP	<i>Influenza Nucleoprotein</i>
iNOS	<i>Stickstoffmonoxid-Synthase</i>
IVAC	<i>individualized vaccination against cancer</i>
kD	<i>Kilodalton</i>
KIF18b	<i>kinesin family member 18B</i>
KIR	<i>killer-cell immunoglobulin receptoren</i>
Luc	<i>Luziferase</i>
MACS	<i>magnetic activated cell sorting</i>
MDSC	<i>myeloid-derived suppressor cells</i>
MFI	<i>mean/median fluorescence intensity</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
Min	<i>Minuten</i>
ml	<i>Milliliter</i>
ms	<i>Millisekunden</i>
Mut	<i>mutiert</i>
MΦ	<i>Makrophagen</i>

---

NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
NGS	next generation sequencing
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
NOD	nucleotide-binding oligomerization domain
OVA	ovalbumin
PBS	phosphate buffered saline
PD-1	Programmed cell death protein 1
PD-L1	Programmed death-ligand 1
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
Poly I:C	Polyinosinic:polycytidylic acid
RAG	Recombination-activating gene
RNA	ribonucleic acid
ROI	region of interest
RPKM	reads per kilobase per million Reads
rpm	revolution per minute
RPMI	roswell Park Memorial Institute
RT	room temperature
SDS	sodium dodecyl sulfate
SEM	standard error of the mean
SSC	side scatter
Std	Stunden
TAA	Tumor-assoziierte Antigene
TAP	transporter associated with antigenprocessing
T-eff	Effektor-T-Zellen
TGF- $\beta$	Tumor growth factor- $\beta$
Th	T-Helfer
TLR	Toll-like Rezeptoren
TLRs	Toll-like-receptors
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor alpha
Trp2	tyrosinase related protein 2
TYRP1	tyrosinase-related protein 1
TZR	T-Zell-Rezeptors
V	Volt
VSV-NP	vesicular stomatitis virus
WT	Wildtyp
ZVTE	Zentralen Versuchstiereinrichtung

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1	Prinzip der Antigen kodierenden mRNA Pharmakologie .....	14
Abbildung 1.2	Experimenteller Aufbau des IVAC-Konzeptes .....	15
Abbildung 3.1	Poly I:C zeigt den stärksten Effekt.....	34
Abbildung 3.2	Optimierung der Peptidimmunisierung: 2 vs. 3.....	35
Abbildung 3.3	32% der mutierten Epitope induzieren eine Immunreaktion .....	36
Abbildung 3.4	Immunisierung mit RNA bestätigt 75 % der im Peptid Screen gefundenen Epitope als immunogen.....	37
Abbildung 3.5	Immunogene Epitope zeigen CD4 <sup>+</sup> sowie CD8 <sup>+</sup> Reaktivität .....	39
Abbildung 3.6	RNA induzieren keine spontane Immunität in B16-F10 tragenden C57BL/6 Mäusen...41	41
Abbildung 3.7	Neo-Epitop können anti-tumoralen Effekt erzeugen .....	42
Abbildung 3.8	Auch die auf RNA basierende Vakzine zeigt anti-tumoralen Effekt.....	44
Abbildung 3.9	Kinesin family member 18B (KIF18b).....	46
Abbildung 3.10	Mut-30 induziert CD4 <sup>+</sup> spezifische T-Zellen .....	47
Abbildung 3.11	Das Minimalepitop von Mut-30 umfasst 11 Aminosäuren.....	48
Abbildung 3.12	Mut-30 spezifische T-Zellen induzieren einen starken Memory-Effekt.....	50
Abbildung 3.13	Das anti-tumorale Potenzial von Mut-30 kann im therapeutischen Lungenmodel bestätigt werden.....	52
Abbildung 3.14	Mut-30 spezifische T-Zellen sind nicht in der Lage B16-F10 Zellen <i>in vitro</i> zu erkennen .....	53
Abbildung 3.15	Mut-30 spezifische T-Zellen infiltrieren das Tumorgewebe .....	55
Abbildung 3.16	Mut-30-Vakzinierung führt zu signifikant erhöhter Lymphozyteninfiltration .....	56
Abbildung 3.17	Die erhöhte Infiltration von CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> T-Zellen kann in der IF Analyse bestätigt werden.....	58
Abbildung 3.18	In Mut-30 RNA behandelten Tieren finden sich signifikant weniger CD4 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> T-Zellen im Tumor. ....	59
Abbildung 3.19	Tumore zeigen erhöhte Expression von MHC Molekülen nach Mut-30 Vakzinierung.....	60
Abbildung 3.20	NK-Zellen spielen in der frühen Phase eine entscheidende Rolle .....	62
Abbildung 3.21	In der späten Phase der Therapie verschwindet der NK-Zell Effekt .....	64
Abbildung 3.22	In IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> K.O. Mäusen verschwindet der Mut-30 Effekt .....	66
Abbildung 3.23	Die Position innerhalb des Pentatopes hat direkten Einfluss auf die Immunogenität des Epitopes .....	69
Abbildung 3.24	Pentatop vs. Monotop. Vs. Mix.....	71
Abbildung 4.1	Subzelluläre Lokalisationen des Mutanoms .....	75
Abbildung 4.2	Venn-Diagramme, die die Frequenz des Peptid- und RNA-Screens in Beziehung setzen .....	77
Abbildung 4.3	Gliederung der Kinesine in 14 Familien (adaptiert Cross 2014) .....	81
Abbildung 4.4	Zwei-Phasen-Modell der Tumormunität <i>in vivo</i> .....	92

## 9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1	Mechanismen der Immunevasion von Tumoren.....	09
Tabelle 1.2	Vakzinierungsstrategien.....	11
Tabelle 1.3	RNA assoziierte Toll-like-Rezeptoren mit ihrer Lokalisation und ihren natürlich und synthetischen Liganden .....	13
Tabelle 2.1	RNA + Liposomen Formulierung .....	29
Tabelle 3.1	Sequenz der verwendeten Model-Antigene für Pentatop-Design .....	68
Tabelle 5.1	Tabelle aller Peptide die für B16-F10 Mutationen kodieren. Alle Peptide wurden Von der Firma JPT Peptide Technologies (Berlin, D) synthetisiert.....	108

## 10 Veröffentlichungen

### 10.1 Originalarbeiten

Castle, J. C., Kreiter, S., Diekmann, J., Löwer, M., **van de Roemer, N.**, de Graaf, J., ... Sahin, U. (2012). Exploiting the mutanome for tumor vaccination. *Cancer Research*, 72(5), 1081–91

Diken, M., Attig, S., Grunwitz, C., Kranz, L., Simon, P., **van de Roemer, N.**, ... Kreiter, S. (2013). CIMT 2013: advancing targeted therapies--report on the 11th Annual Meeting of the Association for Cancer Immunotherapy, May 14-16 2013, Mainz, Germany. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 9(9), 2025–32.

Diken, M., Boegel, S., Grunwitz, C., Kranz, L. M., Reuter, K., **van de Roemer, N.**, ... Kreiter, S. (2014). CIMT 2014: Next waves in cancer immunotherapy--report on the 12th annual meeting of the Association for Cancer Immunotherapy: May 6–8 2014, Mainz, Germany. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*,

Kranz, L. M., Birtel, M., Krienke, C., Grunwitz, C., Petschenka, J., **van de Roemer, N.**, ... Diken, M. (2015). CIMT 2015: The right patient for the right therapy - Report on the 13th Annual Meeting of the Association for Cancer Immunotherapy. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*.

Kreiter, S., Vormehr, M., **van de Roemer, N.**, Diken, M., Löwer, M., Diekmann, J., ... Sahin, U. (2015). Mutant MHC class II epitopes drive therapeutic immune responses to cancer. *Nature*, 520(7549), 692–6

### 10.2 Abstracts und Poster

**van de Roemer, N.**, Diekmann, J., Kreiter, S., Castle, J. C., Selmi, A., Diken, M., Löwer, M.,...Sahin,U. Individualized vaccines for cancer. 10<sup>th</sup> annual CIMT meeting, Mainz, 2012

**van de Roemer, N.**, Diekmann, J., Kreiter, S., Castle, J. C., Selmi, A., Diken, M., Löwer, M.,...Sahin,U. Individualized vaccines for cancer. 3<sup>rd</sup> European Congress of Immunology, Glasgow, 2012

**van de Roemer, N.**, Diekmann, J., Kreiter, S., Boegel, S., Selmi, A., Diken, M., Löwer, M.,...Sahin,U. Non-synonymous mutation of CT26 colon carcinoma cell line are a source of immunogenic targets. 11<sup>th</sup> annual CIMT meeting, Mainz, 2013

**van de Roemer, N.**, Diekmann, J., Kreiter, S., Castle, J. C., Selmi, A., Diken, M., Löwer, M.,...Sahin,U. IVAC-The B16 Story. 43<sup>rd</sup> Annual Meeting German Society for Immunology, Mainz, 2013

---

**van de Roemer, N.,** Diekmann, J., Kreiter, S., Castle, J. C., Selmi, A., Diken, M., Löwer, M.,...Sahin,U. The pharmacodynamics of actively personalized RNA based anti-tumoral vaccination. Keystone - Immune Evolution in Cancer, Whistler, 2014

**van de Roemer, N.,** Diekmann, J., Kreiter, S., Castle, J. C., Selmi, A., Diken, M., Löwer, M.,...Sahin,U. The pharmacodynamics of actively personalized RNA based anti-tumoral vaccination. 12<sup>th</sup> annual CIMT meeting, Mainz, 2014

**van de Roemer, N.,** Diekmann, J., Kreiter, S., Castle, J. C., Selmi, A., Diken, M., Löwer, M.,...Sahin,U. Individualized tumor immunotherapy – From mutanome to actively personalized RNA based cancer vaccination. 13<sup>th</sup> annual CIMT meeting, Mainz, 2015

## 11 Danksagung

## 12 Lebenslauf