

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen  
Abteilung Innere Medizin II  
(Schwerpunkt: Hämatologie, Onkologie, Klinische Immunologie,  
Rheumatologie)

**Kartierung des HLA-Ligandoms von kolorektalen  
Karzinomen mittels massenspektrometrischer Analyse**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Dengler, Florian**

**2021**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. S. Haen

2. Berichterstatter: Professor Dr. M. Ueffing

Tag der Disputation: 07.06.2021

Meinen Eltern

Die Studien wurden durchgeführt in Zusammenarbeit mit:

Interfakultäres Institut für Zellbiologie – Abteilung Immunologie

Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Hans-Georg Rammensee

Prof. Dr. med. Sebastian P. Haen

Dr. rer. nat. Nora Mirza

Prof. Dr. rer. nat. Stefan Stevanović

Daniel Kowalewski

Nico Trautwein

Abteilung für Allgemeine, Viszeral- und Transplantationschirurgie (AVT), Universitätsklinikum Tübingen:

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. univ. Alfred Königsrainer

Dr. med. Markus W. Löffler

Innere Medizin II - Onkologie, Hämatologie, Klinische Immunologie, Rheumatologie und Pulmologie, Universitätsklinikum Tübingen:

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Lothar Kanz

Prof. Dr. med. Sebastian P. Haen

# Inhaltsverzeichnis

<b>Kooperation .....</b>	<b>i</b>
<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>ii</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>v</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>vii</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>ix</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Das kolorektale Karzinom .....	1
1.1.1 Epidemiologie .....	1
1.1.2 Ätiologie und Pathogenese .....	1
1.1.3 Symptome .....	4
1.1.4 Diagnostik .....	4
1.1.5 Histologie .....	6
1.1.6 Klassifikation .....	8
1.1.7 Therapie .....	10
1.2 Das Immunsystem .....	13
1.2.1 Allgemeines zum Immunsystem .....	13
1.2.2 Das angeborene Immunsystem .....	13
1.2.3 Das erworbene Immunsystem .....	17
1.2.4 Der Major Histocompatibility Complex (MHC) .....	18
1.2.5 Erkennung von MHC-restringierten Peptiden .....	24
1.2.6 Aktivierung der T-Lymphozyten .....	27
1.3 Immunologische Tumorthherapie .....	31
1.3.1 Grundlagen der Immuntherapie .....	32

1.3.2	Möglichkeiten der Immuntherapie.....	34
<b>2</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit .....</b>	<b>44</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>46</b>
3.1	Material .....	46
3.1.1	Patientengewebe .....	46
3.1.2	Geräte.....	48
3.1.3	Software .....	50
3.1.4	Verbrauchsmaterialien.....	50
3.1.5	Puffer und Lösungen .....	52
3.1.6	Antikörper .....	54
3.2	Methoden .....	55
3.2.2	Identifizierung von Peptidsequenzen durch Massenspektrometrie.....	57
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>66</b>
4.1	Ergebnisse der identifizierten MHC-Klasse-I-Liganden.....	66
4.2	Auswertung der Ergebnisse der MHC-Klasse-I-Liganden.....	72
4.2.1	Vergleichende Gegenüberstellung der detektierten Quellproteine anhand des prozentualen Anteils an Antigen-positiven Ligandomen.....	72
4.2.2	Literaturrecherche zu den gefundenen Quellproteinen.....	80
4.3	Ergebnisse der identifizierten MHC-Klasse-II-Liganden.....	90
4.4	Auswertung der Ergebnisse der MHC-Klasse-II-Liganden.....	94
4.4.1	Vergleichende Gegenüberstellung der detektierten Quellproteine anhand des prozentualen Anteils an Antigen-positiven Ligandomen.....	94
4.4.2	Literaturrecherche zu den gefundenen Quellproteinen.....	100
4.5	Semiquantitative Analyse.....	107
4.6	Tumor-assoziierte Änderung des HLA-Ligandoms und Zuordnung zu metabolischen Pfaden.....	119

<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>128</b>
5.1	Allgemeines .....	128
5.2	MHC-Klasse-I.....	129
5.3	MHC-Klasse-II.....	132
5.4	Semiquantitative Betrachtung .....	135
5.5	Tumor-assoziierte Änderung des HLA-Ligandoms und Zuordnung zu metabolischen Pfaden.....	136
5.6	Limitationen und Ausblick .....	140
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>144</b>
<b>7</b>	<b>Referenzen .....</b>	<b>146</b>
<b>8</b>	<b>Veröffentlichungen .....</b>	<b>172</b>
8.1	Abstracts für Kongresse: Poster und Vorträge.....	172
8.2	Biomedizinische Fachzeitschrift .....	172
<b>9</b>	<b>Erklärung zum Eigenanteil.....</b>	<b>173</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>174</b>
<b>11</b>	<b>Curriculum vitae .....</b>	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ACT	adoptive cell transfer
AGC	automatic gain control
APC	antigen-presenting cell
CAR-T-Zellen	chimeric antigen receptor-T-Zellen
CD**	cluster of differentiation **
CDR	complementary determining regions
CEA	carcinoembryonales Antigen
CID	collision induced dissociation
CLIP-Fragment	class-II-associated invariant-chain peptide-Fragment
CMS	consensus molecular subtypes
CRC	colorectal cancer
DNA	deoxyribonucleic acid
DRiPs	defective ribosomal products
EGFR	epidermal growth factor receptor
ERAAP	endoplasmatic reticulum aminopeptidase associated with antigen processings
FAP	familial adenomatous polyposis
FOBT	fäkaler okkultter Bluttest
FTMS	fourier transform mass spectrometry
GILT	IFN- $\gamma$ induzierte lysosomale Thiolreduktase
GM-CSF	granulocyte-macrophage colonystimulating factor
HLA	human leucocyte antigene
HNPCC	hereditary nonpolyposis colorectal cancer
ICOS	inducible T-cell costimulator
IFN	Interferon
IL	Interleukin
ILL	innate like lymphocytes
irAE	immune related adverse events
ITAMs	immunoreceptor tyrosine-based activation motifs



ITMS	ion trap mass spectrometry
JAK	Januskinase
MHC	major histocompatibility complex
mRNA	messenger ribonucleic acid
MSI	microsatellite instability
MSS	microsatellite stability
NK-Zellen	naturliche Killerzellen
NSCLC	non-small-cell lung cancer
ORR	objective response rate
OS	overall survival
PFS	progression free survival
PMN	polymorphonuclear neutrophil
STAT	signal transducers and activators of transcription
TAP	transporters associated with antigen processing
TCR	T-cell receptor
TCRm-mAB	T-cell-receptor mimic-antibodies
TGF- $\beta$	transforming growth factor $\beta$
TIL	tumor infiltrating lymphocyte
TLR	toll-like Rezeptor
uHPLC	ultra high performance liquid chromatography
UICC	union internationale contre le cancer
VEGF	vascular endothelial growth factor

## Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: HÄMATOPOESE .....	16
ABBILDUNG 2: DIE STRUKTUR EINES MHC-KLASSE-I-MOLEKÜLS, BESTIMMT DURCH DIE RÖNTGENKRISTALLOGRAFIE .....	20
ABBILDUNG 3: DIE STRUKTUR EINES MHC-KLASSE-II-MOLEKÜLS, BESTIMMT DURCH DIE RÖNTGENKRISTALLOGRAFIE .....	20
ABBILDUNG 4: MHC-KLASSE-I-MOLEKÜLE VERLASSEN DAS ENDOPLASMATISCHE RETICULUM NUR, WENN SIE PEPTIDE GEBUNDEN HABEN.....	21
ABBILDUNG 5: DIE STRUKTUR DES T-ZELLREZEPTORS.....	25
ABBILDUNG 6: FÜR DIE MEISTEN CD8-T-ZELL-REAKTIONEN SIND CD4-T-LYMPHOZYTEN NOTWENDIG .....	29
ABBILDUNG 7: BEI DER AKTIVIERUNG VON NAIVEN T-LYMPHOZYTEN SPIELEN DREI ARTEN VON SIGNALEN EINE ROLLE .....	29
ABBILDUNG 8: BOX-WHISKERS-PLOT PEPTIDSEQUENZ- UND PROTEINAUSBEUTE MHC-KLASSE-I. ....	67
ABBILDUNG 9: VENN-DIAGRAMME DER PEPTID- UND PROTEINAUSBEUTE DER MHC-KLASSE-I. ....	67
ABBILDUNG 10: MHC-I: DER PROZENTUALE ANTEIL ANTIGEN-POSITIVER HLA-LIGANDOME NACH DEN QUELLPROTEINEN GEORDNET. ....	73
ABBILDUNG 11: MHC-I: DER PROZENTUALE ANTEIL LIGAND-POSITIVER HLA-LIGANDOME NACH DEN GEFUNDENEN PEPTIDSEQUENZEN GEORDNET.....	75
ABBILDUNG 12: RELATIVE HÄUFIGKEITEN DER AUSGEWÄHLTEN QUELLPROTEINE DER MHC-KLASSE-I-LIGANDEN IN ALLEN CRC-PROBEN. ....	81
ABBILDUNG 13: RELATIVE HÄUFIGKEITEN DER AUSGEWÄHLTEN MHC-KLASSE-I-LIGANDEN IN ALLEN CRC-PROBEN.....	82
ABBILDUNG 14: BOXPLOT PEPTIDSEQUENZ- UND PROTEINAUSBEUTE MHC-KLASSE-II. ....	91
ABBILDUNG 15: VENN-DIAGRAMME DER PEPTID- UND PROTEINAUSBEUTE DER MHC-KLASSE-II. ....	91
ABBILDUNG 16: MHC-II: DER PROZENTUALE ANTEIL ANTIGEN-POSITIVER HLA-LIGANDOME NACH DEN QUELLPROTEINEN GEORDNET. ....	95

ABBILDUNG 17: MHC-II: DER PROZENTUALE ANTEIL LIGAND-POSITIVER HLA-LIGANDOME NACH DEN GEFUNDENEN PEPTIDSEQUENZEN GEORDNET.....	97
ABBILDUNG 18: RELATIVE HÄUFIGKEITEN DER AUSGEWÄHLTEN QUELLPROTEINE DER MHC-KLASSE-II-LIGANDEN IN ALLEN CRC-PROBEN. ....	101
ABBILDUNG 19: RELATIVE HÄUFIGKEITEN DER AUSGEWÄHLTEN MHC-KLASSE-II-LIGANDEN IN ALLEN CRC-PROBEN.....	101
ABBILDUNG 20: VOLCANO-PLOTS MHC-KLASSE-I.....	111
ABBILDUNG 21: MHC-KLASSE-I: ÜBERREPÄSENTIERTE PEPTIDE GEGEN UNTERREPÄSENTIERTE PEPTIDE AUFGETRAGEN. ....	112
ABBILDUNG 22: VOLCANO-PLOTS MHC-KLASSE-II.....	115
ABBILDUNG 23: MHC-KLASSE-II: ÜBERREPÄSENTIERTE PEPTIDE GEGEN UNTERREPÄSENTIERTE PEPTIDE AUFGETRAGEN. ....	116
ABBILDUNG 24: VORONOI-DIAGRAMM MHC-KLASSE-I CRC UND NMC KOMBINIERT .....	121
ABBILDUNG 25: VORONOI-DIAGRAMM MHC-KLASSE-II CRC UND NMC KOMBINIERT .....	122
ABBILDUNG 26: ÜBERREPRÄSENTIERTE UND TUMOREXKLUSIVE MHC-KLASSE-I-LIGANDEN AUS DEN CRC- UND NMC-PROBEN VERGlichen MIT BEKANNTEN METABOLISCHEN PFADEN IN KARZINOMEN .....	123
ABBILDUNG 27: AUSSCHNITT A: ÜBERREPRÄSENTIERTE UND TUMOREXKLUSIVE MHC-KLASSE-I-LIGANDEN AUS DEN CRC- UND NMC-PROBEN VERGlichen MIT BEKANNTEN METABOLISCHEN PFADEN IN KARZINOMEN .....	124
ABBILDUNG 28: AUSSCHNITT B: ÜBERREPRÄSENTIERTE UND TUMOREXKLUSIVE MHC-KLASSE-I-LIGANDEN AUS DEN CRC- UND NMC-PROBEN VERGlichen MIT BEKANNTEN METABOLISCHEN PFADEN IN KARZINOMEN .....	125
ABBILDUNG 29: AUSSCHNITT C: ÜBERREPRÄSENTIERTE UND TUMOREXKLUSIVE MHC-KLASSE-I-LIGANDEN AUS DEN CRC- UND NMC-PROBEN VERGlichen MIT BEKANNTEN METABOLISCHEN PFADEN IN KARZINOMEN .....	126
ABBILDUNG 30: AUSSCHNITT D: ÜBERREPRÄSENTIERTE UND TUMOREXKLUSIVE MHC-KLASSE-I-LIGANDEN AUS DEN CRC- UND NMC-PROBEN VERGlichen MIT BEKANNTEN METABOLISCHEN PFADEN IN KARZINOMEN .....	127

## Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: EMPFEHLUNG KONTROLLKOLOSKOPIEN.....	5
TABELLE 2: STAGING DES KOLOREKTALEN KARZINOMS .....	6
TABELLE 3: TNM – KLASSIFIKATION UND UICC – KLASSIFIKATION.....	9
TABELLE 4: STADIENGERECHTE THERAPIE DES KOLOREKTALEN KARZINOMS.....	12
TABELLE 5: DIE ANZAHL DER MENSCHLICHEN T-ZELL-REZEPTOR-GEN-SEGMENTE ..	26
TABELLE 6: KATEGORIEN VON TUMORANTIGENEN ANHAND IHRER ENTSTEHUNG UND JEWELIGE BEISPIELE. ....	33
TABELLE 7: VERWENDETE GEWEBEPROBEN.....	46
TABELLE 8: VERWENDETE ANTIKÖRPER.....	54
TABELLE 9: ANZAHL IDENTIFIZIERTER MHC-KLASSE-I-LIGANDEN UND KORRESPONDIERENDER QUELLPROTEINE AUS DEN ANALYSIERTEN PROBEN. ....	68
TABELLE 10: ANZAHL DER BINDER UND DEREN PROZENTUALER ANTEIL. ....	71
TABELLE 11: QUELLPROTEINE, DIE AUSSCHLIEßLICH AUF MINDESTENS FÜNF TUMORPROBEN GEFUNDEN WURDEN .....	76
TABELLE 12: PEPTIDSEQUENZEN, DIE AUSSCHLIEßLICH AUF MINDESTENS FÜNF TUMORPROBEN GEFUNDEN WURDEN. „M“ IN DER FASTA-FORMEL DER PEPTIDE BEZEICHNET EIN DURCH OXIDATION MODIFIZIERTES METHIONIN. ....	78
TABELLE 13: MHC-I: ERGEBNISSE DER LITERATURRECHERCHE ZU DEN QUELLPROTEINEN UND DEN IHNEN ZUGEORDNETEN PEPTIDSEQUENZEN. ....	84
TABELLE 14: MHC-I: ERGEBNISSE DER LITERATURRECHERCHE ZU DEN PEPTIDSEQUENZEN UND DEREN ZUGEORDNETEN QUELLPROTEINE.....	88
TABELLE 15: ANZAHL IDENTIFIZIERTER MHC-KLASSE-II-LIGANDEN UND KORRESPONDIERENDER QUELLPROTEINE AUS DEN ANALYSIERTEN CRC-PROBEN .....	93
TABELLE 16: QUELLPROTEINE, DIE AUSSCHLIEßLICH AUF MINDESTENS VIER TUMORPROBEN GEFUNDEN WURDEN .....	98
TABELLE 17: PEPTIDSEQUENZEN, DIE AUSSCHLIEßLICH AUF MINDESTENS VIER TUMORPROBEN GEFUNDEN WURDEN. ....	98
TABELLE 18: MHC-II: ERGEBNISSE DER LITERATURRECHERCHE ZU DEN QUELLPROTEINEN UND DEN IHNEN ZUGEORDNETEN PEPTIDSEQUENZEN. ....	102

TABELLE 19: MHC-II: ERGEBNISSE DER LITERATURRECHERCHE ZU DEN PEPTIDSEQUENZEN.....	105
TABELLE 20: MHC-KLASSE-I: PEPTIDSEQUENZEN, DIE AUF MINDESTENS FÜNF CRC- PROBEN ÜBERREPRÄSENTIERT SIND.....	118
TABELLE 21: LITERATURRECHERCHE ZU DEN QUELLPROTEINEN DER ÜBERREPRÄSENTIERTEN PEPTIDSEQUENZEN DER MHC-KLASSE-I.....	118

# 1 Einleitung

## 1.1 Das kolorektale Karzinom

### 1.1.1 Epidemiologie

In Deutschland ist das kolorektale Karzinom mit jährlich ca. 60.000 Neuerkrankungen die zweithäufigste Tumorentität nach dem Bronchialkarzinom, obwohl die Rate an Neuerkrankungen in den letzten Jahren kontinuierlich zurückgegangen ist. Männer sind häufiger betroffen als Frauen, wobei die Erkrankungswahrscheinlichkeit mit zunehmendem Alter bei beiden Geschlechtern ansteigt. Bei den Männern ist das kolorektale Karzinom die zweithäufigste tumorassoziierte Todesursache, bei den Frauen die dritthäufigste. Im Jahr versterben ungefähr 25.000 Menschen in Deutschland an einem kolorektalen Karzinom und dessen Folgen (Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2017). Ähnliche Verhältnisse können für Amerika angenommen werden. Für das Jahr 2019 werden ca. 147.950 Neuerkrankungen und bis zu 53.200 Todesfälle in den USA erwartet (Siegel et al., 2020).

### 1.1.2 Ätiologie und Pathogenese

#### 1.1.2.1 Polypen des Kolons

Polypen des Kolons finden sich bei 10 % aller Erwachsenen im Sektionsgut. Hierbei wird zwischen juvenilen (Hamartomen), entzündlichen, hyperplastischen und neoplastischen (meist Adenome) Polypen unterschieden. Fast alle kolorektalen Karzinome entstehen aus Adenomen, weshalb diesen sowohl in der Pathogenese, als auch in der Vorsorge eine zentrale Rolle zukommt.

#### 1.1.2.2 Adenom – Karzinom Sequenz

Der Übergang von einem Adenom zum Karzinom wird als Adenom-Karzinom-Sequenz bezeichnet. Vogelstein et al. konnten zeigen, dass dieser Prozess typischerweise ca. 10 Jahre in Anspruch nimmt und das Resultat von Inaktivierungen einiger Tumorsuppressorgene bzw. von Aktivierung einiger Onkogene ist. Wird eine kritische Anzahl an solchen Mutationen überschritten, so wird das Wachstum der mutierten Zellen unkontrolliert und möglicherweise invasiv. Dies wird als

malignes Wachstum bezeichnet (Fearon et al., 1990; Vogelstein et al., 1988). Andere Entartungswege sind mittlerweile bekannt und beschrieben. Die Entartungswahrscheinlichkeit eines Adenoms hängt vom makroskopischen Erscheinungsbild, der Histologie und seiner Größe ab. Prinzipiell wird makroskopisch zwischen gestielten und flachen (sessilen) Adenomen unterschieden. Histologisch wird zwischen tubulären, villösen und tubulovillösen Adenomen differenziert (Lambert et al., 2009; Participants in the Paris Workshop, 2003). Das höchste Entartungsrisiko weisen villöse sessile Adenome auf. Ferner steigt das Risiko mit zunehmender Größe des Adenoms an (DiSario et al., 1991).

### 1.1.2.3 Sporadisches kolorektales Karzinom

Das sporadische kolorektale Karzinom in Abgrenzung zum hereditären tritt ohne Vererbung von bestimmten Syndromen auf, die mit einem höheren Risiko einhergehen an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken. Auch wenn die Ätiologie des sporadischen kolorektalen Karzinoms nicht endgültig gesichert ist, so scheinen einige Umweltfaktoren eine Rolle zu spielen. Das kolorektale Karzinom ist in den westlichen Industriestaaten sehr viel häufiger als in den übrigen Ländern. Dies wird vor allem mit den hier vorherrschenden Ernährungsgewohnheiten in Verbindung gebracht. So konnte gezeigt werden, dass vor allem der häufige Verzehr von tierischen Fetten und Fleisch ein eigenständiger Risikofaktor für das kolorektale Karzinom darstellt (Giovannucci et al., 1994; Zhu et al., 2014). Auch weitere Probleme, die sich aus den Ernährungsgewohnheiten ergeben, wie z.B. der Diabetes mellitus Typ II (Larsson et al., 2005; Marble, 1934), sowie erhöhte Cholesterinspiegel (Holtzman et al., 1987) konnten als weitere Risikofaktoren identifiziert werden. Ebenfalls soll Tabakrauch ein Risikofaktor für die Entstehung eines kolorektalen Karzinoms sein, auch wenn kausale Zusammenhänge noch nicht hergestellt werden konnten (Botteri et al., 2008; Liang et al., 2009).

Chronisch entzündliche Prozesse sind ebenfalls ein Risikofaktor für die maligne Entartung im Allgemeinen und im Speziellen im Kolon (Okada, 2014). Daher sind die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ein erheblicher Risikofaktor für die Entwicklung des kolorektalen Karzinoms (Dyson et al., 2012). Hierbei ist das Risiko zur malignen Entartung im Kolon bei der Colitis ulcerosa höher als beim

Morbus Crohn (Ahmadi et al., 2009). Auch eine Entzündung bzw. eine Endokarditis durch *Streptococcus bovis* stellt einen unabhängigen Risikofaktor dar (Krishnan et al., 2014).

#### 1.1.2.4 Hereditäres kolorektales Karzinom

Es gibt einige hereditäre Syndrome, die mit einem gehäuften Vorkommen von kolorektalen Polypen und/oder kolorektalen Karzinomen assoziiert sind. Diese Syndrome werden im Allgemeinen autosomal-dominant vererbt. Die wichtigsten Syndrome sind die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) und das hereditäre non-polypöse kolorektale Karzinom (HNPCC, Lynch-Syndrom). Weitere Beispiele sind das Birt-Hogg Dubé-Syndrom, die MUTYH-assoziierte Polyposis, das Peutz-Jeghers-Syndrom, die juvenile Polyposis und das Cowden-Syndrom. Bei der FAP kommt es durch einen Defekt des APC-Gens (Tumorsuppressorgen) zu einer Daueraktivierung des Wnt-Signalweges, wodurch es zu einem unkontrollierten Zellwachstum und damit einhergehend zur Bildung unzähliger Kolonpolypen kommt (Friedrich et al., 2003; Nagase et al., 1993). Die Mutation des APC-Gens kann auch in anderen Zellen zu einem unkontrollierten Zellwachstum führen, weshalb auch das Risiko für andere Tumoren erhöht ist, z.B. für Epidermoidzysten und Osteome (Gardner-Syndrom), Glio- und Medulloblastome (Turcot-Syndrom) und für eine spezielle Art der Retinahyperplasie (CHRPE) (Hamilton et al., 1995). Im Laufe ihres Lebens erkranken Patienten, die an einer FAP leiden, zu 100 % an einem kolorektalen Karzinom.

Patienten mit einem HNPCC erkranken zu 80 % an einem kolorektalen Karzinom. Bei ihnen bilden sich keine Schleimhautpolypen (Lynch et al., 2003). Jedoch ist das Risiko für das Karzinom erhöht. Dies liegt an defekten DNA-Reparaturgenen, die zu einer erhöhten Fehlerzahl in der Replikation führen (messbar anhand der Mikrosatelliteninstabilitäten) (Peltomaki et al., 1993). Durch diese erhöhte Fehlerzahl kann es zu weiteren Mutationen kommen und dadurch zu einer malignen Transformation (Ionov et al., 1993). Bisher sind sechs verschiedene Mutationen von DNA – Mismatch-Repair-Genen bekannt, die ein HNPCC Syndrom verursachen. In Abhängigkeit von diesen Mutationen ist auch das Risiko extraintestinaler Tumoren erhöht, vor allem für das Endometrium-, das Magen-, das Ovarial-



sowie das Urothelkarzinom (Lipkin et al., 2000; Lucci-Cordisco et al., 2001; Lucci-Cordisco et al., 2003; Nicolaidis et al., 1994) .

### **1.1.3 Symptome**

Die klinischen Symptome variieren sehr stark in Abhängigkeit von der Lokalisation des Karzinoms. Sie sind sehr unspezifisch, was oftmals zu einer späten Diagnosestellung führt. Prinzipiell sind Karzinome umso früher symptomatisch, je weiter aboral sie liegen. Dies lässt sich durch die zunehmende Stuhlkonsistenz begründen, was dazu führt, dass distal gelegene Karzinome früher zu Passagestörungen bis hin zum Ileus führen. Auch Stuhlunregelmäßigkeiten bzw. Veränderungen der Stuhlgewohnheiten können ein Symptom des kolorektalen Karzinoms sein. Viele Patienten fallen durch die B-Symptomatik auf. Besonders bei wiederholten (okkulten) Blutungen aus dem Karzinom kann es als Folge zur Anämie kommen.

### **1.1.4 Diagnostik**

#### **1.1.4.1 Screeninguntersuchung**

In den Screeninguntersuchungen sollen möglichst Polypen erkannt und entfernt werden, bevor ein Karzinom entstehen konnte. Auch wenn bereits eine maligne Entartung stattgefunden hat, wird eine Früherkennung sowohl die Therapie beeinflussen (siehe Kap. 1.1.7) als auch die Prognose verbessern. In Deutschland wird die Vorsorge des kolorektalen Karzinoms ab dem 50. Lebensjahr empfohlen (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft), 2019). Diese Vorsorgeuntersuchungen sollten durch eine komplette Koloskopie in Verbindung mit einer digital-rektalen Untersuchung (DRU) durchgeführt werden (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft), 2019). Diese soll dann bei unauffälligem Befund alle zehn Jahre wiederholt werden. Patienten, die sich weigern an einer Koloskopie teilzunehmen, sollten zumindest eine Rektosigmoidoskopie, eine digital-rektale Untersuchung und einen fäkalen occulten Bluttest (FOBT) erhalten (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft), 2019). Bei bekannten hereditären Prädispositionen oder bereits vorangehenden Auffälligkeiten, sowie dem Vorliegen von chronisch

entzündlichen Darmerkrankungen wird von diesem Schema abgewichen (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft), 2019).

#### 1.1.4.2 Diagnostik bei vorhandenen Polypen

Wird bei einer solchen Screeninguntersuchung oder aber im Zuge einer Koloskopie bei einem symptomatischen Patienten ein oder mehrere Polyp(en) entdeckt, so sollten diese mittels Schlingenektomie *in toto* abgetragen werden und histologisch begutachtet werden. Kann der Polyp nicht mittels Schlinge abgetragen werden, so können andere Verfahren, wie die Zangenektomie oder auch chirurgische Verfahren, zum Einsatz kommen. Primäres Ziel ist stets die vollständige Resektion bei möglichst geringer Blutungs- und Perforationsgefahr. Kontrollkoloskopien sollten sich nach abgetragenen Polypen anschließen, sind aber abhängig von der gefundenen Histologie und auch der Anzahl und der Größe der Polypen (siehe Tabelle 1) (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft), 2019).

**Tabelle 1: Empfehlung Kontrollkoloskopien (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft), 2019)**

<b>Abgetragener Befund</b>	<b>Kontrollkoloskopie nach</b>
Nicht neoplastische Polypen	Keine Nachkontrolle empfohlen
Einzelne Adenome (<1cm, ohne höhergradige intraepitheliale Neoplasie (IEN))	5 – 10 Jahre
Multiple Adenome Villöses Adenom Adenom mit höhergradiger IEN und vollständiger Resektion (R0)	3 Jahre
Unvollständige Abtragung (R1, R2) Abtragung großer Adenome in piecemeal-Technik	2-6 Monate
Nach unauffälliger Kontrollendoskopie	5 -10 Jahre

#### 1.1.4.3 Diagnostik bei vorhandenem Karzinom

Ist ein Karzinom histologisch gesichert, so wird eine Ausbreitungsdiagnostik, das so genannte *Staging*, erforderlich. Zum klassischen Staging gehört die lokale Ausbreitungsdiagnostik, die die Eindringtiefe des Tumors sowie dessen Einwachsen in andere Organe abklärt. Ferner gehört dazu die Suche nach Lymphknoten,

sowie nach Fernmetastasen. Um diese verschiedenen Qualitäten abzuklären, werden unterschiedliche Untersuchungsverfahren benötigt, die in Tabelle 2 ersichtlich sind. Hier wird zwischen dem Kolonkarzinom und dem Rektumkarzinom unterschieden, da sie sich sowohl in den Metastasierungswegen als auch in der Therapie (siehe Kap. 1.1.7) unterscheiden. Auch sind einige diagnostischen Verfahren nicht bei jeder Tumorlokalisation durchführbar oder aussagekräftig.

**Tabelle 2: Staging des kolorektalen Karzinoms (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft), 2019)**

<b>Untersuchungsverfahren</b>	<b>Kolonkarzinom</b>	<b>Rektumkarzinom</b>
Digital-rektale Untersuchung	Empfohlen	Empfohlen
Komplette Koloskopie	Empfohlen	Empfohlen
Bestimmung des CEA*	Empfohlen	Empfohlen
Abdomensonographie	Empfohlen	Empfohlen
Röntgen – Thorax	Empfohlen	Empfohlen
Starre Rektoskopie		Empfohlen
MR-Becken		Empfohlen
Rektale Endosonografie		Empfohlen
* Carcinoembryonales Antigen		

Zusätzlich zu den in Tabelle 2 genannten Untersuchungen soll eine Computertomographie (Staging-CT) gemacht werden, wenn der Befund unklar ist oder der Verdacht auf eine Fernmetastasierung besteht. Ein Staging-CT dient auch zur Differenzierung zwischen Tumoren, die auf die Darmwand beschränkt sind, und den Tumoren, die diese überschreiten (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft), 2019).

Das kolorektale Karzinom befindet sich zu 50% im Rektum, zu 30% im Sigma und zu 10% im Coecum/Colon ascendens. Die anderen 10% verteilen sich auf das übrige Kolon.

### **1.1.5 Histologie**

Die histologische Aufarbeitung des OP-Resektates und deren Ergebnis ist wichtig für das weitere therapeutische Vorgehen und für die Prognose. Auch die rezezierten Lymphknoten müssen auf einen Befall hin untersucht werden.

#### 1.1.5.1 Grading

Als Grading wird eine Einteilung von Tumorgewebe bezeichnet, die den Grad der Dysplasie im Vergleich zum Normalgewebe angibt. Prinzipiell kann man davon ausgehen, dass hochdifferenziertes Gewebe (wenige Dysplasien bzw. Veränderungen im Vergleich zu Normalgewebe) eine bessere Prognose aufweist als niedrigdifferenziertes (anaplastisches) Gewebe. Auch die Invasivität und die Wachstumsgeschwindigkeiten sind oftmals korreliert mit dem Grad der Differenzierung. Klassisch wird das Grading in den Stufen G1 bis G4 angegeben, wobei G1 hochdifferenziert und G4 komplett undifferenziert bedeutet (Edge et al., 2010).

#### 1.1.5.2 Beurteilung des Schnittrandes

Bei der Beurteilung des Schnittrandes ist vor allem wichtig, ob der Tumor bis an den Rand heranreicht oder nicht. Ist weder makroskopisch noch mikroskopisch ein Tumorrest im Patienten verblieben, so wird dies als R0 Resektion bezeichnet. Reicht der Tumor an den Schnittrand heran, dann muss von einem verbleibenden Tumorrest im Patienten ausgegangen werden und gegebenenfalls nachreseziert werden. Ist der verbleibende Rest makroskopisch sichtbar, so wird dies als R2 Zustand bezeichnet. Ist der verbleibende Rest nur mikroskopisch nachweisbar so wird dies als R1 Resektion bezeichnet (Edge et al., 2010).

#### 1.1.5.3 Metastasierung

Die Metastasierung des kolorektalen Karzinoms erfolgt in Abhängigkeit von seiner Lokalisation. Prinzipiell metastasiert das kolorektale Karzinom sowohl lymphogen als auch hämatogen. Lokoregionäre Metastasen sind ebenfalls möglich, was vor allem beim Rektumkarzinom eine große Rolle spielt.

Die lymphogene Ausbreitung erfolgt entlang der Lymphabflusswege. Diese verlaufen entlang der Blutgefäße des entsprechenden Abschnitts im Mesocolon. Daher befinden sich die meisten Lymphknotenmetastasen auch im Mesocolon. Das Rektum bildet hiervon eine Ausnahme. Tumore, die im oberen Teil des Rektums (12 – 16cm ab ano) lokalisiert sind, metastasieren in die paraaortalen Lymphknoten. Bei Tumoren im mittleren Teil des Rektums (6 – 12cm ab ano) kommen als weiterer Metastasierungsweg die Lymphknoten der Beckenwand hinzu. Tumoren

des unteren Rektumdrittels können zusätzlich in die inguinalen Lymphknoten metastasieren. Anhand dieses Sachverhaltes wird deutlich, dass die Prognose schlechter wird, je tiefer ein Rektumkarzinom lokalisiert ist.

Die hämatogene Metastasierung erfolgt primär in die Leber und danach in die Lunge. Einzige Ausnahme hiervon bildet das distale Rektumkarzinom, das direkt in die Lunge metastasieren kann. Nach der pulmonalen Metastasierung können prinzipiell alle weiteren Organe befallen werden.

### **1.1.6 Klassifikation**

Die Klassifikation dient zur Vereinfachung der Kommunikation, der Risikostratifizierung und schließlich auch zur Therapieentscheidung. Früher wurden die Stadien des kolorektalen Karzinoms nach Dukes eingeteilt. Diese Einteilung wurde durch die heute gebräuchliche TNM-Klassifikation und der darauf basierenden UICC-Klassifikation (Union internationale contre le cancer) ersetzt. TNM steht dabei für die drei zur Klassifikation herangezogenen Parameter, sprich die Tumorgöße des Primärtumors, die betroffenen Lymphknoten (Nodi lymphatici) und schließlich die Fernmetastasierung.

Tabelle 3 zeigt die aktuell gültige TNM Klassifikation und deren Einordnung in die aktuelle UICC Klassifikation.

Tabelle 3: TNM – Klassifikation und UICC – Klassifikation (Wittekind et al., 2010)

Stadium nach UICC	Tumor	Lymphknoten	Metastasen
0	Tis (carcinoma in situ)	N0	M0
I	T1 (Infiltration der Tela Submukosa) T2 (Infiltration der Lamina muscularis propria)	N0	M0
IIa	T3 (Infiltration der Lamina subserosa)	N0	M0
IIb	T4a (Durchwächst alle Kolonschichten)	N0	M0
IIc	T4b (Infiltration anderer Organe)	N0	M0
IIIa	T1 T1 T2	N1 (1-3 LK befallen) N2a (4-6 LK befallen) N1 (1-3 LK befallen)	M0
IIIb	T1 T2 T2 T3 T3 T4	N2b (≥7 LK befallen) N2b (≥7 LK befallen) N2a (4-6 LK befallen) N2a (4-6 LK befallen) N1 (1-3 LK befallen) N1 (1-3 LK befallen)	M0
IIIC	T3 T4a T4a T4b	N2b (≥7 LK befallen) N2a (4-6 LK befallen) N2b (≥7 LK befallen) Jedes N	M0 M0
IVa	Jedes T	Jedes N	M1a (Fernmetastasen in einem Organ)
IVb	Jedes T	Jedes N	M1b (Fernmetastasen in mehreren Organen)
IVC	Jedes T	Jedes N	Peritonealbefall

### 1.1.7 Therapie

Die Therapie erfolgt beim kolorektalen Karzinom stadienabhängig. Es wird grundsätzlich zwischen einem kurativem Ansatz und einem palliativem Ansatz unterschieden.

#### 1.1.7.1 Therapie des Kolonkarzinoms

Die UICC Stadien I – III werden beim Kolonkarzinom klassischerweise kurativ angegangen. Beim metastasierten Karzinom (UICC Stadium IV) kommt es auf die spezielle Situation an ob ein kurativer oder palliativer Therapieansatz gewählt wird. Bei dieser Entscheidung sollen zum einen die eigentliche Tumorausbreitung und dessen Genetik, als auch der Allgemeinzustand des Patienten berücksichtigt werden. Bei der chirurgischen Therapie des Kolonkarzinoms wird immer das Mesokolon mit den entsprechenden Lymphabflussbahnen mit entfernt werden. Da bei dieser kompletten mesokolischen Exzision, die als En-bloc-Resektion erfolgt, auch die zuführenden zentralen Arterien ligiert werden, ist dadurch auch das Resektionsausmaß bestimmt. Je nach Lokalisation des Karzinoms bietet sich also eine Hemikolektomie rechts/links, eine erweiterte Hemikolektomie, eine Transversumresektion, sowie eine Sigmaresektion an. Liegen bereits Leber oder Lungenmetastasen vor, so werden diese, wenn möglich, reseziert. Sind diese nicht resektabel, können lokalablative Verfahren, wie die Radiofrequenzablation bei Lebermetastasen, eingesetzt werden. Ist so eine Ablation dieser Metastasen ebenfalls unmöglich, so erfolgt eine systemische Chemotherapie, an die sich dann sekundär eine Resektion anschließen kann (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft), 2019).

Ansonsten wird eine neoadjuvante Chemotherapie beim Kolonkarzinom in den aktuell gültigen Therapieschemata nicht empfohlen. Eine adjuvante Chemotherapie ist jedoch in einigen Stadien empfohlen (siehe Tabelle 4). Hierbei kommen vor allem Oxaliplatin-haltige Präparate zum Einsatz und ansonsten Fluoropyrimidine (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft), 2019; Wolpin et al., 2007). In der palliativen Situation können weitere Chemotherapieschemata angewandt werden. Beim metastasierten Kolonkarzinom werden zusätzlich monoklonale Antikörper eingesetzt. Standardmäßig sind das aktuell EGFR-

Antikörper (*epidermal growth factor receptor*). Als EGFR-Antikörper sind Cetuximab und Panitumumab in der Therapie des metastasierten Kolonkarzinoms zugelassen. Sie binden an den EGF-Rezeptor und blockieren diesen, wodurch dieser inaktiviert wird. Diese Antikörper benötigen allerdings den Wildtyp des K-RAS Gens, was bedeutet, dass einige Tumore primäre Resistenzen gegen diese EGFR-Antikörper aufweisen und andere dadurch dann der Wirkung entkommen (sekundäre Resistenz) (Amado et al., 2008; Lievre et al., 2006). Auch der VEGF-Antikörper (*vascular endothelial growth factor*) Bevacizumab wird beim kolorektalen Karzinom eingesetzt. Dieser hemmt die Angiogenese, die essentiell für das Tumorwachstum ist (Bar et al., 2014; Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft), 2019).

#### 1.1.7.2 Therapie des Rektumkarzinoms

Wie aus Tabelle 4 ersichtlich wird, unterscheidet sich die Therapie des Rektumkarzinoms von der des Kolonkarzinoms in den UICC-Stadien II und III. Hier wird beim Rektumkarzinom eine neoadjuvante Therapie durchgeführt. Diese beinhaltet im Regelfall 5-Fluorouracil und kann mit einer Radiotherapie kombiniert werden. Vor allem bei hohen T-Stadien kann dadurch teilweise eine Operabilität erreicht werden, die vor der Therapie nicht bestanden hatte (Downsizing). Auch lässt sich durch die Verkleinerung des Tumors manchmal die Extirpation vermeiden und dadurch eine kontinenzerhaltende Operation durchführen. Es kommen hier vor allem zwei Operationsverfahren zum Einsatz: die tiefe anteriore Rektumresektion und die abdominoperineale Rektumextirpation. Bei der ersten Herangehensweise kann der Sphinkter erhalten werden und das nach Operation (neu) aborale Darmende wird mit dem natürlichen Sphinkter (Canalis analis) anastomosiert. Hier kann je nach Patient ein Pouch angelegt werden, um eine geringere Stuhlfrequenz zu erzielen. Es wird hierbei, wenn überhaupt, nur ein temporäres Stoma angelegt. Anders bei der abdominoperinealen Rektumextirpation. Hier wird das Rektum mit dem Analkanal und dem Sphinkterapparat entfernt und ein dauerhaftes Stoma angelegt. Die Entscheidung, welches Verfahren zum Einsatz kommt bzw. dem Patienten nahegelegt wird, hängt vor allem vom präoperativen (nach neoadjuvanter Therapie) Tumorrand und dessen Nähe zum Sphinkterapparat ab. Im Anschluss an die chirurgische Intervention wird adjuvant



weitertherapiert. Diese erfolgt klassisch ebenfalls mit 5-Fluorouracil und wird mit einer Radiotherapie kombiniert, falls nicht bereits vor der Operation eine Radiotherapie durchgeführt worden ist.

Die Therapie der UICC-Stadien I und IV ist denen des Kolonkarzinoms gleich (Abbas et al., 2010a; Abbas et al., 2010b; Cunningham et al., 2010; Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft), 2019; Wolpin et al., 2007).

**Tabelle 4: Stadiengerechte Therapie des kolorektalen Karzinoms (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft), 2019)**

<b>UICC Stadium</b>	<b>Kolonkarzinom</b>	<b>Rektumkarzinom</b>
I	- En-bloc-Resektion	- En-bloc-Resektion
II	- En-bloc-Resektion - (Adjuvante Therapie kann erwogen werden)	- Radiochemotherapie (→ Downstaging) - En-bloc-Resektion - Adjuvante Therapie (5-FU)
III	- En-bloc-Resektion - Adjuvante Therapie	Siehe Stadium II
IV	- Resektion einzelner Leber- und Lungenmetastasen - Chemotherapie - Ggf. Einsatz von monoklonalen Antikörpern	

## 1.2 Das Immunsystem

### 1.2.1 Allgemeines zum Immunsystem

Die zellulären Komponenten des Immunsystems leiten sich aus der hämatopoetischen Stammzelle ab. Aus dieser reifen im Knochenmark die verschiedenen Zellen heran und werden dann ins Blut freigesetzt, von wo aus sie dann ihren eigentlichen Bestimmungsort erreichen (siehe Abbildung 1). Nur die T-Lymphozyten reifen erst vollständig im Thymus aus. Prinzipiell gehen zwei große Zellreihen aus der Stammzelle hervor, die wiederum ihre eigenen Vorläuferzellen besitzen (Progenitorzellen). Zum einen die myeloische Reihe aus der die Granulozyten, die Makrophagen, die dendritischen Zellen, die Mastzellen, die Megakaryozyten und damit die Thrombozyten, sowie die Erythrozyten hervorgehen und zum anderen die lymphatische Reihe aus der die B- und die T-Lymphozyten sowie die NK-Zellen hervorgehen. Die genauen Ausreifungsprozesse werden in den folgenden Kapiteln dargelegt.

### 1.2.2 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem (innate immune system) ist mit all seinen Bestandteilen im Genom des Menschen verankert. Dies trifft zwar auch für das adaptive (erworbene) Immunsystem zu, jedoch können die dort beteiligten Proteine durch verschiedene Rearrangements auf Genomebene an die entsprechende Antigene angepasst werden (vgl. Kap. 1.2.3). Das angeborene Immunsystem hat den Zweck Erreger oder Fremdstoffe, die die natürlichen Barrieren des Körpers durchdrungen haben, direkt zu attackieren und wenn möglich abzuwehren. Es benötigt hierfür keinen vorangehenden Antigenkontakt. Es ist daher für die akut einsetzende Immunreaktion verantwortlich und entscheidend in den ersten 96 Stunden, weil dies die Latenzzeit ist, die vor allem beim Erstkontakt mit einem Erreger benötigt wird, bevor die adaptive Immunabwehr fähig ist, den Erreger zu bekämpfen.

Die Komponenten der angeborenen Immunabwehr sind sowohl humoraler als auch zellulärer Art. Die Granulozyten, die Makrophagen, die dendritischen Zellen (DCs), die Mastzellen und die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) werden dem angeborenen Immunsystem zugeordnet. Mit Ausnahme der beiden

letztgenannten Zellarten können diese Zellen direkt Erreger zerstören. Sie können aber auch durch bestimmte Botenstoffe (Chemokine, Zytokine) weitere Immunzellen in das betroffene Gebiet lotsen und eine generelle Entzündungsreaktion hervorrufen. Vor allem die dendritischen Zellen und die Makrophagen spielen eine große Rolle bei der Verknüpfung zur adaptiven Immunabwehr, da sie die phagozytierten Erreger auf speziellen Molekülen präsentieren können (vgl. Kap. 1.2.4) und so B- sowie T-Lymphozyten zum einen primen und zum anderen aktivieren können (Kupiec-Weglinski et al., 1988). Die NK-Zellen dienen zur Beseitigung körpereigener Zellen, die z.B. virenbefallen sind oder maligne entartet. Außer den NK-Zellen, die aus der lymphatischen Progenitorzelle hervorgehen, entstehen alle Zellen des angeborenen Immunsystems aus der myeloischen Progenitorzelle.

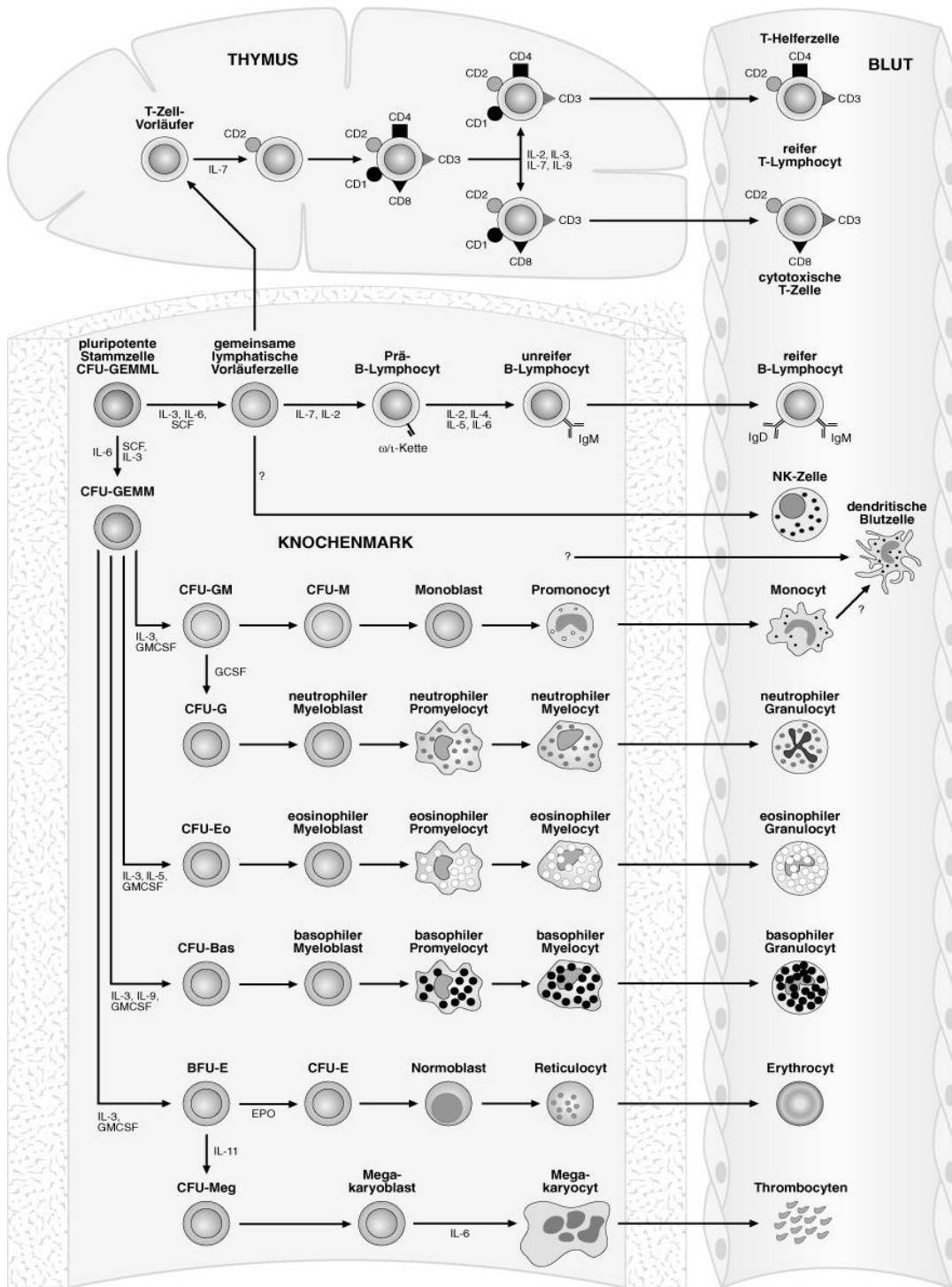
Haben Pathogene (insbesondere Bakterien) die natürlichen Barrieren des Körpers durchdrungen und beginnen sich dort zu vermehren, so werden sie oftmals sofort von Makrophagen oder polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMNs) phagozytiert und zerstört. Hierfür stehen diesen Zellen verschiedene Mechanismen zur Verfügung. Ein wichtiger Faktor sind hierbei die Lysosomen, die mit dem aufgenommenen Erreger verschmolzen werden können und Proteasen (vor allem Lysozym) und weitere Enzyme enthalten, die die Erreger schädigen können (Harrison et al., 2002). Auch sind die phagozytierenden Zellen in der Lage über verschiedene Enzyme Radikale zu produzieren (Superoxiddismutase, NADPH-Oxidase), die wiederum die Erreger schädigen und zerstören können (Bogdan et al., 2000). Weitere Mechanismen senken den pH-Wert der Zelle, entziehen dem Erreger Eisen (Lactoferrin), was für viele Bakterien essentiell für ihr Wachstum ist, oder interagieren direkt mit der Erregermembran und stören so deren Integrität (Defensine) (Drago-Serrano et al., 2017). Die phagozytierenden Zellen halten sich zu einem Großteil im Gewebe auf und haben so sofort nach Erregereintritt Kontakt zu diesen. Sie phagozytieren diese umgehend, setzen aber gleichzeitig Cytokine frei, die weitere Immunzellen in das entsprechende Gebiet lotsen und daher den Auftakt zur allgemeinen Entzündungsreaktion darstellen (Svanborg et al., 1999). Durch die Cytokine werden zum einen die kleinen Gefäße in dem Bereich weitgestellt und zum anderen das Endothel aktiviert. Die

Endothelzellen exprimieren daraufhin vermehrt Adhäsionsmoleküle (z.B. ICAM), die nötig sind, damit weitere Leukozyten (vor allem neutrophile Granulozyten) in das entzündete Gewebe einwandern können (Carlos et al., 1994).

Ein wichtiger Faktor der humoralen Komponente der angeborenen Immunität sind die Interferone. Die Produktion von Interferonen (IFN) wird durch eine Virusinfektion induziert. IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$  werden von verschiedenen Zelltypen produziert. Diese beiden Interferone binden sowohl an die produzierende Zelle als auch an deren Nachbarn und induzieren über eine Tyrosinkinase der Janusfamilie (JAK/STAT-Pathway) die Produktion von Proteinen, die die Virusvermehrung hemmen. Durch weitere Mechanismen hemmen sie auch die Translation und damit die Replikation des Virus (Pindel et al., 2011). Zudem spielen diese Interferone eine Rolle in der Vermittlung zwischen angeborener und adaptiver Immunität. Sie führen dazu, dass die dendritischen Zellen und die Makrophagen vermehrt costimulierende Moleküle exprimieren und dadurch die T-Lymphozyten vollständig aktivieren (siehe unten) (Durbin et al., 2000). Auch die Expression von MHC-I Molekülen nimmt unter dem Einfluss von Interferon- $\alpha/\beta$  bei allen Zellen zu, sodass diese leichter von CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten erkannt werden können (Locardi et al., 1987). Interferon- $\gamma$  wird von den NK-Zellen (Handa et al., 1983) und den T-Lymphozyten (CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>) gebildet. Es erhöht ebenfalls die Expression von MHC-I Molekülen und hemmt die Virusvermehrung (Wedgwood et al., 1988).

Die natürlichen Killerzellen werden ebenfalls von Interferon- $\alpha/\beta$  aktiviert. Sie bekämpfen intrazelluläre Erreger und maligne entartete körpereigene Zellen. Mit Hilfe ihrer Rezeptoren können die NK-Zellen gesunde körpereigene Zellen von entarteten bzw. befallenen Zellen unterscheiden. Sie registrieren Veränderungen in der MHC-I-Expression (Zellen mit zu niedriger Expression werden zerstört) und mit bestimmten Rezeptoren andere Oberflächenmoleküle und Liganden, die dann entweder hemmend oder aktivierend auf die NK-Zellen wirken (z.B. NKG2D-Rezeptor (Bauer et al., 1999), KIR-Rezeptor, NC-Rezeptor).

BLUTBILDUNG



**Abbildung 1: Hämatopoese** BFU-E: burst forming unit erythrocyte, CD: cluster of differentiation, CFU-Bas: colony forming unit basophil, CFU-E: colony forming unit erythrocyte, CFU-Eo: colony forming unit eosinophil, CFU-G: colony forming unit granulocyte, CFU-GEMM: colony forming unit granulocyte/erythrocyte/megakaryocyte/macrophage, CFU-GEMML: colony forming unit granulocyte/erythrocyte/megakaryocyte/macrophage/lymphocyte, CFU-GM: colony forming unit granulocyte/macrophage, CFU-M: colony forming unit macrophage, CFU-Meg: colony forming unit megakaryocyte, EPO: Erythropoetin, G-CSF: granulocyte colony stimulating factor, GM-CSF: granulocyte/macrophage colony stimulating factor, IL: Interleukin (aus [www.spektrum.de](http://www.spektrum.de) entnommen am 30.10.2014)

### 1.2.3 Das erworbene Immunsystem

Das adaptive Immunsystem wird durch den Kontakt zwischen dem Immunsystem und verschiedenen Pathogenen erworben. Hierbei werden die entsprechenden Rezeptoren und Antikörper immer spezifischer auf das Pathogen zugeschnitten und daher einerseits wirkungsvoller in der Abwehr des Zielantigens, andererseits jedoch auch eingeschränkter in der Breite der erkannten Erreger. Die Spezifizierung erfolgt über klonale Selektion (Burnet, 1959). Durch genetisches Rearrangement werden die Rezeptoren und Antikörper an den antigenbindenden Stellen (Fab-Region) stetig verändert und dann die Zellen, die einen antigenspezifischen Antikörper bzw. Rezeptor tragen, zur weiteren Teilung animiert (Dudley et al., 2005; Leder, 1982; Leder, 1983; Tonegawa, 1988). Die Zellen, die zu unspezifisch an das Antigen binden bzw. zu sehr an körpereigene Strukturen binden, gehen in Apoptose. Die adaptive Immunabwehr besitzt die Fähigkeit sich Pathogene, mit denen es in Kontakt gekommen ist, zu „merken“ und kann so bei wiederholten Kontakten schneller und sofort sehr spezifisch auf die Erreger reagieren. Die Zellen des adaptiven Immunsystems werden im Knochenmark gebildet und die B-Lymphozyten reifen dort vollständig aus. Sie gelangen über die Blutbahn in ihre eigentlichen Zielgewebe (Lymphknoten, Tonsillen, etc.), wo sie sich mit anderen Immunzellen zu Lymphfollikeln zusammenlagern. Die T-Lymphozyten gelangen als unreife Vorläuferzelle vom Knochenmark in den Thymus. Dort findet die weitere Selektion statt. Im ersten Schritt müssen sie einen funktionsfähigen Rezeptor besitzen, der in der Lage ist Antigene zu binden (positive Selektion). Im zweiten Schritt dürfen sie nicht zu affin für körpereigene Strukturen sein, weil sonst Autoimmunphänomene drohen würden (negative Selektion). Dies wird als zentrale Toleranz bezeichnet. Die T-Lymphozyten gelangen dann als naive CD4<sup>+</sup>-Zellen oder CD8<sup>+</sup>-Zellen in die Blutbahn und wandern z.B. in die Lymphknoten ein.

#### 1.2.4 Der Major Histocompatibility Complex (MHC)

Der Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*, MHC) ist eine Gruppe von Proteinen, die dazu dient Peptidfragmente so auf der Zelloberfläche zu präsentieren, dass sie von entsprechenden T-Lymphozyten erkannt werden können. Der Genlocus der MHC-Moleküle befindet sich beim Menschen auf Chromosom 6. Hier werden die Hauptketten codiert (siehe Abbildung 2 und Abbildung 3). Das  $\beta_2$ -Mikroglobulin wird auf Chromosom 15 codiert.

Beim Menschen werden diese Gene als HLA-Gene (*human leucocyte antigen genes*) bezeichnet. Der Mensch besitzt drei Gene für die MHC-Klasse-I-Moleküle (HLA-A, HLA-B, HLA-C) und drei Genpaare für die  $\alpha$ - und die  $\beta$ -Kette der MHC-Klasse-II-Moleküle (HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP). Oftmals befindet sich jedoch im Bereich des HLA-DRs ein weiteres Gen für eine zweite  $\beta$ -Kette, sodass aus diesen drei Genpaaren vier verschiedene MHC-Klasse-II-Moleküle entstehen können (The MHC sequencing consortium, 1999). Da die HLA-Gene codominant vererbt werden und eine Vielzahl von Allelen in den einzelnen HLA-Genloci bekannt ist (an einigen über 400 verschiedene Allele), ist der MHC polygen und hoch polymorph und daher von Mensch zu Mensch unterschiedlich (Flajnik et al., 2001). Die Zellen eines Menschen tragen also sechs verschiedene (drei Gene à zwei Allele) MHC-Klasse-I-Moleküle und acht verschiedene (vier Gene à zwei Allele) auf ihrer Oberfläche. Aufgrund der hohen Allelanzahl kann nahezu immer von einer Heterozygotie ausgegangen werden. Durch weitere Alternativen bei der Zusammenlagerung der Moleküle (z.B.  $\alpha$ - mit  $\beta$ -Ketten) entstehen weitere Möglichkeiten, sodass es nahezu ausgeschlossen ist zwei Menschen mit den exakt gleichen MHC-Molekülen zu finden. MHC-Klasse-I-Moleküle werden auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert, wohingegen MHC-Klasse-II-Moleküle fast ausschließlich auf Immunzellen (dendritische Zellen, Makrophagen, B-Lymphozyten) exprimiert werden.

Wie in Abbildung 2 ersichtlich, besteht das MHC-I-Molekül aus einer  $\alpha$ -Kette, die sich in drei Domänen unterteilen lässt ( $\alpha_1$ - $\alpha_3$ ), und einer  $\beta_2$ -Mikroglobulinkette. Die peptidbindende Spalte (*peptide-binding cleft*) wird von der  $\alpha_1$ - und der  $\alpha_2$ -Domäne gebildet (Bjorkman et al., 1987). In dieser Spalte werden Peptide an ihren freien Amino- und Carboxylenden gebunden (Bouvier et al., 1994), was

durch weitere unspezifische Wechselwirkungen zwischen dem Peptid und dem MHC-Molekül unterstützt wird. Wichtig hierbei sind vor allem polymorphe Aminosäurereste (Verankerungsreste oder Ankeramino-säuren), die in bestimmten Bindungstaschen der MHC-Klasse-I-Moleküle vorhanden sind. Diese führen dazu, dass jede MHC-I-Variante verschiedene Peptide mit unterschiedlicher Affinität bindet. Die von einer MHC-Variante gebundenen Peptide haben aber an zwei oder drei definierten Positionen innerhalb ihrer Sequenz die gleichen Aminosäurereste (Falk et al., 1991; Rammensee et al., 1995). Diese Tatsache und die Tatsache, dass die an MHC-I gebundenen Peptide in der Regel aus 8 – 10 Aminosäuren bestehen, kann genutzt werden, um potentielle MHC-Liganden aus einer Peptidsequenz vorherzusagen (Rammensee et al., 1999). Gleichzeitig erklärt sich dadurch aber auch, dass die Präsentation von bestimmten Peptiden abhängig vom MHC-Genotyp unterschiedlich erfolgt. Daher scheint dieser Polymorphismus auch eine gewisse Schutzfunktion zu haben, um entsprechende Lücken in der adaptiven Immunabwehr zu schließen (Bodmer, 1972; Clarke et al., 1966).

Das MHC-Klasse-II-Molekül besteht aus einer  $\alpha$ -Kette und einer  $\beta$ -Kette mit jeweils zwei Domänen ( $\alpha_1$  und  $\alpha_2$ ;  $\beta_1$  und  $\beta_2$ ). Die peptidbindende Spalte wird von der  $\alpha_1$ - und der  $\beta_1$ - Domäne gebildet (vgl. Abbildung 3). Anders als bei den MHC-Klasse-I-Molekülen liegen die Enden des Peptids damit frei (Dessen et al., 1997; Stern et al., 1994). Dies erklärt den Fakt, dass die Länge von Peptiden, die auf MHC-Klasse-II-Molekülen präsentiert werden, nicht beschränkt ist. In der Regel sind sie zwischen 13 – 17 Aminosäuren lang, weil längere Peptide meist durch Peptidasen verkürzt werden (Rudensky et al., 1991; Sercarz et al., 2003). Auch die Bindung an den Peptidenden fehlt, weshalb das Peptid längs der Bindungsfurche liegt und durch Wechselwirkungen von Aminosäureresten festgehalten wird. Diese sind ebenfalls je nach Genotyp polymorph und daher ist auch hier die Bindungsaffinität zu Peptiden unterschiedlich. Jedoch scheint dies bei den MHC-Klasse-II-Molekülen nicht so stringent zu sein, wie bei MHC-Klasse-I-Molekülen, sodass hier Peptide mit verschiedenen Verankerungspräferenzen in unterschiedlichen MHC-Varianten präsentiert werden können. Dies erschwert eine Vorhersage von möglichen Liganden (Jorgensen et al., 2010).



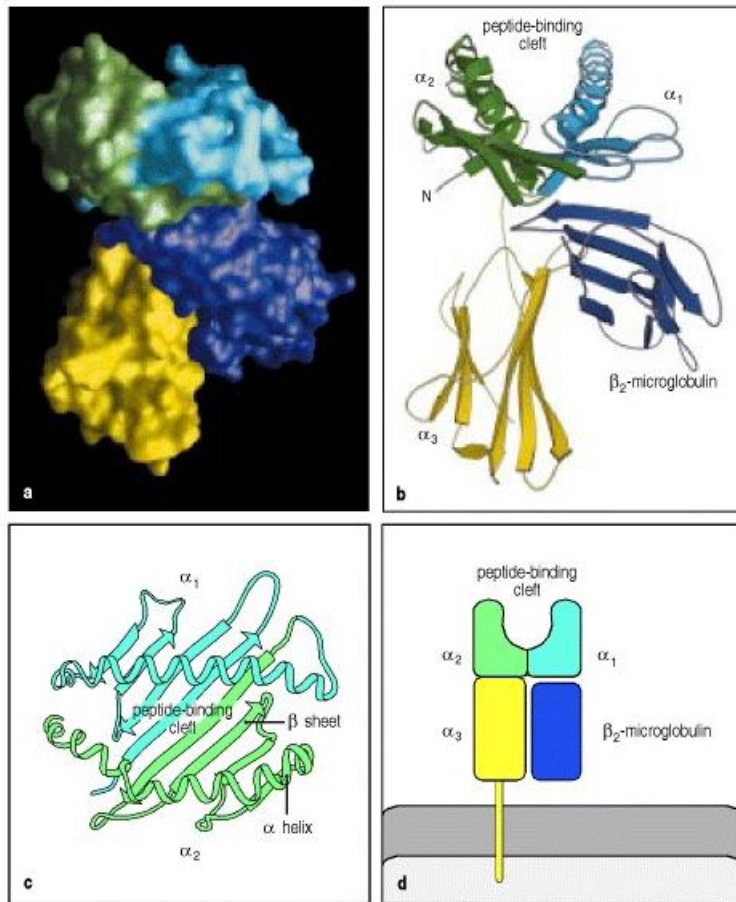


Abbildung 2: Die Struktur eines MHC-Klasse-I-Moleküls, bestimmt durch die Röntgenkristallografie (Janeway, 2001)

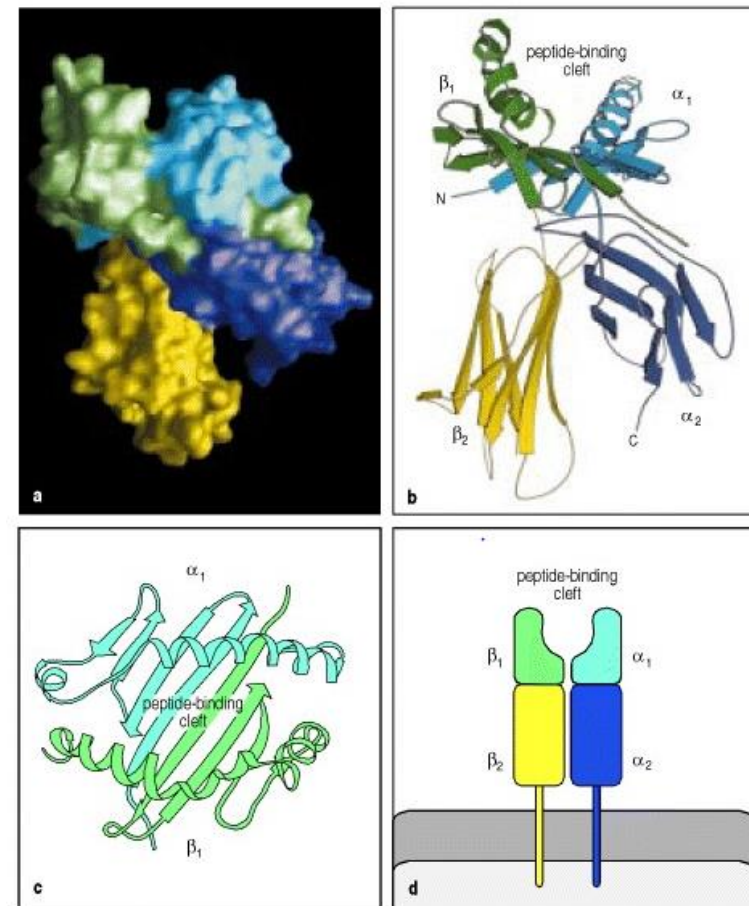
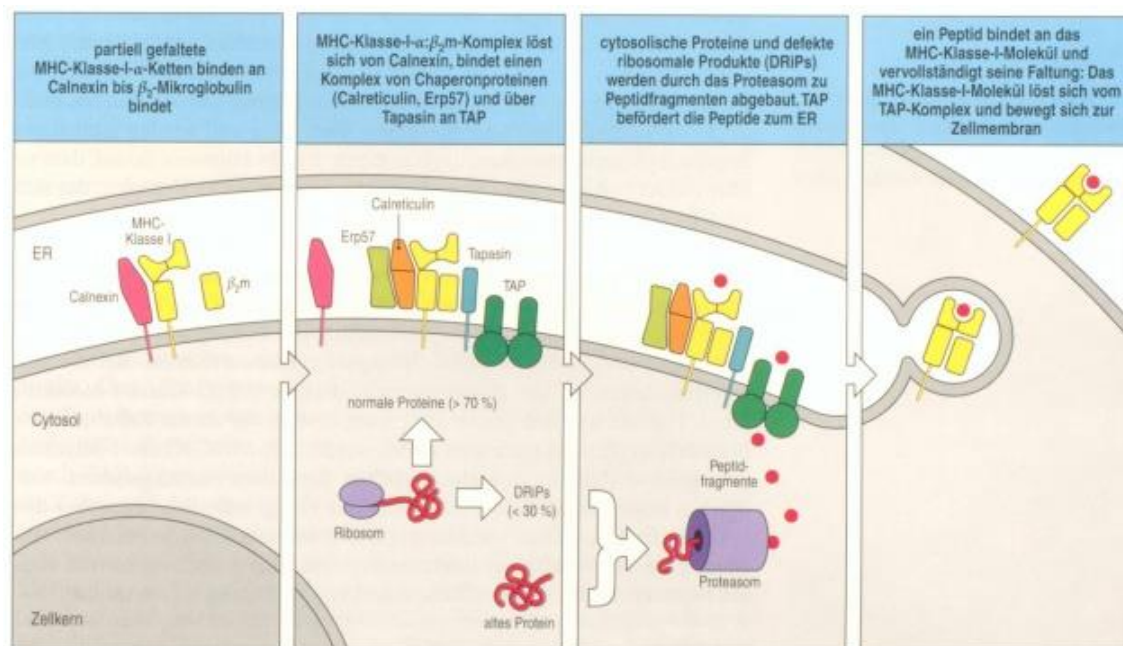


Abbildung 3: Die Struktur eines MHC-Klasse-II-Moleküls, bestimmt durch die Röntgenkristallografie (Janeway, 2001)

Die Peptide müssen fest in die MHC-Moleküle eingebunden sein, damit diese einen verlässlichen Indikator für die Aufnahme eines speziellen Antigens darstellen. Deshalb sind die Peptide auch ein integraler Bestandteil der Struktur der MHC-Moleküle. Ohne ein gebundenes Peptid sind die MHC-Moleküle weder stabil, noch stabil in der Zellmembran verankert. Auf MHC-Klasse-I-Moleküle werden vorwiegend zelleigene Peptide präsentiert (Ausnahme: dendritische Zellen). Die MHC-Klasse-I-Moleküle werden im Cytosol der Zelle synthetisiert und cotranslational in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums verlagert (Hegde et al., 2011; Shao et al., 2011; Vyas et al., 2008). Dort falten sie sich zusammen, wodurch sich auch die Antigenbindungsfurche ausbildet. Über verschiedene Proteine und Chaperone (Calnexin, Erp57, Calreticulin, Tapasin) wird das gefaltete MHC-Protein nun solange festgehalten, bis es ein Peptid gebunden hat (vgl. Abbildung 4) (Bouvier, 2003).



**Abbildung 4: MHC-Klasse-I-Moleküle verlassen das endoplasmatische Reticulum nur, wenn sie Peptide gebunden haben (aus Murphy et al., 2009)**

Diese Peptide werden aktiv über Transporter (z.B. TAP) in das endoplasmatische Reticulum transportiert. Sobald das Peptid an das MHC-Molekül gebunden hat,

werden die Peptid-MHC-Komplexe freigesetzt. Bei den Peptiden handelt es sich um Proteine, die im Proteasom zerkleinert wurden. Ein Großteil dieser Fragmente wird im Cytosol von Peptidasen weiter abgebaut, einige entgehen jedoch diesem Prozess und gelangen dann über die Transporter in das endoplasmatische Reticulum. Bei den Proteinen, die im Proteasom zerkleinert werden, handelt es sich zum einen um fehlgefaltete Proteine (DRiPs, *defective ribosomal products*), die bei der normalen Translation entstehen (etwa 30% sind DRiPs), und zum anderen um gealterte Proteine (Reits et al., 2000). Die DRiPs werden durch Ubiquitin markiert, was der entscheidende Marker zu sein scheint, damit Proteine dem Proteasom zugeführt werden (Ciechanover, 2005). Das Proteasom kann in zwei unterschiedlichen Formen vorliegen, die sich vor allem in ihrer Proteinspezifität unterscheiden. Unter Interferoneinfluss kommt es zum Austausch einzelner Untereinheiten des Proteasoms, was zur Folge hat, dass mehr Peptide mit Carboxylenden entstehen (Aki et al., 1994; Kloetzel et al., 2004). Diese werden zum einen schneller durch TAP (*transporters associated with antigen processing*) in das endoplasmatische Reticulum transportiert und zum anderen weisen sie eine höhere Affinität zu den meisten MHC-Molekülen auf. Interferon- $\gamma$  induziert die Bindung eines Proteinkomplexes (PA28) an das Proteasom. Der so entstehende Proteinkomplex wird als PA28-Protein-Aktivator-Komplex bezeichnet und führt dazu, dass Peptide schneller aus dem Proteasom entlassen werden und dass die Peptide eine höhere Antigenität aufweisen (Dick et al., 1996; Groettrup et al., 1996; Sijts et al., 2002). Interferon- $\gamma$  führt auch zum vermehrten Einschleusen von Peptiden in das endoplasmatische Reticulum, die eigentlich zu lang sind um auf MHC-I-Molekülen präsentiert zu werden. Daher induziert Interferon- $\gamma$  auch die Expression von ERAAP (*endoplasmatic reticulum aminopeptidase associated with antigen processings*), die die Peptide am N-terminalen Ende verkürzen kann (Kloetzel et al., 2004). Treten Fehler in diesem *antigen processing* auf, so kann dies zu einer verminderten Funktion der CD8<sup>+</sup>-Zellen führen und damit zu einer vermehrten Anfälligkeit gegenüber bestimmten Viren oder auch Tumoren. Bestimmte Alleltypen des Proteasoms und der assoziierten Proteine scheinen teilweise problematisch zu sein. Auch bei der Entstehung von kolorektalen

Karzinomen gibt es hierfür Anhaltspunkte (Chen et al., 2013; Fellerhoff et al., 2011; Yamauchi et al., 2014).

Eine weitere Art MHC-Klasse-I-Moleküle mit Peptiden zu beladen wird als Kreuzpräsentation bezeichnet. Hierbei präsentiert die Zelle phagozytierte Peptide auf MHC-Klasse-I-Molekülen. Dies geschieht durch die Hilfe der retrograden Translokation (Imai et al., 2005), die Proteine aus den Zellorganellen wieder ins Cytosol befördert, wo sie dann durch das Proteasom zerlegt werden können (siehe oben) (Guermontprez et al., 2003; Ramirez et al., 2002). Dieser Mechanismus ermöglicht es auch virale Hüllproteine, sezernierte Proteine oder Membranproteine auf MHC-Klasse-I-Molekülen zu präsentieren. Am ausgeprägtesten ist dieser Mechanismus bei den CD8<sup>+</sup> dendritischen Zellen zu beobachten (Smyth et al., 2008). Diese spielen vor allem beim primen von naiven CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten gegen Viren eine Rolle (Bevan, 1976; Kovacsovics-Bankowski et al., 1995; Sigal et al., 1999).

Phagozytierte und endozytierte Proteine werden auch auf MHC-Klasse-II-Molekülen präsentiert. Die so aufgenommenen Proteine werden in den Endosomen durch Ansäuerung und durch Proteasen denaturiert und zerkleinert, was durch die Verschmelzung der Endosomen mit den Lysosomen noch verstärkt wird. Teilweise wird dieser Mechanismus von Interferon- $\gamma$  beeinflusst, da dieses die Expression von einer Thiolreduktase (GILT, IFN- $\gamma$  induzierte lysosomale Thiolreduktase) induziert, die Disulfidbrücken aufspalten kann. Da Zellen regelmäßig auch selbstsezernierte Proteine aufnehmen (Autophagie) werden auf MHC-Klasse-II-Proteine auch durchaus zelleigene Proteine präsentiert (Dengjel et al., 2005). Die Beladung der MHC-Klasse-II-Proteine erfolgt dann mit Hilfe der invarianten Kette. Nach der Synthese und der anschließenden Translokation des MHC-Klasse-II-Moleküls in das endoplasmatische Reticulum wird das MHC-Klasse-II-Molekül dort gefaltet (analog zur MHC-Klasse-I). Damit sich jetzt jedoch keine Peptide an die peptidbindende Spalte anlagern, bindet die invariante Kette in diese Spalte (Roche et al., 1990). Die invariante Kette wird zusammen mit dem MHC-Klasse-II-Molekül synthetisiert. Sie dient im Weiteren dazu die MHC-Klasse-II-Komplexe, die an sie gebunden sind, in saure Kompartimente zu überführen (Bakke et al., 1990). Dort wird die invariante Kette durch die Proteasen

verkürzt und über mehrere proteolytische Zwischenschritte entsteht ein kurzes Stück der invarianten Kette (CLIP-Fragment, *class-II-associated invariant-chain peptide*). Dieses verhindert noch immer eine Anlagerung von Peptiden in die Bindungsfurche, kann jedoch durch passende Peptide verdrängt werden, die dann ihren Platz einnehmen. Dissoziiert das CLIP-Fragment von dem MHC-Klasse-II-Molekül ohne dass ein Peptid diesen Platz einnimmt, so ist das Molekül instabil und wird abgebaut. Das Kompartiment in dem die Beladung stattfindet und das sich in den endosomalen Abbauprozess einschleibt wird als MIIC (*MHC II compartment*) bezeichnet (Neefjes et al., 1990). Die Beladung des MHC-Klasse-II-Moleküls wird durch ein spezielles MHC-ähnliches Protein (HLA-DM) katalysiert, das selbst jedoch keine Peptide binden kann (Mosyak et al., 1998). Das HLA-DM-Molekül besitzt auch die Fähigkeit des *peptide editing* und kann so instabil gebundene Peptide von den MHC-Klasse-II-Molekülen lösen (Kropshofer et al., 1996). Seine Expression wird durch Interferon- $\gamma$  verstärkt. Nach Abschluss der Beladung gelangen die MHC-Klasse-II-Moleküle an die Zelloberfläche (Wubbolts et al., 1996).

Die Instabilität der MHC-Moleküle ohne gebundenes Peptid verhindert, dass sie unspezifisch Peptide aus dem extrazellulären Raum aufnehmen können sobald sie an der Zelloberfläche exprimiert sind. Dies ist vor allem für die Aktivierung und Erkennung der „richtigen“ Zelle durch die T-Lymphozyten wichtig.

### **1.2.5 Erkennung von MHC-restringierten Peptiden**

T-Lymphozyten erkennen präsentierte Peptide mit ihrem T-Zellrezeptor (TCR). Sie können nur Peptide erkennen, die prozessiert wurden und dann auf MHC-Molekülen präsentiert werden (Zinkernagel et al., 1974). Dies wird als MHC-Restriktion bezeichnet. Dieser Vorgang bewirkt auch, dass die T-Lymphozyten nicht nur Fremdpeptide erkennen können, sondern auch Nicht-Selbst-MHC-Moleküle. Dies ist der Grund der Alloreaktivität. Die negative Selektion im Thymus scheint hierbei eine Schlüsselrolle zu spielen, da sie zwar dafür sorgt, dass T-Lymphozyten schwach an Selbst-MHC-Moleküle binden, jedoch auch eine erhöhte

Kreuzreaktivität mit Nicht-Selbst-MHC-Molekülen hervorzurufen scheint (Stockinger et al., 1981; Wagner et al., 1981).

Der T-Zellrezeptor besteht aus zwei unterschiedlichen Proteinketten, die durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Er stellt sich homolog zum Fab-Fragment der Immunglobuline dar (siehe Abbildung 5). Er ist membranständig und wird nicht sezerniert. Die Ketten lassen sich in einen konstanten Anteil (C-Region) und einen variablen Anteil (V-Region) unterteilen (Chothia et al., 1988). Die C-Region ist wichtig für die Verankerung in der Zellmembran, die V-Region für die Antigenerkennung. Sie bildet die *complementary determining regions* (CDR). Dies sind spezielle Loops, die für die Antigenbindung elementar sind. Jeder TCR enthält sechs solcher Regionen, jeweils drei auf jeder Kette (CDR 1-3). CDR3 ist sehr variabel und bildet das Zentrum der Antigenbindungsstelle.

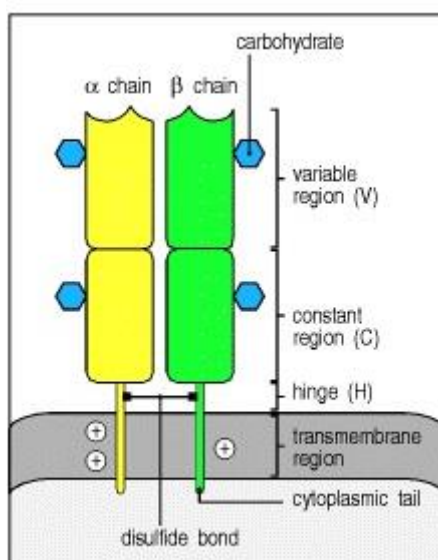


Abbildung 5: Die Struktur des T-Zellrezeptors (Janeway, 2001)

Die meisten T-Lymphozyten tragen den hier dargestellten T-Zellrezeptor, der aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette besteht. Eine Minderheit der T-Lymphozyten besitzt etwas andere Antigenerkennungseigenschaften, da ihr Rezeptor von einer  $\gamma$ - und einer  $\delta$ -Kette gebildet wird. Die Funktion der  $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten ist noch nicht abschließend geklärt, jedoch scheinen sie nicht der MHC-Restriktion zu unterliegen und können daher, ähnlich wie die Zellen der angeborenen Immunabwehr,

bestimmte andere Oberflächenstrukturen erkennen und daran binden. Sie werden daher auch zu der Gruppe der *innate like Lymphocytes* (ILL) gezählt. Die Diversität des  $\gamma:\delta$ -T-Zellrezeptors scheint dabei auch deutlich kleiner zu sein, als die des  $\alpha:\beta$ -T-Zellrezeptors (Bonnevillie et al., 2010; Carding et al., 2002). Die Diversität des  $\alpha:\beta$ -T-Zellrezeptors beläuft sich auf  $10^{18}$  verschiedene Spezifitäten. Dieser Wert wird durch Rearrangements auf Genomebene erreicht. Die Genloci des T-Zellrezeptors sind dabei in verschiedene Segmente unterteilt. So wird zwischen den V- (variable), den J- (joining) und den D- (diverse) Genen unterschieden. Für die  $\alpha$ -Kette des T-Zellrezeptors befindet sich der Genlocus auf dem Chromosom 14. Er beinhaltet V-Gensegmente ( $V_\alpha$ ) sowie J-Gensegmente ( $J_\alpha$ ) für die V-Region des T-Zellrezeptors und C-Gensegmente, die die C-Region codieren und die sich bei allen T-Zellrezeptoren gleichen. Der Genlocus der  $\beta$ -Kette befindet sich beim Menschen auf Chromosom 7. Er beinhaltet V-Gensegmente ( $V_\beta$ ), D-Gensegmente ( $D_\beta$ ), J-Gensegmente ( $J_\beta$ ), sowie ebenfalls die C-Gensegmente (hier zwei Varianten) (Rowen et al., 1996). Diese Gensegmente werden über bestimmte Enzyme (V(D)J-Rekombinase) neu geordnet bevor sie transkribiert werden. Es handelt sich hierbei also um eine Art beabsichtigte somatische Hypermutation. Für eine V-Region wird pro Kette ein V-Segment mit einem J-Segment (und einem D-Segment bei der  $\beta$ -Kette) verknüpft. Die Anzahl der einzelnen Segmente für die  $\alpha$ - und die  $\beta$ -Kette sind unterschiedlich (vgl. Tabelle 5).

**Tabelle 5: Die Anzahl der menschlichen T-Zell-Rezeptor-Gen-Segmente (nach Murphy et al., 2009)**

	<b><math>\alpha</math>-Kette</b>	<b><math>\beta</math>-Kette</b>
V-Segmente	ca. 70	52
D-Segmente	0	2
J-Segmente	61	13
Anzahl der V-Genpaare	$5,8 \times 10^6$	
Verknüpfungsvielfalt	ca. $2 \times 10^{11}$	
Gesamtvelfalt	ca. $10^{18}$	

Gelangt ein T-Zellrezeptor nun in Kontakt mit dem passenden Peptid-MHC-Komplex, so bindet er daran. Die CDR1 und CDR2 der  $V_\alpha$ -Region gelangen dabei in Kontakt zu dem Aminoende des präsentierten Peptids, die CDR1 und CDR2 der  $V_\beta$ -Region mit dem Carboxylende. Diese Regionen interagieren auch mit den  $\alpha$ -Helices der MHC-Moleküle und sind so mehr an der MHC-Erkennung als an der

Erkennung der Peptide beteiligt (Chlewicki et al., 2005; Sim et al., 1996). Die CDR3 passt sich bei dieser Bindung an den entsprechenden Liganden an (*induced fit*), was die Spezifität für eine bestimmte Aminosäureabfolge zwar weiter erhöht, allerdings auch eine gewisse Kreuzreaktivität zur Folge hat (Reiser et al., 2003; Reiser et al., 2002). Die Bindungskräfte wirken sowohl zwischen dem T-Zellrezeptor und dem Peptid als auch zwischen dem T-Zellrezeptor und dem MHC-Komplex. Daher ist es verständlich, dass der Peptid-MHC-Komplex spezifisch erkannt wird (Garboczi et al., 1996). An der Signaltransduktion in das Zellinnere sind weitere mit dem TCR assoziierte Proteine beteiligt. Sie werden in ihrer Gesamtheit als CD3 (*cluster of differentiation*) bezeichnet. Diese Proteine stabilisieren zudem den TCR an der Zelloberfläche und ohne sie wird der TCR nicht exprimiert. Der CD3-Komplex besteht aus mehreren Untereinheiten (CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$ , CD3 $\zeta$ ) (Sun et al., 2001). Die genaue Signaltransduktion ist nicht endgültig aufgeschlüsselt, allerdings enthält der CD3-Komplex zehn ITAMs (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*), die an der Signaltransduktion beteiligt sind. Nach Phosphorylierung der intrazellulären Anteile des CD3-Komplexes setzt sich die Signalkaskade dann über die Anlagerung von speziellen Proteinen (z. B. ZAP70 (*zeta-chain associated protein*)) fort (Bubeck Wardenburg et al., 1996; Kersh et al., 1998; Weiss, 1993).

### 1.2.6 Aktivierung der T-Lymphozyten

Reife naive T-Lymphozyten, die aus dem Thymus freigesetzt werden, tragen entweder CD4-Rezeptoren (T-Helferzellen) oder CD8-Rezeptoren (T-Killerzellen). Diese Corezeptoren interagieren mit dem MHC-Molekül der präsentierenden Zelle und führen dazu, dass CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten MHC-Klasse-II-Moleküle erkennen und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten MHC-Klasse-I-Moleküle. Ein naiver T-Lymphozyt benötigt zu seiner Erstaktivierung (*priming*) spezielle Zellen. Diese werden als antigenpräsentierende Zellen (APCs) bezeichnet und tragen MHC-Klasse-II-Moleküle. Hierzu zählen vor allem die dendritischen Zellen, aber auch Makrophagen und B-Lymphozyten. Erkennt ein naiver T-Lymphozyt den zu seinem T-Zellrezeptor passenden Peptid-MHC-Komplex auf einer



antigenpräsentierenden Zelle, so benötigt er zur Aktivierung ein zweites Signal. Bleibt dieses zweite Signal aus, so wird der T-Lymphozyt anerg, d.h. er proliferiert nicht und differenziert sich auch nicht zu einer Effektorzelle (Jenkins et al., 1987; Mueller et al., 1989; Quill et al., 1987). Ein Teil dieser Zellen geht auch in Apoptose, die meisten bleiben jedoch erhalten. Dies wird als Teil der peripheren Toleranz gegen körpereigene Strukturen gewertet, weil diese anergen T-Lymphozyten im weiteren Verlauf mit anderen naiven T-Lymphozyten um dieselben Antigene konkurrieren. Auch eine Überschneidung dieser Lymphozytenpopulation mit den regulatorischen T-Lymphozyten scheint denkbar (Schwartz, 2003; Singh et al., 2006).

Das zweite Signal besteht aus der Interaktion von CD28 (exprimiert vom T-Lymphozyt) und von CD80 (B7.1) bzw. CD86 (B7.2) (June et al., 1987). Die letztgenannten werden von der antigenpräsentierenden Zelle exprimiert (siehe Abbildung 7). Dadurch wird der T-Lymphozyt zur Proliferation angeregt und kann länger überleben. Er produziert nun IL-2 was für seine eigene Proliferation wichtig ist (autokrine Funktion), aber auch, die durch klonale Vermehrung entstandenen, T-Lymphozyten erreicht (parakrine Funktion). Dieser Effekt wird noch verstärkt, weil die aktivierten T-Lymphozyten einen speziellen IL-2-Rezeptor exprimieren, der affiner zu IL-2 ist als der konstitutionell Exprimierte (Willerford et al., 1995). Dieses zweite Signal kann im weiteren Verlauf der T-Lymphozytenproliferation und -differenzierung durch andere costimulierende Signale beeinflusst werden. Einer dieser Stimuli wird ICOS (induzierbarer Costimulator) genannt, der mit seinem Liganden (LICOS), der von den antigenpräsentierenden Zellen exprimiert wird, das Cytokinschema der CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten verändern kann (Yoshinaga et al., 1999).

Die Aktivierung eines naiven T-Lymphozyten wird als *Priming* bezeichnet. Die naiven CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten benötigen für ihre Erstaktivierung MHC-I-Moleküle. Hierbei spielt die Kreuzpräsentation der antigenpräsentierenden Zellen, die neben MHC-Klasse-II-Molekülen auch MHC-Klasse-I-Moleküle tragen, eine elementare Rolle (siehe 1.2.4). Jedoch reicht nur selten die primäre Aktivierung der naiven CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten durch die antigenpräsentierende Zelle aus, um sie zur Proliferation und zur Differenzierung zu veranlassen. Es ist deshalb

notwendig, dass an die gleiche antigenpräsentierende Zelle (an das MHC-Klasse-II-Molekül) eine entsprechende CD4<sup>+</sup>-T-Effektorzelle bindet, die das *Priming* der naiven CD8<sup>+</sup>-T-Zelle unterstützt (Bennett et al., 1997). Die CD4<sup>+</sup>-T-Effektorzelle stimuliert dafür mittels CD40L den CD40-Rezeptor der antigenpräsentierenden Zelle und veranlasst sie dazu vermehrt B7-Moleküle zu exprimieren. Ferner kann sie direkt IL-2 produzieren und so über den parakrinen Weg auf den naiven CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten Einfluss nehmen. Diese Mechanismen führen zu einer Verstärkung des zweiten Signals für den CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten und bewirken so dessen Aktivierung (siehe Abbildung 6) (Ridge et al., 1998).

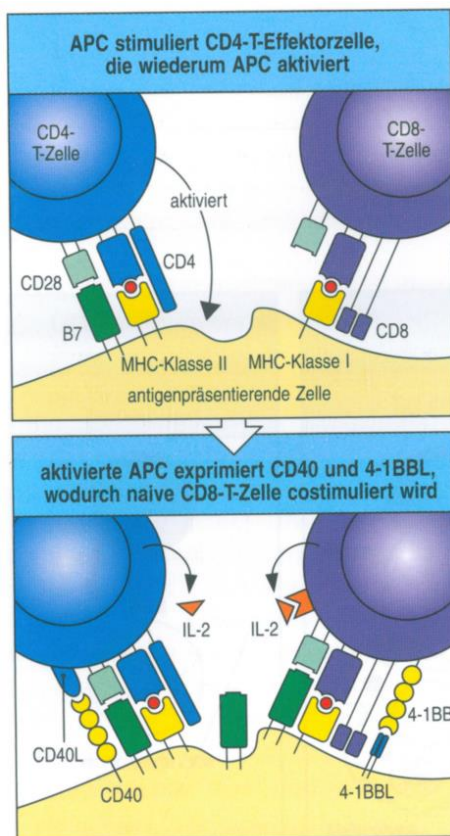


Abbildung 6: Für die meisten CD8-T-Zell-Reaktionen sind CD4-T-Lymphozyten notwendig (aus Murphy et al., 2009)

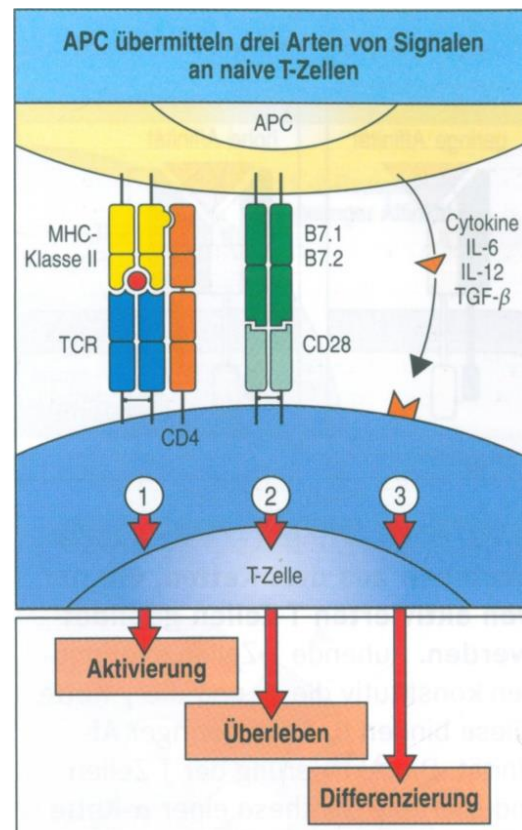


Abbildung 7: Bei der Aktivierung von naiven T-Lymphozyten spielen drei Arten von Signalen eine Rolle (aus Murphy et al., 2009)

Das *Priming* erfolgt nur beim Primärkontakt zwischen den T-Lymphozyten und dem entsprechenden Peptid-MHC-Komplex. T-Lymphozyten, die sich bereits zu

T-Effektorzellen differenziert haben, werden durch den einfachen Kontakt mit dem, für ihren Rezeptor spezifischen, Peptid-MHC-Komplex aktiviert. Bei diesem sogenannten *Recall* ist also kein weiteres Signal erforderlich, bevor die T-Effektorzellen aktiviert werden.

CD4<sup>+</sup>-T-Effektorzellen stellen eine heterogene Gruppe mit unterschiedlichen Untergruppen dar (z. B. T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2, T<sub>H</sub>17), die jeweils spezifische Aufgaben erfüllen. Welche T-Effektorzellen vorwiegend gebildet werden, wird durch das Cytokinmilieu (3. Signal) beim *Priming* der CD4<sup>+</sup>-T-Zelle beeinflusst (Annunziato et al., 2007; Chen et al., 2007b; Finkelman et al., 1997; Hsieh et al., 1993; Maldonado-Lopez et al., 2001; Moser, 2001; Volpe et al., 2008; Wilson et al., 2007).

CD8<sup>+</sup>-T-Effektorzellen töten die antigentragenden Zellen ab, indem sie über verschiedene Wege die Apoptose dieser Zellen einleiten (Kagi et al., 1994; Nagata, 1999; Sarin et al., 1997; Sharma et al., 2000; Trapani et al., 1998; Trapani et al., 2002; Vandenabeele et al., 2010).

### 1.3 Immunologische Tumortherapie

Das Immunsystem ist prinzipiell in der Lage Tumorzellen oder allgemeiner entartete Zellen des Körpers zu eliminieren (Dunn et al., 2004a). Coley und Ehrlich vermuteten bereits Ende des 19. Jahrhunderts, dass Tumore durch das Immunsystem bekämpft werden können (Coley, 1893; Ehrlich, 1909). Die Theorie wurde von Burnet erweitert, der postulierte, dass kontinuierlich Tumorzellen im Körper entstehen, die allerdings vom Immunsystem direkt eradiziert werden (Tumor-Immunüberwachung - *immune surveillance*) (Burnet, 1957). Mehrere weitere Studien zeigten, dass das Immunsystem in der Lage ist, Tumorzellen zu erkennen und zu zerstören, sodass diese Theorie nun als bestätigt gilt (Dunn et al., 2004a; Klein et al., 1960; Prehn et al., 1957; Smyth et al., 2001; Stutman, 1975). Die von Burnet beschriebene *immune surveillance* stellt nach der heutigen Theorie nur den ersten Schritt der Immunantwort gegen Tumoren dar (Burnet, 1957). Sie wird als Eliminierungsphase bezeichnet, weil hier Tumorzellen vom Immunsystem erkannt und zerstört werden. Ist diese Elimination nicht vollständig, schließt sich daran eine Gleichgewichtsphase (Equilibrium) an. Die Tumorzellen weisen zu meist eine hohe Teilungsrates und eine genetische Instabilität auf. Diese Eigenschaften der Tumorzellen gehören zu den „*Hallmarks of cancer*“ (Hanahan et al., 2011). In Tumorzellen kommt es daher zu vielen verschiedenen Mutationen. Einige von diesen Mutationen können dazu führen, dass die Tumorzellen, die diese Mutation tragen, nicht mehr vom Immunsystem erkannt werden können. Dies kann zum Beispiel bei Mutationen im Bereich der MHC-Komplexe der Fall sein oder aber durch veränderte Ankeraminosäuren bei Tumorantigenen, sodass diese beim vorliegenden HLA-Typ nicht mehr präsentiert werden können. Diese Tumorzellen erhalten dadurch einen Selektionsvorteil und können überleben (Garrido et al., 2016; Marijt et al., 2018; Ritter et al., 2017; Setiadi et al., 2007). Das Immunsystem selektiert also in dieser Phase genau diejenigen Tumorzellen aus, gegen die es vorgehen kann, und es bleiben diejenigen Tumorzellen übrig, die nicht vom Immunsystem zerstört werden können (*immunoediting*). Anschließend kommt es zum *tumor escape* („Entkommensphase“). Die resistenten Tumorzellen vermehren sich und können vom Immunsystem nicht mehr effizient

bekämpft werden (Dunn et al., 2002; Dunn et al., 2004a; Dunn et al., 2004b; Smyth et al., 2006).

Es existieren viele verschiedene Mechanismen, wie sich Tumore dem Einfluss des Immunsystems entziehen. So können sie nur eine geringe Immunogenität aufweisen. Sie exprimieren also keinerlei (oder sehr wenige) Adhäsionsmoleküle für Leukozyten sowie MHC-Moleküle und bleiben so vom Immunsystem lange Zeit unentdeckt (Bodmer et al., 1993; Ferrone et al., 1995; Ikeda et al., 1997; Koopman et al., 2000; Yee et al., 2000). Dieser Mechanismus ist auch für das kolorektale Karzinom nachgewiesen worden (Bicknell et al., 2005; Cabrera et al., 2003). Ferner besteht die Möglichkeit, dass sich Tumore selbst eine immunprivilegierte Umgebung schaffen. Dies erreichen sie zum Beispiel durch nodales Wachstum oder durch die Abgrenzung vom restlichen Gewebe durch eine Kapsel (meist bestehend aus Kollagen und Fibrin) (Ochsenbein et al., 1999). Durch diese Abschottung gelangen die Immunzellen nicht in ausreichender Zahl an die eigentlichen Tumorzellen und der Tumor kann nicht adäquat zerstört werden. Teilweise induzieren die Tumoren eine Art Toleranz gegenüber ihren Oberflächenmolekülen. Sie sezernieren dafür immunsuppressive Faktoren (z. B. TGF- $\beta$ ), um direkt T-Lymphozyten in ihrer Aktivität zu hemmen, oder aktivieren durch andere Botenstoffe regulatorische T-Lymphozyten, die ihrerseits die Immunreaktion hemmen (Tada et al., 1991; Torre-Amione et al., 1990; Wang et al., 2004).

### **1.3.1 Grundlagen der Immuntherapie**

Die maligne Entartung ist ein mehrstufiger Prozess. Durch das sequentielle Auftreten von Mutationen in Tumorsuppressorgenen, proto-Onkogenen, Transkriptionsregulatoren und weiteren Genen, die den Zellzyklus regulieren, kommt es zur unkontrollierten Proliferation der betroffenen Zellen. Durch diese Mutationen kommt es auch zu einer Veränderung innerhalb des Proteoms, da viele Proteine in abgewandelter Form gebildet werden oder aber Proteine gebildet werden, die so in gesunden Zellen nicht vorliegen (Fearon et al., 1990). Diese veränderten Proteine bzw. die daraus HLA-präsentierten Peptide können vom Immunsystem erkannt werden.

Auch in Tumorzellen findet, wie in Zellen des Normalgewebes, eine stetige Präsentation der zelleigenen Proteine bzw. deren Peptidfragmente auf MHC-Klasse-I-Molekülen statt. Diese werden als Tumorantigene bezeichnet. Sie lassen sich weiter unterteilen. Tumorspezifische Antigene werden ausschließlich auf Tumorgewebe präsentiert. Sie werden von den tumorassoziierten Antigenen abgegrenzt, welche vorwiegend auf Tumorgewebe präsentiert werden, aber auch auf nicht-malignem Gewebe vorkommen können (Heemskerk et al., 2013). Des Weiteren können die Tumorantigene nach der Art ihrer Entstehung in folgende Gruppen eingeteilt werden (siehe Tabelle 6).

**Tabelle 6: Kategorien von Tumorantigenen anhand ihrer Entstehung und jeweilige Beispiele. Modifiziert nach (Jager et al., 2003).**

<b>Kategorien von Tumorantigenen anhand ihrer Entstehung</b>	<b>Beispiele</b>
Cancer/Testis-Antigene	MAGE, BAGE, GAGE, NY-ESO-1, SSX
Differenzierungsantigene	Melan A / MART-1, Tyrosinase, gp100, CEA, NY-BR-1, rab38
Punktmutationen	$\beta$ -Catenin, MUM-1, CDK-4, p53, ras
Überexprimierte Antigene	Her2/neu, p53, MUC-1
Virale Antigene	HPV: E6, E7 ; LMP1, LMP2, HTLV-1, HTLV-8

Bei den Cancer/Testis-Antigenen handelt es sich um Antigene, die normalerweise nur im Hoden und auf der Plazenta exprimiert werden. Da diese Gewebe immunprivilegiert sind (Blut-Hoden/Plazenta-Schranke, geringe oder keine Expression von MHC-Molekülen), werden sie vom eigenen Immunsystem nicht erkannt (Smith et al., 2001). Im Zuge der Karzinogenese können diese Gene auch auf Tumorgewebe wieder exprimiert werden (Jager et al., 1998; Jager et al., 2003). Sie können als tumorspezifisch angesehen werden, da sie auf keinem anderen Gewebe des Körpers, mit dem das Immunsystem Kontakt hat, vorkommen. Differenzierungsantigene hingegen sind spezifisch für das Gewebe auf dem sie exprimiert werden, nicht für den Tumor selbst. Sie sind daher höchstens tumorassoziiert, wenn sie auf dem Tumor signifikant häufiger präsentiert werden (Brichard et al., 1993; Magro et al., 2006). Das Gleiche gilt für die überexprimierten Antigene. Sie sind im Gegensatz zu den Differenzierungsantigenen jedoch nicht gewebsspezifisch, sodass sie möglicherweise auch auf anderen

Normalgewebe zu finden sind (Iqbal et al., 2014; Jerome et al., 1991; Vonderheide et al., 1999). Sequenzalterierte Antigene, die auf Punktmutationen im Genom des Tumors zurückgehen, sind indes hochspezifisch für den Tumor. Sie werden auch als mutierte Neoantigene bezeichnet und kommen im Normalgewebe nicht vor. Meist sind die Mutationen spezifisch für exakt diesen einen Tumor in diesem einen Patienten. Seltener gibt es gleiche Mutationen in verschiedenen Patienten, die dann an speziellen Stellen im Genom erfolgen (*hot-spot mutations*) (Brosh et al., 2009; Freed-Pastor et al., 2012; Parada et al., 1982; Resnick et al., 2003; Santos et al., 1982; Taparowsky et al., 1982; Tran et al., 2015). Einige dieser Punktmutationen wurden bereits auf genetischer Ebene in verschiedenen Tumoren nachgewiesen und auch ihre Translation wurde vorhergesagt. Sie scheinen also auf Proteomebene vorzuliegen. Seit längerem gab es indirekte Beweise und Anhaltspunkte, beispielsweise durch die Analyse von TILs (Linnemann et al., 2015; Rajasagi et al., 2014; Robbins et al., 2013; van Buuren et al., 2014; van Rooij et al., 2013) oder durch Rückschlüsse, die aus Mausmodellen gewonnen wurden (Gubin et al., 2014; Yadav et al., 2014), dass einige dieser Neoepitope auch auf MHC-Molekülen präsentiert werden. Bassani-Sternberg et al. konnten schließlich Neoepitope, die auf MHC Molekülen präsentiert werden, bei Melanompatienten durch eine massenspektrometrische Analyse nachweisen (Bassani-Sternberg et al., 2016). Diese mutierten Neoantigene scheinen sich besonders gut für eine Vakzinierung zu eignen, da sie nicht der zentralen Toleranz des Immunsystems unterworfen sind und daher vom Immunsystem direkt als nichtkörpereigen erkannt werden können (Gilboa, 1999; Schumacher et al., 2015). Der Nachteil ist, dass es sich dabei stets nur um einen individuellen Ansatz handeln kann, da sie für einzelne Patienten spezifisch sind (Haen et al., 2013). Virale oder onkovirale Proteine werden von Viren in das Genom des Tumors eingebracht (der dann meist durch diese Einschleusung erst entsteht) (Ressing et al., 1995). Sie kommen deshalb nur im Tumor vor und können vom Immunsystem als Fremdartigene erkannt werden.

### **1.3.2 Möglichkeiten der Immuntherapie**

Es stehen verschiedene Formen der Immuntherapie bei Tumoren zur Verfügung. Im folgenden Abschnitt wird nur die T-Zell-abhängige Immuntherapie

beschrieben, die eine spezifische Reaktion der T-Lymphozyten gegen die Tumorzellen, trotz der in Kapitel 1.3.1 beschriebenen Mechanismen, stimulieren soll. Vor allem für die CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten wurde gezeigt, dass sie einen integralen Bestandteil der adaptiven Immunantwort gegen Tumorzellen darstellen (Boon et al., 2006; Rosenberg, 2001). Hierbei scheint das kolorektale Karzinom sehr immunogen zu sein. So wurden bereits früh *tumor infiltrating lymphocytes* (TILs) im kolorektalen Karzinom beschrieben. Wurden diese TILs zuerst nur beschrieben (Nagtegaal et al., 2001; Spratt et al., 1967), so zeigte sich im Verlauf, dass die Prognose bezüglich des Überlebens der Patienten mit zunehmendem Anteil an CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten an den TILs zunimmt (Deschoolmeester et al., 2010; Di Giorgio et al., 1992; Diederichsen et al., 2003; Mei et al., 2014; Ohtani, 2007). Diese Daten belegen ebenfalls, dass spontan eine Antwort des Immunsystems gegen die kolorektalen Karzinome erfolgt. Untermuert wird dies durch Studien, die zeigen, dass durch eine Suppression, der von den kolorektalen Karzinomen induzierten Toleranz des Immunsystems gegenüber sich selbst, eine Verbesserung der Prognose erzielt werden kann (Galon et al., 2006; Mlecnik et al., 2016; Mlecnik et al., 2011; Munn et al., 2007; Uyttenhove et al., 2003). Zudem zeigten Studien bei kolorektalen Karzinomen mit Mikrosatelliten-Instabilität (MSI-CRC) eine höhere Dichte an TILs, im Speziellen an CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, als bei kolorektalen Karzinomen ohne MSI (MSS-CRC) (Dolcetti et al., 1999; Galon et al., 2006). Diese TILs sind meistens spezifisch gegen die Neoepitope gerichtet, die sich durch Frameshift-Mutationen in den MSI-CRC-Zellen bilden (Banerjea et al., 2004; Garbe et al., 2011; Ishikawa et al., 2003; Maby et al., 2015; Saeterdal et al., 2001; Schwitalle et al., 2008; Schwitalle et al., 2004). Bei den MSS-CRC scheint die spontan induzierte Immunität geringer zu sein (Banerjea et al., 2009). Dies liegt möglicherweise daran, dass immunregulierende T-Zellen und Zytokine vermehrt in MSS-CRCs vorkommen, als in MSI-CRCs (Le Gouvello et al., 2008), auch wenn die genaue Funktion vor allem der T<sub>reg</sub>-Zellen nicht endgültig geklärt ist, da es Hinweise auf eine Verbesserung der Prognose (vor allem bei MSI-CRCs (Frey et al., 2010)), als auch auf eine Verschlechterung der Prognose gibt (Ladoire et al., 2011; Salama et al., 2009; Salama et al., 2012). Dennoch scheint das Immunsystem, im Speziellen die CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, in der Lage zu sein auch



gegen die MSS-CRCs vorzugehen und so zu einer besseren Prognose zu führen (Deschoolmeester et al., 2010; Li et al., 2016; Mlecnik et al., 2016). Um das Ansprechen auf die unterschiedlichen Immuntherapien noch genauer Voraussagen zu können, wird das CRC in der aktuellen Literatur abhängig von der Genexpression in vier Typen eingeteilt, den sogenannten CMS (*consensus molecular subtypes*) (Guinney et al., 2015; Sadanandam et al., 2013). CMS1 wird dabei auch *MSI-like type* genannt und ist durch eine Mikrosatelliteninstabilität, eine *Mismatch-Repair-Deficiency*, sowie durch eine extrem hohe Mutationsrate gekennzeichnet. Häufige Mutationen dieses Typs betreffen das BRAF-Onkogen. CMS2 ist durch eine Instabilität der Chromosomen gekennzeichnet und besitzt häufig Mutationen, die den WNT-Signalweg und das MYC-*proto-Onkogen* betreffen. CMS3 besitzt häufig ein mutiertes KRAS-Gen und einen dysregulierten Metabolismus z.B. den Auf- und Abbau von Fettsäuren betreffend. CMS4 wird als mesenchymaler Typ bezeichnet und zeichnet sich durch eine Infiltration des umliegenden Bindegewebes aus, sowie durch häufige Angiogenese (Guinney et al., 2015; Sadanandam et al., 2013).

Beim kolorektalen Karzinom werden diverse Studien mit verschiedenen Immuntherapien durchgeführt. Einige davon werden bereits im klinischen Alltag verwendet.

#### 1.3.2.1 Cytokintherapie

Cytokintherapien können eingesetzt werden, um die Proliferation und Ausdifferenzierung von T-Lymphozyten zu unterstützen und zu beschleunigen. Systemisch verabreicht wirken sie allerdings sehr unspezifisch und können viele unerwünschte Wirkungen hervorrufen. Eingesetzt werden hierfür zum Beispiel IL-2 (Beldegrun et al., 1993; Bronte et al., 1995) und IL-12 (Brunda et al., 1993) oder IFN- $\alpha$ . IL-2 hat hierbei bereits eine Zulassung in Amerika für das maligne Melanom und das Nierenzellkarzinom. Einige wenige Studien haben auch die Effektivität und das Sicherheitsprofil einer Cytokintherapie beim kolorektalen Karzinom untersucht. So konnte beispielsweise durch pegyliertes IL-10 eine dauerhafte T-Zellantwort (vor allem CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (T<sub>H</sub>1)) gegen das kolorektale

Karzinom induziert werden (Phase-I-Studie) (Infante et al., 2015). Auch mit IL-2 wurden bereits einige Studien zum kolorektalen Karzinom durchgeführt, die gezeigt haben, dass sich durch hohe Dosen IL-2 eine Remission des kolorektalen Karzinoms erzielen lässt (Rosenberg et al., 1989) oder aber durch niedrigere Dosen zumindest das Ansprechen auf eine zusätzliche Chemotherapie erhöhen lässt (Lissoni et al., 2005). Jedoch zeigten sich bisher in allen diesen Studien erhebliche Nebenwirkungen der Interleukintherapie und eine nicht unerhebliche Letalität unter der Therapie vor allem in den Hochdosisstudien (Lissoni et al., 2005; Rosenberg et al., 1989). Zudem gibt es Hinweise darauf, dass eine IL-2 Therapie nicht nur die Antitumor-T-Zellen und NK-Zellen stimuliert, sondern ebenso die möglicherweise tumorprotektiven T<sub>reg</sub>-Zellen (Beyer et al., 2012).

#### 1.3.2.2 Adoptiver Zelltransfer

Beim adoptiven Zelltransfer (*adoptive cell transfer, ACT*) handelt es sich um eine passive Immuntherapie bei der der Patient in vitro aktivierte Immunzellen (zumeist T-Zellen) infundiert bekommt (Berger et al., 2009). Bei den T-Zellen handelt es sich vorwiegend um autologe TILs, die in vitro vermehrt und aktiviert werden. Diese Methode ist vor allem beim metastasierten Melanom erforscht und ihre Wirksamkeit nachgewiesen (Rosenberg et al., 2011).

Auch für das kolorektale Karzinom konnte in Phase I/II-Studien bereits eine Verlängerung des *overall survivals (OS)* bei relativ geringer therapiebedingter Toxizität durch ACT von T-Lymphozyten gezeigt werden, was jedoch noch in Phase-III-Studien bestätigt werden muss (Zhen et al., 2015).

Auch durch den adoptiven Transfer von Cytokin-induzierten Killerzellen (CIKs) und dendritischen Zellen (DCs) konnte beim CRC eine Verlängerung des *Progression free survivals (PFS)* und des *overall survivals* erzielt werden (Gao et al., 2014).

Ein spezielle Art des adoptiven Zelltransfers sind so genannte *CAR-T-Zellen (Chimeric Antigen Receptor-T-Zellen)*. Hierfür werden den Patienten T-Zellen entnommen, die gentechnisch so verändert werden, dass sie chimäre Rezeptoren bilden, die einerseits gegen tumorspezifische Oberflächenproteine gerichtet sind und andererseits *intracellular immunoreceptor tyrosine-based activation*

*motifs (ITAMs)* enthalten, sodass nach Bindung des Oberflächenantigens die T-Lymphozyten direkt aktiviert werden (Eshhar et al., 1993). Diese CAR-T-Zellen arbeiten daher unabhängig von MHC-Molekülen. Die CAR-T-Zell Therapie wird bisher erfolgreich in der Behandlung von Leukämien (vorwiegend der akuten lymphatischen Leukämie (ALL)) eingesetzt und ist für diese Indikation auch bereits in den USA mit zwei Präparaten zugelassen (Tisagenlecleucel, Axicabtagen-Ciclioleucel) (Maude et al., 2014; U.S. Department of Health and Human Services, 2017). Beide Präparate sind mittlerweile auch in der europäischen Union zur Behandlung der ALL zugelassen (European Medicines Agency, 2018a; European Medicines Agency, 2018b). Beim kolorektalen Karzinom werden derzeit viele Studien zur CAR-T-Zell-Therapie durchgeführt (z.B. NCT02850536, NCT02541370, NCT03018405, NCT02617134) (Gutting et al., 2018). Am Mausmodell konnte die Wirksamkeit der Car-T-Zellen gegen das kolorektale Karzinom bereits gezeigt werden (Magee et al., 2018; Magee et al., 2016; Yong et al., 2017).

### 1.3.2.3 Monoklonale Antikörper

Monoklonale Antikörper zielen auf spezielle Strukturen ab, die vorwiegend für das Tumorwachstum wichtig sind. Sie blockieren diese Rezeptoren oder deren Liganden und hemmen damit das Tumorwachstum. Der Nutzen der Therapie mit monoklonalen Antikörpern wurde beim kolorektalen Karzinom mehrfach belegt (Kurniali et al., 2014). Einige der monoklonalen Antikörper werden beim kolorektalen Karzinom bereits regelhaft in der Therapie in metastasierten Stadien eingesetzt (z. B. Cetuximab (Van Cutsem et al., 2009), Panitumumab (Giusti et al., 2007), Bevacizumab (Cohen et al., 2007)), einige andere werden erst in Studien geprüft (Lynch et al., 2016).

Monoklonale Antikörper, die gegen EGFR (*epidermal growth factor receptor*) gerichtet sind (Cetuximab, Panitumumab), sollten zusätzlich zu einer klassischen Chemotherapie zum Einsatz kommen, da sie dann sowohl das OS, das PFS als auch *die objective response rate* (ORR) verbessern können. Sie werden sogar in der Erstlinientherapie (je nach Lokalisation des Tumors und dem Allgemeinzustand des Patienten) erwogen. Hierfür ist jedoch der Nachweis des KRAS Wildtyp

wichtig, da die Tumoren ansonsten nicht mehr auf den EGFR angewiesen sind (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft), 2019). Eine Kombination mit anti-VEGF-Substanzen (*vascular endothelial growth factor*) erfolgt in der Regel nicht. Jedoch können diese Substanzen (z. B. Bevacizumab) in Kombination mit einer Fluoropyrimidin-Monotherapie, die vor allem bei reduziertem Allgemeinzustand des Patienten eingesetzt wird, zu einer signifikanten Steigerung der OS, des PFS und der ORR führen (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft), 2019).

#### 1.3.2.4 Toll-like-Rezeptor-Agonisten

Unabhängig von den T-Lymphozyten gibt es auch Ansätze, die eine Stimulation des angeborenen Immunsystems zum Ziel haben. Über toll-like-Rezeptor-Agonisten (TLR-Agonisten) werden zum Beispiel Makrophagen und NK-Zellen stimuliert. Vor allem die Toll-like-Rezeptoren Untergruppe 9 scheint hierfür vielversprechend zu sein. Dies hat beim CRC in Phase II Studien auch schon zu einem längeren PFS und OS geführt (Riera-Knorrenschild et al., 2015; Schmoll et al., 2014). Aktuelle Phase III Studien, die diesen Ansatz beim CRC verfolgen, laufen gerade (ClinicalTrials.gov: NCT02077868).

#### 1.3.2.5 Checkpoint Blockade

Einer der vielversprechendsten Ansätze der aktuellen Immuntherapie ist die Checkpoint Blockade (Pardoll, 2012; Topalian et al., 2015). Diese Substanzen führen zu einer generellen Immunsystemaktivierung in dem sie unterschiedliche Inhibitoren des Immunsystems hemmen. Diesen Ansatz verfolgt zum einen der anti-CTLA-4-Antikörper (Ipilimumab). Dieser bindet an den CTLA-4-Rezeptor der T-Lymphozyten und verhindert dessen Aktivierung und damit die Inaktivierung des Lymphozyten (Klein et al., 2009). Diese Art der Therapie ist bereits zur Behandlung des malignen Melanoms zugelassen und ist in der Lage auch in fortgeschrittenen Stadien das Tumorwachstum abzuschwächen (Hodi et al., 2010). Bei diesem Vorgehen kann von einer „endogenen Vakzinierung“ gesprochen werden, die zum Nachteil hat, dass das Immunsystem grundsätzlich aktiviert wird und daher die Gefahr von Autoimmunreaktionen (*immune related adverse events*, irAE) besteht (Haen et al., 2012; Lacouture et al., 2014; Ryder et al.,

2014; Wolchok et al., 2013). Beim CRC konnte bisher durch eine Monotherapie mit CTLA-4-Antikörper keine wesentliche Verbesserung der Prognose erzielt werden (Chung et al., 2010). Durch eine Kombination von PD-1-Inhibitoren und CTLA-4-Antikörpern konnte jedoch in Phase-II Studien durch ein Regime, das bereits für das maligne Melanom getestet wurde, bei tolerierbaren Nebenwirkungen eine Verbesserung der Prognose erzielt werden (Larkin et al., 2015; Overman et al., 2018).

PD-1-Inhibitoren sind insgesamt der wichtigere Checkpoint-Inhibitor in der Therapie des kolorektalen Karzinoms. Im Vergleich zu CTLA-4, welches eher die T-Zell-Aktivierung bei nativen T-Zellen verhindert, führt eine Aktivierung von PD-1 zu einer Anergie bereits aktivierter T-Zellen (Ito et al., 2015). Es wird davon ausgegangen, dass dies ein Grund dafür ist, weshalb die PD-1 Blockade weniger irAE provoziert als eine CTLA-4 Blockade. Des Weiteren scheinen die PD-1-Inhibitoren auch vermehrt in der direkten Umgebung des Tumors zu wirken und nicht wie die CTLA-4-Inhibitoren gleichmäßig im ganzen Organismus (Keir et al., 2008; Kim et al., 2014; Nishimura et al., 1999; Nishimura et al., 2001). Die PD-1-Inhibition wird bereits in der Behandlung des malignen Melanoms, des Bronchiolalkarzinoms (NSCLC), des Hodgkin-Lymphoms, sowie bei Urothelkarzinomen eingesetzt (Bellmunt et al., 2017; Chan et al., 2017; Garon et al., 2015; Hui et al., 2017; Kim et al., 2018; Kuo, 2017; Kwong et al., 2017; Reck et al., 2016; Robert et al., 2015; Simeone et al., 2017; Vardhana et al., 2018; Wolchok et al., 2013).

Seit 2017 sind in den USA Pembrolizumab und Nivolumab (beides PD-1-Inhibitoren) für jeden soliden Tumor mit einer Mismatch-Repair-Defizienz zugelassen, nachdem in klinischen Studien die Effektivität und die Sicherheit der PD-1-Blockade unter anderem beim kolorektalen Karzinom nachgewiesen werden konnte (Brahmer et al., 2012; Topalian et al., 2012). Jedoch zeigte sich, dass bisher nur Patienten mit einer Mikrosatelliten-Instabilität von der PD-1-Inhibition profitieren. Bei dieser Subgruppe konnte das PFS um bis zu 50% gesteigert werden (Le et al., 2015; Overman et al., 2018). Bei den MSS-CRC jedoch und bei Patienten ohne Mismatch-Repair-Defizienz konnte kein Benefit durch eine PD-1-Blockade nachgewiesen werden (Brahmer et al., 2012; Dudley et al., 2016; Topalian et al., 2012). Da nur circa 13-14% aller kolorektalen Karzinome eine

Mikrosatelliteninstabilität aufweisen, profitiert der Großteil aller Patienten mit einem kolorektalen Karzinom daher nicht von einer singulären PD-1-Blockade (Guinney et al., 2015; Kim et al., 1994).

#### 1.3.2.6 Vakzinierung

Da die Antwort auf veränderte Eigenantigene bei Tumoren vermindert sein kann, wird bei der Tumorstimmung versucht, durch Anbieten von Zielantigenen eine Immunantwort auszulösen bzw. eine bestehende Immunantwort zu unterhalten (Haen et al., 2013; Lynch et al., 2016). Diese Zielantigene können dem Immunsystem auf unterschiedliche Art und Weise angeboten werden. Die vier Formen Ganzzellvakzine, Peptidvakzine, dendritische-Zell-Vakzine und Virus-Antigen-Vakzine sollen im Weiteren dargelegt werden.

Ganzzellvakzine mit autologen (oder allogenen) Tumorzellen enthalten das komplette Antigenrepertoire der entsprechenden Tumoren. Sie enthalten jedoch auch viele Antigene, die auf Normalgewebe präsentiert werden (Lynch et al., 2016). Daher ist zumeist die ausgelöste Immunantwort nicht sehr stark und die Rate an Autoimmunphänomenen ist relativ hoch (Klebanoff et al., 2011; Veelken et al., 1997). Daher werden die Tumorzellvakzine teilweise noch so verändert, dass sie GM-CSF oder andere Zytokine sezernieren. Aktuelle Studien, die diesen Ansatz verfolgen, sind z. B. das GVAX und das Belagenpumatucel-L Projekt (Geary et al., 2013; Giaccone et al., 2015; Haen et al., 2012; Hege et al., 2006; Nemunaitis et al., 2006; Nemunaitis et al., 2009). Für das kolorektale Karzinom wurden ebenfalls kleine Studien durchgeführt, die diesen Ansatz verfolgt haben (Zheng et al., 2014).

Bei der Peptidvakzinierung werden dem Immunsystem Zielpeptide angeboten, die möglichst tumorspezifisch sind und auf HLA-Molekülen präsentiert werden. Der Vorteil dieses Ansatzes liegt darin, dass es sich um eine sehr gezielte Therapie handelt, sodass Autoimmunphänomene fast vollständig ausgeschlossen werden können. Des Weiteren sind diese kurzen Peptide leicht zu synthetisieren, sodass sie in kurzer Zeit und in großer Menge produziert werden können (Bartnik et al., 2012). Nachteil ist jedoch, dass die Peptide an den entsprechenden HLA-

Haplotyp des Patienten angepasst werden müssen, da durch die HLA-Restriktion nicht jedes Peptid auf jedem HLA-Haplotyp präsentiert werden kann.

Für das Nierenzellkarzinom wird bereits solch ein multivalenter Impfstoff in Phase-III-Studien getestet ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), ID: NCT01265901). Die bisherigen Ergebnisse der dazugehörigen Phase-II-Studien zeigen vielversprechende Ergebnisse in Kombination mit *low-dose* Cyclophosphamid (Rausch et al., 2014; Walter et al., 2013; Walter et al., 2012). Auch für das kolorektale Karzinom konnten bereits in Phase-II-Studien vielversprechende Ergebnisse (ebenfalls in Kombination mit *low-dose* Cyclophosphamid, GM-CSF oder Imiquimod) erzielt werden, die jedoch in weiteren Studien bestätigt werden müssen (Hazama et al., 2014; Mayer et al., 2012).

Bei einer dendritischen-Zell-Vakzine werden die dendritischen Zellen ausgenutzt um die T-Lymphozyten zu primen. Da diese Zellen darauf spezialisiert sind T-Lymphozyten zu aktivieren, scheint diese Form sehr effektiv zu sein. In der ursprünglichen Form wurden die dendritischen Zellen *in vivo* mit der Vakzine in Kontakt gebracht und haben dann eine Immunreaktion ausgelöst. So wurde zum Beispiel stabilisierte mRNA von tumorassoziierten Antigenen in die Haut eingebracht. Hierbei wurden meist verschiedene proinflammatorische Adjuvantien beigemischt, um eine lokale Entzündungsreaktion zu provozieren. Die dendritischen Zellen translatieren die mRNA nach der Aufnahme und präsentieren so das gewünschte tumorassoziierte Antigen (Kallen et al., 2014; Pascolo, 2004; Pascolo, 2015).

Die meisten neueren Ansätze verfolgen eine *ex vivo* Stimulation mit der anschließenden Retransfusion der bereits gereiften dendritischen Zellen. Die tumorassoziierten Antigene können den dendritischen Zellen dabei in Form von Peptiden (Celluzzi et al., 1996), Tumorzelllysaten (Nestle et al., 1998), kompletten Tumorzellen (Gong et al., 1997), Tumor-RNA oder auch apoptotischen Tumorzellen angeboten werden (Berard et al., 2000; Koido et al., 2000).

Momentan ist *Sipuleucel-T* der wichtigste Vertreter der *ex vivo* Stimulation. *Sipuleucel-T* ist in den USA zur Behandlung des asymptomatischen metastasierten Prostatakarzinoms zugelassen (in Europa wurde die Zulassung widerrufen

(European Medicines Agency, 2015)). Dem Patienten werden hierfür *peripheral blood mononuclear cells* (PBMCs) über eine Leukapherese entnommen und anschließend werden diese Zellen mit einem Fusionsprotein von *prostatic acid phosphatase* (PAP) und GM-CSF inkubiert. Die so aktivierten antigenpräsentierenden Zellen werden dem Patienten zurückinfundiert und bedingen so eine T-Zellreaktion (Haen et al., 2012; Kantoff et al., 2010a; Small et al., 2006).

Beim kolorektalen Karzinom wurden ebenfalls einige Studien mit dendritischen Zellen, die vorwiegend mit CEA (Carcinoembryonales Antigen) als Zielantigen arbeiteten, durchgeführt. Und obwohl einige Phase I/II-Studien relativ vielversprechend waren und eine Immunantwort gegen den Tumor erzeugt werden konnte (Caballero-Banos et al., 2016; Itoh et al., 2002; Morse et al., 1999; Ying et al., 2014), wurde bisher keine Phase III-Studie veröffentlicht, die einen Benefit bezüglich PFS oder OS zeigen konnte (Lynch et al., 2016).

Virale Vektoren können eingesetzt werden, um eine effektive Immunantwort von T-Lymphozyten zu induzieren. Dies liegt vermutlich daran, dass die Viren selbst eine Immunantwort provozieren und daher eine generelle Aktivierung des Immunsystems bewirken. Der Nachteil dieser Vorgehensweise ist, dass die meisten Vektoren nur wenige Male eingesetzt werden können, da dann das Immunsystem gegen die Viren sensibilisiert ist (Borysiewicz et al., 1996; Haen et al., 2012; Kantoff et al., 2010b; Kutzler et al., 2008). Beim kolorektalen Karzinom wurden virale Vektoren ebenfalls zur Vakzinierung in Phase I und anderen präklinischen Studien getestet. Zumeist war auch hier wiederum das Zielantigen CEA (Kaufman et al., 2008; Mukherjee et al., 2007).



## 2 Zielsetzung der Arbeit

Die Prognose des kolorektalen Karzinoms (CRC) hängt maßgeblich von den TILs ab. Diese beeinflussen die Prognose sogar mehr als das eigentliche UICC Stadium (Galon et al., 2006; Mlecnik et al., 2016; Mlecnik et al., 2011). Im Gegensatz zu vielen anderen Tumorerkrankungen können Patienten mit kolorektalen Karzinomen aller meistens nicht von einer Therapie mit Immuncheckpoint-Inhibitoren profitieren. Daher ist für den Großteil der CRC-Patienten eine Immuntherapie keine Option (Le et al., 2015). Positive Ergebnisse konnten aber dennoch isoliert für die Subgruppe von Tumoren, die eine Mikrosatelliteninstabilität aufweisen, gesehen werden. Dies zeigt aber, dass das CRC prinzipiell auch eine immuno-gene Erkrankung ist. Bei den MSI-CRCs (CMS1) wurde eine hohe Dichte an TILs (vor allem CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten) nachgewiesen, sowie eine hohe Mutationsrate (Maby et al., 2015). Jedoch scheinen Neoepitope bei den nicht-MSI-CRC (CMS2-4) eine geringere Relevanz zu haben. Es ist daher notwendig für kolorektale Karzinome (insbesondere, wenn sie mikrosatellitenstabil sind) andere Zielstrukturen für eine Immuntherapie zu identifizieren. Des Weiteren ist nicht alleine die MSI und die Mutationshäufigkeit als ausschlaggebendes Kriterium für die Prognose zu nennen sondern die Art der TILs (Mlecnik et al., 2016), sodass auch hier weitere definitive Zielstrukturen interessant sind.

Während hierfür das Genom und das Transkriptom des kolorektalen Karzinoms weitestgehend untersucht worden sind, ist über das eigentliche HLA-repräsentierte Peptidom (Ligandom) der kolorektalen Karzinome – vor allem auch im Vergleich zum Ligandom des nicht-malignen Kolongewebes – wenig bekannt.

Ziel dieser Arbeit ist es daher mittels direkter Identifikation via Massenspektrometrie einen umfassenden Überblick über das Ligandom der kolorektalen Karzinome zu gewinnen und damit die Grundlage für mögliche neue Zielantigene der Immuntherapie beim kolorektalen Karzinom insgesamt zu legen.

Ferner soll das Ligandom des nicht-malignen korrespondierenden Kolongewebes ebenfalls erfasst werden. Mit diesen Daten lassen sich mögliche tumorassoziierte Antigene bzw. tumorspezifische Antigene identifizieren. Zudem wird auch eine semiquantitative Analyse durchgeführt von tumorassoziierten Antigenen, die

bei den Tumoren deutlich überrepräsentiert sind im Vergleich zum nicht-malignen Gewebe.

Abschließend wird mittels Datenbankenabgleichen (KEGG-Pathway, Proteo-maps) vom veränderten Ligandom auf veränderte zelluläre Prozesse des kolo-rektalen Karzinoms, verglichen mit dem nicht-malignen Kolongewebe, geschlossen.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Patientengewebe

Die analysierten humanen kolorektalen Tumore, sowie das entsprechende Normalgewebe wurden durch die Universitätsklinik für Allgemeine, Viszeral- und Transplantationschirurgie (AVT) Tübingen bereitgestellt.

Die Gewebe wurden nach der Operation sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Analyse bei -80 °C gelagert. Die Auftrennung des Gewebes in einen Normalgewebe- und einen Tumor-Anteil erfolgten vor dem Einfrieren der Proben.

**Tabelle 7: Verwendete Gewebeproben.** Die Liganden der Proben oberhalb des Doppelstriches wurden aus der hauseigenen Datenbank entnommen und zur Auswertung herangezogen. Die Liganden der Proben unterhalb des Doppelstriches wurden im Rahmen dieser Arbeit experimentell ermittelt. n.d.=not determined

Probenbezeichnung	Tumorgröße [cm]	Tumormasse [g]	Histologische Einteilung	TNM-Stadium	Grading	HLA-A	HLA-B	HLA-C
KC139	n.d.	0,5	Adeno-Ca	pT3, pN2, Mx, L1, V0, R0	2	A*02; A*03	B*15; B*40	n.d.
KC141	n.d.	2,3	Adeno-Ca	n.d.	n.d.	A*11; A*24	B*07	n.d.
KC145	n.d.	1,3	Adeno-Ca	Tx, Nx, Mx, Lx, Vx, Rx	1	A*02; A*25	B*40	n.d.
KC151	n.d.	0,6	Adeno-Ca	Tx, Nx, Mx, Lx, Vx, Rx	2	A*01; A*02	B*37; B*57	n.d.
KC160	n.d.	1,1	Adeno-Ca	pT2, pN0, cM0, Lx, Vx, R0	1	A*01; A*26	B*08; B*13	n.d.
KC176	n.d.	1,9	Adeno-Ca	pT3, pN1, pM1, Lx, V0, R0	2	A*23; A*31	B*15; B*44	n.d.
KC177	n.d.	1,1	Adeno-Ca	pT4, pN2, pM1, L1, V0, R1	2	A*02; A*03	B*13; B*44	n.d.
KC178	n.d.	1,1	Adeno-Ca	n.d.	3	A*02; A*23	B*14; B*44	n.d.
KC179	n.d.	1,1	Adeno-Ca	n.d.	3	A*02; A*03	B*35; B*44	n.d.
KC183	n.d.	0,8	Adeno-Ca	pT2, pN0, cM0, L0, V0, R0	1	A*02; A*68	B*40; B*51	n.d.
KC185	n.d.	1,0	Adeno-Ca	n.d.	2	A*26; A*29	B*44; B*49	n.d.
KC186	n.d.	1,5	Adeno-Ca	pT3, pN0, pM0, L0, V0, R0	1	A*03:01; A*11:01	B*07:02; B*51:01	n.d.

## Material und Methoden

Probenbezeichnung	Tumorgroße [cm]	Tumormasse [g]	Histologische Einteilung	TNM-Stadium	Grading	HLA-A	HLA-B	HLA-C
KC24	0,3	1,7	Adeno-Ca	pT3, pN2, Mx, L1, V1, R1	3	A*02:01; A*03:01	B*07:02; B*14:01	C*07:02; C*08:02
KC28	0,25	1,4	Adeno-Ca	pT4, pN0, Mx, L0, V0, R0	2	A*01:01; A*26:01	B*41:01; B*49:01	C*07:01; C*17:01
KC29	0,4	3,6	Adeno-Ca	pT2, pN0, M0, L1, V0, R0	2	A*02:01	B*44:02; B*51:01	C*05:01; C*15:02
KC38	1,5	5,8	Adeno-Ca	ypT3, pN1, M0, L1, V0, R0	2	A*24:02; A*32:01	B*07:02; B*44:02	C*05:01; C*07:02
KC53	0,2	3,1	Adeno-Ca	pT1, pN0, Mx, L0, V0, R0	2	A*01:01; A*02:01	B*15:01; B*44:02	C*03:04; C*05:01
KC54	0,1	0,92	Adeno-Ca	pT3, pN1, M1, L1, V0, R0	2	A*02:01; A*03:01	B*07:02; B*27:02	C*02:02; C*07:02
KC58	0,2	1,8	Adeno-Ca	pT3, pN1, M0, L1, Vx, R0	2	A*02:01; A*23:01	B*07:02	C*04:01; C*07:02
KC60	0,2	0,7	Adeno-Ca	pT3, pN1, pM0, L1, V0, R0	2	A*02:01; A*32:01	B*44:02; B*51:01	C*05:01; C*15:02
KC64	0,1	0,5	Adeno-Ca	pT3, pN0, Mx, L1, V0, R0	2	A*03:01; A*68:01	B*51:01; B*57:02	C*15:02; C*18:01
KC67	0,1	1,0	Adeno-Ca	pT1, pN0, M0, L0, V0, R0	2	A*03:01; A*32:01	B*07:02; B*13:02	C*07:02; C*16:04
KC70	0,1	1,0	Adeno-Ca	pT4, pN0, cM0, L0, V0, R0	3	A*02:01; A*31:02	B*13:02; B*51:05	C*04:01; C*06:02
KC71	0,4	2,8	Adeno-Ca	pT3, pN1, pM0, L0, V0, R0	2	A*24:02; A*29:02	B*07:02; B*27:05	C*02:02; C*07:02
KC77	0,2	0,4	Adeno-Ca	pT3, pN0, cM0, L1, V0, R0	2	A*02:01	B*07:02; B*50:01	C*06:02; C*07:02
KC80	0,2	1,0	Adeno-Ca	pT4, pN1, M1, L1, V0, R0	2	A*01:01; A*03:01	B*15:01; B*39:06	C*01:02; C*07:02
KC82	0,1	1,2	Adeno-Ca	pT4, pN0, pMx, L0, V0, R0	3	n.d.	n.d.	n.d.
KC84	0,2	0,6	Adeno-Ca	pT2, pN0, M0, L0, V0, R0	2	A*02:01; A*03:01	B*07:02; B*56:01	C*01:02; C*07:02
KC86	1	5,4	Adeno-Ca	pT3, pN0, Mx, L0, V0, R0	2	A*03:01; A*31:01	B*07:02; B*15:01	C*01:02; C*07:02
KC89	0,2	0,0	Adeno-Ca	pT4, pN2, M1, L1, V0, R0	3	A*01:01; A*32:01	B*40:02; B*51:01	C*02:02; C*14:02
KC90	0,4	2,9	Adeno-Ca	pT3, pN2, M0, L0, V0, R0	2	A*01:01	B*27:05; B*35:01	C*04:01; C*06:02
KC92	0,2	1,0	Adeno-Ca	pT2, pN0, cM0, L0, V0, R0	2	A*01:01; A*24:02	B*08:01; B*35:01	C*04:01; C*07:01
KC93	0,4	1,2	n.d.	Tx, Nx, Mx, Lx, Vx, Rx	0	A*02:01; A*03:01	B*07:02; B*39:01	C*07:02; C*12:03
KC94	0,3	1,0	Adeno-Ca	pT4, pN2, M1, L1, V1, R0	2	A*26:01; A*30:02	B*08:01; B*44:02	C*05:01; C*07:01
KC97	0,3	2,1	Adeno-Ca	pT4, pN1, M0, Lx, Vx, R1	2	A*03:01; A*68:26	B*08:01; B*44:02	C*05:01; C*07:01
KC104	0,3	1,8	Adeno-Ca	pT3, pN0, Mx, L1, V0, R1	2	A*01:01	B*44:03; B*55:01	C*03:03; C*04:01

**3.1.2 Geräte**

Analysewaage AC 211 S	Sartorius, Göttingen
Autosampler Micro AS	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Einkanalpipetten 1, 10, 20 µl	Gilson, Middleton, USA
Einkanalpipetten 100, 1000 µl	Gilson, Middleton, USA
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Flachschüttler Vibrax VXR	IKA, Staufen
Gefrierschrank -20 °C	Liebherr, Biberach
Gefrierschrank -80 °C	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Kältefalle KF-2-110	H. Saur Laborbedarf, Reutlingen
Kühlschrank	Liebherr, Biberach
Magnetrührer RCT basic	IKA, Staufen
Massenspektrometer LTQ Orbitrap XL	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Mikrozentrifuge Biofuge fresco	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Mikrozentrifuge Biofuge pico	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Nano-HPLC NanoLC 2D	Eksigent, Dublin, USA
Nano-HPLC Ventil VICI Cheminert	VICI, Schenk, CH
Nano-LC Säule Acclaim PepMap 100, C18, 3 µm 100 Å, 75 µm I.D. x 25 cm	Dionex, Sunnyvale, USA

---

Nano-LC Säule Acclaim PepMap RSLC, C18, 2 $\mu\text{m}$ 100 Å, 75 $\mu\text{m}$ I.D. x 15 cm	Dionex, Sunnyvale, USA
Nano-LC Säule Acclaim PepMap RSLC, C18, 2 $\mu\text{m}$ 100 Å, 75 $\mu\text{m}$ I.D. x 50 cm	Dionex, Sunnyvale, USA
Nano Trap Säule C18, 3 $\mu\text{m}$ , 100 Å 75 $\mu\text{m}$ I.D. x 2 cm, nanoViper	Dionex, Sunnyvale, USA
Nano-UHPLC UltiMate 3000 RSLCnano	Dionex, Sunnyvale, USA
pH-Meter	Knick Elektronische Messgeräte, Berlin
Pipettierhilfe Pipetboy acu	Integra Biosciences, Fernwald
Pneumatische Pumpe LKB P-1	Pharmacia (GE Healthcare), Little Chal- font, UK
Potterglas 5 ml, 25 ml	Novodirect, Kehl
Quarzküvette, 10 mm Schichtdicke	Hellma, Müllheim
Rührwerk RZR 2020	Heidolph Instruments, Schwabach
Spektrometer Ultrospec 3000 font, UK	Pharmacia (GE Healthcare), Little Chal-
Tischzentrifuge Megafuge 1.0	Thermo Fisher Scientific, Waltham , USA
Ultraschall-Homogenisator	Branson Ultrasonics, Danbury, USA
Ultrazentrifuge L-80	Beckman Coulter, Krefeld
Ultrazentrifugenrotor Ti70	Beckman Coulter, Krefeld

Vakuumzentrifuge	Bachofer, Reutlingen
Vorsäulenkartusche Acclaim PepMap100, C18, 5 µm, 100 Å, 300 µm I.D. x 5 mm	Dionex, Sunnyvale, USA
Vortexer Minishaker MS2	IKA, Staufen
<b>3.1.3 Software</b>	
MASCOT Server 2.2.04	Matrix Science, Boston, USA
Matlab R2012b	The Mathworks, Natick, USA
Microsoft Office 2007	Microsoft, Redmond, USA
Microsoft Office 2010	Microsoft, Redmond, USA
SigmaPlot 12	Systat Software Inc., San Jose, USA
Thermo Proteome Discoverer 1.1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
XCalibur 2.0.7	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<b>3.1.4 Verbrauchsmaterialien</b>	
15 ml-Röhrchen Falcon BD	Becton, Dickinson and Company (BD) Franklin Lakes, USA
50 ml-Röhrchen	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Acetonitril LC/MS Grade	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
β-Glycerophosphat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
CNBr-aktivierte Sepharose	GE Healthcare, Little Chalfont, USA
CHAPS	AppliChem, Darmstadt
Cryo-Röhrchen: 1,8 ml Cryo.S,	Greiner Bio-one, Frickenhausen,
Dreiwegehahn Discofix C3	B. Braun Melsungen AG, Melsungen

Filtrationseinheiten Amicon Ultra, 10 kDa NMWL, 0,5 ml, 4 ml, 15 ml	Millipore, Billerica, USA
Glycin, >99 % p.a.	Merck, Darmstadt
HCl, >37 % Lösung p.a.	Merck, Darmstadt
Imidazol ACS grade	Merck, Darmstadt
Miniatursäulchen 900 µl	Thermo Pierce, Rockford, USA
Nano-ESI Emitter PicoTip 360/20 µm	New Objective, Woburn, USA
Natriumazid p.a.	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid p.a.	Merck, Darmstadt
Natriumfluorid, >99 % p.a.	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriummolybdat p.a.	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natrium-ortho- Vanadat p.a.	Calbiochem/ Merck, Darmstadt
Natriumpyrophosphat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumtartrat p.a.	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
PBS	Claudia Falkenburger, Immunologie, Tü- bingen
Petrischalen aus Polystyrol	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Pipettenspitzen 10, 200, 1000 µl	Starlab, Ahrensburg
Pipettenspitzen mit C 18 -Matrix, ZipTip µ-C 18 ,10 µl	Millipore, Billerica, USA
Pipettenspitzen PEG-reduziert	Gilson, Middleton, USA



Diamond 10, 200, 1000 µl

Proteaseinhibitorcocktail Complete	Roche, Basel, CH
Protein Lobind Tubes 0,5ml, 1,5ml	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Spritzen 5 ml, 10 ml, 30 ml, 50 ml	BD, Franklin Lakes, USA
Sterilfilter 0,20 µm	Sartorius Stedim Biotech, Franklin Lakes, USA
Trifluoressigsäure (TFA)	Applied Biosystems, Foster City, USA
Wasser Ultra LC/MS grade	Mallinckrodt Baker, Philipsburg, USA

### 3.1.5 Puffer und Lösungen

#### Antikörper-Kopplungspuffer:

- 0,5 M NaCl
- 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>
- pH mit NaOH auf 8,3 einstellen

#### polares Lösungsmittel A :

- H<sub>2</sub>O
- 2 % Acetonitril
- 0,1 % Ameisensäure

#### unpolares Lösungsmittel B:

- H<sub>2</sub>O
- 80 % Acetonitril
- 0,1 % Ameisensäure

#### Lysepuffer (2-fach):

- 33 ml PBS

- 400 mg CHAPS
- 1 Tablette Proteaseinhibitor
- 660 µl Phosphataseinhibitorcocktail

Elusionslösung (intern ABe Lösung genannt):

- H<sub>2</sub>O
- 50 % Acetonitril
- 0,2 % TFA

polares saures Lösungsmittel (intern A\*-Lösung genannt):

- H<sub>2</sub>O
- 0,1 % TFA

lipophiles Lösungsmittel (intern B\*-Lösung genannt):

- H<sub>2</sub>O
- 80 % Acetonitril

Ladelösung für die HPLC (intern ALoad-Lösung genannt):

- H<sub>2</sub>O
- 1 % Acetonitril
- 0,05 % TFA

Phosphataseinhibitorcocktail (100-fach):

- 200 mM Imidazol
- 100 mM Natriumfluorid
- 115 mM Natriummolybdat
- 100 mM Natrium-ortho-Vanadat
- 400 mM Natriumtartrat
- 200 mM β-Glycerophosphat
- 200 mM Natriumpyrophosphat
- HCl zugeben, bis alle Inhaltsstoffe gelöst sind

### 3.1.6 Antikörper

Tabelle 8: Verwendete Antikörper

Bezeichnung	Isotyp	Spezifität	Herstellung	Referenz
W6/32	IgG 2a, κ	HLA-A, HLA-B, HLA-C	Claudia Falkenburger, Immunologie, Tübingen	(Barnstable et al., 1978)
L243	IgG 2a, κ	HLA-DR	Claudia Falkenburger, Immunologie, Tübingen	(Goldman et al., 1982)
Tü39	IgG 2a, κ	HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ	Claudia Falkenburger, Immunologie, Tübingen	(Pawelec et al., 1985)

(Gesamte Liste nach Kowalewski, 2011; Kowalewski et al., 2013)

## 3.2 Methoden

### 3.2.1.1 Isolation der MHC-Liganden mittels Affinitätschromatographie

Um im Weiteren massenspektrometrisch analysiert werden zu können, müssen die MHC-Liganden aus dem entsprechenden Gewebe freigesetzt werden und aus den übrigen Peptiden und Zellbestandteilen isoliert werden. Hierfür wird die Immunaффinitätschromatographie genutzt. Das hierfür verwendete Protokoll erstreckt sich über zwei Tage und beinhaltet die Herstellung der Matrix der Chromatographiesäule, die Lyse der Probe, die eigentliche Chromatographie sowie die Elution der Liganden von der stationären Phase der Säule.

### 3.2.1.2 Herstellung der Matrix

Für jedes Gramm Gewebe der Probe wird ein Milligramm der Antikörper auf der Säule benötigt (vgl. 3.1.6). Da sowohl der Antikörper Tü39 als auch L243 zur Identifizierung von MHC-Klasse-II-Molekülen dienen und sie daher auf eine Säule gegeben werden, wird von beiden jeweils nur die Hälfte benötigt. Ein Milligramm Antikörper wird an 40 mg CNBr-aktivierte Sepharose gekoppelt. Die Kopplung erfolgt hierbei in der von Kohn beschriebenen Reaktion (Kohn et al., 1981). Praktisch wurde hierbei die Sepharose (entsprechend abgewogene Menge) in 1 mM Salzsäure suspendiert und unter Rotation (30 min) reaktiviert. Nach der Zentrifugation (300 rpm ohne Bremse bei Raumtemperatur) wird der Überstand abgenommen und die Sepharose in Kopplungspuffer (siehe 3.1.5) resuspendiert. Die entsprechende Menge des Antikörpers wird dazugegeben und die Sepharose kann nun unter Rotation für 120 min an diesen koppeln. Erneute Zentrifugation wie oben und Abnahme des Überstandes. Nun wird die Sepharose mit 0,2 M Glycin überschichtet und für 60 min unter Rotation belassen. Dieser Schritt dient zur Absättigung der unspezifischen Bindungen der Sepharose für Aminosäuren bzw. Peptide aller Art. Nach der nächsten Zentrifugation wird abermals der Überstand abgenommen und die Sepharose mit PBS gespült. Dieser Schritt wird insgesamt dreimal wiederholt und zum Schluss wird die Sepharose abermals in PBS aufgenommen und entsprechend der Proben aliquotiert (Kowalewski et al., 2013).

### 3.2.1.3 Herstellung des Gewebelysats

Die Herstellung des Lysats erfolgt vollständig im Kühlraum bei 4 °C. Die Proben aus dem -80 °C Gefrierschrank werden langsam auf Eis erwärmt und in eine Petrischale überführt. Nach Zerkleinerung der Proben mittels Skalpell werden sie mit Lysepuffer (siehe 3.1.5) übergossen und in ein Potterglas überführt. Hierin wird die Lösung durch den Potter homogenisiert. Danach werden die Proben 60min lang auf dem Flachsüttler inkubiert. Anschließend wird das Lysat mit Ultraschall weiter homogenisiert. Dieser Schritt dient vor allem dazu die Membranproteine in Lösung zu bringen. Nach diesem Schritt inkubiert das Lysat wiederum 60 min auf dem Flachsüttler. Danach wird das Lysat für 20 min bei 4000 rpm und 4 °C in der *Megafuge* zentrifugiert um die groben, nicht gelösten Zellbestandteile ab zu zentrifugieren. Das Zellpellet wird danach verworfen und der Überstand in Eppendorfgefäße überführt. Diese werden dann bei 13000 rpm für 99 min in der *BioFuge fresco* zentrifugiert. Hier wird abermals das Pellet verworfen und der Überstand durch einen 0,2 µm Sterifilter filtriert (Kowalewski et al., 2013).

### 3.2.1.4 Durchführung der Chromatografie

Die Säulen werden primär mit 70 %-igem Alkohol und PBS gespült. Anschließend werden sie mit der entsprechenden Menge der hergestellten Matrix (Sepharose) befüllt und nochmals für 60 min mit PBS gespült. Dies dient dazu, jedwede Verunreinigung im System zu eliminieren und die Dichtigkeit des Systems zu überprüfen. Nun wird das Lysat in das System eingespeist. Es wird ein geschlossener Kreislauf installiert, um den Verlust so gering wie möglich zu halten und um den Verdünnungseffekt im System auf ein Minimum zu reduzieren. Die beiden Säulen (W6/32 und L243/Tü39), die pro Probe befahren werden, werden direkt in Reihe geschaltet. Durch eine Pumpe wird das Lysat so über Nacht durch beide Säulen umgewälzt. Am nächsten Morgen wird das System dann für 60 min mit PBS und anschließend für 60 min mit ddH<sub>2</sub>O gespült. Das Zelllysate wird aufgefangen und bei -80 °C asserviert. Nach dem Spülgang wird Luft über die Säule geblasen um diese zu trocknen (Kowalewski et al., 2013).

### 3.2.1.5 Elution der Peptide

Die luftgetrockneten Säulen werden nun mit 0,2 %-igem Trifluoressigsäure (TFA) überschichtet (Matrix sollte vollständig bedeckt sein) und für 30 min auf dem Flachsüttler inkubiert. Danach wird die Flüssigkeit durch eine Spritze in ein *LoBind*-Eppendorfgefäß geblasen. Dieser Schritt wird insgesamt achtmal durchgeführt. Beim ersten Schritt wird 10 %-iges TFA (1 µl pro mg Antikörper) hinzugegeben. Dies führt dazu, dass der pH-Wert initial stärker absinkt. Beim letzten Schritt wird ABe-Lösung (siehe 3.1.5) anstelle des TFAs benutzt um die Peptid-ausbeute weiter zu erhöhen. Abschließend wird das Eluat lyophilisiert und kann dann asserviert werden und der Probenvorbereitung für die Massenspektrometrie zugeführt werden (modifiziert nach Kowalewski et al., 2013).

## 3.2.2 Identifizierung von Peptidsequenzen durch Massenspektrometrie

### 3.2.2.1 Probenvorbereitung

In der Probe befinden sich die Ligandenpeptide sowie die MHC-Moleküle. Diese werden durch die Amiconfiltration (cut-off 10 kDa NMWL) voneinander getrennt. Ferner ist die Probe meist durch Salze, Peptidfragmente und weitere unspezifische Stoffe kontaminiert. Daher wird durch die Probenvorbereitung eine Aufreinigung und Entsalzung der Probe vorgenommen.

Die lyophilisierte Probe wird zur Vorbereitung auf die Massenspektrometrie in 400 µl ABe-Lösung aufgenommen und gelöst. Nach einer Minute im Ultraschallbad wird die Probe 5 min zentrifugiert (13000 rpm). Die Amiconfilter werden mehrmals mit ABe-Lösung gewaschen und befeuchtet. Nun wird die Probe auf den Filter gegeben und bei 13000 rpm für 30 min filtriert. Das Filtrat (enthält die MHC-Liganden) wird in ein *LoBind*-Eppendorfgefäß überführt und in der Vakuumzentrifuge auf ein Zielvolumen von 30 µl eingengt. Das Retentat (MHC-Moleküle) wird für weitere Versuche bei -80 °C asserviert. Nun beginnt die Probenreinigung. Hierzu wird eine spezielle Pipettenspitze (ZipTip) zuerst zehnmal mit B\*-Lösung und dann zehnmal in A\*-Lösung gespült. Danach wird zehnmal in der Probe pipettiert und dann die Spitze dreimal in A\*-Lösung pipettiert. Anschließend wird die Spitze in einem Autosamplergefäß, das B\*-Lösung enthält,

ausgewaschen und das Ganze mit derselben Probe zwei weitere Male wiederholt, wobei der erste Spülschritt in der B\*-Lösung ausgelassen wird.

Anschließend wird die Probe ein weiteres Mal in der Vakuumzentrifuge eingeeengt (Zielvolumen 5µl) und mit ALoad-Lösung auf ein Volumen von 25 µl gebracht. In dieser Form wird die Probe der Massenspektrometrie zugeführt.

### 3.2.2.2 Massenspektrometrie

Die Probe wird anschließend durch ein Hybridmassenspektrometer analysiert. Da das Peptidgemisch sehr konzentriert und komplex ist, wird zuvor eine *high performance liquid chromatography* (HPLC) durchgeführt, um die Peptide bereits aufzutrennen. Die verwendete HPLC-Säule besitzt eine Länge von 250 mm. Der Gradient des Lösungsmittels B wurde über 90 min kontinuierlich von 0 auf 32 % erhöht. Der eigentlichen Trennsäule ist eine Vorsäule vorgeschaltet, um Kontaminationen der Probe weiter zu verringern und eine weitere Entsalzung durchzuführen (Nelde et al., 2019).

Direkt im Anschluss wird das Peptidgemisch dem LTQ Orbitrap XL Hybridmassenspektrometer der Firma Thermo Fisher zugeführt (sogenannte on-line-Kopplung). Hierbei wird das Peptidgemisch aus der HPLC direkt mit der Elektrosprayionisationsquelle (Nanosprayionisation) verbunden und ionisiert.

Bei der eigentlichen Massenspektrometrie wird die „high-low“-Strategie (FTMS1-ITMS2) angewandt, wobei die Peptidionen für die MS/MS in einem sogenannten datenabhängigen Modus (*data-dependent acquisition*) ausgewählt werden.

Das heißt, die Vorläuferionen eines jeden Scanzklus (<2,5s) werden in der Orbitrap mit hoher Auflösung gemessen (R=60 000). Dann werden die fünf häufigsten Peptidionen mittels CID (*collision induced dissociation*) im *linear trap quadrapol* fragmentiert (Top 5 CID Methode) und dort mit niedrigerer Auflösung gemessen. Hierbei werden für die MHC-Klasse-I nur Peptidionen zur Fragmentierung zugelassen, die zum einen einen Masse-Ladungsquotienten von 400-650m/z aufweisen und zum anderen mindestens zweifach und höchstens dreifach positiv geladen sind. Für die MHC-Klasse-II werden nur Peptidionen zugelassen, die mindestens zweifach positiv geladen sind und einen Masse-

Ladungsquotienten von 300-1500m/z aufweisen (Berlin, 2018; Kowalewski, 2011; Kowalewski et al., 2015).

Die „high-low“ Methode wird deshalb verwendet, weil sie bei Untersuchungen mit limitierten Probenmengen mehrere Vorteile aufweist (Choudhary et al., 2010).

So ist zum einen die Sensitivität höher. Die Ionenfalle (*linear trap quadrupole*) detektiert die Ionen semidirekt mittels Sekundärelektronenvervielfacher. Dies benötigt im Gegensatz zur indirekten Detektion eines Bildstroms (*image current*) in der Orbitrap ein Vielfaches weniger an Ionen für die Aufnahme eines aussagekräftigen Spektrums über dem Rauschen (Hecht et al., 2020). Konkret konnte bei der ITMS (MS2) eine Zielionenzahl (*AGC target = automatic gain control target*) von  $5 * 10^3$  verwendet werden, wohingegen die FTMS (MS1) eine Zielionenzahl von  $1 * 10^5$  benötigt hat.

Ein zweiter Vorteil bei der „high-low“ Methode ist die Scangeschwindigkeit. So können die FTMS1 und die ITMS2 parallel ablaufen. Für die hochauflösende Messung in der Orbitrap kreisen die Ionenpakete mehr als 100ms. Die Top 5 Vorläuferionen aus dem Scan werden jedoch bereits früher identifiziert (zwar mit geringerer Auflösung, aber ausreichend für das 2m/z Isolationsfenster) und dann in der Ionenfalle selektiert, fragmentiert und detektiert (Makarov et al., 2006).

Zusammenfassend gesprochen kann durch die „high-low“ Methode eine globale Analyse des HLA-Ligandomes der CRC und der NMC Proben erfolgen. Die Alternative wäre eine „high-high“ Messung, d.h. das beide Analysen in der Orbitrap stattfinden würden, was jedoch bei den geringen Ionenströmen (bei limitierter Probenmenge in der HLA Proteomik) nahezu eine Top1 Methode wäre. Das heißt, es würde auch deutlich seltener ein MS/MS Event ausgelöst werden. Dies würde zwar eine höhere Massegenauigkeit bedingen, jedoch auch nur einen Bruchteil des Ligandomes überhaupt wiedergeben. Die Abdeckung bzw Erfassung des gesamten Proteoms (in diesem Fall Ligandomes) nimmt nämlich mit der Anzahl an durchgeführten MS/MS Scans zu (Andrews et al., 2011; Kalli et al., 2012; Kalli et al., 2013). Da das Ziel dieser Arbeit eine umfassende Analyse des gesamten HLA-Ligandomes der CRC- und NMC-Proben ist, wird daher die „high-low“-Methode verwendet (Kowalewski, 2011; Wong et al., 2009).



Um eine semiquantitative Messung der Peptide durchführen zu können, werden die Konzentrationen der Peptide der beiden Proben eines Patienten (Tumorgewebe/Normalgewebe) nach der Vormessung angepasst und in fünf technischen Replikaten gemessen. Dies gewährleistet, dass die Ergebnisse der Peptidausbeute vergleichbar sind und ermöglicht, neben der rein qualitativen Analyse der Peptide, auch deren semiquantitative Analyse. Die Signalintensität eines Peptids kann unter anderem durch Betrachtung der Werte „Area“ („*area under the curve*“) und der Ausschlagshöhe („*peak height*“) ermittelt werden. Daraus kann die Menge des Peptids abgeleitet werden, jedoch nicht absolut, sondern nur im Vergleich mit den anderen gefundenen Peptiden derselben Probe und durch die Angleichung der Konzentrationen auch mit den Peptiden der Probe des Normalgewebes.

Für die weitere Analyse (vgl. Kapitel 3.2.2.5) wird der „Area“-Wert als Maß der Signalintensität verwendet, da er besser mit der Molekülanzahl, die am Detektor gemessen wird, korreliert (Coombes et al., 2015; Neilson et al., 2011) und zudem stabiler ist bezüglich Dispersionseffekten (Anand et al., 2017; O'Haver, 2020).

### **3.2.2.3 Prozessierung der MS-Daten**

Die Prozessierung der Rohdaten der Massenspektrometrie erfolgt mittels eines MASCOT-Servers. Hierbei wird ein wahrscheinlichkeitsbasierter Algorithmus zur Bewertung der Daten herangezogen (Perkins et al., 1999). Dieser gleicht die Fragmentspektren gegen die „Swiss-Prot“-Datenbank ab. Potentiell mutierte Proteine werden durch den Abgleich mit der COSMIC Datenbank (<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/>) gesucht. Hierbei wurden alle bei COSMIC verfügbaren menschliche Tumore berücksichtigt (Zeitpunkt der Auswertung 10/14). Diese enthält das menschliche Proteom mit vereinzelt Aminosäurevarianten (*single amino acid variants (SAV)*). In unserer Annotation werden nur diejenigen Varianten berücksichtigt, die in zwei verschiedenen Proben nachgewiesen werden. Als MHC-Klasse-I-Liganden werden Peptide mit einer Länge von 8 – 12 Aminosäuren betrachtet. Die Liganden der MHC-Klasse-II werden mit einer Länge von 12 – 25 Aminosäuren angenommen. Oxidiertes Methionin wird hierbei als dynamische Modifikation akzeptiert. Da je Fragmentspektrum mehrere Annotationen in

Frage kommen, wird ein Maß benötigt, das die Qualität der Annotation beschreibt. Der IonScore beschreibt die Irrtumswahrscheinlichkeit negativ logarithmisch (Perkins et al., 1999). Um eine ausreichende Wahrscheinlichkeit der korrekten Annotation zu erhalten, wurden nur Annotationen mit einem IonScore von 20 oder höher berücksichtigt, was bedeutet, dass eine Fehlannotation in unter 1 % der Fälle vorliegt.

#### **3.2.2.4 HLA-Annotation**

Um die genauen HLA-Liganden der MHC-Klasse-I zu erhalten werden in einem weiteren Schritt die Peptide auf ihre Bindungsstärke analysiert. Hierzu werden die gefundenen Peptide der jeweiligen Proben mit den dazu gehörigen HLA-Typisierungen über die SYFPEITHI- und die NetMHC-Datenbank abgeglichen (Lundegaard et al., 2008a; Lundegaard et al., 2008b; Nielsen et al., 2003). Als Ligand werden Peptide betrachtet, die bei SYFPEITHI mehr als 50% des maximalen Scores des *SYFPEITHI epitope prediction algorithm* (Rammensee et al., 1999) erreicht haben oder bei NetMHC einen Score von unter 500nM haben. Dieses Vorgehen dient als Kontrolle der Reinheit der Probe. So werden nur Proben in die Analyse eingeschlossen, deren Anteil der Liganden an der Gesamtmenge der gefundenen Peptide der Probe größer als 65% ist. Problematisch ist an diesem Vorgehen, dass nicht alle MHC-Liganden in diesen Datenbanken erfasst sind und so auch einige Peptide als nicht-bindende Peptide deklariert werden, die eigentlich einen MHC-Liganden darstellen. Des Weiteren bedarf dieses Vorgehen der hochauflösenden HLA-Typisierung. Die Patienten, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht worden sind, wurden allesamt hochauflösend HLA-typisiert, die Proben aus der Datenbank wurden nur auf zwei Stellen genau typisiert.

Da die MHC-Klasse-II-Moleküle der Proben nicht typisiert wurden, konnte diese Binderanalyse nur für die MHC-Klasse-I erfolgen.

#### **3.2.2.5 Identifizierung tumorassoziierter Antigene**

Um tumorassoziierte und tumorexklusive Antigene zu entdecken, werden die Quellproteine, die auf den Tumorzellen gefunden werden, denjenigen gegenübergestellt, die auf Normalgewebe gefunden werden. Dies geschieht zu Beginn unabhängig vom HLA-Typ des Gewebes und von der Peptidsequenz, die als

Ligand auf den HLA-Molekülen aus dem entsprechenden Protein gefunden werden. Durch dieses Vorgehen können sowohl tumorexklusive als auch tumorassoziierte Proteine entdeckt werden. Proteine, die solitär auf Tumorgewebe gefunden werden, werden in dieser Arbeit nur als tumorexklusiv klassifiziert, wenn sie auf mindestens fünf der Proben gefunden werden (für MHC-Klasse-II-Liganden wird als *cut-off* vier positive CRC-Proben gewählt). Die so gefundenen Proteine werden als tumorexklusive Quellproteine bezeichnet. Im Anschluss werden die so identifizierten Proteine auf ihre zu Grunde liegenden Peptidsequenzen hin aufgeschlüsselt und diese wiederum mittels NetMHC auf ihre voraussichtliche HLA-Restriktion untersucht. Diese prädiktive HLA-Restriktion wird mit dem tatsächlichen HLA-Typ der Proben verglichen, auf denen die entsprechende Sequenz detektiert wurde, um die Plausibilität der Ergebnisse zu überprüfen. Durch dieses Vorgehen kann überprüft werden mit welchen Sequenzen die entsprechenden Proteine präsentiert werden und auf welchen HLA-Typen (Haen et al., 2013; Singh-Jasuja et al., 2004). Im weiteren Vorgehen werden die gefundenen Peptidsequenzen – wiederum Normal- gegenüber Tumorgewebe – nach dem gleichen Schema aufgetragen. Die nur auf Tumor gefundenen Peptidsequenzen, die mindestens fünffach (MHC-Klasse-II vierfach) detektiert worden sind, werden als tumorexklusive Peptide klassifiziert. Sie werden ihrem entsprechenden Quellprotein zugeordnet.

Im Anschluss wird den jeweils 15 am häufigsten detektierten tumorexklusiven Quellproteinen und ihren zugeordneten Peptidsequenzen sowie zu den 15 am häufigsten detektierten Peptidsequenzen und ihren zugeordneten Quellproteinen eine Literaturrecherche durchgeführt. Diese Literaturrecherche wird mit [www.pubmed.com](http://www.pubmed.com) durchgeführt. Hierbei werden die entsprechenden Quellproteine im ersten Schritt mit dem Zusatz „colorectal cancer“ und „colon cancer“ versehen. Werden bereits hier Ergebnisse ermittelt, werden die entsprechenden Artikel nach Durchsicht auf Relevanz angegeben und die Recherche daraufhin beendet. Liefert dieser erste Suchlauf keine relevante Literatur, wird die Suche mit dem alleinigen Zusatz „cancer“ fortgesetzt. Auch hier wird wiederum eine Relevanzprüfung durchgeführt und bei negativem Ergebnis die Suche allein auf das Quellprotein ausgedehnt. Hier werden Literaturquellen als relevant erachtet, die

einen Zusammenhang des Proteins mit dem Zellzyklus, der Embryogenese oder anderen intrazellulären Regelmechanismen herstellen können.

In einem weiteren differenzierten Ansatz werden die Peptidsequenzen, die auf einer CRC-Probe gefunden werden, nur gegen das korrespondierende Normalgewebe abgeglichen. Hierdurch kann für jeden Fall einzeln die gefundene Über- bzw. Unterrepräsentation dargestellt werden. Dieses wird dann in einem Volcano-Plot dargestellt (Cui et al., 2003; Li, 2012). Für diese semiquantitative Analyse werden die CRC- sowie die Normalgewebeproben vor der Massenspektrometrie in fünf technische Replikate aliquotiert. Die Peptidkonzentration in diesen wird für jede CRC-Probe und ihre korrespondierende NMC-Probe anhand einer Vormessung zur Dosisfindung angeglichen. Hierfür werden die „Area“ Werte aller in dieser Vormessung identifizierten Peptide addiert.

Anschließend werden die Peptide der Massenspektrometrie zugeführt und die ermittelten Peptide werden zusätzlich nach dem Maßstab „Area“ quantifiziert und in den *Volcano-Plots* gegen ihr korrespondierendes Normalgewebe dargelegt. Hierbei wird als Signifikanztest der Zweistichproben-T-Test verwendet, nachdem die Grundgesamtheit der Stichproben sowohl durch den Kolmogorow-Smirnow-Test (Stephens, 1974) als auch durch den Shapiro-Wilk-Test (Wilk, 1965) auf eine Normalverteilung hin untersucht worden ist. Als signifikant über- respektive unterrepräsentierte Peptide werden die Peptide bezeichnet, deren p-Wert kleiner als der entsprechend Benjamini Hochberg korrigierte Wert ist, der vom Signifikanzniveau  $\alpha=0,05$  ausgehend errechnet wurde, und deren *fold* größer als 4 ist (Benjamini, 2010; Benjamini et al., 1995; Kowalewski et al., 2016).

Nur Peptide, die in mindestens zwei der Replikate nachgewiesen werden können, werden in die Analyse eingeschlossen. Der „Area“ Wert der fünf identifizierten Peptide, die mit der geringsten Intensität gemessen werden, wird für jedes Replikat als Grenze der Nachweisbarkeit (*limit of detection*) betrachtet. Dieser Wert wird auch für fehlende „Area“-Werte angenommen, um die statistische Auswertung für den Volcano-Plot durchführen zu können, auch wenn nur auf CRC respektive NMC-Gewebe das entsprechende Peptid nachgewiesen werden kann (Lazar et al., 2016). Um die Anzahl an fehlenden Werten zu minimieren, werden

zusätzlich noch sogenannte *seed lists* (Liu et al., 2004; Stead et al., 2008) verwendet. Diese werden nach dem Schema, das von Nelde et al. im Kapitel „*Label-free quantitation of HLA ligand presentation*“ beschrieben wurde, erstellt (Nelde et al., 2018). Die Peptidsequenzen in diesen Listen werden dann ohne weiteren Filter in der Messung jedes der Replikate berücksichtigt, um den Existenznachweis in diesem Replikat auch bei qualitativ schlechtem Spektrum oder geringer Intensität zu ermöglichen (Kowalewski et al., 2016; Löffler et al., 2018b; Nelde et al., 2018).

Bei den MHC-Klasse-II-Liganden ist ein so umfassendes Vorgehen noch nicht möglich, da weder eine Typisierung vorlag, noch die Datenbanken die Liganden so genau vorhersagen können. Deshalb werden die dort gefundenen Peptidsequenzen und deren Proteine nur qualitativ erfasst und dann analog zum Vorgehen bei der MHC-Klasse-I gegen das Normalgewebe abgeglichen. Zudem wird ebenfalls die Analyse auf überrepräsentierte Peptide mittels *Volcano-Plots* durchgeführt.

Anschließend wurden die detektierten Proteine, sowie die zugeordneten Quellproteine der detektierten Peptidsequenzen der MHC-Klasse-I und der MHC-Klasse-II, die sich im obigen Ansatz als über- oder unterrepräsentiert herausgestellt haben, mittels verschiedenen Datenbanken den entsprechenden intrazellulären metabolischen Prozessen zugeordnet. Hier wurden auch die solitär auf nicht-malignem Gewebe detektierten Proteine eingeschlossen, da sie ebenfalls auf eine Veränderung der zellulären Prozesse hinweisen.

Die verwendeten Datenbanken sind zum einen „Proteomaps“ ([www.proteomaps.net](http://www.proteomaps.net)) um im Rahmen eines Voronoi-Diagramms die entsprechenden Aberrationen bezüglich ihrer Zugehörigkeit zu bestimmten intrazellulären Prozessen darzustellen und um auch die quantitative Komponente dieser Aberration zu visualisieren (Liebermeister et al., 2014; Otto et al., 2010).

Hierfür wurde ein Voronoi-Diagramm mit allen ausschließlich auf Tumorgewebe, sowie allen ausschließlich auf Normalgewebe detektierten Proteinen bzw. zugeordneten Quellproteinen zu den entsprechenden Peptiden, sowie den in der semiquantitativen Analyse über- und unterrepräsentierten Peptiden angefertigt.

Dieses zeigt also die im Tumor vorliegenden Änderungen des HLA-Ligandoms und die funktionale Zugehörigkeit der entsprechenden Quellproteine, sowie die Gewichtung der Veränderung der Präsentation an. Dieses Vorgehen wurde sowohl für die MHC-Klasse-I als auch für die MHC-Klasse-II durchgeführt. Als quantitative Komponente wurde der „Area“-Wert aller gleicher Proteine bzw. Peptidsequenzen von den einzelnen Proben addiert.

Als zweite Datenbank wurde der KEGG-Pathway über die DAVID Database ([david.ncifcrf.gov](http://david.ncifcrf.gov)) zur funktionalen Annotation der Proteine benutzt (Huang et al., 2009a; Huang et al., 2009b). Auch hierfür wurden wieder die tumorexklusiven Quellproteine und Peptidsequenzen und die überrepräsentierten Peptide den entsprechenden intrazellulären metabolischen Prozessen zugeordnet. Dieses Procedere wurde sowohl für die MHC-Klasse-I, als auch für die MHC-Klasse-II durchgeführt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Ergebnisse der identifizierten MHC-Klasse-I-Liganden

Für die Analyse der MHC-Klasse-I restringierten Peptide konnten die Daten aus 30 Tumorproben und 35 nicht-malignen Kolongewebeproben (*non-malignant colon*, NMC) in die Auswertung eingeschlossen werden. Wie in Tabelle 9 ersichtlich, handelt es sich hierbei um 29 korrespondierende Probenpaare aus einem Patienten, um eine „*Tumor-only*“ Probe, sowie um sechs „*NMC-only*“ Proben. Insgesamt konnten 21 270 verschiedene Peptidsequenzen, die auf MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert werden, identifiziert werden. Von diesen Peptidsequenzen wurden 8617 nur auf Tumorgewebe, 4162 nur auf nicht-malignem Kolongewebe und 8491 auf beiden Gewebearten gefunden (Abbildung 9, links). Diese Peptidsequenzen stammen wiederum aus 8678 verschiedenen Quellproteinen (*NMC-only*: 994, *Tumor-only*: 2366) (Abbildung 9, rechts).

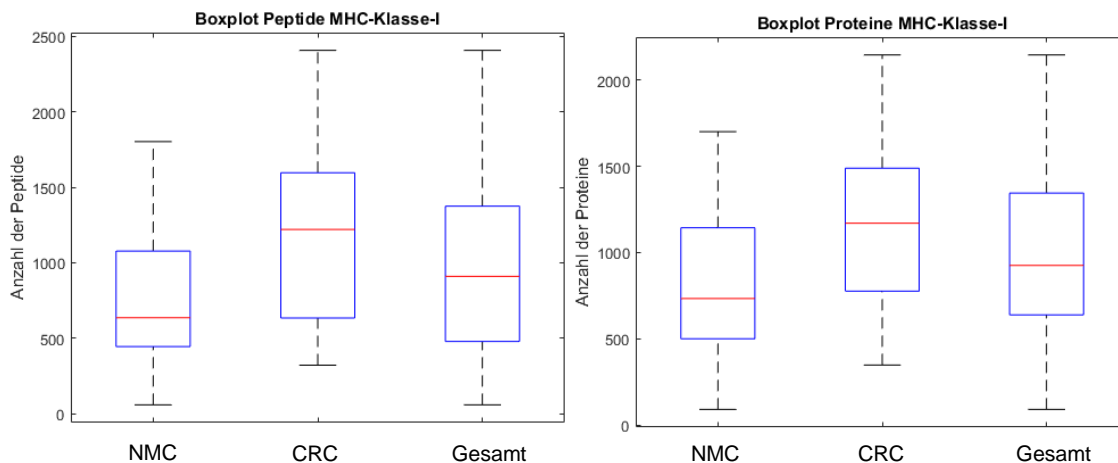
Abbildung 8 stellt die genau detektierten Peptid- und Proteinmengen pro Einzelprobe als klassischen Box-Whiskers-Plot dar (Beyer, 1981). Die Whisker spannen sich dabei vom Maximalwert bis zum Minimalwert. Die Box beginnt (untere Grenze) am Übergang vom ersten zum zweiten Quartil und endet (obere Grenze) am Übergang vom dritten zum vierten Quartil. Die rote Linie kennzeichnet den Median der Werte.

Die mediane Peptidsequenzausbeute pro Probe (sowohl malignes als auch nicht-malignes Gewebe) liegt bei 910 Peptiden (minimal 59, maximal 2407) aus im Median 926 Quellproteinen stammend (minimal 91, maximal 2146).

Getrennt betrachtet ergibt sich eine mediane Ausbeute beim Tumorgewebe von median 1220 verschiedenen Peptidsequenzen (minimal 322, maximal 2407) bzw. median 1170 verschiedenen Proteinen (minimal 348, maximal 2146).

Aus dem nicht-malignen Gewebe konnten median 636 unterschiedliche Peptidsequenzen (minimal 59, maximal 1802) bzw. im Median 734 Proteine (minimal 91, maximal 1701) detektiert werden (Abbildung 8).

## Ergebnisse



**Abbildung 8: Box-Whiskers-Plot Peptidsequenz- und Proteinausbeute MHC-Klasse-I.**

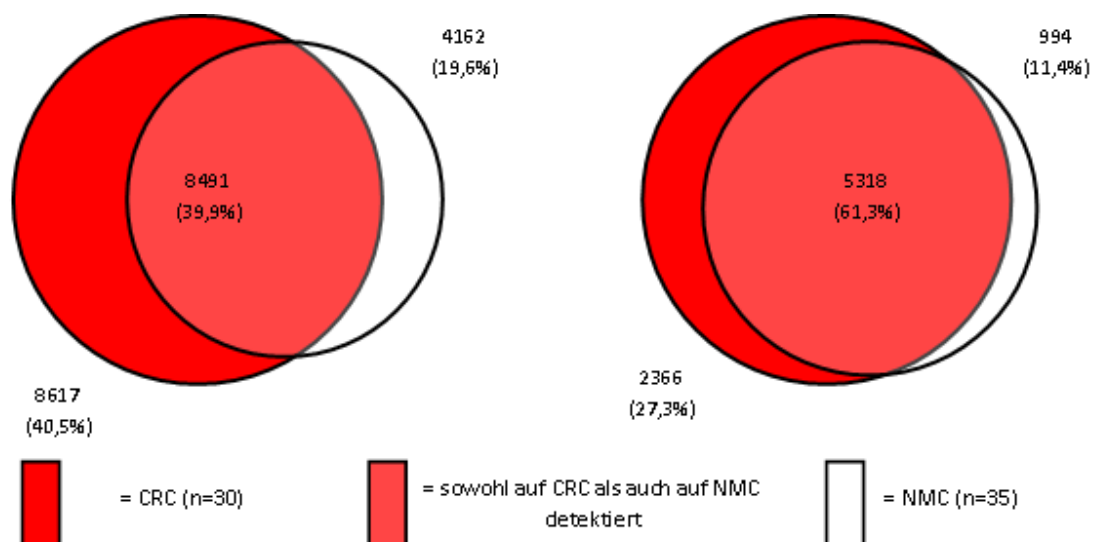
Rote Linie: medianer Wert; blaue Box: untere Grenze am Übergang vom ersten zum zweiten Quartil und obere Grenze am Übergang vom dritten zum vierten Quartil; oberer Whisker: maximaler Wert; unterer Whisker: minimaler Wert.

Links: Peptidsequenzausbeute pro Probe: Die mediane Peptidsequenzausbeute pro Probe (sowohl malignes als auch nicht-malignes Gewebe, n=65) beträgt 910 Peptide (minimal 59, maximal 2407). Die mediane Ausbeute beim Tumorgewebe (n=30) beträgt 1220 verschiedene Peptidsequenzen (minimal 322, maximal 2407) und 636 unterschiedliche Peptidsequenzen (minimal 59, maximal 1802) beim nicht-malignen Gewebe (n=35).

Rechts: Proteinausbeute pro Probe. Die Proteinausbeute pro Probe (sowohl malignes als auch nicht-malignes Gewebe) beträgt im Median 926 Quellproteine (minimal 91, maximal 2146). Die mediane Ausbeute beim Tumorgewebe beträgt 1170 verschiedene Proteine (minimal 348, maximal 2146) und 734 verschiedene Proteine (minimal 91, maximal 1701) beim nicht-malignen Gewebe.

Peptidsequenzen MHC-Klasse I

Quellproteine MHC-Klasse I



**Abbildung 9: Venn-Diagramme der Peptid- und Proteinausbeute der MHC-Klasse-I.**

Die Venn-Diagramme zeigen den Überlappungsgrad der detektierten Peptidsequenzen bzw. Proteine an. Die Menge der exklusiv auf CRC- oder NMC-Proben gefundenen Peptidsequenzen bzw. Quellproteine wird in „Rot“ bzw. in „Weiß“ dargestellt. Die Menge der Peptidsequenzen bzw. Quellproteine, die auf beiden



## Ergebnisse

Gewebearten gefunden wurden, wird in „Hellrot“ dargestellt. Die absolute Anzahl sowie der prozentuale Anteil an der gesamten Peptid-/Proteinanzahl wird ebenfalls angegeben.

Links: Verteilung der gefundenen Peptidsequenzen. Gesamtanzahl an detektierten Peptidsequenzen: 21270.

Rechts: Verteilung der gefundenen Quellproteine. Gesamtanzahl an detektierten Quellproteine: 8678.

Eine Einzelaufstellung der Anzahl der identifizierten Liganden und Quellproteine in den jeweiligen Proben befindet sich in Tabelle 9.

**Tabelle 9: Anzahl identifizierter MHC-Klasse-I-Liganden und korrespondierender Quellproteine aus den analysierten Proben.** n.d.=not determined, \*NMC-only--Probe, \*\* Tumor-only-Probe

Die Liganden der Proben oberhalb des Doppelstriches wurden aus der hauseigenen Datenbank entnommen und zur Auswertung herangezogen. Die Liganden der Proben unterhalb des Doppelstriches wurden im Rahmen dieser Arbeit experimentell ermittelt.

Probenbezeichnung	Tumor-masse [g]	NMC-Masse [g]	Identifizierte MHC-Klasse-I-Liganden		Identifizierte Quellproteine		HLA-A	HLA-B	HLA-C
			NMC	Tumor	NMC	Tumor			
KC139	0,5	n.d.	441	449	645	674	A*02; A*03	B*15; B*40	n.d.
KC141*	2,3	n.d.	59	*	91	*	A*11; A*24	B*07	n.d.
KC145	1,3	n.d.	209	392	353	528	A*02; A*25	B*40	n.d.
KC151	0,6	n.d.	189	634	364	802	A*01; A*02	B*37; B*57	n.d.
KC160	1,1	n.d.	458	322	486	348	A*01; A*26	B*08; B*13	n.d.
KC176	1,9	n.d.	626	1449	718	1384	A*23; A*31	B*15; B*44	n.d.
KC177	1,1	n.d.	300	910	375	1014	A*02; A*03	B*13; B*44	n.d.
KC178*	1,1	n.d.	282	*	350	*	A*02; A*23	B*14; B*44	n.d.
KC179*	1,1	n.d.	170	*	330	*	A*02; A*03	B*35; B*44	n.d.
KC183	0,8	n.d.	759	949	806	933	A*02; A*68	B*40; B*51	n.d.
KC185*	1,0	n.d.	286	*	330	*	A*26; A*29	B*44; B*49	n.d.
KC186	1,5	n.d.	636	2303	622	1493	A*03:01; A*11:01	B*07:02; B*51:01	C*07:02; C*15:02
KC24	1,7	3.0	473	632	547	681	A*02:01; A*03:01	B*07:02; B*14:01	C*07:02; C*08:02
KC28	1,4	1.3	825	736	851	827	A*01:01; A*26:01	B*41:01; B*49:01	C*07:01; C*17:01
KC29	3,6	1.1	635	481	709	532	A*02:01	B*44:02; B*51:01	C*05:01; C*15:02
KC38	5,8	5.0	1351	411	1286	488	A*24:02; A*32:01	B*07:02; B*44:02	C*05:01; C*07:02
KC53	3,1	1.0	966	947	1064	899	A*01:01; A*02:01	B*15:01; B*44:02	C*03:04; C*05:01
KC54*	0,9	0.8	416	*	399	*	A*02:01; A*03:01	B*07:02; B*27:02	C*02:02; C*07:02

Probenbezeichnung	Tumor-masse [g]	NMC-Masse [g]	Identifizierte MHC-Klasse-I-Liganden		Identifizierte Quellproteine		HLA-A	HLA-B	HLA-C
				*		*			
KC58*	1,8	1.8	1693	*	1594	*	A*02:01; A*23:01	B*07:02	C*04:01; C*07:02
KC60	0,7	1.0	460	527	734	777	A*02:01; A*32:01	B*44:02; B*51:01	C*05:01; C*15:02
KC64	0,5	0.4	605	1025	711	1049	A*03:01; A*68:01	B*51:01; B*57:02	C*15:02; C*18:01
KC67	1,0	2.1	1554	1654	1441	1569	A*03:01; A*32:01	B*07:02; B*13:02	C*07:02; C*16:04
KC70	1,0	1.7	850	804	926	742	A*02:01; A*31:02	B*13:02; B*51:05	C*04:01; C*06:02
KC71**	2,8	1.1	**	1696	**	1595	A*24:02; A*29:02	B*07:02; B*27:05	C*02:02; C*07:02
KC77	0,4	1.0	703	1241	737	1198	A*02:01	B*07:02; B*50:01	C*06:02; C*07:02
KC80	1,0	0.4	1236	1761	1253	1685	A*01:01; A*03:01	B*15:01; B*39:06	C*01:02; C*07:02
KC82	1,2	0.3	606	1217	733	1173	n.d.	n.d.	n.d.
KC84	0,6	1.6	1568	1596	1415	1489	A*02:01; A*03:01	B*07:02; B*56:01	C*01:02; C*07:02
KC86	5,4	2.4	1602	1254	1468	1207	A*03:01; A*31:01	B*07:02; B*15:01	C*01:02; C*07:02
KC89	1,7	1.0	961	1862	1150	1808	A*01:01; A*32:01	B*40:02; B*51:01	C*02:02; C*14:02
KC90	2,9	1.2	926	1340	931	1324	A*01:01	B*27:05; B*35:01	C*04:01; C*06:02
KC92	1,0	0.5	1802	2407	1701	2146	A*01:01; A*24:02	B*08:01; B*35:01	C*04:01; C*07:01
KC93	1,2	0.9	1096	1448	1127	1398	A*02:01; A*03:01	B*07:02; B*39:01	C*07:02; C*12:03
KC94	1,0	0.4	1595	2122	1519	1852	A*26:01; A*30:02	B*08:01; B*44:02	C*05:01; C*07:01
KC97	2,1	0.6	1024	1224	1007	1168	A*03:01; A*68:26	B*08:01; B*44:02	C*05:01; C*07:01
KC104	1,8	0.5	501	1338	545	1332	A*01:01	B*44:03; B*55:01	C*03:03; C*04:01

Wie in Kapitel 3.2.2.4 dargelegt wird, wurde der Anteil der „Binder“ an den MHC-Klasse-I-Moleküle anhand der NetMHC- und SYFPEITHI-Datenbank ermittelt und deren prozentualer Anteil an der Gesamtpeptidmenge errechnet (Lundegaard et al., 2008a; Lundegaard et al., 2008b; Nielsen et al., 2003; Rammensee et al., 1999). Die Anzahl der Binder jeder analysierten Probe ist in Tabelle 10 ersichtlich. Da zu der Bestimmung der Binder die HLA-Typisierung notwendig ist, konnte diese bei den Proben aus der Datenbank nicht durchgeführt werden, weil diese zum einen nicht hochauflösend typisiert worden sind und zum anderen eine Typisierung der HLA-C-Moleküle ausblieb. Bei den Proben, bei denen eine Analyse des Binderanteils möglich ist, konnte ein Anteil von minimal

65,8% (KC58 nicht-malignes Gewebe) und von maximal 94,4% (KC38 Tumorge- webe) ermittelt werden, bei einem arithmetischen Mittelwert von 82,5% und einer Standardabweichung von 6,33%. Dies zeugt insgesamt von einer sehr hohen Reinheit der analysierten Proben, da sehr wenige Peptide detektiert worden sind, die wahrscheinlich nicht an MHC-Moleküle binden können, wobei einschränkend zu sagen ist, dass diese Datenbanken auch nicht jedes Peptid sicher zu einem MHC-Molekül zuordnen können und daher der Anteil der Binder möglicherweise noch etwas höher liegt, als die Werte hier suggerieren.

## Ergebnisse

**Tabelle 10: Anzahl der Binder und deren prozentualer Anteil.** n.d.=not determined, \*NMC-only-Probe, \*\*Tumor-only-Probe Die Liganden der Proben oberhalb des Doppelstriches wurden aus der hauseigenen Datenbank entnommen und zur Auswertung herangezogen. Die Liganden der Proben unterhalb des Doppelstriches wurden im Rahmen dieser Arbeit experimentell ermittelt.

Probenbezeichnung	Identifizierte MHC-Klasse-I-Liganden		Anzahl der „Binder“		Prozentualer Anteil der „Binder“ an allen identifizierten MHC-Klasse-I-Liganden	
	NMC	Tumor	NMC	Tumor	NMC	Tumor
KC139	441	449	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
KC141*	59	*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
KC145	209	392	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
KC151	189	634	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
KC160	458	322	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
KC176	626	1449	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
KC177	300	910	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
KC178*	282	*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
KC179*	170	*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
KC183	759	949	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
KC185*	286	*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
KC186	636	2303	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<hr/>						
KC24	473	632	339	484	71,7	76,6
KC28	825	736	668	578	81,0	78,5
KC29	635	481	493	406	77,6	84,4
KC38	1351	411	1182	388	87,5	94,4
KC53	966	947	882	782	91,3	82,6
KC54*	416	*	290	*	69,7	*
KC58*	1693	*	1114	*	65,8	*
KC60	460	527	407	466	88,5	88,4
KC64	605	1025	500	789	82,6	77,0
KC67	1554	1654	1204	1380	77,5	83,4
KC70	850	804	715	664	84,1	82,6
KC71**	**	1696	**	1513	**	89,2
KC77	703	1241	600	1052	85,3	84,8
KC80	1236	1761	971	1413	78,6	80,2
KC82	606	1217	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
KC84	1568	1596	1304	1470	83,2	92,1
KC86	1602	1254	1385	1102	86,5	87,9
KC89	961	1862	773	1346	80,4	72,3
KC90	926	1340	789	1145	85,2	85,4
KC92	1802	2407	1462	1995	81,1	82,9
KC93	1096	1448	1002	1306	91,4	90,2
KC94	1595	2122	1401	1855	87,8	87,4
KC97	1024	1224	857	986	83,7	80,6
KC104	501	1338	374	964	74,7	72,0

## 4.2 Auswertung der Ergebnisse der MHC-Klasse-I-Liganden

### 4.2.1 Vergleichende Gegenüberstellung der detektierten Quellproteine anhand des prozentualen Anteils an Antigen-positiven Ligandomen

Zuerst wurden alle identifizierten Quellproteine danach sortiert, wie häufig sie auf malignem und wie häufig sie auf nicht-malignem Gewebe detektiert wurden. Hierbei wurde zum einen die absolute Zahl als Wert festgestellt und zum anderen eine Rangliste erstellt. Diese ordnete die Proteine entlang des prozentualen Anteils von Tumorgeweben an den Geweben, auf denen dieses Protein überhaupt gefunden wurde. Die nachfolgende Anordnung erfolgte anhand der prozentualen Häufigkeit des gefundenen Proteins auf allen malignen Geweben und nachrangig anhand der prozentualen Häufigkeit des detektierten Proteins auf nicht-malignem Gewebe. Hierbei wurde das maligne Gewebe positiv definiert und das nicht-maligne negativ. Anschließend wurden die Proteine entlang der x-Achse aufgereiht dargestellt, wobei die Gewebe, die häufig auf malignem Gewebe und nicht auf Normalgewebe detektiert wurden, links stehen, die, die nur auf Normalgewebe detektiert wurden ganz rechts (siehe Abbildung 10). Vor allem der ganz links stehende Bereich ist sehr interessant, da diese Proteine nur auf Tumorgewebe detektiert worden sind und nicht auf Normalgewebe (Bereich A in Abbildung 10). Tabelle 11 listet die Proteine auf, die das in Kapitel 3.2.2.5 definierte Kriterium erfüllen und auf wenigstens fünf verschiedenen kolorektalen Karzinomen detektiert worden sind. Die 15 am häufigsten detektierten davon wurden in die Literaturrecherche eingeschlossen (siehe 4.2.2).

Ein analoges Vorgehen wurde auf die detektierten Peptidsequenzen angewandt. Das Ergebnis ist in Abbildung 11 ersichtlich. Die Peptidsequenzen, die auf mindestens fünf Tumorproben gefunden wurden und nicht auf nicht-malignem Gewebe, sind in Tabelle 12 dargestellt.

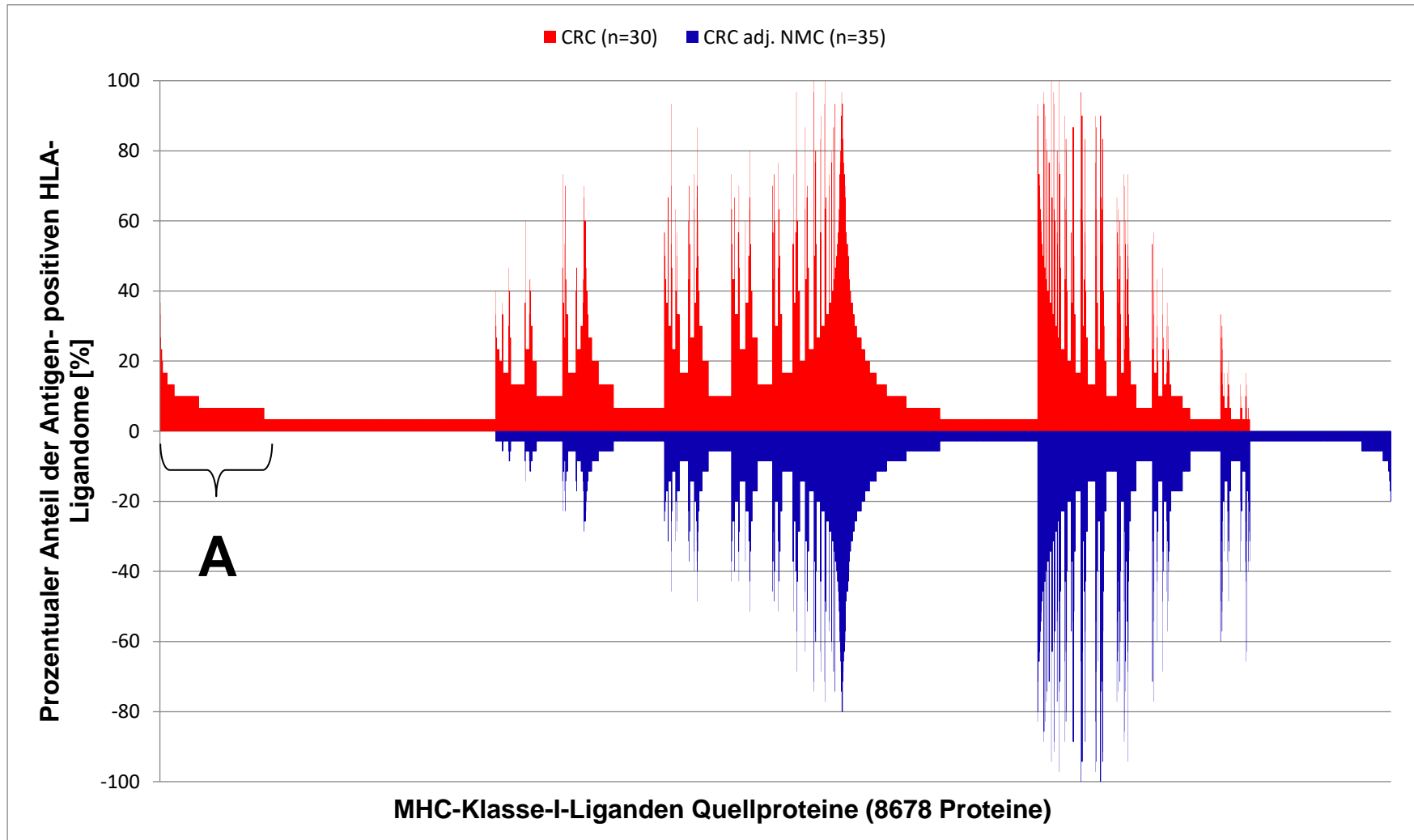


Abbildung 10: MHC-I: Der prozentuale Anteil Antigen-positiver HLA-Ligandome nach den Quellproteinen geordnet.

Weitere Beschriftung zu Abbildung 10 und Abbildung 11, S. 73 und S. 75:

Abbildung 10: Vergleichende Gegenüberstellung der HLA-Quellproteine der CRC- und der NMC-Proben. Auf der y-Achse ist dabei der prozentuale Anteil der für ein Protein positiven Proben an der Gesamtprobenanzahl aufgetragen ( $n(\text{CRC})=30$ ;  $n(\text{NMC})=35$ ), wobei CRC positiv und NMC negativ terminiert ist. Die Sortierung entlang der x-Achse erfolgt nach einer bestimmten Rangfolge: im ersten Schritt wird der Anteil aller positiven Tumorproben an der Gesamtheit aller für dieses Protein positiven Proben betrachtet. Es ergibt sich also ein Wert von 1 (ausschließlich auf CRC-Proben nachgewiesen) bis 0 (ausschließlich auf NMC-Proben nachgewiesen). Im zweiten Schritt (nachrangig) wird dann nach den Häufigkeiten der positiven CRC-Proben sortiert und reziprok dazu nach den Häufigkeiten auf NMC-Proben. Hierbei wird das CRC nach links, das NMC nach rechts sortiert. Daher ist der Bereich A sehr interessant, da er tumorexklusive Peptide, die auf mindestens fünf CRC-Proben detektiert worden sind, enthält.

Abbildung 11: Vergleichende Gegenüberstellung der HLA-Peptide der CRC- und der NMC-Proben. Analog zur Abbildung 10 wird dabei auf der y-Achse der prozentuale Anteil der für ein Peptid positiven Proben an der Gesamtprobenanzahl aufgetragen ( $n(\text{CRC})=30$ ;  $n(\text{NMC})=35$ ), wobei CRC positiv und NMC negativ terminiert ist. Die Sortierung entlang der x-Achse erfolgt nach der oben beschriebenen Rangfolge.

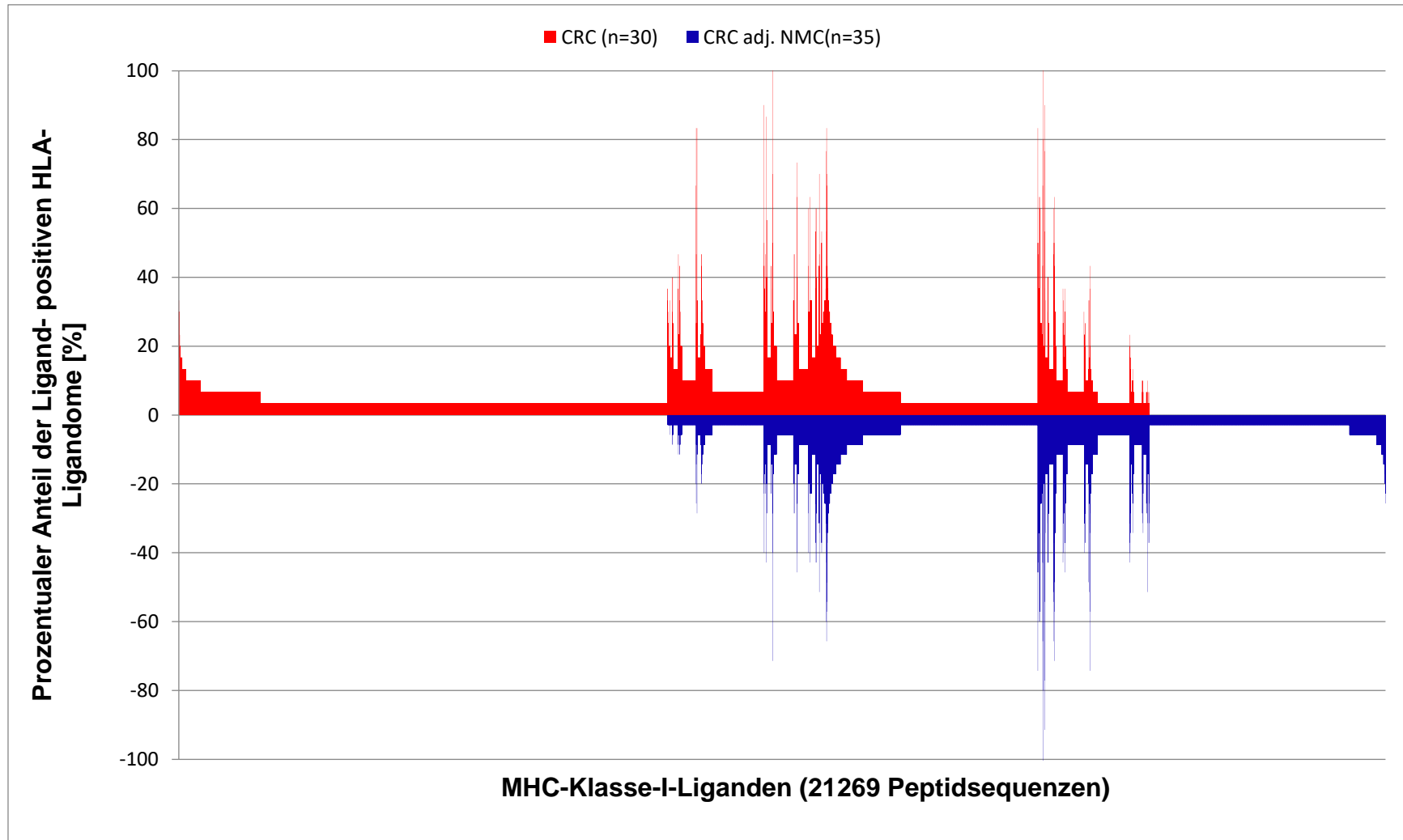


Abbildung 11: MHC-I: Der prozentuale Anteil Ligand-positiver HLA-Ligandome nach den gefundenen Peptidsequenzen geordnet.



Tabelle 11: Quellproteine, die ausschließlich auf mindestens fünf Tumorproben gefunden wurden

Uniprot Accession	Quellprotein	Gen	Positive CRC-Proben	Prozentualer Anteil positiver CRC-Proben
Q8IZW8	Tensin-4	TNS4	12	40,00
Q8IWU6	Extracellular sulfatase Sulf-1	SULF1	11	36,67
Q8IWU5	Extracellular sulfatase Sulf-2	SULF2	10	33,33
O14682	Ectoderm-neural cortex protein 1	ENC1	8	26,67
O15525	Transcription factor MafG	MAFG	8	26,67
Q96T88	E3 ubiquitin-protein ligase UHRF1	UHRF1	8	26,67
Q9Y2G9	Protein strawberry notch homolog 2	SBNO2	8	26,67
P13612	Integrin alpha-4	ITGA4	7	23,33
P16444	Dipeptidase 1	DPEP1	7	23,33
P25440	Bromodomain-containing protein 2	BRD2	7	23,33
P42345	Serine/threonine-protein kinase mTOR	MTOR	7	23,33
Q6P5R6	60S ribosomal protein L22-like 1	RPL22L1	7	23,33
Q92508	Piezo-type mechanosensitive ion channel component 1	PIEZO1	7	23,33
Q9ULW0	Targeting protein for Xklp2	TPX2	6	23,33
O14777	Kinetochose protein NDC80 homolog	NDC80	6	20,00
Q13753	Laminin subunit gamma-2	LAMC2	6	20,00
Q15942	Zyxin	ZYX	6	20,00
Q9NQW6	Actin-binding protein anillin	ANLN	6	20,00
Q9NSV4	Protein diaphanous homolog 3	DIAPH3	6	20,00
Q9UDY8	Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1	MALT1	6	20,00
O00469	Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2	PLOD2	6	16,67
O14879	Interferon-induced protein	IFIT3	5	16,67
O14965	Aurora kinase A	AURKA	5	16,67
O60832	H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 4	DKC1	5	16,67
O95147	Dual specificity protein phosphatase 14	DUSP14	5	16,67
O95425	Supervillin	SVIL	5	16,67
P01106	Myc proto-oncogene protein	MYC	5	16,67
P17213	Bactericidal permeability-increasing protein	BPI	5	16,67

## Ergebnisse

Uniprot Accession	Quellprotein	Gen	Positive CRC-Proben	Prozentualer Anteil positiver CRC-Proben
P28676	Grancalcin	GCA	5	16,67
P31641	Sodium- and chloride-dependent taurine transporter	SLC6A6	5	16,67
P31949	Protein S100-A11	S100A11	5	16,67
P49279	Natural resistance-associated macrophage protein 1	SLC11A1	5	16,67
P53804	E3 ubiquitin-protein ligase TTC3	TTC3	5	16,67
P57678	Gem-associated protein 4	GEMIN4	5	16,67
Q02153	Guanylate cyclase soluble subunit beta-1	GUCY1B1	5	16,67
Q06124	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11	PTPN11	5	16,67
Q5T653	39S ribosomal protein L2, mitochondrial	MRPL2	5	16,67
Q5TA45	Integrator complex subunit 11	INTS11	5	16,67
Q69YQ0	Cytospin-A	SPECC1L	5	16,67
Q6ZUJ8	Phosphoinositide 3-kinase adapter protein 1	PIK3AP1	5	16,67
Q86Y91	Kinesin-like protein KIF18B	KIF18B	5	16,67
Q8N3A8	Poly [ADP-ribose] polymerase 8	PARP8	5	16,67
Q8N442	Translation factor GUF1, mitochondrial	GUF1	5	16,67
Q8NB90	Spermatogenesis-associated protein 5	SPATA5	5	16,67
Q8NFP9	Neurobeachin	NBEA	5	16,67
Q8TEK3	Histone-lysine N-methyltransferase	DOT1L	5	16,67
Q8WWI1	LIM domain only protein 7	LMO7	5	16,67
Q92526	T-complex protein 1 subunit zeta-2	CCT6B	5	16,67
Q9NVM9	Protein asunder homolog	INTS13	5	16,67
Q9NX09	DNA damage-inducible transcript 4 protein	DDIT4	5	16,67
Q9UL15	BAG family molecular chaperone regulator 5	BAG5	5	16,67

## Ergebnisse

**Tabelle 12: Peptidsequenzen, die ausschließlich auf mindestens fünf Tumorproben gefunden wurden.** „m“ in der FASTA-Formel der Peptide bezeichnet ein durch Oxidation modifiziertes Methionin.

Peptidsequenz	Uniprot Accession des Quellproteins	Gen des Quellproteins	Positive CRC-Proben	Prozentualer Anteil positiver CRC-Proben
LMISRTPEV	P01857; P01859; P01860; P01861	IGHG1; IGHG2; IGHG3; IGHG4	10	33,33
AmNPVEHPF	P62917	RPL8	9	30,00
GLALKVQEV	Q8IZW8	TNS4	9	30,00
ILGPPPPSF	P43243	MATR3	9	30,00
IRPNILVL	Q8IWU6; Q8IWU5	SULF1; SULF2	9	30,00
LTGPVMPVR	P26373	RPL13	9	30,00
KSLSLSPGK	P01857; P01859; P01860	IGHG1; IGHG2; IGHG3	8	26,67
RIYGESADAVK	P51114	FXR1	8	26,67
SPTVRVSVV	P12111	COL6A3	8	26,67
ADMGHLKY	P12004	PCNA	7	23,33
DELPEPPATF	Q16643	DBN1	7	23,33
HVDKAEGTTY	O14617	AP3D1	7	23,33
TLFDYEVRL	Q96T88	UHRF1	7	23,33
ALHNHYTQK	P01857; P01859; P01861	IGHG1; IGHG2; IGHG4	6	20,00
AVYDRPGASPK	Q12769	NUP160	6	20,00
EIDKNDHLY	Q9UNF1	MAGED2	6	20,00
ETAmSFVAR	P12111	COL6A3	6	20,00
IGGSILASLSTF	P60709; P62736; P63261; P63267; P68032; P68133; Q562R1	ACTB; ACTA2; ACTG1; ACTG2; ACTC1; ACTA1; ACTBL2	6	20,00
IIMPHNIYL	P49279	SLC11A1	6	20,00
ITDPDPDIRY	P42345	MTOR	6	20,00
LTDPIQGTEY	Q9UDY8	MALT1	6	20,00
QTDKLYELY	O76094	SRP72	6	20,00
RPAQGVVTTL	P02751	FN1	6	20,00
TVQQVISER	P12111	COL6A3	6	20,00
YYKNIGLGF	P62280	RPS11	6	20,00
APFEPLASGIL	P01033	TIMP1	6	16,67
ATDINGDDY	P06756	ITGAV	5	16,67
ATSVITIVK	O15525	MAFG	5	16,67
ATYHGFSSTKK	P12111	COL6A3	5	16,67
AVNKQLADK	Q9Y3D0	CIAO2B	5	16,67
DAIPGLKI	Q8TC07	TBC1D15	5	16,67
DDEDDDDVDTK	P06454	PTMA	5	16,67
ESEPGRGAQY	Q5T653	MRPL2	5	16,67
EYPDRIMN	P07437; P68371; Q13885; Q9BVA1; Q13509; Q9H4B7	TUBB; TUBB4B; TUBB2A; TUBB2B; TUBB3; TUBB1	5	16,67

## Ergebnisse

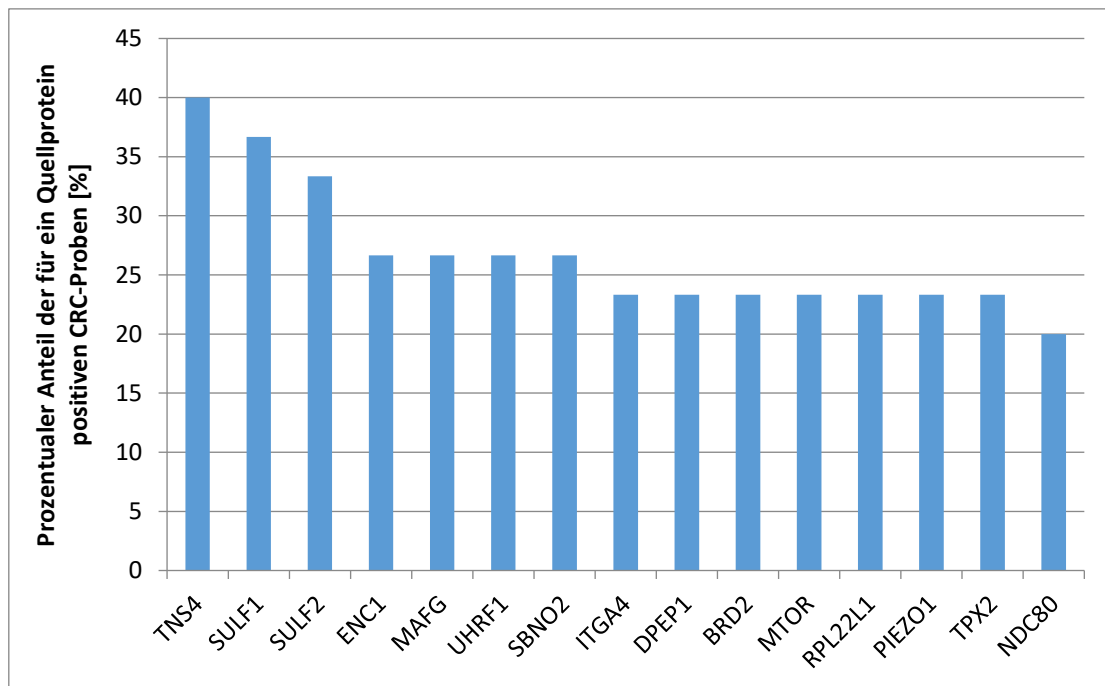
Peptidsequenz	Uniprot Accession des Quellproteins	Gen des Quellproteins	Positive CRC-Proben	Prozentualer Anteil positiver CRC-Proben
FVDKNNLLY	O43795	MYO1B	5	16,67
GFTLGNVVGM	E0CX11	STMP1	5	16,67
KPAPAKPVAA	P12111	COL6A3	5	16,67
LLDEHHISY	Q69YQ0	SPECC1L	5	16,67
LNFTITNLQ	Q8WXI7	MUC16	5	16,67
LPALPQQLI	P12111	COL6A3	5	16,67
LPPMDHSTI	Q99439	CNN2	5	16,67
LQLPSPTAT	P61978	HNRNPK	5	16,67
MLDHQPPQY	Q92925	SMARCD2	5	16,67
NKGPSYGL	Q15417; Q99439	CNN3; CNN2	5	16,67
NRGQFFTVY	Q9Y2G9	SBNO2	5	16,67
QPREPQVYTL	P01857; P01859; P01860; P01861	IGHG1; IGHG2; IGHG3; IGHG4	5	16,67
QTDPVTLQY	Q9BYK8	HELZ2	5	16,67
RLAQNILSY	Q9UL15	BAG5	5	16,67
RLFTDVLLH	O14682	ENC1	5	16,67
SPKATGVFTTL	P02751	FN1	5	16,67
SPLNTGKAL	P12111	COL6A3	5	16,67
SVRKASHTPK	O76021	RSL1D1	5	16,67
TPSSSNSTSKL	Q13492	PICALM	5	16,67
TTLHRVTTI	Q69YN4	VIRMA	5	16,67
TVADKIHSV	O95147	DUSP14	5	16,67

#### 4.2.2 Literaturrecherche zu den gefundenen Quellproteinen

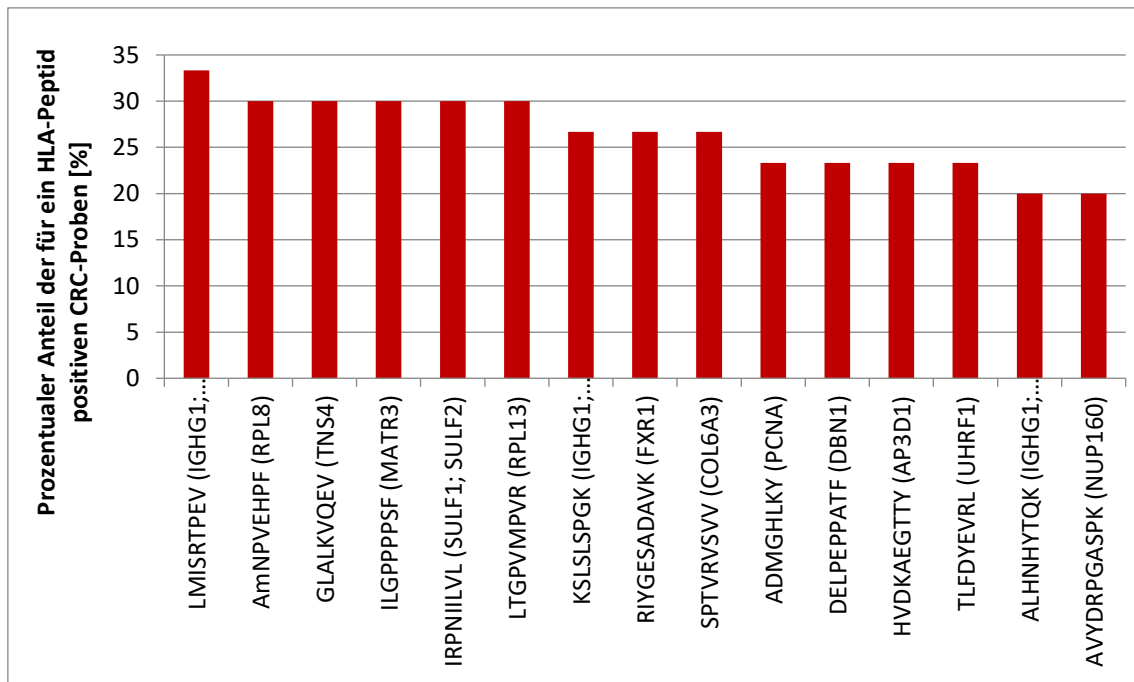
Die 15 am häufigsten nur auf Tumor detektierten Proteine wurden für die Literaturrecherche verwendet. Das am häufigsten detektierte Protein, (Uniprot Accession ID:) Q8IZW8, wurde dabei auf zwölf Tumorproben (40 %) gefunden und wurde durch sieben verschiedene Liganden detektiert. Das 15. Protein O14777 wurde noch auf sechs Tumorproben (20 %) detektiert und wurde mit vier verschiedenen Liganden präsentiert. Der relative Anteil an positiven Tumorproben mit dem speziellen Protein kann Abbildung 12 entnommen werden.

In Tabelle 13 werden zu jedem Quellprotein die entsprechenden detektierten Peptidsequenzen angegeben. Diese wurden mit der NetMHC-Datenbank den entsprechenden HLA-Molekülen zugeordnet und dieses Ergebnis wurde wiederum mit der tatsächlichen Typisierung des Patienten abgeglichen (Rammensee et al., 1999; Rammensee et al., 1995). Hierdurch wurde das Ergebnis direkt auf Plausibilität geprüft und ferner konnte so das entsprechende HLA-Molekül, das für die Bindung des konkreten Liganden verantwortlich ist, aus dem kompletten HLA-Typus der Patienten ausgewählt werden. Die Zuordnung erfolgte dabei nach folgendem Schema: Es wurden alle „*strong binder*“ angegeben, die bei einem Patienten vorkamen oder falls sich mehrere Patienten diese *strong binder* teilten. Konnte bei mehreren Patienten kein gemeinsamer *strong binder* eruiert werden, so wurde zusätzlich zu den *strong bindern* auch noch der gemeinsame *weak binder* angegeben. Teilten sich die verschiedenen Patienten keine gemeinsamen HLA-Typen, so wurden alle *strong binder* bzw. *weak binder* angegeben, sodass eine plausible Präsentation bei jedem Patienten angenommen werden konnte. Als *strong binder* wurden nach dem NetMHC-Standard Peptide klassifiziert, die einen Prozentrang kleiner 0,5 % erreichen und als *weak binder* die Peptide, die einen Prozentrang kleiner 2 % erreichen (Andreatta et al., 2016; Lundegaard et al., 2008a; Nielsen et al., 2003). Danach schloss sich eine Literaturrecherche nach dem in Kapitel 3.2.2.5 dargelegten Algorithmus an. Die in der Literaturrecherche ermittelten Quellen stellen also einen Zusammenhang des detektierten Quellproteins und dem kolorektalen Karzinom her. Ist dieser Zusammenhang bisher nicht beschrieben, so beziehen sich die Quellen auf andere Tumore oder aber den Zellzyklus, der durch das entsprechende Protein

kontrolliert wird. In Tabelle 14 wurde die Literaturrecherche auf die 15 am häufigsten detektierten Peptidsequenzen bzw. deren Quellproteine ausgedehnt. Die relativen Häufigkeiten der 15 am häufigsten detektierten Peptidsequenzen lassen sich Abbildung 13 entnehmen. Die am häufigsten gefundene Sequenz wurde dabei auf zehn (33,3 %) Tumorproben nachgewiesen, die 15. auf sechs (20 %).



**Abbildung 12: Relative Häufigkeiten der ausgewählten Quellproteine der MHC-Klasse-I-Liganden in allen CRC-Proben.** Insgesamt wurden 30 CRC Proben für die MHC-Klasse-I analysiert. Die Proteine sind mit den zugehörigen Genkurznamen angegeben und auf der x-Achse entlang ihrer Häufigkeit nach angeordnet (links am häufigsten).



**Abbildung 13: Relative Häufigkeiten der ausgewählten MHC-Klasse-I-Liganden in allen CRC-Proben.** Insgesamt wurden 30 CRC Proben für die MHC-Klasse-I analysiert. Die detektierte Peptidsequenz ist angegeben, die Genkurznamen der Quellproteine sind in Klammern angegeben. Die Anordnung entlang der x-Achse entspricht der Häufigkeit der Peptide (links am häufigsten).

Die Peptidsequenzen, die sich in Tabelle 13 und zudem in Tabelle 12 oder in Tabelle 14 wiederfinden, wurden hierbei „fett“ markiert. Diese Peptidsequenzen wurden also aus „beiden Richtungen“ identifiziert. Die einzelne Peptidsequenz wurde tumorexklusiv eingestuft und das zugehörige Quellprotein ebenfalls in der Proteinanalyse.

Bei den Peptidsequenzen, die sich aus der Analyse der Quellproteine ergaben, gelang eine Zuordnung zu den MHC-Klasse-I-Molekülen, auf denen die entsprechenden Peptide präsentiert werden könnten, durch NetMHC in fast allen Fällen. Lediglich in drei Fällen konnte für eine einzelne Karzinomprobe kein passender HLA-Typ identifiziert werden. In zwei weiteren Fällen konnte zu der Peptidsequenz kein passender HLA-Typ identifiziert werden, wobei diese Peptide auch jeweils nur auf einer Karzinomprobe detektiert worden sind. Gründe hierfür können zum einen eine nicht hochauflösende HLA-Typisierung der Datenbankproben sein, zum anderen sind nicht alle HLA-Typisierungen bei NetMHC vertreten und damit auswählbar. Ferner kann es sein, dass das Peptid von NetMHC nicht

als Binder erkannt wird, da es entweder nicht bindet, also als Verunreinigung der Probe gewertet werden muss, oder aber nicht als potentieller Binder bekannt ist.

Von den 15 untersuchten Proteinen konnte bei 12 eine bekannte Aberration beim kolorektalen Karzinom durch die Literaturrecherche gefunden werden. Bei zwei weiteren konnte eine bekannte Aberration in anderen Tumoren festgestellt werden. Nur für eines (Q9Y2G9) konnte nach den obigen Kriterien keine relevante Literatur gefunden werden.

Bei den Peptidsequenzen, die direkt als tumorexklusiv repräsentiert eingestuft worden sind, gelang eine Zuordnung zu den MHC-Klasse-I-Molekülen, auf denen die entsprechenden Peptide präsentiert werden könnten, durch NetMHC in zehn von 15 Fällen komplett. In den fünf anderen Fällen konnte zu einzelnen CRC-Proben keine Zuordnung erfolgen. Auffällig ist, dass dies zweimal nicht für KC29 und zweimal nicht für KC77 gelingt. Es liegt nahe, dass für KC29 auf Grund der oben genannten Gründe keine Zuordnung erfolgen konnte, wohingegen sich aus der Typisierung von KC77 der HLA Subtyp B\*50:01, der bei NetMHC noch nicht ausgewählt werden kann (Stand: 03.03.2020, <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC/>), ergibt. Auch in den anderen Fällen, in denen keine Zuordnung gelang, sind in den meisten Fällen (bis auf KC60, KC92, und KC93) HLA-Subtypen vorhanden, die nicht bei Net-MHC ausgewählt werden können (KC24: B\*14:01, KC67: B\*13:02, C\*16:04, KC80: B\*39:06, KC84: B\*56:01) (Stand: 03.03.2020).

Bei den Peptidsequenzen bzw. ihren zugeordneten Quellproteinen konnte bei sechs der 15 durch die Literaturrecherche eine bekannte Verbindung zum kolorektalen Karzinom hergestellt werden. Bei sieben weiteren konnte eine Verbindung zu anderen Tumoren hergestellt werden. Nur bei zwei der Peptidsequenzen (ILGPPPPSF und AmNPVEHPF) konnte keine relevante Literatur nach obigen Kriterien detektiert werden.



## Ergebnisse

**Tabelle 13: MHC-I: Ergebnisse der Literaturrecherche zu den Quellproteinen und den ihnen zugeordneten Peptidsequenzen.** (WB) = *weak binder*, unbekannt = keine passende Zuordnung mittels NetMHC möglich. Die fettgedruckten Peptidsequenzen wurden zusätzlich in der Peptidsequenzanalyse häufig detektiert und finden sich in Tabelle 12 wieder. „m“ in der FASTA-Formel der Peptide bezeichnet ein durch Oxidation modifiziertes Methionin.

Protein Accession	Quellprotein	Peptidsequenzen	HLA	Patienten	Literatur
O14682	Ectoderm-neural cortex protein 1	<b>RLFTDVLLH</b>	A*03:01 (WB), A*01:01 (WB)	KC177, KC64, KC67, KC80, KC84	<b>Kolorektales-Ca:</b> (Fujita et al., 2001)
		SAKLKLFAP	B*08:01	KC94	
		YLPELLQTV	A*02:01	KC29	
		GELKIADF	B*44:03	KC104	
		GELKIADFGW	B*44:03	KC104	
KIADFGWSV	A*02:01, C*15:02, A*32:01	KC29, KC67			
O14777	Kinetochores protein NDC80 homolog	ALNEQIARL	A*02:01 (WB), A*02:02, A*02:03, A*02:11, A*02:12, A*02:16, A*02:19, A*02:50	KC177, KC77, KC93	<b>Kolorektales-Ca:</b> (Sugimasa et al., 2015) <b>Pankreas-Ca:</b> (Meng et al., 2015)
		EINKALNKK	A*11:01 (WB)	KC186	
		GLNEEIARV	A*02:01	KC70	
		SINKPTSER	A*03:01 (WB)	KC67, KC93	
O15525	Transcription factor MafG	ARSPVAPAR	B*27:05 (WB), C*04:01 (WB)	KC71, KC90	<b>Kolorektales Ca und ma-</b> <b>lignes Melanom:</b> (Fang et al., 2016; Fang et al., 2014)
		<b>ATSVITIVK</b>	A*03:01	KC67, KC84, KC93, KC97	
		KLISEEDLLRK	A*03:01 (WB)	KC64, KC67, KC84	
		STRKDYPAAK	A*03:01 (WB),	KC64	

## Ergebnisse

Protein Accession	Quellprotein	Peptidsequenzen	HLA	Patienten	Literatur
			A*68:01 (WB)		
		YPAAKRVKL	B*07:02	KC67, KC84	
P13612	Integrin alpha-4	FPEPNPRVI	B*51:01	KC89	<b>Kolorektales Ca:</b> (Ahmed et al., 2012; Chang et al., 2010; Lv et al., 2016)
		FVNPTSFVY	A*29:02	KC71	
		NVDTESALLY	A*01:01	KC89, KC90, KC92	
		SVINPGAIYR	A*68:01, A*03:01 (WB), A*11:01 (WB)	KC186, KC64	
P16444	Dipeptidase 1	ALADNLLRV	A*03:01	KC177, KC67	<b>Kolorektales Ca:</b> (Eisenach et al., 2013; McIver et al., 2004; Nicastrì et al., 2014; Park et al., 2016; Toiyama et al., 2011)
		KYPDLIAEL	A*24:02 (WB), KC64: unbekannt	KC64, KC92	
		RmYPETFLY	A*24:02	KC71	
		VLIDLAHVSV	A*02:01	KC24, KC29	
		NFDLSIEGM	unbekannt	KC70	
VLQPHQNFL	C*06:02 (WB), C*07:02 (WB), A*02:01 (WB)	KC77			
P25440	Bromodomain-containing protein 2	KLQDVFEFRY	A*30:02	KC94	<b>Diverse Tumoren:</b> (Barbieri et al., 2013) <b>Kolorektales Ca:</b> (Yamada et al., 2009)
		SQGPIKPK	A*03:01 (WB), A*11:01 (WB), A*68:01 (WB)	KC186, KC64	
		TAAPPAQPL	C*03:03, B*15:02 (WB), B*15:03 (WB), B*15:09, B*15:17 (WB) B*35:01 (WB)	KC104, KC139, KC176, KC92	
		SDGQLDFSEF	C*07:01, (WB), KC71, KC104: unbekannt	KC104, KC71, KC94	
		SLIAVFQKY	B*15:01	KC80, KC86	
P42345	Serine/threonine-protein kinase mTOR	DGLLKMLSL	B*08:01 (WB)	KC94	<b>Kolorektales Ca:</b> (Carpten et al., 2007; Francipane et al., 2014; Slattery et al., 2010; Wang et al., 2014)
		EMRKWVDEL	B*44:02 (WB)	KC94	
		<b>ITDPDPDIRY</b>	A*01:01	KC104, KC151, KC80, KC89, KC90, KC92	
Q6P5R6	60S ribosomal protein L22-like 1	ASDKETYELRY	A*01:01	KC104, KC151, KC90, KC92	<b>Ovarial-Ca:</b> (Wu et al., 2015)
		VVSEKQFSK	A*03:01, A*11:01	KC186, KC64, KC84	
		IARLPSSTL	B*07:02, C*12:03	KC67, KC77, KC84, KC93	

## Ergebnisse

Protein Accession	Quellprotein	Peptidsequenzen	HLA	Patienten	Literatur
Q8IWU5	Extracellular sulfatase Sulf-2	<b>IRPNILVL</b>	C*07:01, C*07:02, C*06:02	KC24, KC77, KC80, KC84, KC86, KC90, KC93, KC94, KC97	<u>Diverse Tumoren:</u> (Rosen et al., 2010) <u>Bronchial-Ca:</u> (Lemjabbar-Alaoui et al., 2010)
		METIYNmLV	unbekannt	KC64	
Q8IWU6	Extracellular sulfatase Sulf-1	<b>IRPNILVL</b>	C*07:01, C*07:02, C*06:02	KC24, KC77, KC80, KC84, KC86, KC90, KC93, KC94, KC97	<b>Kolorektales Ca:</b> (Vicente et al., 2015) <u>Pankreas-Ca:</u> (Nawroth et al., 2007) <u>Mamma-Ca:</u> (Okolicsanyi et al., 2014)
		AVGPPTTVR	A*11:01 (WB)	KC186	
		DPYQLTNTV	B*07:02, B*51:01	KC186, KC64	
		MPYDFDIRV	B*51:01	KC64	
Q8IZW8	Tensin-4	APRNPTLTm	B*07:02	KC93	<b>Kolorektales Ca:</b> (Albasri et al., 2011; Albasri et al., 2014; Thorpe et al., 2015)
		FVIRDSSSY	B*15:01, B*15:02	KC176	
		<b>GLALKVQEV</b>	A*02:01	KC177, KC183, KC24, KC29, KC53, KC70, KC77, KC93	
		SPRPPNSPSI	B*07:02	KC93	
		VQKAISTTF	B*15:01	KC139, KC176, KC53, KC80	
		MQKIKSQL	B*08:01	KC92, KC94	
		SAVEPKTAL	B*15:09, B*15:17 (WB), B*15:02 (WB) C*03:03	KC104, KC139, KC176	
Q92508	Piezo-type mechanosensitive ion channel component 1	FAEGQGRAL	B*15:02 (WB), C*03:03, KC145: unbekannt	KC104, KC139, KC145	<u>Mamma-Ca:</u> (Li et al., 2015a) <b>Kolorektale Polyposis:</b> (Spier et al., 2016) <u>Magen-Ca:</u> (Yang et al., 2014)
		PTEISQSLLY	A*01:01	KC80, KC92	
		TEIAVVVKY	B*44:03	KC104	
		KTEVNSGFFY	A*01:01	KC80, KC90, KC92	
Q96T88	E3 ubiquitin-protein ligase UHRF1	<b>TLFDYEVRL</b>	A*02:01	KC177, KC24, KC29, KC60, KC70, KC77, KC84	<b>Tumorgenese (diverse Karzinome):</b> (Bronner et al., 2013) <b>Kolorektales Ca:</b>

## Ergebnisse

Protein Accession	Quellprotein	Peptidsequenzen	HLA	Patienten	Literatur
					(Kofunato et al., 2012; Wang et al., 2012)
Q9ULW0	Targeting protein for Xklp2	KILEDVVGV	A*02:01	KC177, KC77, KC93	<u>Ösophagus-Ca (PE):</u> (Hsu et al., 2014) <u>HCC:</u> (Satow et al., 2010) <u>Pankreas-Ca:</u> (Warner et al., 2009) <u>Blasen-Ca:</u> (Yan et al., 2013) <u>Kolorektales Ca:</u> (Wei et al., 2013)
		KSSDQPLTV	C*15:02	KC186	
		LPLPHFDTI	B*51:01	KC64, KC70, KC89	
Q9Y2G9	Protein strawberry notch homolog 2	EELGHTETY	B*44:03	KC177	Keine relevante Literatur gefunden
		KPNIGRQSQL	B*07:02	KC71	
		<b>NRGQFFTVY</b>	C*06:02 (WB), C*07:02 (WB),	KC67, KC71, KC77, KC80, KC84	

## Ergebnisse

**Tabelle 14: MHC-I: Ergebnisse der Literaturrecherche zu den Peptidsequenzen und deren zugeordneten Quellproteine.** Die fettgedruckten Peptidsequenzen können Quellproteinen aus Tabelle 13 zugeordnet werden. „m“ in der FASTA-Formel der Peptide bezeichnet ein durch Oxidation modifiziertes Methionin.

Peptidsequenzen	Protein Accesion	Quellprotein	HLA	Patienten	Literatur
ADMGHLKY	P12004	Proliferating cell nuclear antigen	A*01:01 (WB)	KC104, KC151, KC89, KC90, KC92	<u>Mamma-Ca:</u> (Jurikova et al., 2016; Tahan et al., 1993)
AmNPVEHPF	P62917	60S ribosomal protein L8	C*04:01, C*07:02	KC151, KC67, KC70, KC71, KC77	Für Untergruppe L keine relevante Literatur gefunden
ALHNHYTQK	P01857	Ig gamma-1 chain C region	A*03:01; C*04:01 (WB); A*31:01 (WB) KC29, KC60, KC77: unbekannt	KC151, KC177, KC24, KC29, KC60, KC70, KC77, KC84, KC93	<b>Diverse Tumoren:</b> (Chen et al., 2007a) <u>Pankreas-Ca:</u> (Li et al., 2011) <u>Ovarial-Ca:</u> (Ji et al., 2015)
	P01859	Ig gamma-2 chain C region			
	P01861	Ig gamma-4 chain C region			
AVYDRPGASPK	Q12769	Nuclear pore complex protein Nup160	A*03:01	KC186, KC64, KC67, KC80, KC84, KC86	<u>Angiosarkom:</u> (Shimozono et al., 2015)
DELPEPPATF	Q16643	Drebrin	A*26:01 (WB), B*44:02 (WB), B*51:01 (WB), C*05:01 (WB), C*07:02 (WB) KC92: unbekannt	KC28, KC64, KC67, KC71, KC92, KC94, KC97	<b>Kolorektales Ca:</b> (Lin et al., 2014)
<b>GLALKVQEV</b>	Q8IZW8	Tensin-4	A*02:01	KC145, KC177, KC183, KC24, KC29, KC53, KC70, KC77, KC93	<b>Kolorektales Ca:</b> (Albasri et al., 2011; Albasri et al., 2014; Thorpe et al., 2015)
HVDKAEGTTY	O14617	AP-3 complex subunit delta-1	A*01:01 (WB)	KC104, KC151, KC80, KC82, KC89, KC90, KC92	<u>Downregulation in Halstumoren:</u> (Petrenko et al., 2006)
ILGPPPSF	P43243	Matrin-3	B*15:01 (WB) C*04:01 (WB), C*07:02 (WB), KC29: unbekannt	KC145, KC177, KC183, KC24, KC29, KC53, KC70, KC77, KC93	Keine relevante Literatur gefunden
<b>IRPNILVL</b>	Q8IWU6	Extracellular sulfatase Sulf-1	C*07:01, C*07:02, C*06:02	KC24, KC77, KC80, KC84, KC86, KC90, KC93, KC94, KC97	<b>Kolorektales Ca:</b> (Vicente et al., 2015) <u>Pankreas-Ca:</u> (Nawroth et al., 2007) <u>Mamma-Ca:</u> (Okolicsanyi et al., 2014)

## Ergebnisse

Peptidsequenzen	Protein Accesion	Quellprotein	HLA	Patienten	Literatur
	Q8IWU5	Extracellular sulfatase Sulf-2			<u>Diverse Ca:</u> (Rosen et al., 2010) <u>Bronchial-Ca:</u> (Lemjabbar-Alaoui et al., 2010)
KSLSLSPGK	P01859	Ig gamma-2 chain C region	A*03:01	KC177, KC186, KC24, KC67, KC80, KC86, KC93, KC97	<b><u>Diverse Tumoren:</u></b> (Chen et al., 2007a) <u>Pankreas-Ca:</u> (Li et al., 2011) <u>Ovarial-Ca:</u> (Ji et al., 2015)
	P01860	Ig gamma-3 chain C region			
	P01857	Ig gamma-1 chain C region			
LmISRTPEV	P01859	Ig gamma-2 chain C region	B*51:01 (WB), C*04:01 (WB), C*15:02, KC24, KC77, KC84, KC93: un- bekannt	KC151, KC177, KC24, KC29, KC60, KC70, KC77, KC84, KC93	
	P01857	Ig gamma-1 chain C region			
	P01860	Ig gamma-3 chain C region			
	P01861	Ig gamma-4 chain C region			
LTGPVmPVR	P26373	60S ribosomal protein L13	A*68:01 (WB), KC67, KC 80: un- bekannt	KC177, KC186, KC64, KC67, KC80, KC97	<u>Malignes Melanom:</u> (Kardos et al., 2014) <u>Magen-Ca:</u> (Kobayashi et al., 2006)
RIYGESADAVK	P51114	Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1	A*03:01 (WB), C*15:02 (WB)	KC177, KC64, KC67, KC80, KC84, KC86, KC93, KC97	<b><u>Kolorektales Ca:</u></b> (Jin et al., 2016)
SPTVRVSVV	P12111	Collagen alpha-3(VI) chain	B*51:01 (WB), B*07:02,	KC186, KC38, KC67, KC71, KC77, KC84, KC86, KC93	<u>Pankreas-Ca:</u> (Arafat et al., 2011) <b><u>Kolorektales Ca:</u></b> (Qiao et al., 2015) <u>Magen-Ca:</u> (Xie et al., 2014; Yang et al., 2007)
TLFDYEVRL	Q96T88	E3 ubiquitin-protein ligase UHRF1	A*02:01	KC177, KC24, KC29, KC60, KC70, KC77, KC84	<b><u>Tumorgenese (diverse Karzinome):</u></b> (Bronner et al., 2013) <b><u>Kolorektales Ca:</u></b> (Kofunato et al., 2012; Wang et al., 2012)

### 4.3 Ergebnisse der identifizierten MHC-Klasse-II-Liganden

Für die Analyse der MHC-Klasse-II restringierten Peptide konnten die Daten aus 19 Tumorproben und 20 NMC-Proben in die Auswertung eingeschlossen werden. Wie in Tabelle 15 ersichtlich, handelt es sich hierbei um 19 korrespondierende Probenpaare aus jeweils einem Patienten. Bei KC38 konnte nur die NMC-Probe in die MHC-Klasse-II-Analyse eingeschlossen werden. Insgesamt konnten 7448 verschiedene Peptidsequenzen, die auf MHC-Klasse-II-Molekülen präsentiert werden, identifiziert werden. Von diesen wurden 2562 nur auf Tumorgewebe, 2177 nur auf nicht-malignem Gewebe und 2709 auf beiden Gewebearten gefunden (Abbildung 15, links). Diese Peptidsequenzen stammen wiederum aus 2079 verschiedenen Quellproteinen (*NMC-only*: 477, *Tumor-only*: 570) (Abbildung 15, rechts).

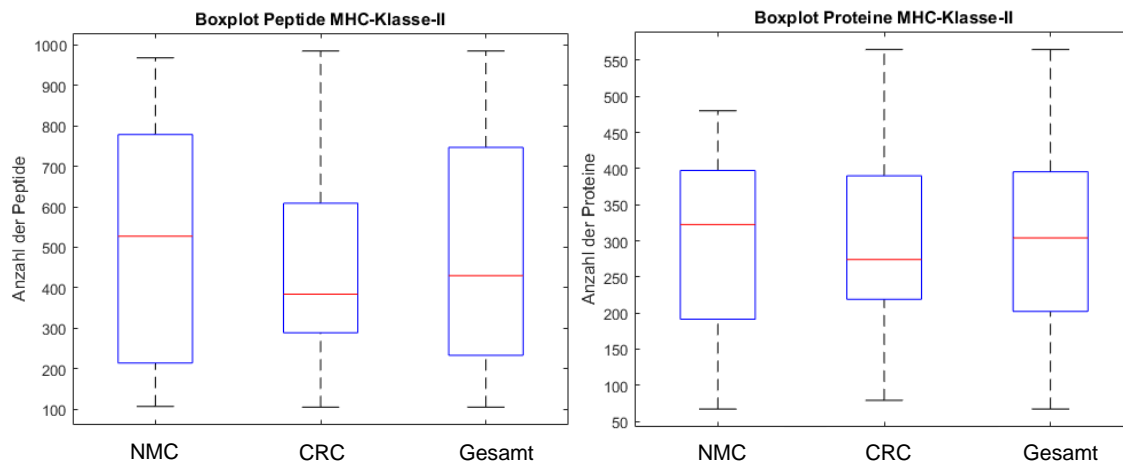
Analog zur MHC-Klasse-I wird die Ausbeute pro Probe als Box-Whiskers-Plot dargestellt.

Die mediane Peptidsequenzausbeute pro Probe (sowohl malignes als auch nicht-malignes Gewebe) liegt bei 430 Peptidsequenzen (minimal 105, maximal 985) aus 304 Quellproteinen (minimal 67, maximal 565).

Getrennt betrachtet ergibt sich für das Tumorgewebe eine mediane Ausbeute von 384 verschiedenen Peptidsequenzen pro Probe (minimal 105, maximal 985) bzw. 274 Proteinen (minimal 79, maximal 565).

Für das nicht-maligne Gewebe liegt der Median bei 527 Peptidsequenzen (minimal 107, maximal 968) bzw. 304 Proteinen (minimal 67, maximal 480) (Abbildung 14).

## Ergebnisse

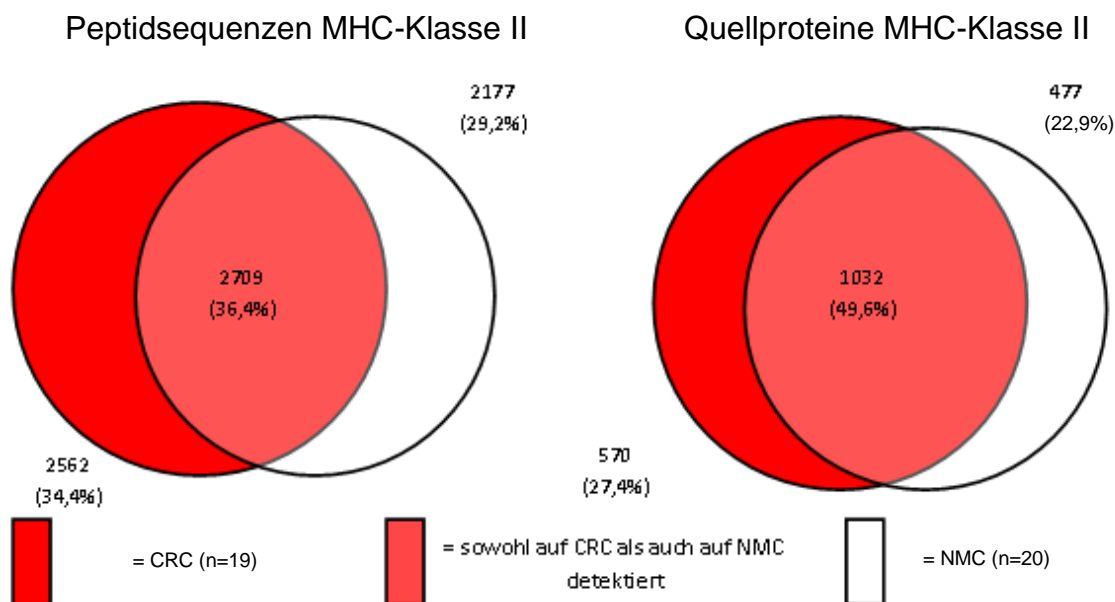


**Abbildung 14: Boxplot Peptidsequenz- und Proteinausbeute MHC-Klasse-II.**

Rote Linie: medianer Wert; blaue Box: untere Grenze am Übergang vom ersten zum zweiten Quartil und obere Grenze am Übergang vom dritten zum vierten Quartil; oberer Whisker: maximaler Wert; unterer Whisker: minimaler Wert.

Links: Peptidsequenzausbeute pro Probe: Die mediane Peptidsequenzausbeute pro Probe (sowohl malignes als auch nicht-malignes Gewebe, n=39) beträgt 430 Peptide (minimal 105, maximal 985). Die mediane Ausbeute beim Tumorgewebe (n=19) beträgt 384 verschiedene Peptidsequenzen (minimal 105, maximal 985) und 527 unterschiedliche Peptidsequenzen (minimal 107, maximal 968) beim nicht-malignen Gewebe (n=20).

Rechts: Proteinausbeute pro Probe. Die Proteinausbeute pro Probe (sowohl malignes als auch nicht-malignes Gewebe) beträgt im Median 304 Quellproteine (minimal 67, maximal 565). Die mediane Ausbeute beim Tumorgewebe beträgt 274 verschiedene Proteine (minimal 79, maximal 565) und 304 verschiedene Proteine (minimal 67, maximal 480) beim nicht-malignen Gewebe.



**Abbildung 15: Venn-Diagramme der Peptid- und Proteinausbeute der MHC-Klasse-II.**

Die Venn-Diagramme zeigen den Überlappungsgrad der detektierten Peptidsequenzen bzw. Proteine an. Die Menge der exklusiv auf CRC- oder NMC-Proben gefundenen Peptidsequenzen bzw. Quellproteine wird in „Rot“ bzw. in „Weiß“ dargestellt. Die Menge der Peptidsequenzen bzw. Quellproteine, die auf beiden Gewebearten gefunden wurden, wird in „Hellrot“ dargestellt. Die absolute Anzahl sowie der prozentuale Anteil an der gesamten Peptid-/Proteinanzahl wird ebenfalls angegeben.



## Ergebnisse

---

Links: Verteilung der gefundenen Peptidsequenzen. Gesamtanzahl an detektierten Peptidsequenzen: 7748.  
Rechts: Verteilung der gefundenen Quellproteine. Gesamtanzahl an detektierten Quellproteine: 2079.

Eine Einzelaufstellung der Anzahl der identifizierten Liganden und Quellproteine in den jeweiligen Proben befindet sich in Tabelle 15.

## Ergebnisse

**Tabelle 15: Anzahl identifizierter MHC-Klasse-II-Liganden und korrespondierender Quellproteine aus den analysierten CRC-Proben.** n.d.=not determined, \*nur NMC -Probe

Die Liganden der Proben oberhalb des Doppelstriches wurden aus der hauseigenen Datenbank entnommen und zur Auswertung herangezogen. Die Liganden der Proben unterhalb des Doppelstriches wurden im Rahmen dieser Arbeit experimentell ermittelt.

Probenbezeichnung	Tumormasse [g]	NMC-Masse [g]	Identifizierte MHC-Klasse-II-Liganden		Identifizierte Quellproteine	
			NMC	Tumor	NMC	Tumor
KC139	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
KC141	2,3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
KC145	1,3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
KC151	0,6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
KC160	1,1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
KC176	1,9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
KC177	1,1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
KC178	1,1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
KC179	1,1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
KC183	0,8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
KC185	1,0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
KC186	1,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<hr/>						
KC24	1,7	3.0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
KC28	1,4	1.3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
KC29	3,6	1.1	212	114	190	157
KC38*	5,8	5.0	318	*	310	*
KC53	3,1	1.0	518	384	335	243
KC54	0,9	0.8	107	105	67	79
KC58	1,8	1.8	792	430	406	274
KC60	0,7	1.0	154	285	158	218
KC64	0,5	0.4	203	320	153	222
KC67	1,0	2.1	968	384	446	267
KC70	1,0	1.7	423	301	234	197
KC71	2,8	1.1	641	905	389	398
KC77	0,4	1.0	537	528	344	336
KC80	1,0	0.4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
KC82	1,2	0.3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
KC84	0,6	1.6	897	620	474	366
KC86	5,4	2.4	692	838	352	450
KC89	1,7	1.0	216	985	193	528
KC90	2,9	1.2	765	575	304	299
KC92	1,0	0.5	937	110	480	565
KC93	1,2	0.9	552	375	329	236
KC94	1,0	0.4	782	531	450	337
KC97	2,1	0.6	771	762	333	394
KC104	1,8	0.5	247	528	224	360

## **4.4 Auswertung der Ergebnisse der MHC-Klasse-II-Liganden**

### **4.4.1 Vergleichende Gegenüberstellung der detektierten Quellproteine anhand des prozentualen Anteils an Antigen-positiven Ligandomen**

Analog zum Vorgehen bei den detektierten MHC-Klasse-I-Liganden (siehe Kapitel 4.2.1) wurden alle identifizierten Quellproteine bei der MHC-Klasse-II danach sortiert, wie häufig sie auf malignem und wie häufig sie auf nicht-malignem Gewebe detektiert wurden. Abbildung 16 zeigt die Gegenüberstellung der gefundenen Quellproteine und Abbildung 17 die Gegenüberstellung der gefundenen MHC-Klasse-II-Liganden.

Tabelle 16 listet die Proteine auf, die das in Kapitel 3.2.2.5 definierte Kriterium erfüllen und auf wenigstens vier verschiedenen kolorektalen Karzinomen detektiert worden sind. Diese 14 wurden in die Literaturrecherche eingeschlossen (siehe 4.4.2).

Die Peptidsequenzen, die auf mindestens vier Tumorproben gefunden wurden und nicht auf nicht-malignem Gewebe, sind in

Tabelle 17 dargestellt. Die obersten 15 dieser Tabelle wurden in die Literaturrecherche eingeschlossen.

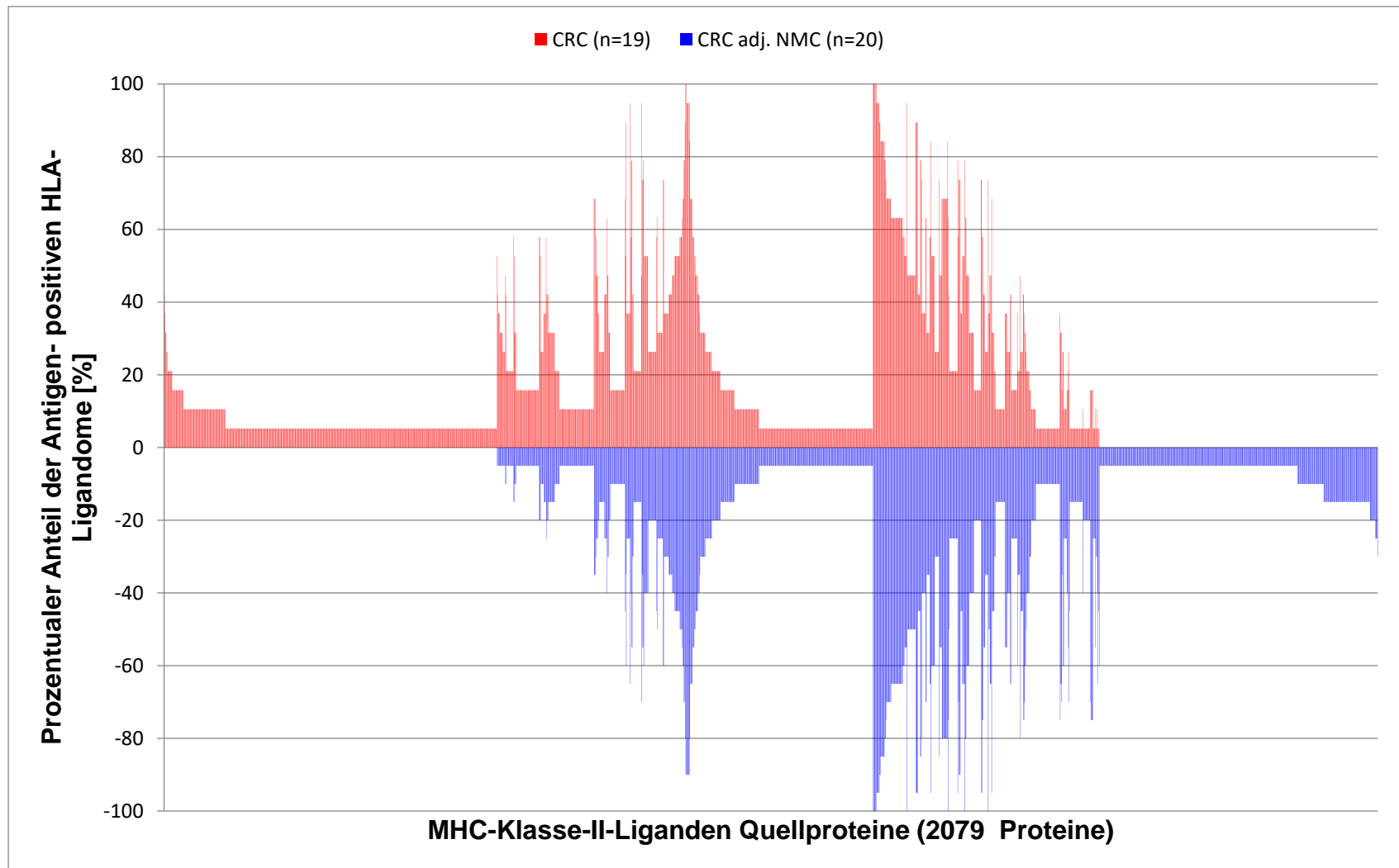


Abbildung 16: MHC-II: Der prozentuale Anteil Antigen-positiver HLA-Ligandome nach den Quellproteinen geordnet.

Weitere Beschriftung zu Abbildung 16 und Abbildung 17, S. 95 und S. 97:

Abbildung 16: Vergleichende Gegenüberstellung der HLA-Quellproteine der CRC- und der NMC-Proben. Auf der y-Achse ist dabei der prozentuale Anteil der für ein Protein positiven Proben an der Gesamtprobenanzahl aufgetragen ( $n(\text{CRC})=19$ ;  $n(\text{NMC})=20$ ), wobei CRC positiv und NMC negativ terminiert ist. Die Sortierung entlang der x-Achse erfolgt nach einer bestimmten Rangfolge: im ersten Schritt wird der Anteil aller positiven Tumorproben an der Gesamtheit aller für dieses Protein positiven Proben betrachtet. Es ergibt sich also ein Wert von 1 (ausschließlich auf CRC-Proben nachgewiesen) bis 0 (ausschließlich auf NMC-Proben nachgewiesen). Im zweiten Schritt (nachrangig) wird dann nach den Häufigkeiten der positiven CRC-Proben sortiert und reziprok dazu nach den Häufigkeiten auf NMC-Proben. Hierbei wird das CRC nach links, das NMC nach rechts sortiert.

Abbildung 17: Vergleichende Gegenüberstellung der HLA-Peptide der CRC- und der NMC-Proben. Analog zur Abbildung 16 wird dabei auf der y-Achse der prozentuale Anteil der für ein Peptid positiven Proben an der Gesamtprobenanzahl aufgetragen ( $n(\text{CRC})=19$ ;  $n(\text{NMC})=20$ ), wobei CRC positiv und NMC negativ terminiert ist. Die Sortierung entlang der x-Achse erfolgt nach der oben beschriebenen Rangfolge.

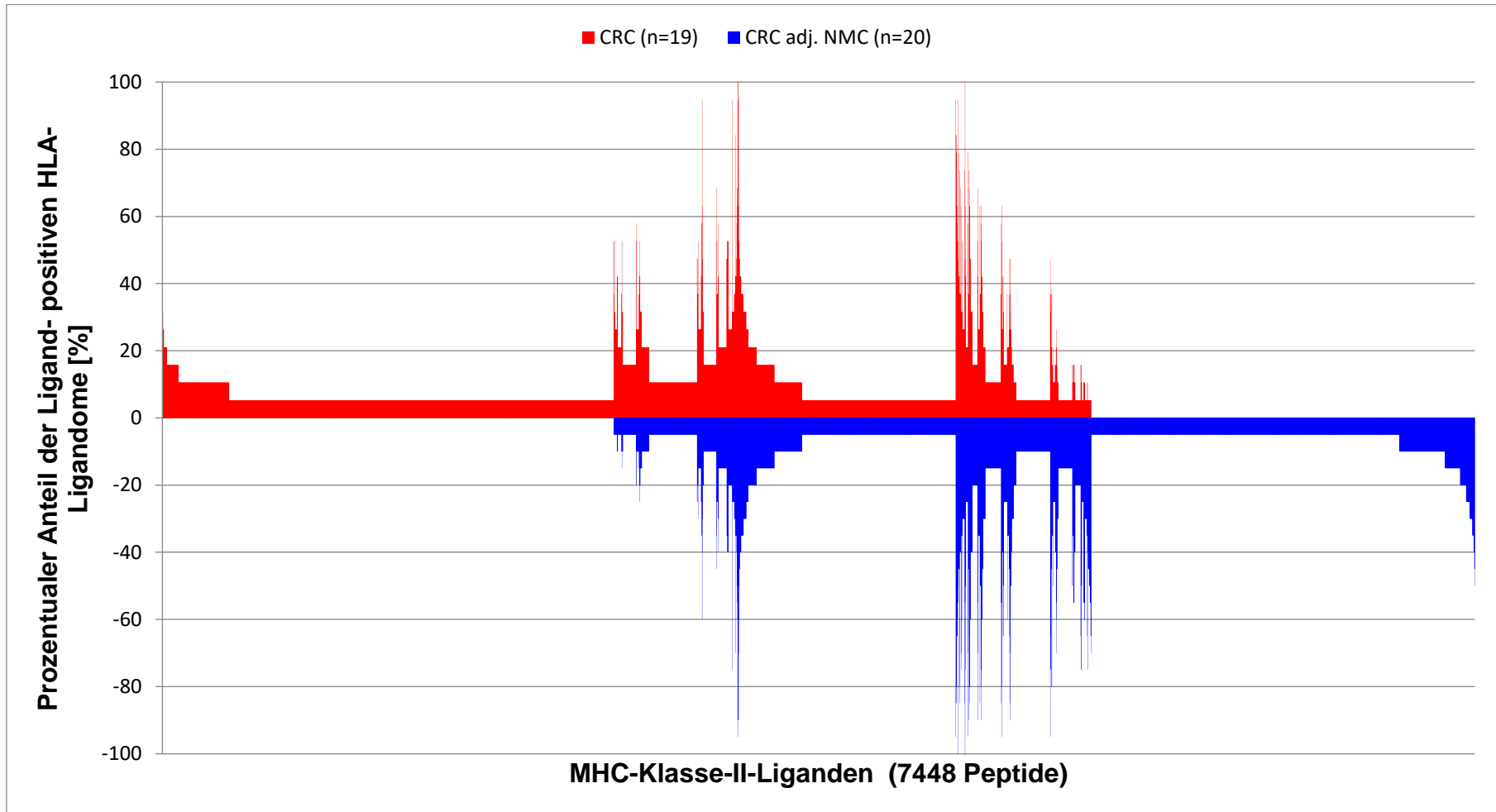


Abbildung 17: MHC-II: Der prozentuale Anteil Ligand-positiver HLA-Ligandome nach den gefundenen Peptidsequenzen geordnet.

Tabelle 16: Quellproteine, die ausschließlich auf mindestens vier Tumorproben gefunden wurden

Uniprot Accession	Quellprotein	Gen	Positive CRC-Proben	Prozentualer Anteil positiver CRC-Proben
Q99715	Collagen alpha-1(XII) chain	COL12A1	8	42,11
P62888	60S ribosomal protein L30	RPL30	7	36,84
P02792	Ferritin light chain	FTL	6	31,58
P06748	Nucleophosmin	NPM1	6	31,58
P35442	Thrombospondin-2	THBS2	5	26,32
Q685J3	Mucin-17	MUC17	5	26,32
O00602	Ficolin-1	FCN1	4	21,05
P05164	Myeloperoxidase	MPO	4	21,05
P14780	Matrix metalloproteinase-9	MMP9	4	21,05
P50281	Matrix metalloproteinase-14	MMP14	4	21,05
Q15181	Inorganic pyrophosphatase	PPA1	4	21,05
Q16643	Drebrin	DBN1	4	21,05
Q96124	Far upstream element-binding protein 3	FUBP3	4	21,05
Q9UGV2	Protein NDRG3	NDRG3	4	21,05

Tabelle 17: Peptidsequenzen, die ausschließlich auf mindestens vier Tumorproben gefunden wurden. „m“ in der FASTA-Formel der Peptide bezeichnet ein durch Oxidation modifiziertes Methionin.

Peptidsequenz	Uniprot Accession des Quellproteins	Gen des Quellproteins	Positive CRC-Proben	Prozentualer Anteil positiver CRC-Proben
PGDSDIIRSMPEQTGEK	P62888	RPL30	9	47,37
GNFGGRSSGP	Q32P51; P09651	HNRNPA1L2; HNRNPA1	6	31,58
PEPAKSAPAPKKGSKKA	P62807; P06899; O60814; Q16778; P57053	H2BC10; H2BC4; H2BC6; H2BC7; H2BC8; H2BC11; H2BC12; HIST2H2BE; H2BFS	6	31,58
AAAPASVPAQAPKRTQAP- TKASE	P47914	RPL29	5	26,32
DGVIKVFNDMKVRKSSTPE	P23528	CFL1	5	26,32
DSGYRPNLSPEE	P28062	PSMB8	5	26,32
STTPVDTSTPATTST	Q685J3	MUC17	5	26,32
VTFLLPAGWILSHLETYRRPE	P10176	COX8A	5	26,32
AKLIATFPDTLTYS	P23229	ITGA6	4	21,05
ANVGAGKKPKE	P62847	RPS24	4	21,05
DELPEPPATF	Q16643	DBN1	4	21,05
FAKALANVN	P05386	RPLP1	4	21,05
FGYNTGVINAPE	Q8TDB8; P11169	SLC2A14; SLC2A3	4	21,05

## Ergebnisse

Peptidsequenz	Uniprot Accession des Quellproteins	Gen des Quellproteins	Positive CRC-Proben	Prozentualer Anteil positiver CRC-Proben
GDEDASRMEEVD	Q58FF7; P08238	HSP90AB3P; HSP90AB1	4	21,05
GNPAEFVVNTSNAGAGA	P21333	FLNA	4	21,05
GQYISPFHDIPIYA	Q15181	PPA1	4	21,05
ImNSFVNDIFERIAAG	P33778; P62807; P58876; Q93079; P06899; O60814; Q99879; Q99877; P23527; Q16778; Q5QNW6; P57053	HIST1H2BB; H2BC10; H2BC4; H2BC6; H2BC7; H2BC8; HIST1H2BD; HIST1H2BH; H2BC11; H2BC12; H2BC14; H2BC15; HIST1H2BO; HIST2H2BE; HIST2H2BF; H2BFS	4	21,05
LKAVPSQKRT	P31949	S100A11	4	21,05
NEDLRSWTAADmAAQ	P30443; P04439; P13746; P18462; P30450; P30512; P16188; P16189; P10314; P16190; P30453; P30455; P30456; P30457; P30459; Q09160; P01893	HLA-A; HLA-H	4	21,05
NRPVILTYHDIGLNHK	Q9UGV2	NDRG3	4	21,05
NSGAVYIYNGHQGTIR	P17301	ITGA2	4	21,05
TPDAMKAAMALEKK	P02792	FTL	4	21,05
YGGGNYGPGGSGGSGGYGGRS	P22626	HNRNPA2B1	4	21,05
YGQTLGQAQAHSQEQ	Q96124	FUBP3	4	21,05



#### 4.4.2 Literaturrecherche zu den gefundenen Quellproteinen

Die 14 Quellproteine aus Tabelle 16 wurden für die Literaturrecherche verwendet. Das am häufigsten detektierte Quellprotein, Q99715, wurde dabei auf acht Tumorproben (42,1 %) gefunden und durch 19 verschiedene Peptidsequenzen präsentiert. Das 14. Quellprotein Q9UGV2 wurde noch auf vier (21,1 %) Tumorproben detektiert und wurde nur mit einer Peptidsequenz präsentiert. Der relative Anteil an positiven Tumorproben mit dem speziellen Quellprotein kann Abbildung 18 entnommen werden.

In Tabelle 18 werden zu jedem Quellprotein die entsprechenden detektierten Peptidsequenzen angegeben. Zudem zeigt die Tabelle die Ergebnisse der Literaturrecherche nach dem in Kapitel 3.2.2.5 dargelegten Algorithmus.

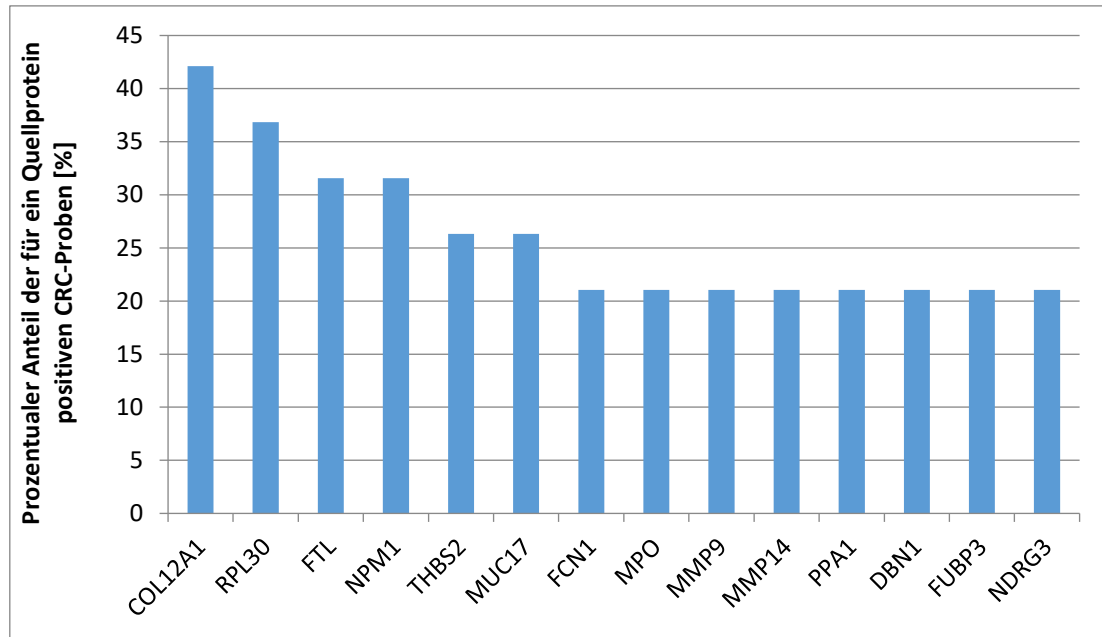
In Tabelle 19 wurde die Literaturrecherche auf die 15 am häufigsten detektierten Peptidsequenzen bzw. deren Quellproteine ausgedehnt. Die relativen Häufigkeiten der 15 am häufigsten detektierten Peptidsequenzen lassen sich Abbildung 19 entnehmen. Die am häufigsten gefundene Sequenz wurde dabei auf neun (47,4 %) Tumorproben nachgewiesen, die 15. auf vier (21,1 %).

Die Peptidsequenzen, die sich in

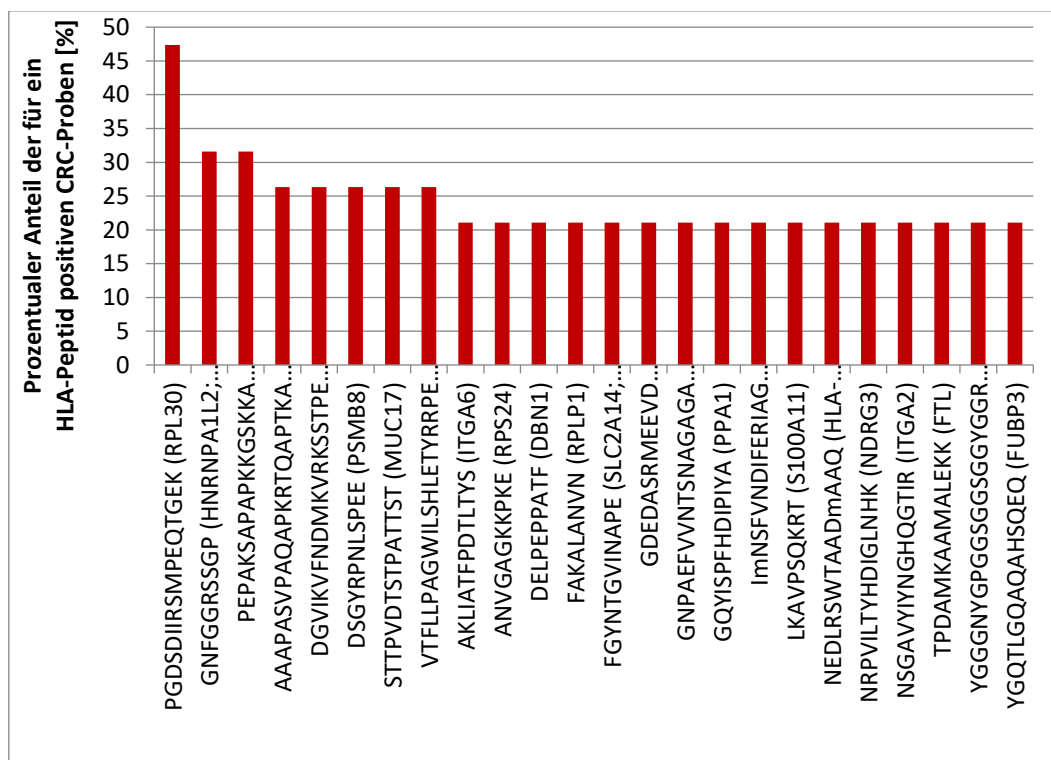
Tabelle 17 und zudem in Tabelle 18 oder in Tabelle 19 wiederfinden, wurden hierbei „fett“-markiert.

Bei acht der 14 detektierten Quellproteine konnte durch die Literaturrecherche ein Zusammenhang zu bekannten Veränderungen auf Genom-, Transkriptom- oder Proteomebene beim kolorektalen Karzinom festgestellt werden. Bei sechs weiteren ergab sich solch ein bekannter Zusammenhang in anderen Tumorentitäten.

Bei neun der 15 Peptidsequenzen konnte durch die Literaturrecherche ebenfalls ein Zusammenhang mit bekannten Veränderungen auf Genom-, Transkriptom- oder Proteomebene des kolorektalen Karzinoms hergestellt werden. Bei vier weiteren mit bekannten Veränderungen anderer Tumorentitäten. Bei zwei der Peptidsequenzen konnte durch die bisherige Literatur kein Zusammenhang zu Veränderungen bei Tumoren hergestellt werden.



**Abbildung 18: Relative Häufigkeiten der ausgewählten Quellproteine der MHC-Klasse-II-Liganden in allen CRC-Proben.** Insgesamt wurden 19 CRC Proben für die MHC-Klasse-II analysiert. Die Proteine sind mit den zugehörigen Genkurznamen angegeben und auf der x-Achse entlang ihrer Häufigkeit nach angeordnet (links am häufigsten).



**Abbildung 19: Relative Häufigkeiten der ausgewählten MHC-Klasse-II-Liganden in allen CRC-Proben.** Insgesamt wurden 19 CRC Proben für die MHC-Klasse-II analysiert. Die detektierte Peptidsequenz ist angegeben, die Genkurznamen der Quellproteine sind in Klammern angegeben. Die Anordnung entlang der x-Achse entspricht der Häufigkeit der Peptide (links am häufigsten).

## Ergebnisse

**Tabelle 18: MHC-II: Ergebnisse der Literaturrecherche zu den Quellproteinen und den ihnen zugeordneten Peptidsequenzen.** Die fettgedruckten Peptidsequenzen wurden zusätzlich in der Peptidsequenzanalyse häufig detektiert und finden sich in Tabelle 19 wieder. „m“ in der FASTA-Formel der Peptide bezeichnet ein durch Oxidation modifiziertes Methionin.

Protein Accesion	Quellprotein	Peptidsequenzen	Patienten	Literatur
O00602	Ficolin-1	GNDNIHALTAQGSSE	KC67	<b>Kolorektales Ca:</b> (Storm et al., 2014)
		GNHQFAKYKSFKVADE	KC84, KC86, KC89	
P02792	Ferritin light chain	KAAmALEKKLNQ	KC90	<b>Mamma-Ca:</b> (Eswaran et al., 2012; Jezequel et al., 2012)
		<b>TPDAmKAAmALEKK</b>	KC67, KC71, KC84, KC86	
		VKLIKMGDHLTNLH	KC94	
P05164	Myeloperoxidase	DNTGITTVSKNNIFm	KC92	<b>Kolorektales Ca:</b> (Meng et al., 2018)
		NTGITTVSKNNIFm	KC92	
		VSNEIVRFTDQLTPD	KC86, KC89, KC93	
P06748	Nucleophosmin	GGGSKVPQKKV	KC104	<b>Kolorektales Ca:</b> (Liu et al., 2012; Nozawa et al., 1996; Wong et al., 2013) <b>Schilddrüsen-Ca:</b> (Pianta et al., 2010) <b>Magen-Ca:</b> (Tanaka et al., 1992) <b>HCC:</b> (Yun et al., 2007)
		GGGSKVPQKKVK	KC104	
		RSAPGGGSKVPQKKVKL	KC67, KC92, KC94	
		SAPGGGSKVPQK	KC104, KC67, KC70	
		SISGKRSAPGGGSKVPQ	KC89	
P14780	Matrix metalloproteinase-9	GRQVWVYTGASVLGPR	KC67, KC84	<b>Kolorektales Ca:</b> (Gimeno-Garcia et al., 2015; Li et al., 2013; Mook et al., 2004; Said et al., 2014; Zucker et al., 2004)
		NQLYLFKDGKYWRFSEG	KC97	
		SGRQVWVYTGASVLGPR	KC67, KC84, KC86	
		YLFKDGKYWRFSEG	KC97	
		IPGYIVDDSVRVE	KC64	
		IPGYIVDDSVRVEQ	KC64, KC71, KC97	
		YIVDDSVRVE	KC64	
YIVDDSVRVEQ	KC97			
P35442	Thrombospondin-2	DEPFYEHLQAEKSR	KC84, KC92	<b>Diverse Tumoren:</b> (Kim et al., 2010)
		RGTLLEALGPGLSQ	KC90, KC92	

## Ergebnisse

Protein Accesion	Quellprotein	Peptidsequenzen	Patienten	Literatur
		SRGTLLEALEGPGLSQ	KC84, KC90, KC92	<u>Magen-Ca:</u> (Lin et al., 2016; Sun et al., 2014) <u>Downregulation im kolorektalem Ca:</u> (Lin et al., 2015)
		SRGTLLEALEGPGLSQR	KC90, KC92	
		SRGTLLEALEGPGLSQRQ	KC90	
		TAQLKQDGKSRG	KC64	
		VHNPAQIDTDN	KC71	
P50281	Matrix metalloproteinase-14	IAAmQKFYGLQ	KC90	<b>Kolorektales Ca:</b> (Kikuchi et al., 2000; Okada et al., 1995; Yamamoto et al., 2008)
		KAFRVWESATPLR	KC84	
		LSAAIAAmQKFYGLQ	KC90	
		SAAIAAmQKFYGLQ	KC90	
		YPKNIKVWEGIPESPR	KC67, KC89	
P62888	60S ribosomal protein L30	AIDPGDSDIIRSmPEQTGEK	KC90	<u>Medulloblastom:</u> (De Bortoli et al., 2006) <u>NSCLC:</u> (Saviozzi et al., 2006) <u>HCC:</u> (Uemura et al., 2003)
		IIDPGDSDIIRSmPEQTGEK	KC90	
		<b>PGDSDIIRSMPEQTGEK</b>	KC67, KC84, KC92, KC94, KC97	
Q15181	Inorganic pyrophosphatase	<b>GQYISPFHDIPIYA</b>	KC71, KC84, KC86, KC89	<u>Larynx-Ca:</u> (Bodnar et al., 2016) <u>Magen-Ca:</u> (Jeong et al., 2012; Yang et al., 2015)
		GQYISPFHDIPIYAD	KC84, KC86	
		KGQYISPFHDIPIYADK	KC84	
Q16643	Drebrin	<b>DELPEPPATF</b>	KC58, KC64, KC92, KC94	<b>Kolorektales Ca:</b> (Lin et al., 2014)
Q685J3	Mucin-17	<b>STTPVDTSTPATTST</b>	KC71, KC77, KC93, KC94	<u>Pankreas-Ca:</u> (Kitamoto et al., 2012) <b>Kolorektales Ca:</b> (Krishn et al., 2016) <u>Downregulation in kolorektalen Ca:</u> (Senapati et al., 2010)
Q96124	Far upstream element-binding protein 3	FYGQTLGQAQAHSSEQ	KC58, KC71	<u>Medulloblastom:</u> (Engidawork et al., 2006) <u>Nierenzell-Ca, Blasen-Ca und Prostata-Ca:</u> (Weber et al., 2008)
		QTLGQAQAHSSEQ	KC58	
		<b>YGQTLGQAQAHSSEQ</b>	KC58, KC71, KC90, KC92	
Q99715	Collagen alpha-1(XII) chain	ADTEYQISVSAmKG	KC71, KC86, KC93	<b>Kolorektales Ca:</b> (Karagiannis et al., 2012; Mikula et al., 2011)
		APSNLVISERTHS	KC97	

## Ergebnisse

Protein Accession	Quellprotein	Peptidsequenzen	Patienten	Literatur
		DITVLPIYKmGEG	KC71	<u>Ovarial-Ca:</u> (Januchowski et al., 2014)
		DPDDTHAYNVADFESL	KC71, KC86, KC93	
		DPDDTHAYNVADFESLSR	KC71, KC92, KC93	
		DTHAYNVADFESL	KC71, KC86, KC93	
		DTHAYNVADFESLSR	KC93	
		ERHVFIVDDFESFEK	KC97	
		GPVQQYRIIYSPTVG	KC89	
		IGVLITDGKSQDDVE	KC64	
		ITVLPIYKmGEG	KC71	
		KNAFVNQPTADLHPN	KC92	
		LENLIPDTKYEVSUIPE	KC97	
		VAIITDGKSQDE	KC64, KC77, KC97	
		VAIITDGKSQDEVE	KC64	
		VDGSYSIGIANFVK	KC92	
		VKNTFTESAGARVG	KC97	
		VQAVLHDLTSEPVT	KC71	
		YSAYRIQKNAFVNQPT	KC89	
Q9UGV2	Protein NDRG3	<b>NRPVILTYHDIGLNHK</b>	KC67, KC84, KC86, KC89	<u>Prostata-Ca:</u> (Ren et al., 2014; Wang et al., 2009) <u>Downregulation diverse Tumoren:</u> (Yang et al., 2013)

## Ergebnisse

**Tabelle 19: MHC-II: Ergebnisse der Literaturrecherche zu den Peptidsequenzen.** Die fettgedruckten Peptidsequenzen können Quellproteinen aus Tabelle 18 zugeordnet werden. „m“ in der FASTA-Formel der Peptide bezeichnet ein durch Oxidation modifiziertes Methionin.

Peptidsequenzen	Protein Accesion	Quellprotein	Patienten	Literatur
<b>PGDSDIIRSMPEQTGEK</b>	P62888	60S ribosomal protein L30	KC67, KC84, KC92, KC94, KC97	<u>Medulloblastom:</u> (De Bortoli et al., 2006) <u>NSCLC:</u> (Saviozzi et al., 2006) <u>HCC:</u> (Uemura et al., 2003)
GNFGGRSSGP	Q32P51	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1-like 2	KC58, KC71, KC77, KC84, KC92, KC93	<b>Kolorektales Ca:</b> (Hope et al., 2011; Ma et al., 2009; Ushigome et al., 2005)
	P09651	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1		
PEPAKSAPAPKKGSKKA	P62807	Histone H2B type 1-C/E/F/G/I	KC104, KC77, KC86, KC90, KC92, KC94	Keine relevante Literatur gefunden
	P06899	Histone H2B type 1-J		
	Q16778	Histone H2B type 2-E		
	O60814	Histone H2B type 1-K		
	P57053	Histone H2B type F-S		
AAAPASVPAQAPKRTQAPTQKASE	P47914	60S ribosomal protein L29	KC67, KC71, KC86, KC90, KC92	<b>Kolorektales Ca:</b> (Liu et al., 2006; Wang et al., 1999)
DGVIKVFNDMKVRKSSTPE	P23528	Cofilin-1	KC67, KC84, KC86, KC97	<u>Prostata-Ca:</u> (Lu et al., 2015) <u>Vulva-Ca:</u> (Wu et al., 2016) <b>Kolorektales Ca und NSCLC:</b> (Dugina et al., 2015)
DSGYRPNLSPEE	P28062	Proteasome subunit beta type-8	KC104, KC64, KC71, KC77, KC93	<u>Magen-Ca:</u> (Kwon et al., 2016) <u>Nasopharynx-Ca:</u> (Gao et al., 2013) <u>Nierenzell-Ca:</u> (Zhu et al., 2016)
<b>STTPVDTSTPATTST</b>	Q685J3	Mucin-17	KC71, KC77, KC93, KC94	<u>Pankreas-Ca:</u> (Kitamoto et al., 2012)

## Ergebnisse

Peptidsequenzen	Protein Accesion	Quellprotein	Patienten	Literatur
				<b>Kolorektales Ca:</b> (Krishn et al., 2016) (Duncan et al., 2007)
VTFLLPAGWILSHLETYRRPE	P10176	Cytochrome c oxidase sub-unit 8A, mitochondrial	KC67, KC84, KC92, KC94, KC97	Keine relevante Literatur gefunden
AKLIATFPDTLTYS	P23229	Integrin alpha-6	KC71, KC84, KC86, KC94	<b>Mamma-Ca:</b> (Brooks et al., 2016) <b>Downregulation Nierenzell-Ca:</b> (Zhang et al., 2016a; Zhang et al., 2016b) <b>Downregulation in kolorektalen Ca:</b> (Sakthianandeswaren et al., 2011)
ANVGAGKKPKE	P62847	40S ribosomal protein S24	KC64, KC67, KC71, KC92	<b>Kolorektales Ca:</b> (Wang et al., 2015b)
<b>DELPEPPATF</b>	Q16643	Drebrin	KC28, KC64, KC67, KC71, KC92, KC94, KC97	<b>Kolorektales Ca:</b> (Lin et al., 2014)
FAKALANVN	P05386	60S acidic ribosomal protein P1	KC58, KC90, KC92, KC97	<b>Kolorektales Ca:</b> (Artero-Castro et al., 2009)
FGYNTGVINAPE	Q8TDB8	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 14	KC104, KC64, KC71, KC77	<b>Magen-Ca:</b> (Berlth et al., 2015)
	P11169	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 3		<b>Kolorektales Ca:</b> (Chung et al., 1999)
GDEDASRMEEVD	Q58FF7	Putative heat shock protein HSP 90-beta-3	KC58, KC64, KC86	<b>Kolorektales Ca:</b> (Drecoll et al., 2014; Haque et al., 2016)
	P08238	Heat shock protein HSP 90-beta		
GNPAEFVVNTSNAGAGA	P21333	Filamin-A	KC104 ,KC53, KC60, KC71	<b>Mamma-Ca:</b> (Zhong et al., 2010) <b>Downregulation in kolorektalen Ca:</b> (Tian et al., 2015)

#### 4.5 Semiquantitative Analyse

Wie in Kapitel 3.2.2.2 und 3.2.2.5 beschrieben, wurden die CRC- sowie die Normalgewebeproben semiquantitativ gegen einander gemessen.

Anschließend wurden die ermittelten Peptide in den *Volcano-Plots* gegen ihr korrespondierendes Normalgewebe dargelegt (MHC-Klasse-I: Abbildung 20, MHC-Klasse-II: Abbildung 22).

Als überrepräsentiert bzw. unterrepräsentiert wurden Peptide betrachtet, die die in Kapitel 3.2.2.5 genannten Kriterien erfüllen. Dass dabei ein „*fold change*“ größer 4 vorausgesetzt wird, ist ein hausinterner Standard (Kowalewski et al., 2016; Löffler et al., 2018b; Nelde et al., 2018). Dieser Wert soll verhindern, dass nur minimal über-/unterrepräsentierte Peptide als solche aufgefasst werden, gegen welche jedoch hochwahrscheinlich eine Toleranz seitens der T-Lymphozyten bestünde oder aber die Gefahr von irAE sehr hoch wäre (Colella et al., 2000; Gallou et al., 2016; Naftzger et al., 1996; Overwijk et al., 1998).

Die auf den CRC-Proben gegenüber den Normalgewebeproben überrepräsentierten Peptide wurden zudem erfasst und gegen die unterrepräsentierten analog zum Vorgehen in Kapitel 4.2.1 und 4.4.1 aufgetragen. Die Peptide, die auf mindestens fünf CRC-Proben überrepräsentiert waren, wurden in die anschließende Literaturrecherche eingeschlossen.

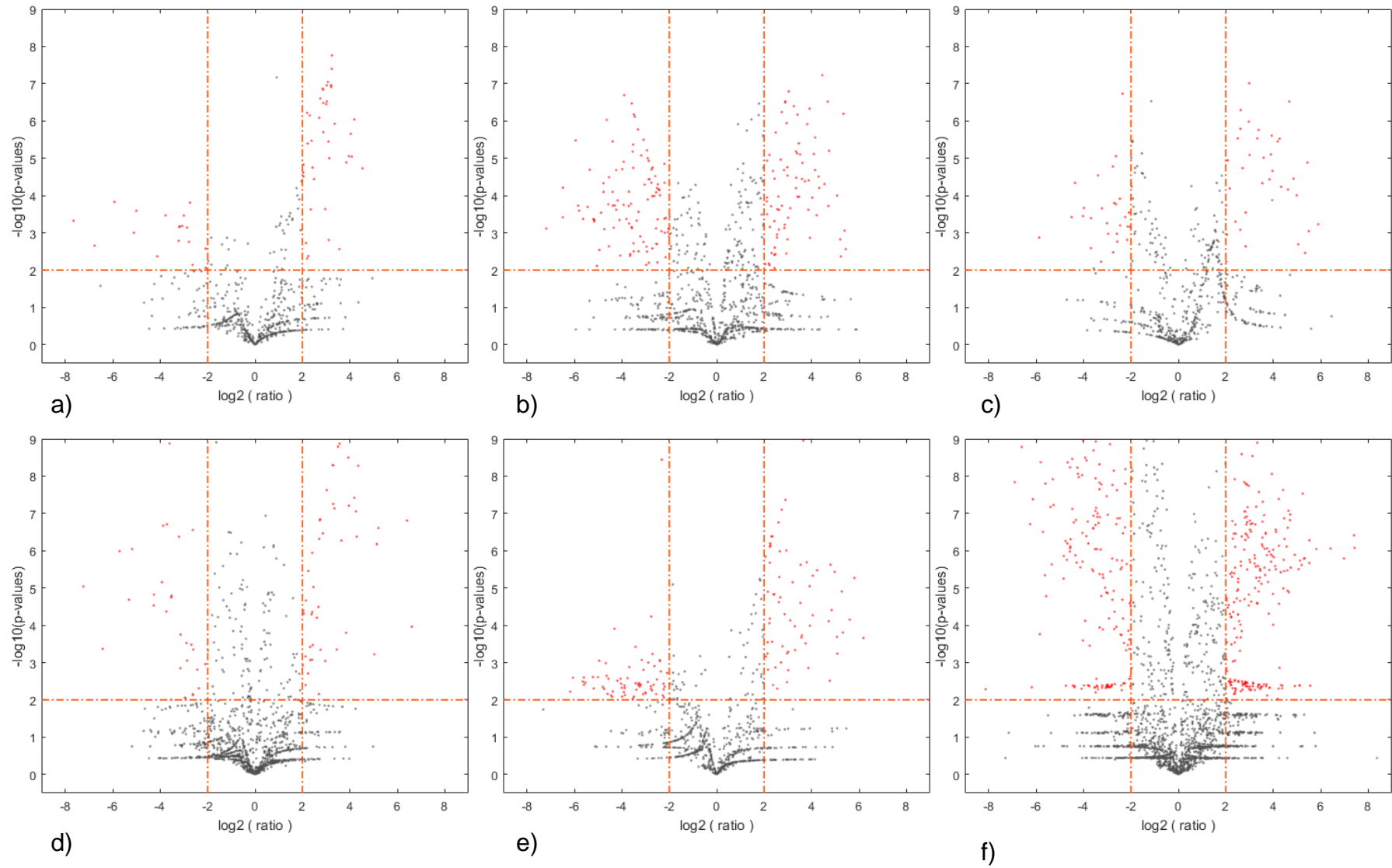
Für die MHC-Klasse-I konnten *Volcano-Plots* für 15 verschiedene kolorektale Karzinome und ihr korrespondierendes Normalgewebe erstellt werden (Abbildung 20). Die signifikant über- und unterrepräsentierten Peptide werden dabei „rot“ dargestellt, falls sie mehr als vierfach über- oder unterrepräsentiert sind. Zum visuellen Angleich der *Volcano-Plots* wurde jeweils für das Diagramm ein Signifikanzniveau von  $p=0,01$  dargestellt. Die p-Werte der Daten wurde jedoch zuvor einer Benjamini-Hochberg-Korrektur unterzogen. Im arithmetischen Mittel wurden für die MHC-Klasse-I 101,1 überrepräsentierte und 98,1 unterrepräsentierte Peptide gefunden. Abbildung 21 stellt die überrepräsentierten Peptide, gegen die unterrepräsentierten Peptide aufgetragen, dar. Die überrepräsentierten Peptide, die auf mindestens fünf Tumorproben überrepräsentiert waren, werden in Tabelle 20 aufgelistet. Hier wurde diesen Peptidsequenzen zudem ihre



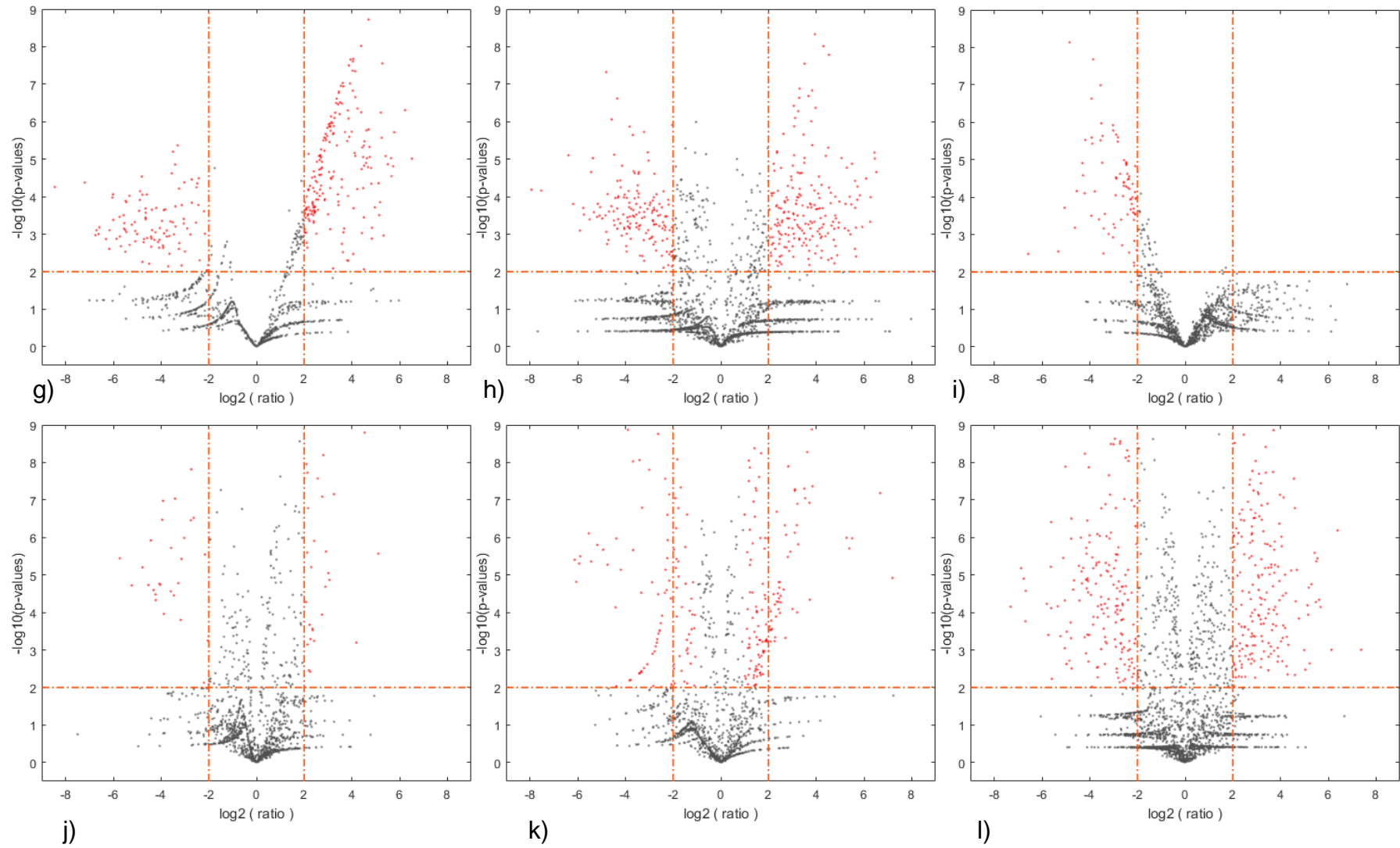
allgemeine Detektionshäufigkeit auf malignem und nicht-malignem Gewebe aus Kapitel 4.2 zugeordnet. Ersichtlich ist, dass es sich bei allen von diesen überrepräsentierten Peptiden um Peptide handelt, die sowohl auf malignem als auch auf nicht-malignem Gewebe gefunden wurden (Tabelle 20). Sie wurden jedoch auf mehr CRC-Proben als auf NMC-Proben detektiert und gleichzeitig waren sie auf den CRC-Proben, verglichen mit ihren korrespondierenden NMC-Proben, semiquantitativ überrepräsentiert. Die am häufigsten überrepräsentierte Peptidsequenz war auf acht der 15 (53,3%), in die semiquantitative Analyse eingeschlossenen, CRC-Proben überrepräsentiert. Die Ergebnisse der Literaturrecherche, die nach dem in Kapitel 3.2.2.5 beschriebenen Algorithmus erfolgt ist, sind in Tabelle 21 dargelegt.

Für die MHC-Klasse-II wurde analog vorgegangen. Hier konnten für die semiquantitative Analyse sieben korrespondierende Probenpaare herangezogen werden. Im arithmetischen Mittel wurden bei der MHC-Klasse-II 41,1 überrepräsentierte und 39,3 unterrepräsentierte Peptide detektiert. Das häufigste überrepräsentierte Peptid konnte auf drei der sieben Proben (42,9%) überrepräsentiert nachgewiesen werden. Die einzelnen *Volcano-Plots* sind in Abbildung 22 dargestellt, die Gegenüberstellung von über- und unterrepräsentierten Peptiden in Abbildung 23. Auf eine Literaturrecherche wurde auf Grund der geringen Anzahl verzichtet.

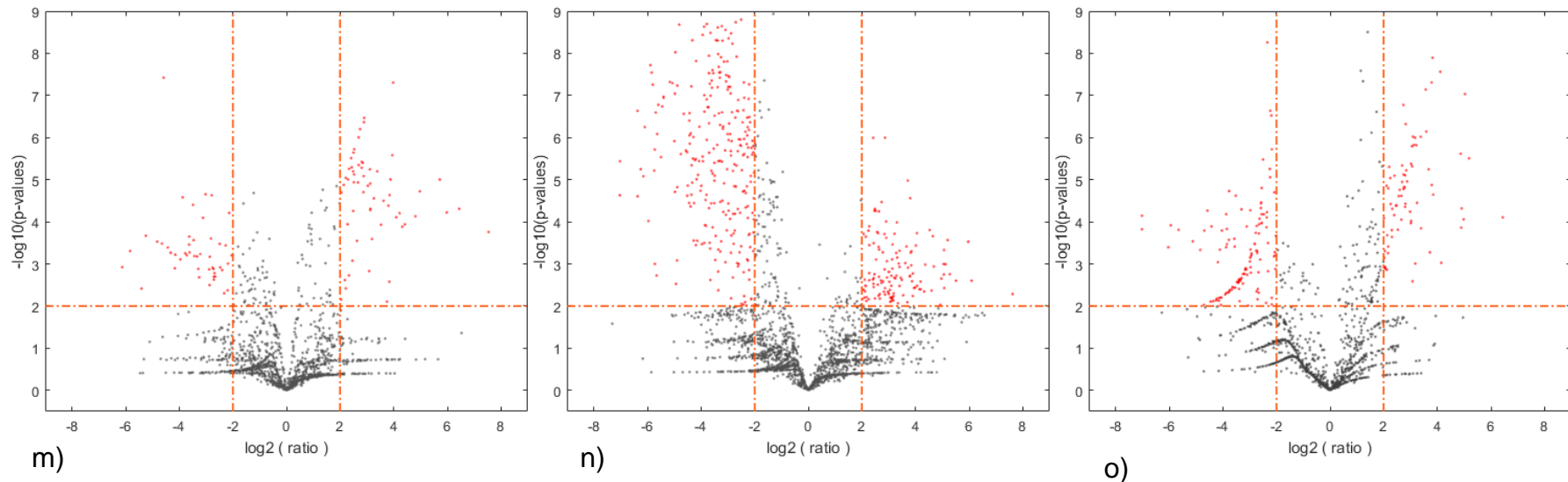
## Ergebnisse



## Ergebnisse



## Ergebnisse



**Abbildung 20: Volcano-Plots MHC-Klasse-I: a) KC24 b) KC28 c) KC29 d) KC53 e) KC64 f) KC67 g) KC82 h) KC84 i) KC86 j) KC89 k) KC90 l) KC92 m) KC93 n) KC94 o) KC97.** Die Volcano-Plots der 15 MHC-Klasse-I-Proben, für die eine vergleichende Analyse zwischen der CRC-Probe und der korrespondierenden NMC-Probe durchgeführt werden konnte. Jeder Punkt repräsentiert einen HLA-Liganden. Auf der x-Achse ist dabei der  $\log_2$ -fold change aufgetragen. Nach rechts (positiv) werden dabei die auf CRC-Proben überrepräsentierten Liganden, nach links (negativ) die auf CRC unterrepräsentierten Liganden aufgetragen. Auf der y-Achse werden die p-Werte (negativ logarithmisch zur Basis 10) dargestellt.

Rot : signifikant überrepräsentierte Peptide (rechter oberer Quadrant), signifikant unterrepräsentierte Peptide (linker oberer Quadrant).

Als signifikant über-/unterrepräsentiert werden dabei HLA-Liganden dargestellt, deren  $fold\text{-}change > 4$  und deren p-Wert  $< 0,01$  ist.

Grau: nicht signifikant über- oder unterrepräsentierte Peptide oder Peptide, die einen  $fold\text{-}change < 4$  haben.

Missing values wurden dabei mittels des im Kapitel 3.2.2.5 beschriebenen Verfahrens ersetzt.

Zur besseren Übersicht wurde hier in allen Volcano-Plots das Signifikanzniveau bei 0,01 eingezeichnet. Für die weiteren Analysen wurden jedoch die HLA-Liganden als signifikant über-/unterrepräsentiert betrachtet, deren p-Wert kleiner als der entsprechend für die einzelne Probe Benjamini-Hochberg korrigierte Wert ist, der vom Signifikanzniveau  $\alpha=0,05$  ausgehend errechnet wurde.

Der  $fold\text{-}change$  größer 4 vorausgesetzt ist ein hausinterner Standard (Kowalewski et al., 2016; Löffler et al., 2018b; Nelde et al., 2018). Dieser Wert soll verhindern, dass nur minimal über-/unterrepräsentierte Peptide als solche aufgefasst werden, gegen welche jedoch höchwahrscheinlich eine Toleranz seitens der T-Lymphozyten bestünde oder aber die Gefahr von irAE sehr hoch wäre (Colella et al., 2000; Gallou et al., 2016; Naftzger et al., 1996; Overwijk et al., 1998).

## Ergebnisse

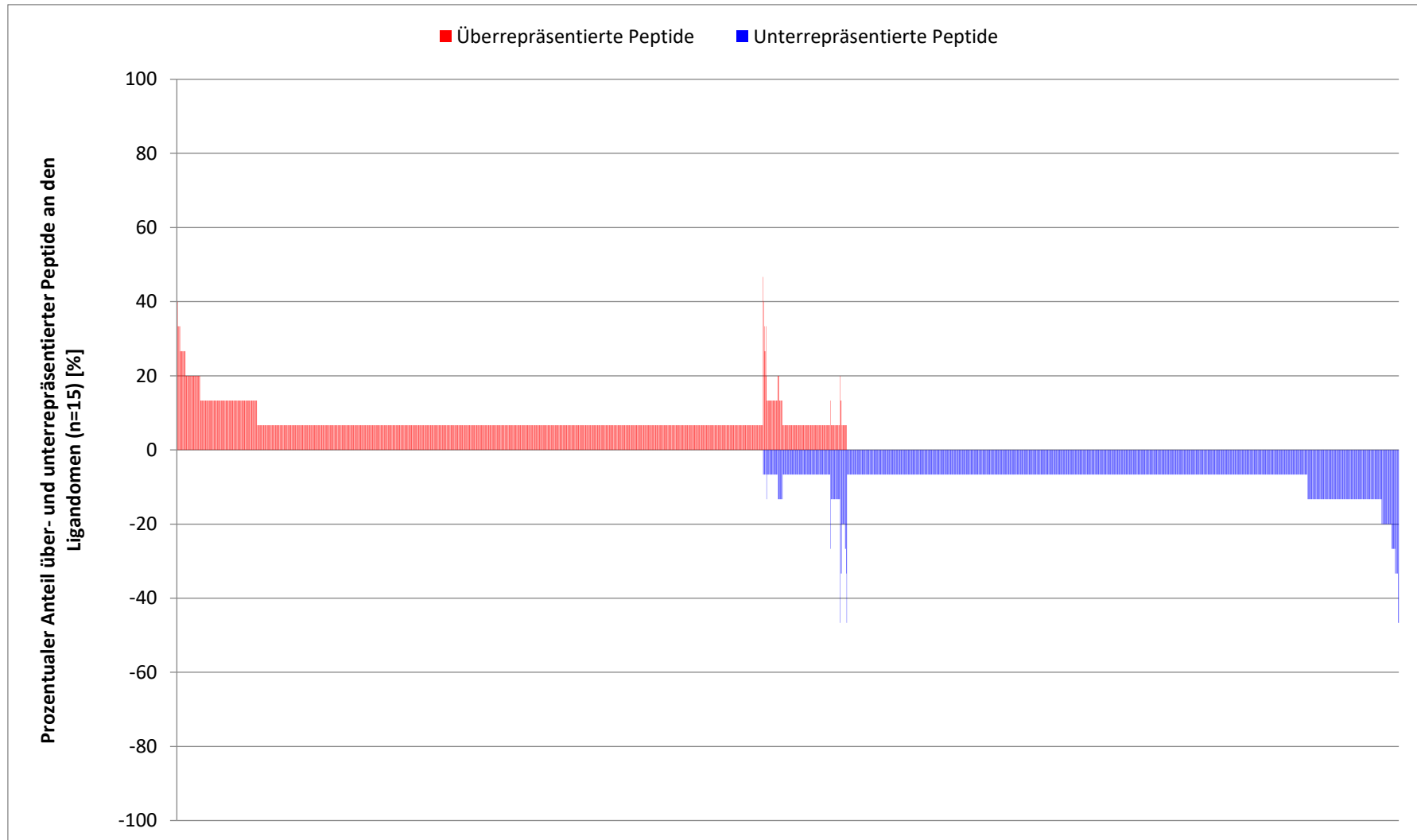
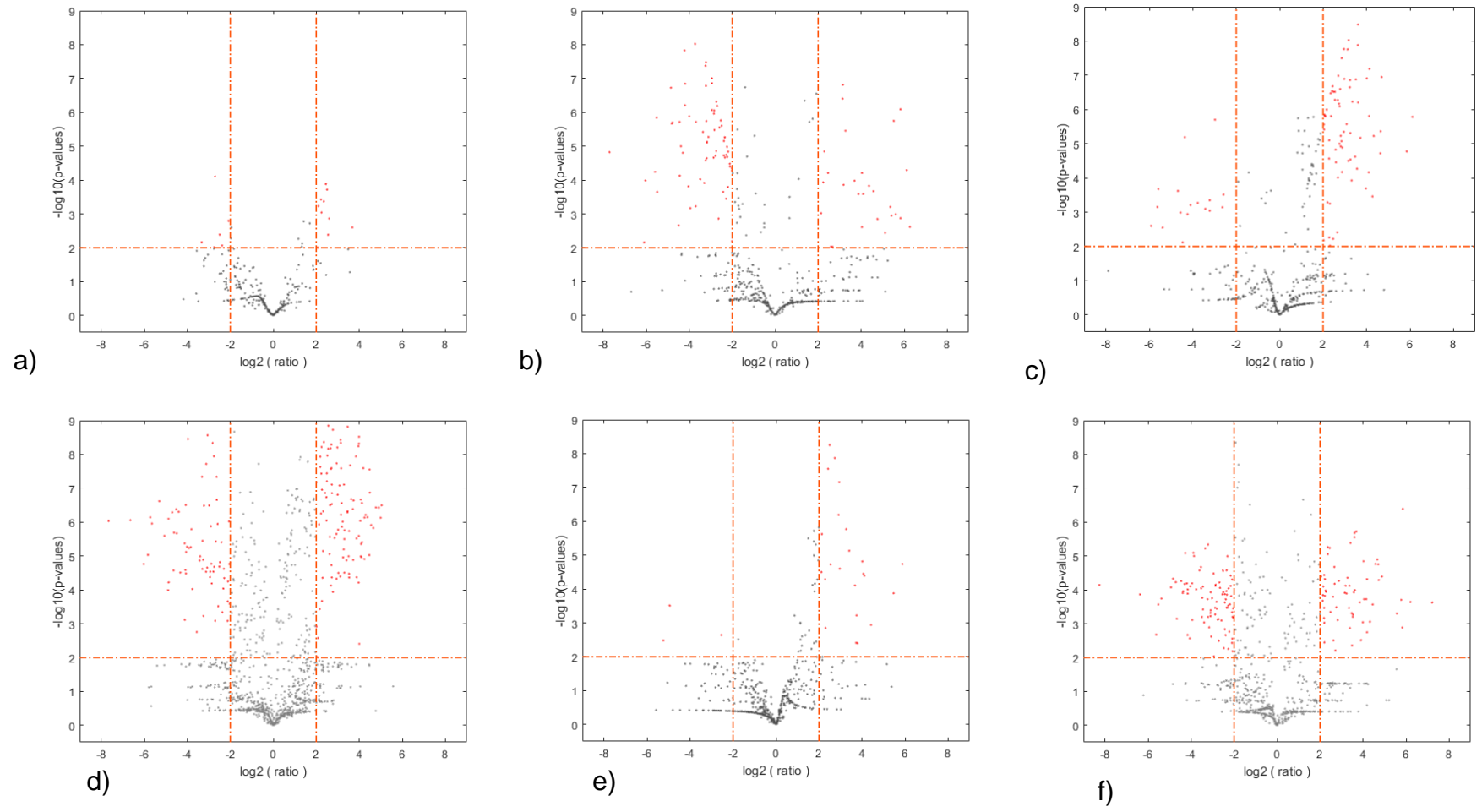


Abbildung 21: MHC-Klasse-I: Überrepräsentierte Peptide gegen unterrepräsentierte Peptide aufgetragen.

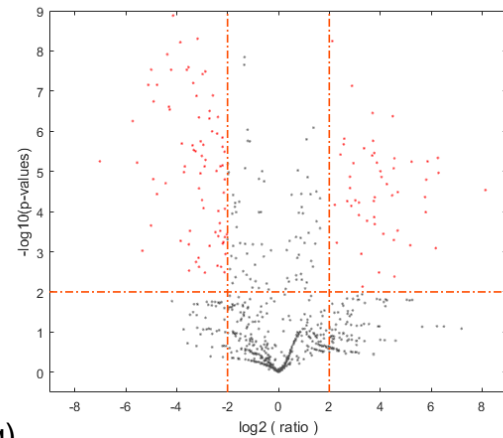
Weitere Beschriftung zu Abbildung 21, S. 112:

Vergleichende Gegenüberstellung der über- respektive unterrepräsentierten HLA-Klasse-I-Liganden der CRC- und der NMC-Proben. Es werden für diese Gegenüberstellung nur die HLA-Liganden dargestellt, die durch die semiquantitative Analyse als signifikant über-/unterrepräsentiert betrachtet werden (p-Wert kleiner als der entsprechend für die einzelne Probe Benjamini-Hochberg korrigierte Wert, der vom Signifikanzniveau  $\alpha=0,05$  ausgehend errechnet wurde und *fold change* >4).

Auf der y-Achse ist dabei der prozentuale Anteil der für einen Liganden positiven Proben an der Gesamtprobenanzahl aufgetragen ( $n(\text{CRC})=15$ ;  $n(\text{NMC})=15$ , korrespondierende Probenpaare), wobei CRC positiv und NMC negativ terminiert ist. Die Sortierung entlang der x-Achse erfolgt nach einer bestimmten Rangfolge: im ersten Schritt wird der Anteil aller positiven Tumorproben an der Gesamtheit aller für dieses Protein positiven Proben betrachtet. Es ergibt sich also ein Wert von 1 (ausschließlich auf CRC-Proben nachgewiesen) bis 0 (ausschließlich auf NMC-Proben nachgewiesen). Im zweiten Schritt (nachrangig) wird dann nach den Häufigkeiten der positiven CRC-Proben sortiert und reziprok dazu nach den Häufigkeiten auf NMC-Proben. Hierbei wird das CRC nach links, das NMC nach rechts sortiert.



## Ergebnisse



g)

**Abbildung 22: Volcano-Plots MHC-Klasse-II: a) KC53 b) KC67 c) KC89 d) KC92 e) KC93 f) KC94 g) KC97.** Die Volcano-Plots der sieben MHC-Klasse-II-Proben, für die eine vergleichende Analyse zwischen der CRC-Probe und der korrespondierenden NMC-Probe durchgeführt werden konnte. Jeder Punkt repräsentiert einen HLA-Liganden. Auf der x-Achse ist dabei der  $\log_2$ -fold change aufgetragen. Nach rechts (positiv) werden dabei die auf CRC-Proben überrepräsentierten Liganden, nach links (negativ) die auf CRC unterrepräsentierten Liganden aufgetragen. Auf der y-Achse werden die p-Werte (negativ logarithmisch zur Basis 10) dargestellt.

Rot: : signifikant überrepräsentierte Peptide (rechter oberer Quadrant), signifikant unterrepräsentierte Peptide (linker oberer Quadrant).

Als signifikant über-/unterrepräsentiert werden dabei HLA-Liganden dargestellt, deren  $fold-change > 4$  und deren p-Wert  $< 0,01$  ist.

Grau: nicht signifikant über- oder unterrepräsentierte Peptide oder Peptide, die einen  $fold-change < 4$  haben.

Missing values wurden dabei mittels des im Kapitel 3.2.2.5 beschriebenen Verfahrens ersetzt.

Zur besseren Übersicht wurde hier in allen Volcano-Plots das Signifikanzniveau bei 0,01 eingezeichnet. Für die weiteren Analysen wurden jedoch die HLA-Liganden als signifikant über-/unterrepräsentiert betrachtet, deren p-Wert kleiner als der entsprechend für die einzelne Probe Benjamini-Hochberg korrigierte Wert ist, der vom Signifikanzniveau  $\alpha=0,05$  ausgehend errechnet wurde.

Der  $fold\ change$  größer 4 vorausgesetzt ist ein hausinterner Standard (Kowalewski et al., 2016; Löffler et al., 2018b; Nelde et al., 2018). Dieser Wert soll verhindern, dass nur minimal über-/unterrepräsentierte Peptide als solche aufgefasst werden, gegen welche jedoch hochwahrscheinlich eine Toleranz seitens der T-Lymphozyten bestünde oder aber die Gefahr von irAE sehr hoch wäre (Colella et al., 2000; Gallou et al., 2016; Naftzger et al., 1996; Overwijk et al., 1998).



## Ergebnisse

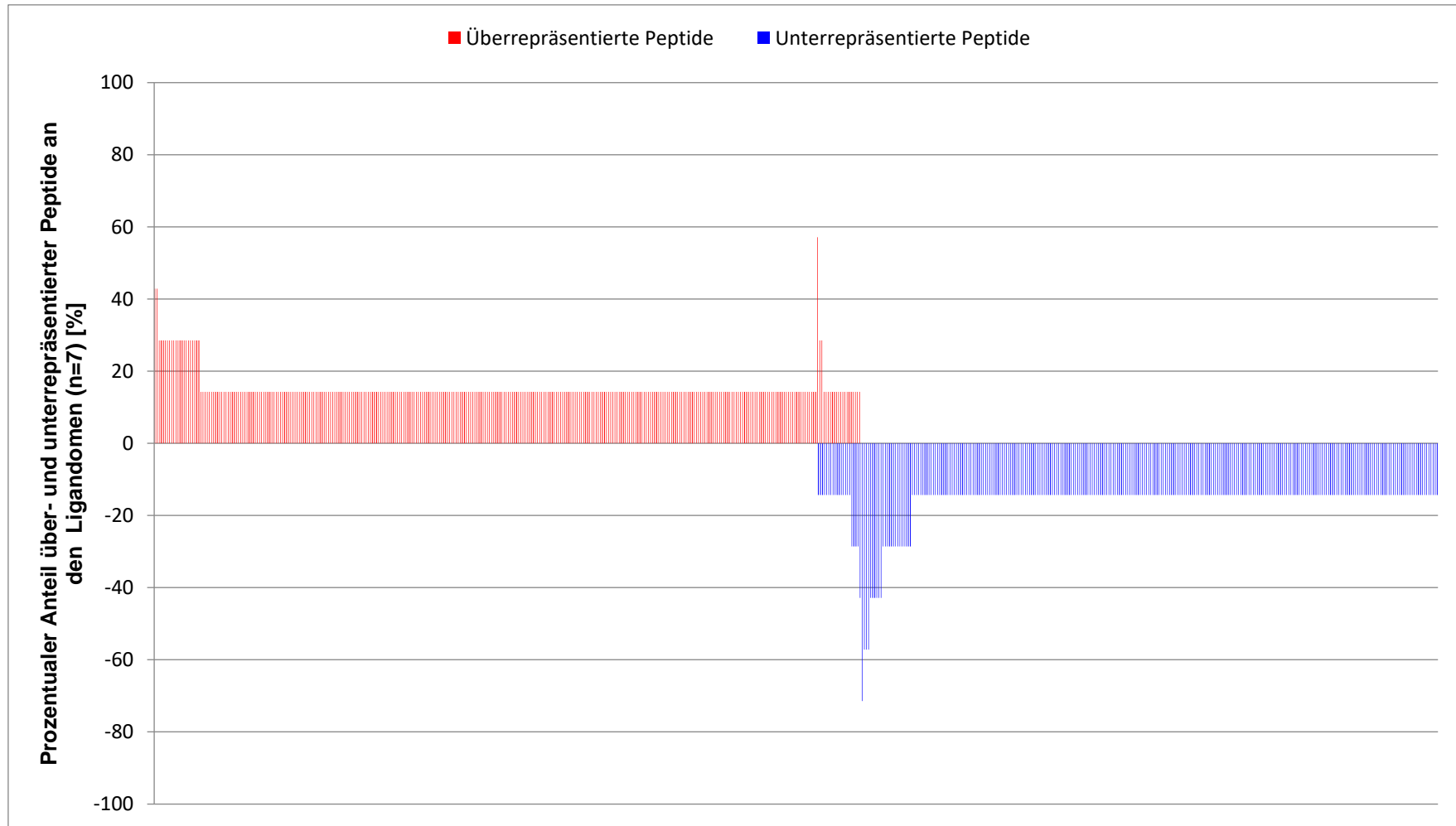


Abbildung 23: MHC-Klasse-II: Überrepräsentierte Peptide gegen unterrepräsentierte Peptide aufgetragen.

Weitere Beschriftung zu Abbildung 23, S. 116:

Vergleichende Gegenüberstellung der über- respektive unterrepräsentierten HLA-Klasse-II-Liganden der CRC- und der NMC-Proben. Es werden für diese Gegenüberstellung nur die HLA-Liganden dargestellt, die durch die semiquantitative Analyse als signifikant über-/unterrepräsentiert betrachtet werden (p-Wert kleiner als der entsprechend für die einzelne Probe Benjamini-Hochberg korrigierte Wert, der vom Signifikanzniveau  $\alpha=0,05$  ausgehend errechnet wurde und *fold change* >4).

Auf der y-Achse ist dabei der prozentuale Anteil der für einen Liganden positiven Proben an der Gesamtprobenanzahl aufgetragen ( $n(\text{CRC})=7$ ;  $n(\text{NMC})=7$ , korrespondierende Probenpaare), wobei CRC positiv und NMC negativ terminiert ist. Die Sortierung entlang der x-Achse erfolgt nach einer bestimmten Rangfolge: im ersten Schritt wird der Anteil aller positiven Tumorproben an der Gesamtheit aller für dieses Protein positiven Proben betrachtet. Es ergibt sich also ein Wert von 1 (ausschließlich auf CRC-Proben nachgewiesen) bis 0 (ausschließlich auf NMC-Proben nachgewiesen). Im zweiten Schritt (nachrangig) wird dann nach den Häufigkeiten der positiven CRC-Proben sortiert und reziprok dazu nach den Häufigkeiten auf NMC-Proben. Hierbei wird das CRC nach links, das NMC nach rechts sortiert.

## Ergebnisse

**Tabelle 20: MHC-Klasse-I: Peptidsequenzen, die auf mindestens fünf CRC-Proben überrepräsentiert sind.** „m“ in der FASTA-Formel der Peptide bezeichnet ein durch Oxidation modifiziertes Methionin.

Peptidsequenzen	Anzahl an Proben mit Upregulation	% Anteil von allen Volcano-Plots (n=15)	Positive CRC-Proben	Positive nicht-maligne Proben	Prozentualer Anteil positiver CRC-Proben (n=30)	Prozentualer Anteil positiver nicht-maligner Proben (n=35)
AAmLDTVVFK	8	53,3	25	9	83,3	25,7
GVAPFTIAR	6	40	13	8	43,3	22,9
EEVQSLPLPL	5	33,3	13	6	43,3	17,1
FGGRNPFDTF	5	33,3	11	1	36,7	2,9
GFTLGNVVGmY	5	33,3	25	10	83,3	28,6
SVDPKNYPK	5	33,3	9	1	30	2,9

**Tabelle 21: Literaturrecherche zu den Quellproteinen der überrepräsentierten Peptidsequenzen der MHC-Klasse-I.** „m“ in der FASTA-Formel der Peptide bezeichnet ein durch Oxidation modifiziertes Methionin.

Peptidsequenzen	Protein Accession	Quellprotein	Literatur
AAmLDTVVFK	O00487	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 14	<u>Diverse Ca:</u> (Gallery et al., 2007; Liu et al., 2009; Wang et al., 2015a)
GVAPFTIAR	P12111	Collagen alpha-3(VI) chain	<u>Pankreas-Ca:</u> (Arafat et al., 2011) <b>Kolorektales Ca:</b> (Qiao et al., 2015) <u>Magen-Ca:</u> (Xie et al., 2014; Yang et al., 2007)
EEVQSLPLPL	Q9NX24	H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 2	<b>Kolorektales Ca und Magen-Ca:</b> (Kim et al., 2012)
FGGRNPFDTF	P25685	DnaJ homolog subfamily B member	<u>Verhindert Apoptose bei Tumorzellen:</u> (Cui et al., 2015)
GFTLGNVVGmY	E0CX11	Uncharacterized protein C7orf73	Keine relevante Literatur gefunden
SVDPKNYPK	P01584	Interleukin-1 beta	<b>Kolorektales Ca:</b> (Gelfo et al., 2016; Mustafi et al., 2012)

#### **4.6 Tumor-assoziierte Änderung des HLA-Ligandoms und Zuordnung zu metabolischen Pfaden**

Im ersten Schritt wurden alle detektierten Quellproteine sowohl der CRC- als auch der NMC-Proben für die MHC-Klasse-I und die MHC-Klasse-II einer KEGG-Pfad-Analyse unterzogen, um generelle Veränderungen zu erkennen. Hierbei wurde jedoch kein absoluter Unterschied festgestellt (Liebermeister et al., 2014). Im nächsten Schritt wurden dann nur die tumorexklusiven Proteine und die Quellproteine zu den tumorexklusiven Peptiden, sowie die signifikant überrepräsentierten Quellproteine über die „David Database“ intrazellulären Prozessen zugeordnet. Hierbei wird sichtbar, dass viele Veränderungen im HLA-Ligandom der analysierten CRC-Proben bekannten intrazellulären „Pathways in cancer“ zugeordnet werden können (siehe Abbildung 26) (Huang et al., 2009a; Huang et al., 2009b). Beispiele sind Veränderungen der Präsentation im Wnt/ $\beta$ -Catenin-Weg (Abbildung 27), im Jak/Stat-Signalweg, im FGF/FGFR-System, der RAS/RAF-Kaskade, dem EGF-Rezeptor (Abbildung 28), bei C-myc und TGF- $\beta$  (Abbildung 27), sowie bei mTOR (Abbildung 28).

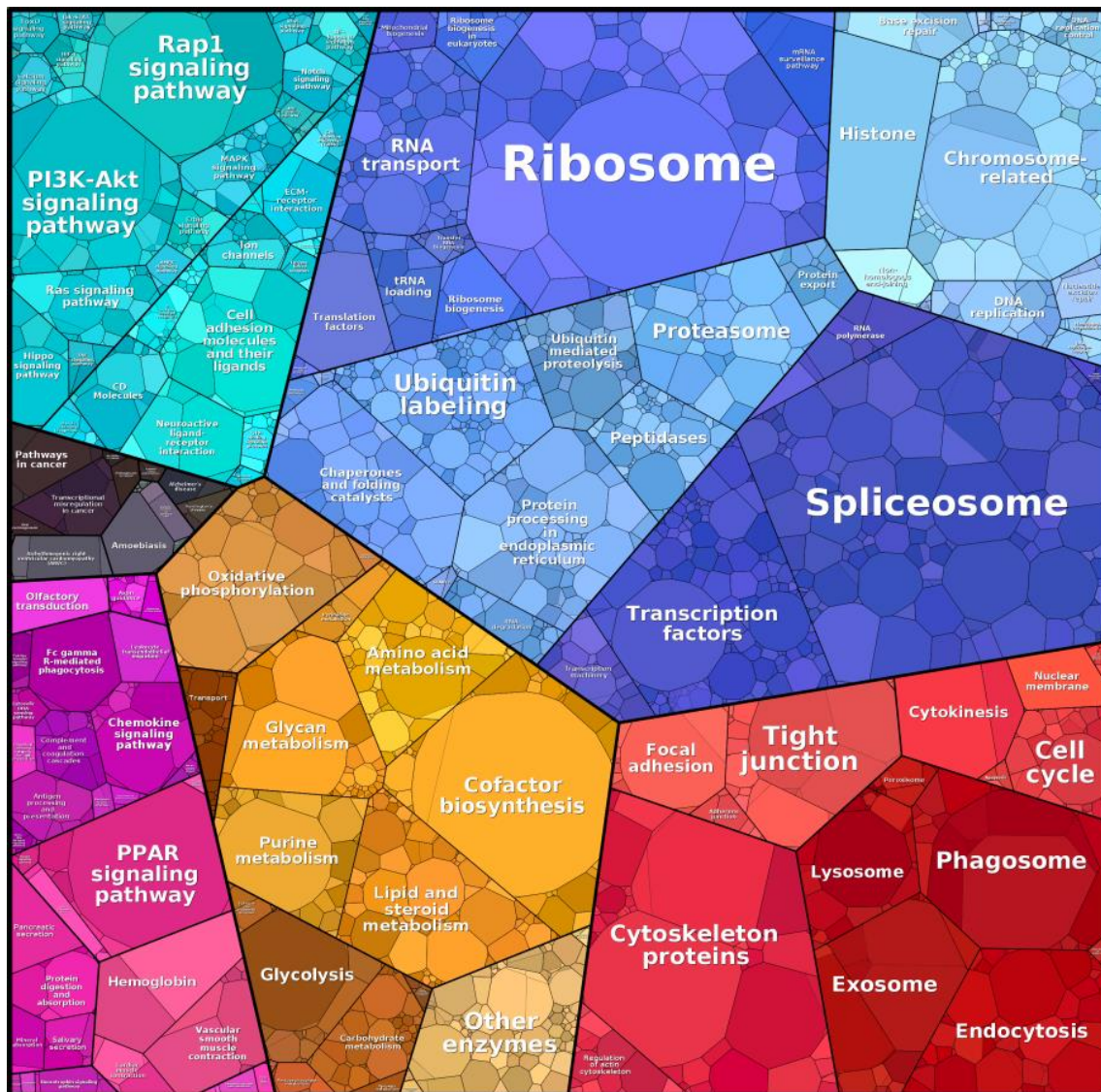
Bei den über- oder unterrepräsentierten Liganden auf den MHC-Klasse-II Molekülen wurde analog vorgegangen, jedoch waren hier die meisten Zuordnungen zu bekannten Pfaden aus Zellen des Immunsystems, wie zum Beispiel lysosomalen Strukturen oder Strukturen der Phagozytose oder der fokalen Adhäsion sowie des Komplementsystems, zu verzeichnen (Huang et al., 2009a; Huang et al., 2009b).

Um diesen Sachverhalt auch quantitativ zu visualisieren wurde mittels proteo-maps.net ein Voronoi-Diagramm erzeugt, das anhand der „Area“-Werte der tumorexklusiven und tumorüberrepräsentierten, sowie NMC-exklusiven und tumorunterrepräsentierten Peptide bzw. deren Quellproteinen, die präsentierten Proteine metabolischen intrazellulären Prozessen zuordnet und gleichzeitig durch die zugeordneten Flächen einen quantitativen Aspekt der entsprechenden Veränderung der Präsentation darstellt. Durch die Kombination von tumorexklusiven und NMC-exklusiven Proteinen, sowie den über- und unterrepräsentierten

Proteinen gelingt die umfassende Darstellung aller detektierten Veränderungen des HLA-Ligandoms (Liebermeister et al., 2014; Otto et al., 2010).

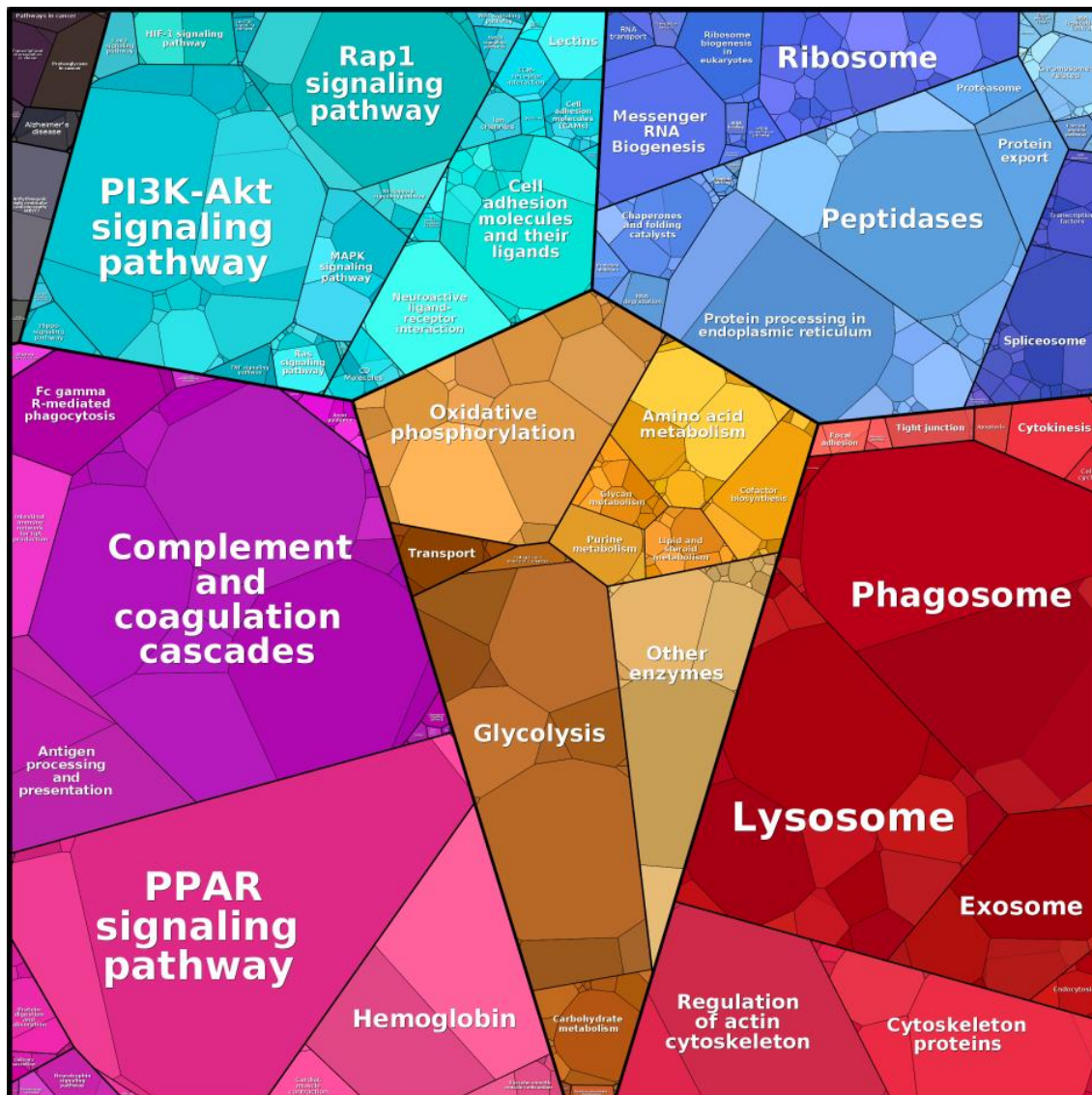
Bei den auf MHC-Klasse-I präsentierten Liganden (siehe Abbildung 24) stammen viele aus dem Bereich der RNA-Biosynthese (Ribosomen/Spliceosomen), sowie aus den intrazellulären Signalkaskaden (PI3K, Rap1, Ras, MAPK) und aus der Proteinprozessierung am endoplasmatischen Retikulum. Ferner können einige dieser HLA-Liganden zu epigenetischen Regulationsprozessen (z.B. bei den Histonkomplexen) und zu direkten Änderungen am Chromosomensatz zugeordnet werden. Auch die Zuordnung zu bekannten „*Pathways in cancer*“ wird wieder deutlich (siehe Abbildung 24, schwarzes Feld linker Rand). Dieses Feld ist verhältnismäßig groß dafür, dass bekannte tumorspezifische Prozesse diesen verändert präsentierten HLA-Klasse-I-Liganden zugeordnet werden können. Es zeigt sich daher, dass sich die veränderten Proteome der CRC-Proben ebenfalls zu einem Großteil im Ligandom wiederfinden.

Bei den präsentierten MHC-Klasse-II-Liganden handelt es sich größtenteils um Proteine aus dem Bereich der Immunzellen (Phagosomen, Lysosomen, PPAR-Signalweg), jedoch ebenfalls aus dem Bereich der Signalkaskaden (PI3K, Rap1, MAPK) und der RNA-Biosynthese (siehe Abbildung 25).



**Abbildung 24: Voronoi-Diagramm MHC-Klasse-I CRC und NMC kombiniert.** Tumorexklusive und NMC-exklusive MHC-Klasse-I-Liganden und die Quellproteine zu den exklusiven Peptiden, sowie signifikant im Tumor über- und unterrepräsentierte Peptide bzw. deren Quellproteine wurden anhand der „Area“-Werte metabolischen intrazellulären Prozessen zugeordnet und gleichzeitig wird durch die zugeordneten Flächen ein quantitativer Aspekt der entsprechenden Veränderung der Präsentation dargestellt. Bei den auf MHC-Klasse-I präsentierten Liganden stammen viele aus dem Bereich der RNA-Biosynthese (Ribosomen/Spliceosomen), aus den intrazellulären Signalkaskaden (PI3K, Rap1, Ras, MAPK) und aus der Proteinprozessierung am endoplasmatischen Retikulum. Zudem können viele der Peptide und ihre Quellproteine bekannten „Pathways in cancer“ zugeordnet werden (schwarzes Feld am linken Rand). Dieses Feld ist verhältnismäßig groß dafür, dass bekannte tumorspezifische Prozesse diesen verändert präsentierten HLA-Klasse-I-Liganden zugeordnet werden können. Es zeigt sich daher, dass sich die veränderten Proteome der CRC-Proben ebenfalls zu einem Großteil im Ligandom wiederfinden. Dieses Voronoi-Diagramm wurde mittels proteo-maps.net erzeugt.





**Abbildung 25: Voronoi-Diagramm MHC-Klasse-II CRC und NMC kombiniert.** Tumorexklusive und NMC-exklusive MHC-Klasse-II-Liganden und die Quellproteine zu den exklusiven Peptiden, sowie signifikant im Tumor über- und unterrepräsentierte Peptide bzw. deren Quellproteine wurden anhand der „Area“-Werte metabolischen intrazellulären Prozessen zuordnet und gleichzeitig wird durch die zugeordneten Flächen ein quantitativer Aspekt der entsprechenden Veränderung der Präsentation darstellt. Bei den auf MHC-Klasse-II präsentierte Liganden stammen viele aus dem Bereich der Immunzellen (Phagosomen, Lysosomen, PPAR-Signalweg), jedoch ebenfalls aus dem Bereich der Signalkaskaden (PI3K, Rap1, MAPK) und der RNA-Biosynthese. Dieses Voronoi-Diagramm wurde mittels proteomaps.net erzeugt.

## Ergebnisse

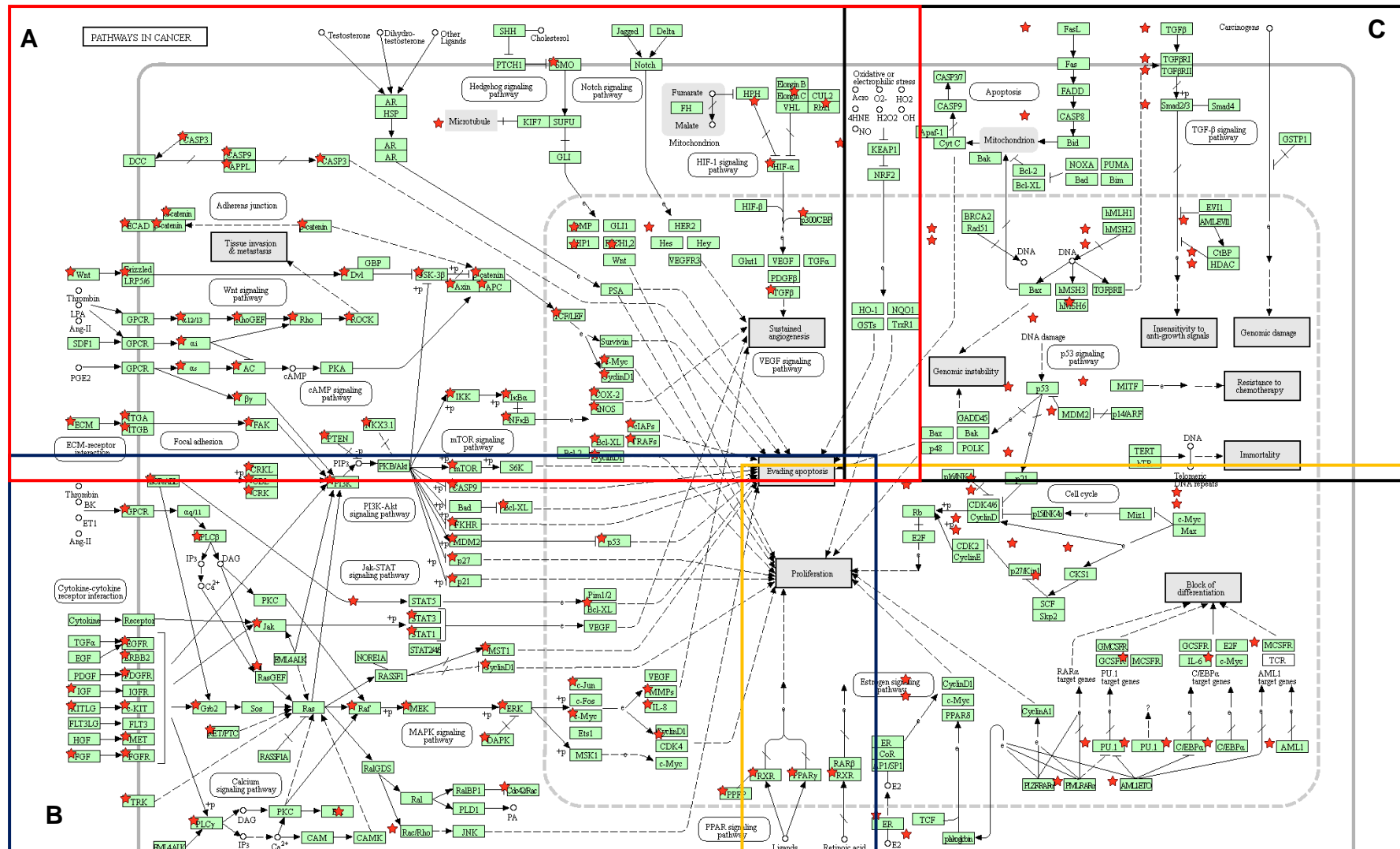
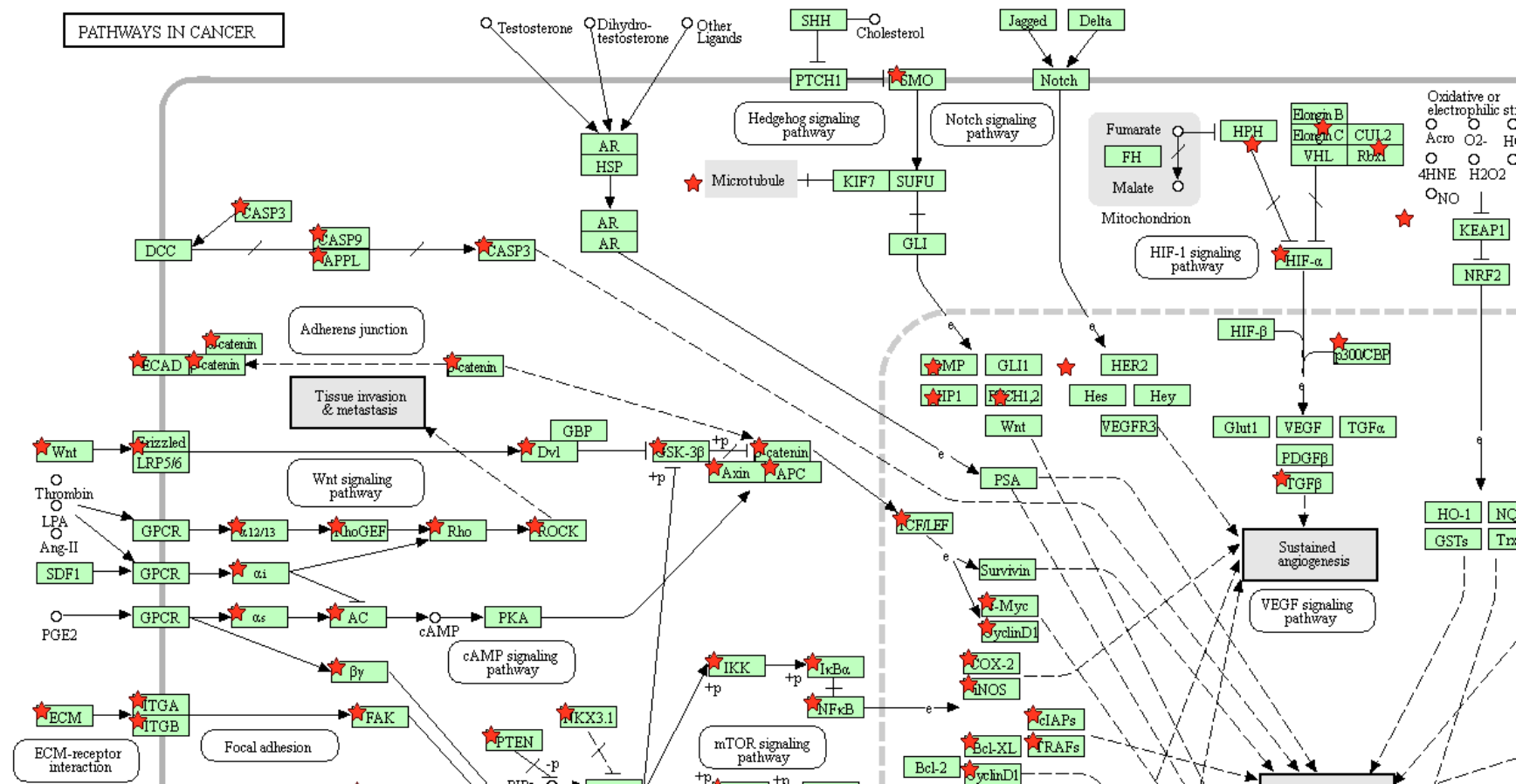


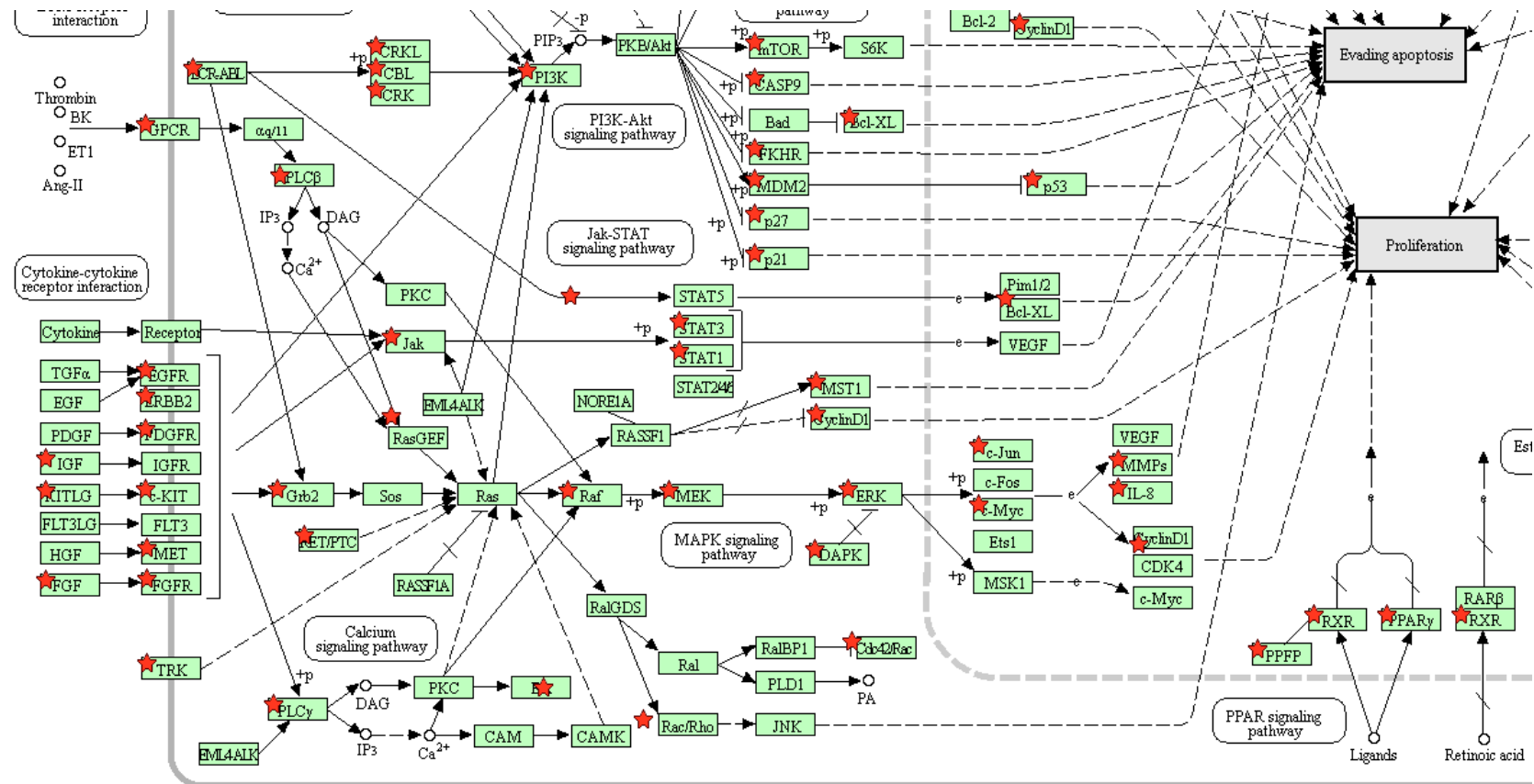
Abbildung 26: Überrepräsentierte und tumorexklusive MHC-Klasse-I-Liganden aus den CRC- und NMC-Proben verglichen mit bekannten metabolischen Pfaden in Karzinomen (nach david.ncicrf.gov (Huang et al., 2009a; Huang et al., 2009b)). Roter Stern: markiert die Zuordnung, der in den analysierten Proben überrepräsentierter und tumorexklusiv präsentierter Proteine. In den weiteren Abbildungen werden die entsprechenden Abschnitte dieses Schaubildes vergrößert dargestellt: Abschnitt A (rotes Rechteck) in Abbildung 27, Abschnitt B (blaues Rechteck) in





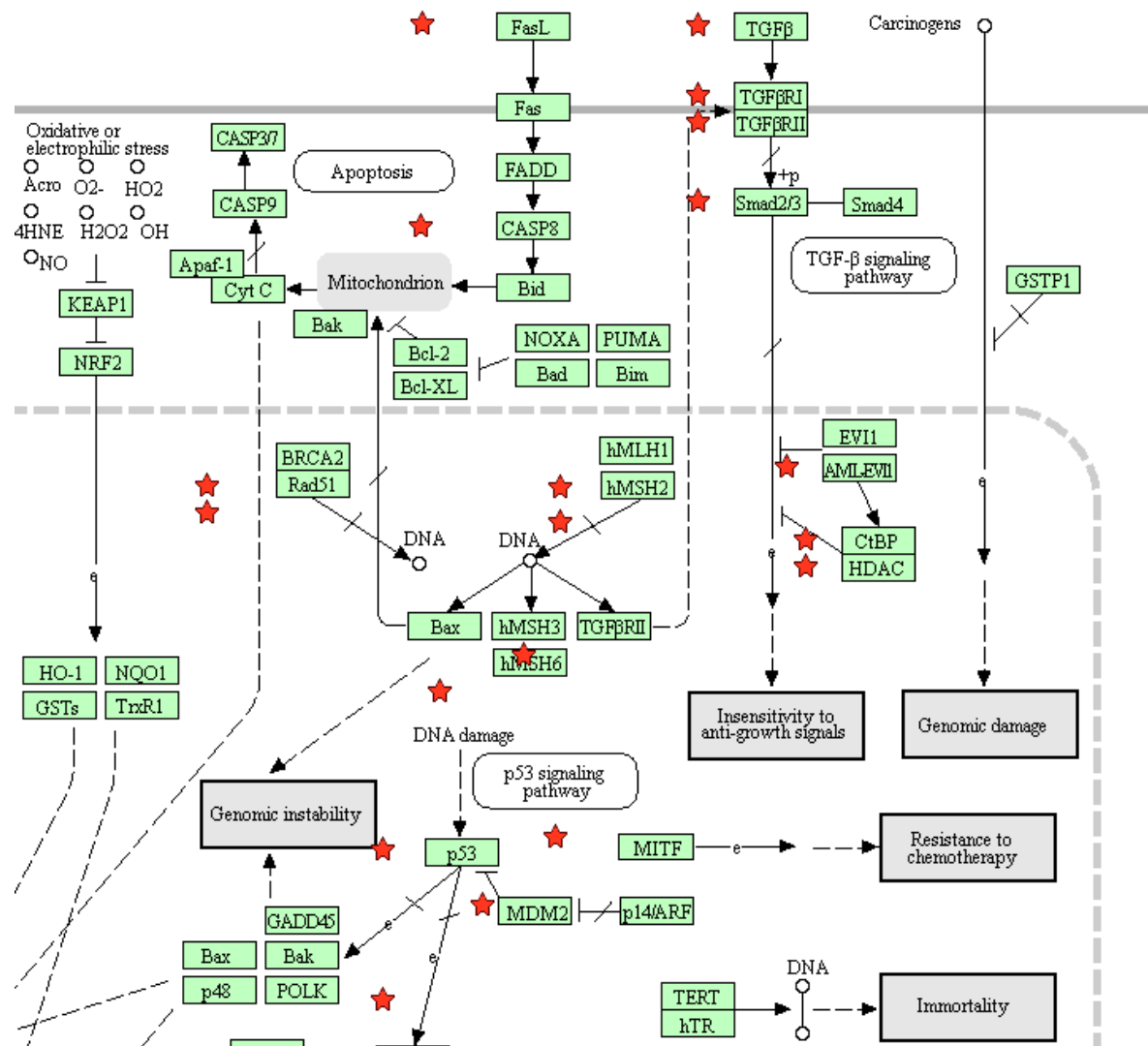
**Abbildung 27: Ausschnitt A: Überrepräsentierte und tumorexklusive MHC-Klasse-I-Liganden aus den CRC- und NMC-Proben verglichen mit bekannten metabolischen Pfaden in Karzinomen (nach david.ncicrf.gov (Huang et al., 2009a; Huang et al., 2009b)).** Die tumorexklusiven Proteine und die Quellproteine zu den tumorexklusiven Peptiden, sowie die signifikant überrepräsentierten Quellproteine wurde über die „David Database“ intrazellulären Prozessen zugeordnet. Hierbei wird sichtbar, dass viele Veränderungen im HLA-Ligandom der analysierten CRC-Proben bekannten intrazellulären „Pathways in Cancer“ zugeordnet werden können. Die roten Sterne markieren die Zuordnung der bekannten Proteine/Enzyme in den „Pathways in Cancer“ zu den in den analysierten Proben überrepräsentierten und tumorexklusiv präsentierten Proteinen. Bekannte „Pathways in Cancer“ für verschiedene Karzinome (auch für das CRC), in denen eine Veränderung der Präsentation der daraus stammenden HLA-Liganden festzustellen war, sind in diesem Abschnitt beispielsweise der Wnt/β-Catenin-Weg, sowie C-myc und TGF-β.

## Ergebnisse

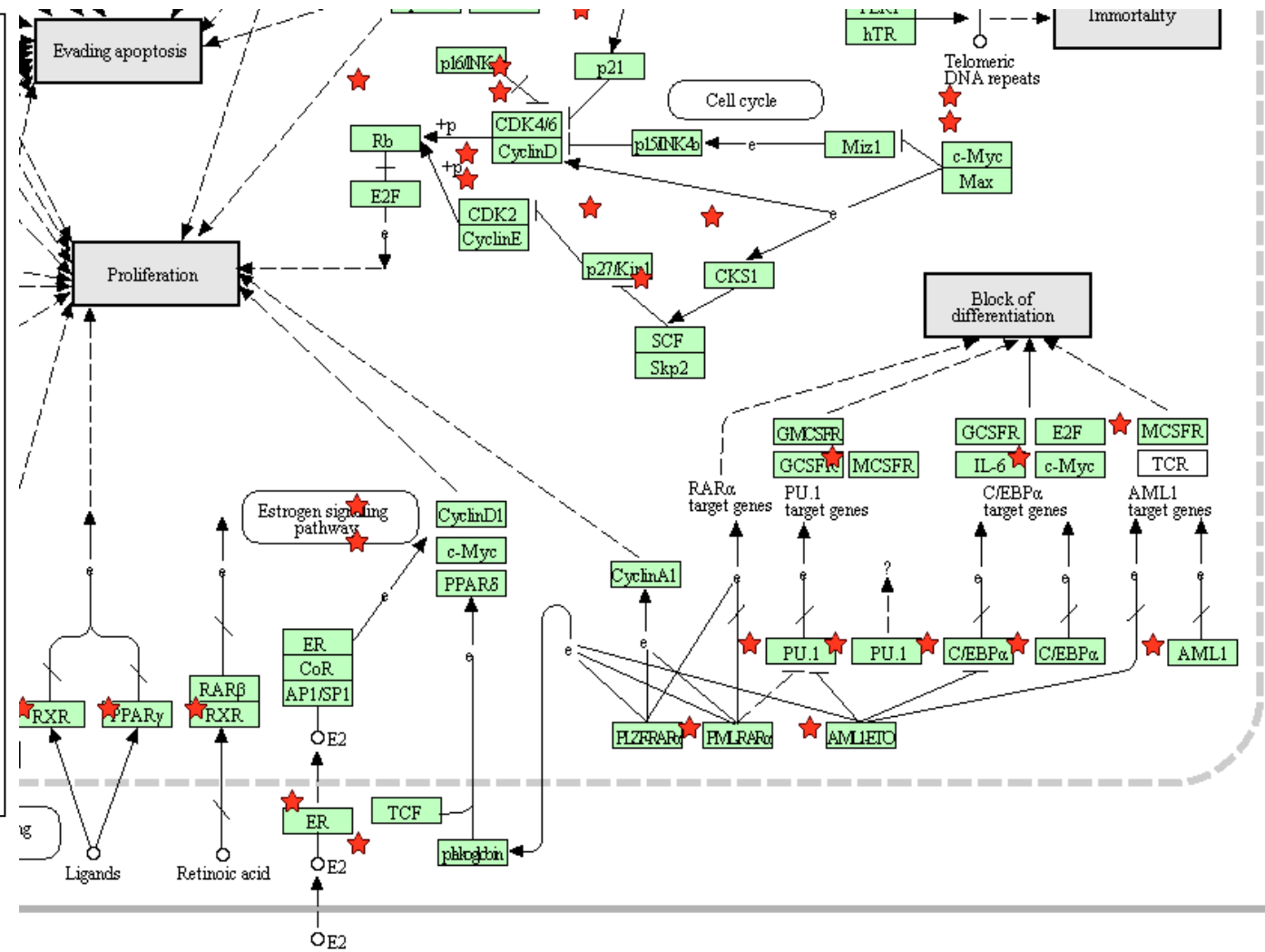


**Abbildung 28: Ausschnitt B: Überrepräsentierte und tumorexklusive MHC-Klasse-I-Liganden aus den CRC- und NMC-Proben verglichen mit bekannten metabolischen Pfaden in Karzinomen (nach david.ncicfcrf.gov (Huang et al., 2009a; Huang et al., 2009b)).** Die tumorexklusiven Proteine und die Quellproteine zu den tumorexklusiven Peptiden, sowie die signifikant überrepräsentierte Quellproteine wurde über die „David Database“ intrazellulären Prozessen zugeordnet. Hierbei wird sichtbar, dass viele Veränderungen im HLA-Ligandom der analysierten CRC-Proben bekannten intrazellulären „Pathways in Cancer“ zugeordnet werden können. Die roten Sterne markieren die Zuordnung der bekannten Proteine/Enzyme in den „Pathways in Cancer“ zu den in den analysierten Proben überrepräsentierten und tumorexklusiv präsentierten Proteinen. Bekannte „Pathways in Cancer“ für verschiedene Karzinome (auch für das CRC), in denen eine Veränderung der Präsentation der daraus stammenden HLA-Liganden festzustellen war, sind in diesem Abschnitt beispielsweise der Jak/Stat-Signalweg, das FGF/FGFR-System, die RAS/RAF-Kaskade, der EGF-Rezeptor sowie mTOR.

**Abbildung 29: Ausschnitt C: Überrepräsentierte und tumorexklusive MHC-Klasse-I-Liganden aus den CRC- und NMC-Proben verglichen mit bekannten metabolischen Pfaden in Karzinomen (nach david.ncifcrf.gov (Huang et al., 2009a; Huang et al., 2009b)).** Die tumorexklusiven Proteine und die Quellproteine zu den tumorexklusiven Peptiden, sowie die signifikant überrepräsentierten Quellproteine wurde über die „David Database“ intrazellulären Prozessen zugeordnet. Hierbei wird sichtbar, dass viele Veränderungen im HLA-Ligandom der analysierten CRC-Proben bekannten intrazellulären „Pathways in Cancer“ zugeordnet werden können. Die roten Sterne markieren die Zuordnung der bekannten Proteine/Enzyme in den „Pathways in Cancer“ zu den in den analysierten Proben überrepräsentierten und tumorexklusiv präsentierten Proteinen. Bekannte „Pathways in Cancer“ für verschiedene Karzinome (auch für das CRC), in denen eine Veränderung der Präsentation der daraus stammenden HLA-Liganden festzustellen war, sind in diesem Abschnitt beispielsweise der TGF-β und p53.



**Abbildung 30: Ausschnitt D: Überrepräsentierte und tumorexklusive MHC-Klasse-I-Liganden aus den CRC- und NMC-Proben verglichen mit bekannten metabolischen Pfaden in Karzinomen (nach david.ncifcrf.gov (Huang et al., 2009a; Huang et al., 2009b)).** Die tumorexklusiven Proteine und die Quellproteine zu den tumorexklusiven Peptiden, sowie die signifikant überrepräsentierte Quellproteine wurde über die „David Database“ intrazellulären Prozessen zugeordnet. Hierbei wird sichtbar, dass viele Veränderungen im HLA-Ligandom der analysierten CRC-Proben bekannten intrazellulären „Pathways in Cancer“ zugeordnet werden können. Die roten Sterne markieren die Zuordnung der bekannten Proteine/Enzyme in den „Pathways in Cancer“ zu den in den analysierten Proben überrepräsentierten und tumorexklusiv prä-sentierten Proteinen.



## 5 Diskussion

### 5.1 Allgemeines

Das kolorektale Karzinom ist der zweithäufigste zum Tode führende Tumor in Europa und in Amerika. Obwohl die 5-Jahres-Überlebensrate unabhängig vom Stadium bei 64% (+/- 10%) liegt, so liegt sie beim metastasierten Stadium nur noch bei 14% (+/- 10%) (Siegel et al., 2020). Da eine Diagnosestellung in 21% der Fälle erst in diesem Stadium erfolgt (Siegel et al., 2020), wären Alternativen in der Therapie wünschenswert.

Die Immuntherapie, in all ihren Facetten, ist bei vielen Tumoren in der Erprobung und teilweise bereits fest in die Standardtherapie integriert. Vor allem die Checkpointinhibitoren (PD-1-Inhibitoren) sind zum Beispiel beim malignen Melanom (Callahan, 2016; Hodi et al., 2010) und dem NSCLC integraler Bestandteil der Therapie geworden (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft), 2018; Reck et al., 2016). Auch beim kolorektalen Karzinom wurde für die Subgruppe der MSI-Karzinome die klinische Effektivität der Checkpointblockade nachgewiesen (Brahmer et al., 2012; Le et al., 2015; Mlecnik et al., 2016; Topalian et al., 2012). Die deutsche Leitlinie sieht zum aktuellen Zeitpunkt (März 2020) die PD-1-Blockade noch nicht als Therapie beim kolorektalen Karzinom vor (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft), 2019). Die „American Cancer Society“ sieht hingegen die Checkpoint-Blockade in Form von PD-1-Inhibitoren oder in der Kombination von CTLA-4 und PD-1-Inhibitoren für chemotherapierefraktäre CRCs mit speziellen Genveränderungen vor ([www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/treating/immunotherapy.html](http://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/treating/immunotherapy.html), 07.03.2019). Die Wirksamkeit der Checkpointblockade wurde jedoch primär nur bei MSI-CRCs gezeigt, sodass davon ausgegangen wurde, dass eine große Anzahl an Neoepitopen für die Wirksamkeit der Checkpointinhibitoren unerlässlich ist (Le et al., 2015). Mlecnik et. al. konnten jedoch zeigen, dass die Zusammensetzung der tumorinfiltrierenden Immunzellen (vor allem T- und B-Lymphozyten) stärker mit dem PFS korreliert, als die Anzahl an Mutationen/Neoepitopen. Es konnte daher auch gezeigt werden, dass ein kleiner Anteil der MSI-CRCs eben keine höhere Überlebensrate hat, als die MSS-CRCs und im Gegenzug eine

Subgruppe der MSS-CRCs eine höhere Überlebensrate hat (Mlecnik et al., 2016). Diese Daten zeigen, dass ein tiefgreifendes Wissen über das HLA-Ligandom der CRC unerlässlich für die weitere Immuntherapie ist bzw. um deren Wirksamkeit zum einen voraussagen zu können oder aber im nächsten Schritt verbessern zu können (Fritsche et al., 2018). Auch für die weiteren Immuntherapien ist solch ein Verständnis elementar, vor allem zur Definition von Zielantigenen. Dies ist sowohl für den adoptiven Zelltransfer als auch für die Vakzinierung unerlässlich. Viele der bisher durchgeführten Studien zeigen hier eine extrem eingeschränkte Auswahl an Zielantigenen (häufig CEA oder MAGE) (Wagner et al., 2018). Zudem haben frühere Studien häufig nach tumorspezifischen Neoepitopen gesucht, die auf Mutationen basieren, und damit nur individualisiert auf den entsprechenden Patienten und Tumor passend sind (Bassani-Sternberg et al., 2016; Fritsche et al., 2018). Daher soll hier auch ein Grundstein für ein „Warehouse“ gelegt werden, damit ggf. verschiedene Zielantigene bei einem entsprechenden HLA-Typ des Patienten ausgewählt werden können, ohne dass jeweils der einzelne Tumor analysiert werden muss. Aber auch die neuen vielversprechenden Ansätze, wie zum Beispiel die *T-cell-receptor mimic-antibodies (TCRm-mAB)*, bedürfen eines tiefgreifenden Verständnisses des HLA-Ligandoms. Bei den TCRm-mAB ist neben dem Zielpeptid für die erfolgreiche Therapie auch das HLA-Peptid, auf dem das Zielpeptid präsentiert wird, entscheidend (Dubrovsky et al., 2016; Li et al., 2017).

## 5.2 MHC-Klasse-I

Für die MHC-Klasse-I konnten insgesamt 21 269 verschiedene Peptidsequenzen (63 539 *unique peptides*) auf malignem und nicht-malignem Gewebe identifiziert werden. Dies macht im Median 910 verschiedene Peptidsequenzen (1498 *unique peptides*) pro Probe aus 8678 Quellproteinen (im Median 926) stammend. Verglichen mit ähnlichen Studien zu soliden Tumoren kann daher von einer ähnlichen Ausbeute an Peptiden gesprochen werden. So konnten Schuster et. al. im Median 1381 *unique peptides* auf Ovarialzelltumoren nachweisen, die aus 10 677 Quellproteinen stammen (Median 1334 Quellproteine pro Probe). Des Weiteren ist die Probenanzahl mit 42 Proben zu der hier durchgeführten Analyse

vergleichbar (Schuster et al., 2017). Auch die Arbeit von Bassani-Sternberg et al., bei der 35 Melanomproben massenspektrometrisch untersucht worden sind, ergab mit insgesamt 78 605 *unique peptides* aus 12 663 Quellproteinen einen vergleichbaren Wert zu der hier durchgeführten Analyse (Bassani-Sternberg et al., 2016).

Auch eine HLA-Ligandom Analyse bei der chronisch lymphatischen Leukämie erbrachte in etwa die gleiche mediane Ausbeute an Peptiden pro Probe (Bilich et al., 2018).

Für das kolorektale Karzinom ist nach meinem Kenntnisstand bisher keine so umfassende Analyse des HLA-Ligandoms durchgeführt worden und die Kenntnis darüber lückenhaft (März 2020). Kochin et al. konnten so zum Beispiel nur an insgesamt vier CRC-Proben mittels MS-Analyse im Median 104 Peptide pro Probe identifizieren (Kochin et al., 2017).

Einige Studien haben versucht durch eine Analyse des Genoms und des Transkriptoms tumorspezifische Antigene vorherzusagen (Majumder et al., 2018). Jedoch zeigt sich, dass es im Allgemeinen einen erheblichen Unterschied zwischen dem Transkriptom/Peptidom und dem HLA-Ligandom der (Tumor-)zellen gibt (Altman et al., 1994; Freudenmann et al., 2018; Nature Publishing Group, 2017) und dies ferner auch noch abhängig vom HLA-Typ des Patienten ist (Bassani-Sternberg et al., 2015; Freudenmann et al., 2018). Ein umfassendes Bild des HLA-Ligandoms des kolorektalen Karzinoms fehlt daher bisher.

Die anschließend durchgeführte Literaturrecherche zu den Quellproteinen und den Peptidsequenzen zeigt eindrucksvoll, dass die detektierten Proteine und Peptide im Rahmen des kolorektalen Karzinoms oder aber im Rahmen anderer Tumore bereits als alteriert, und zumeist in der Pathogenese wichtig, vorbeschrieben sind. Dies zeigt zum einen die Plausibilität der Ergebnisse und zum anderen können damit tatsächlich auf HLA-Liganden präsentierte aberrierte Proteine bzw. deren Peptide identifiziert werden, die bisher auf der Ebene des Genoms bzw. des Proteoms vorbeschrieben worden sind (vgl. Tabelle 13 und Tabelle 14).

Auch die zugrunde liegenden HLA-Haplotypen der Proben, die 95,6% aller Kaukasier abdecken, umfasst das breiteste mir bekannte Spektrum, da bei anderen

Studien zumeist nur einzelne HLA-Haplotypen (z.B. HLA-A\*02, HLA-A\*24) und deren Liganden untersucht worden sind (Kawamura et al., 2018; Kochin et al., 2017; Maughan et al., 2012; Mayer et al., 2012).

Durch den Abgleich der tatsächlichen HLA-Typisierungen der Probe mit den Datenbanken SYFPEITHI und NetMHC konnte in fast allen Fällen auch eine Übereinstimmung der vorhergesagten HLA-Bindung und des tatsächlichen HLA-Typs der Probe hergestellt werden. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Peptide auf den entsprechenden HLA-Molekülen präsentiert worden sind und es sich nicht um beliebige Peptidfragmente handelt, was die Reinheit bzw. die Qualität dieser Analyse nochmals bestätigt.

Die umfassende Analyse des HLA-Ligandoms des nicht-malignen Kolongewebes ist, soweit mir bekannt, ebenfalls die ausführlichste Analyse des HLA-Ligandoms von gesundem Kolongewebe. Besonders ist zudem das Vorliegen des Ligandoms des CRC- und des korrespondierenden Normalgewebes. Aber auch allein betrachtet stellt die Analyse des nicht-malignen Kolongewebes einen wichtigen Bestandteil zum Verständnis des HLA-Ligandoms dar. So kann zum einen das regelhafte HLA-Ligandom von Kolongewebe abhängig vom HLA-Typ klassifiziert werden, zum anderen dient das HLA-Ligandom auch zum Abgleich in Datenbanken für potentielle Zielantigene auf anderen Geweben. Damit kann ausgeschlossen werden, dass ein potentielles Zielantigen zwar isoliert auf Tumorgewebe eines anderen Organs vorkommt, jedoch zum regelhaften Ligandom bei Kolongewebe gehört, was eine irAE solch einer Vakzine deutlich wahrscheinlicher werden lässt (Freudenmann et al., 2018).

Beispielhaft soll auf zwei Peptidsequenzen näher eingegangen werden. Das Peptid GLALKVQEV als MHC-Klasse-I-Ligand konnte auf 31 % der kolorektalen Tumoren nachgewiesen werden. Dieses Peptid kann dem Protein Tensin-4 (Q8IZW8) zugeordnet werden, welches ein bekanntes Onkogen des kolorektalen Karzinoms ist (Albasri et al., 2011, Albasri et al., 2014, Thorpe et al., 2015). Es ist auf das HLA-A\*02:01 Molekül restringiert. Ein weiteres vielversprechendes Zielantigen ist IRPNIILVL. Es konnte ebenfalls nur auf Tumorproben (31 %) nachgewiesen werden und stammt aus der extrazellulären Sulfatase-1 (Q8IWU6). Dieses Peptid wird auf HLA-C\*07:01, HLA-C\*07:02 und HLA-C\*06:02 präsentiert.



Es ist als tumorassoziiert bekannt, sowohl vom Mammakarzinom (Okolicsanyi et al., 2014), als auch vom Pankreaskarzinom (Nawroth et al., 2007) und dem kolorektalen Karzinom (Vicente et al., 2015). Bei den letzten beiden konnte eine Verbindung zum Wnt-Signalweg dargelegt werden, sodass die extrazelluläre Sulfatase-1 beim kolorektalen Karzinom eine wichtige Rolle einnimmt. Eine Autoimmunität gegen die höheren Spiegel der extrazellulären Sulfatase-1 bei Patienten mit kolorektalem Karzinom konnte ebenfalls nachgewiesen werden (Babel et al., 2011), sodass davon auszugehen ist, dass das gefundene Antigen als mögliches Zielantigen einer Immuntherapie in Frage kommt. Nichtsdestotrotz sollte auch hier eine immunologische Testung erfolgen.

### **5.3 MHC-Klasse-II**

Für die MHC-Klasse-II konnten insgesamt 7448 verschiedene Peptidsequenzen (20 823 *unique peptides*) auf malignem und nicht-malignem Gewebe identifiziert werden. Dies macht im Median 430 verschiedene Peptidsequenzen pro Probe, die aus 2079 Quellproteinen (im Median 304) stammen.

Dies ist nach meinem Wissen (März 2020) die Identifikation der meisten MHC-Klasse-II-Liganden des kolorektalen Karzinoms. Für andere solide Tumoren ist mir nur eine weitere Arbeit von Schuster et al. bekannt, die auf Ovarialzelltumoren MHC-Klasse-II-Liganden identifiziert haben. Diese erzielten mit insgesamt 17 334 *unique peptides* (Median 697) eine mit der hier durchgeführten Analyse vergleichbare Ausbeute (Schuster et al., 2017). Eine weitere ähnliche Arbeit beschäftigt sich vorwiegend mit dem Nierenzellkarzinom, ist allerdings von der Dimension her weitaus kleiner angelegt (Dengjel et al., 2006).

Auf welchen Zellen genau die MHC-Klasse-II-Liganden präsentiert worden sind, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht eruiert werden. Prinzipiell ist anzunehmen, dass die MHC-Klasse-II-Liganden vorwiegend aus den tumorinfiltrierenden Immunzellen (Leukozyten) stammen, da nur Immunzellen regelhaft MHC-Klasse-II Moleküle unter physiologischen Bedingungen präsentieren. Analysen anderer Tumore deuten jedoch darauf hin, dass auch die Tumorzellen direkt MHC-Klasse-II Moleküle präsentieren. Dies konnte zum Beispiel für das

Ovarialkarzinom (Schuster et al., 2017), das nichtkleinzellige Bronchialkarzinom (He et al., 2017), das Nierenzellkarzinom (Dengjel et al., 2006), als auch für das Mammakarzinom gezeigt werden (Park et al., 2017). Für das kolorektale Karzinom gibt es ebenfalls Studien darüber, dass auf Tumorzellen (und auch auf nicht-malignem Kolongewebe) eine MHC-Klasse-II-Expression stattfindet (Degener et al., 1988; McDougall et al., 1990; Momburg et al., 1986). Jedoch zeigte sich gerade beim kolorektalen Karzinom, dass die MHC-Klasse-II-Expression verglichen mit dem nicht-malignen Kolongewebe vermindert ist (McDougall et al., 1990).

Die Rolle der MHC-Klasse-II-Liganden zur Immuntherapie ist noch nicht endgültig geklärt. Durch die parallele Stimulation sowohl der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen als auch der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wird eine stärkere und länger anhaltende Immunantwort gegen das entsprechende Antigen erzeugt (Gnjatic et al., 2003; Pardoll et al., 1998; Topalian, 1994). Qin et al. konnten zeigen, dass die CD4<sup>+</sup>-T-Zellen sogar eine eigene von den CD8<sup>+</sup>-T-Zellen unabhängige Immunantwort gegen Tumoren auslösen können (Qin et al., 2000). Dies bestätigen auch die Daten von Braumüller et al., die zeigen konnten, dass CD4<sup>+</sup>-T-Zellen über IFN- $\gamma$  und TNF eine Wachstumshemmung von Tumorzellen auslösen können (Braumüller et al., 2013). Perez-Diez et al. zeigen in ihrer Studie sogar eine stärkere Immunantwort durch CD4<sup>+</sup>-T-Zellen als durch CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, zumindest unter bestimmten Voraussetzungen. Sie zeigen ebenso, dass teilweise Tumoren, die durch CD8<sup>+</sup>-T-Zellen kaum affiziert werden, durch CD4<sup>+</sup>-T-Zellen vollständig eradiziert werden können, was als additiver Effekt bzw. als Alternativtherapie sehr nützlich ist (Perez-Diez et al., 2007).

Es erscheint daher sinnvoll neben MHC-I-Liganden auch MHC-II-Liganden in einer Tumorstoffimpfung zu verabreichen, um die CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zu stimulieren (Casares et al., 2001; Kobayashi et al., 2002; Kumai et al., 2017). Auch die Wirksamkeit des adoptiven Zelltransfers mit durch MHC-II-Liganden vorgeprimten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen konnte bei cholangiozellulären Karzinomen nachgewiesen werden (Tran et al., 2014). Jedoch konnten andere Autoren aufzeigen, dass bereits die Vakzinierung mit kürzeren Peptiden (vornehmlich MHC-Klasse-I-Liganden) ebenfalls eine Aktivierung der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen bewirken kann (Gross et al., 2016).

Obwohl der tatsächliche Nutzen noch weiterer Abklärung bedarf, kann mit der hier erfolgten Analyse ein umfassendes Bild sowohl des MHC-Klasse-II-Ligandoms des kolorektalen Karzinoms als auch des nicht-malignen Kolongewebes erzeugt werden. Dies ist für die MHC-Klasse-II noch wichtiger als für die MHC-Klasse-I, da die Prädiktionsalgorithmen bzgl. der tatsächlichen MHC-Klasse-II-Liganden deutlich fehleranfälliger und ungenauer sind (Wang et al., 2008). Daher ist durch eine Analyse des Transkriptoms bzw. des Proteoms eine Vorhersage des Ligandoms quasi unmöglich – in jedem Fall jedoch unvollständig – auch wenn Neuerungen der Vorhersage-Algorithmen eine größere Genauigkeit liefern (Barra et al., 2018).

Exemplarisch soll hier auf zwei Peptidsequenzen näher eingegangen werden. So konnte das Peptid STTPVDTSTPATTST als MHC-Klasse-II-Ligand auf 26,32 % der kolorektalen Tumorproben nachgewiesen werden. Dieses Peptid kann dem Mucin-17 (Q685J3) zugeordnet werden. Krishn et al. konnten zeigen, dass Mucin-17 beim kolorektalen Karzinom und beim Adenom deutlich auf Genomebene hochreguliert ist und sogar zur Unterscheidung zwischen Polypen und Karzinomen dienen kann (Krishn et al., 2016). Ebenfalls eine häufige Oberflächenexpression von Mucin-17 auf kolorektalen Tumorzellen konnten Duncan et al. nachweisen, auch wenn sie keine Korrelation zu der Pathogenese herstellen konnten (Duncan et al., 2007). Dies wird durch die Ergebnisse von Wolff et al. gestützt, die ebenfalls eine deutliche Zunahme – auch an Mutationen in den entsprechenden Genen – bei Mucin-17 feststellen konnten (Wolff et al., 2018). Auch bei anderen Tumoren, wie zum Beispiel dem Pankreaskarzinom, konnte mittels RNA-Analyse eine Überexpression von Mucin-17 nachgewiesen werden und sogar eine Korrelation zum Malignitätsgrad hergestellt werden (Hirono et al., 2010; Kitamoto et al., 2012).

Die Peptidsequenz DELPEPPATF konnte als MHC-Klasse-II-Ligand auf 21,05 % der CRC-Proben detektiert werden und kann dem Quellprotein Drebrin (Q16643) zugeordnet werden. Auch Drebrin konnte beim metastasierten kolorektalen Karzinom deutlich überexprimiert nachgewiesen werden (Lin et al., 2014).

#### 5.4 Semiquantitative Betrachtung

Die anschließend für MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Liganden durchgeführte semiquantitative Betrachtung ist ein Versuch, überrepräsentierte, aber nicht tumorspezifische, Antigene identifizieren zu können. Durch den Abgleich mit dem korrespondierenden nicht-malignen Gewebe kann eine individuelle Überrepräsentation festgestellt werden. Für die MHC-Klasse-I konnten so im arithmetischen Mittel je (CRC-NMC) Paar 101,1 überrepräsentierte und 98,1 unterrepräsentierte Peptidsequenzen gefunden werden. Für die MHC-Klasse-II waren es noch 41,1 überrepräsentierte und 39,3 unterrepräsentierte Peptidsequenzen.

Der Vergleich aller überrepräsentierten Peptide und deren Auftretenshäufigkeit diente im Anschluss dazu, festzustellen, welche Antigene möglicherweise beim kolorektalen Karzinom im Allgemeinen überrepräsentiert sind (siehe Abbildung 21 und Abbildung 23). Dies wird untermauert durch den Fakt, dass die am häufigsten überrepräsentierten Peptide zwar auch auf nicht-malignen Proben gefunden wurden, jedoch jeweils deutlich häufiger auf den Tumorproben (siehe Tabelle 20). Ob diese Peptide jedoch als mögliche Zielantigene für eine Immuntherapie in Frage kommen, hängt von mehreren Faktoren ab.

Zum einen ist die Art der Tumorantigene entscheidend. Hierbei ist es relevant, ob es sich um Differenzierungsantigene (Brichard et al., 1993; Magro et al., 2006) oder um rein überrepräsentierte Antigene handelt (Iqbal et al., 2014; Jerome et al., 1991; Vonderheide et al., 1999). Da die rein überrepräsentierten Antigene auch auf anderen Normalgeweben vorkommen können und dort möglicherweise bereits im Gesunden weitaus häufiger auf MHC-Molekülen präsentiert werden, bedarf es hier, vor der Auswahl von möglichen Zielantigenen, zwingend auch eines Abgleichs mit einer Normalgewebedatenbank.

Zum anderen hängt es davon ab, ob tatsächlich die Überrepräsentation beim einzelnen Patienten hoch genug ist, damit die T-Zellen nur den Tumor attackieren, das Normalgewebe jedoch aussparen, da die dortige Ligandenkonzentration nicht ausreicht, um die T-Zellen zu aktivieren.

Ein letztes Problem von tumorassoziierten und nicht tumorspezifischen Peptiden ist auch, dass sie möglicherweise Toleranzmechanismen unterliegen, sodass die T-Zellen nicht ausreichend aktiviert werden können oder aber gar keine T-Zellen mit einem passenden Rezeptor vorliegen (Colella et al., 2000; Gallou et al., 2016; Naftzger et al., 1996; Overwijk et al., 1998).

Eine Peptidsequenz, die auf insgesamt 13 CRC-Proben, aber nur auf sechs NMC-Proben gefunden wurde und auf insgesamt fünf der CRC-Proben überrepräsentiert war, im Vergleich zum korrespondierenden Normalgewebe, soll im Folgenden exemplarisch genauer beleuchtet werden. Die Peptidsequenz EE-VQSLPLPL ist dem Quellprotein COL6A3 zuzuordnen. Dabei handelt es sich um eine Kollagenkette. Huang et. al. zeigten, dass COL6A3 auch beim Blasenkarzinom deutlich überexprimiert ist (auf Proteom- und mRNA-Ebene) und dort unter anderem die Angiogenese beeinflusst, sowie über den TGF- $\beta$ /SMAD-Pathway Einfluss auf die Epithelial-Mesenchymale Transition hat (Huang et al., 2018). Beim kolorektalen Karzinom wurde ebenfalls eine deutlich höhere COL6A3 Expression auf Proteomebene nachgewiesen. Auch hier scheint es einen Einfluss auf die Zellbewegung, die Zellproliferation und die Angiogenese zu haben. Es wird daher auch von den Autoren der beiden Studien sowohl als mögliches Ziel für Therapien, als auch als diagnostischer und prognostischer Marker vorgeschlagen (Liu et al., 2018; Qiao et al., 2015). Das heißt, die hier überrepräsentierte Peptidsequenz im HLA-Ligandom ist auch auf Proteomebene bekanntermaßen beim kolorektalen Karzinom überexprimiert. Zudem scheint das Protein COL6A3 eine wichtige Rolle im Tumormetabolismus zu spielen (Liu et al., 2018).

### **5.5 Tumor-assoziierte Änderung des HLA-Ligandoms und Zuordnung zu metabolischen Pfaden**

Die Veränderungen des HLA-Ligandoms sowohl der MHC-Klasse-I als auch der MHC-Klasse-II wurden über eine KEGG-Path-Analyse den zugrunde liegenden metabolischen Pfaden bzw. Prozessen zugeordnet (Liebermeister et al., 2014). Interessant dabei ist, dass die Veränderungen vor allem im MHC-Klasse-I-

Ligandom zu vielen Prozessen zugeordnet werden können, deren Aberration sowohl auf Genomebene als auch auf Proteomebene bereits für das kolorektale Karzinom vorbeschrieben worden sind und teilweise sogar als elementar innerhalb der Karzinogenese betrachtet werden (Cancer Genome Atlas, 2012). Einige dieser bekannten, und hier auch im Ligandom veränderten, auf Tumorproben präsentierten Peptidsequenzen sollen im Folgenden näher betrachtet werden. Hierbei muss beachtet werden, dass sich die einzelnen Pfade bzw. Prozesse wiederum gegenseitig bedingen. Peptide aus p53, eines der bekanntesten mutierten Gene in Tumorzellen, konnte auch unterrepräsentiert in der hier vorliegenden Ligandomanalyse detektiert werden. Das Gen p53 verhindert normalerweise das unkontrollierte Wachstum von Zellen und fördert DNA-Reparaturprozesse (Lane, 1992). Durch die Mutation des Genes und die Downregulation können Tumorzellen der Apoptose entgehen und sich unkontrolliert teilen (Li et al., 2015b). Auch beim kolorektalen Karzinom wurde diese Mutation bereits häufig beschrieben (Cancer Genome Atlas, 2012; Li et al., 2015b; Pandurangan et al., 2018). Lo et al. konnten sogar ein mutiertes Peptid aus dem p53-Pfad auf HLA\*02:01 identifizieren und mittels ACT eine Immunreaktion dagegen nachweisen (Lo et al., 2019). Das heißt, auch die aberrante Präsentation im Ligandom ist im Einzelfall bereits vorbeschrieben und unterstreicht die Plausibilität der Ergebnisse dieser Arbeit.

Die PI3K/mTor-Signalkaskade spielt eine elementare Rolle in der Regulation des Zellzyklus. Zudem wurden Mutationen bereits bei vielen Tumoren nachgewiesen. Diese Mutationen haben Einfluss auf die Proliferation, das Wachstum und die Metastasierung diverser Tumoren (Fruman et al., 2014), unter anderem auch auf kolorektale Karzinome (Francipane et al., 2014). Dass auch hier eine tumor-exklusive Präsentation im Tumorigandom nachgewiesen werden konnte, unterstreicht diesen Fakt.

Das APC-Protein, ein Tumorsuppressor, das den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Weg beeinflusst, wurde bereits früh bei kolorektalen Karzinomen in einer mutierten Form nachgewiesen (Senda et al., 2005). Häufig geschah dies in Verbindung mit der FAP (familiäre adenomatöse Polyposis), jedoch wurden auch bei anderen kolorektalen Karzinomen Mutationen nachgewiesen (Liang et al., 2017). Die

Mutationen im Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg führen zur unkontrollierten Teilung und Stimulation der Teilung im Zellkern der Tumoren (Logan et al., 2004; van Neerven et al., 2019). Diverse dieser Proteine bzw. HLA-Liganden aus diesen Quellproteinen konnten in dieser Analyse, im Vergleich zum Normalgewebe verändert präsentiert, im Tumorigenom nachgewiesen werden (unter anderem APC; Wnt und  $\beta$ -Catenin). Auch das APC-Protein wird bereits als mögliches Ziel einer Tumorthherapie diskutiert (Liang et al., 2017).

Über den Jak/Stat-Signalweg werden im Regelfall extrazelluläre Signale (z. B. Interleukine oder Interferone) ohne *second messenger* umgesetzt und führen zu einer Transkription bestimmter Proteine (Decker et al., 1991; Groner et al., 2017). Diverse HLA-Liganden, die aus Quellproteinen dieses Signalweges stammen, konnten hier ebenfalls mit einer veränderten Präsentation, verglichen mit dem Normalgewebe, im Ligandom nachgewiesen werden. Auch auf Genom bzw. Proteomebene sind diese Aberrationen bereits für das kolorektale Karzinom vorbeschrieben (Farooqi et al., 2019).

Der RAS/RAF-Kinaseweg ist ein zentraler Weg der Embryogenese, der Zelldifferenzierung, des Zellwachstums, sowie der Apoptose (Kyriakis et al., 2012). K-RAS und B-RAF sind bekannte Onkogene vieler Tumoren, unter anderem auch des kolorektalen Karzinoms (Garnett et al., 2004; Yuen et al., 2002). Auch weitere Rezeptoren und Proteine sind eng mit dem RAS/RAF-Kinaseweg verbunden und bereits als wichtige Mutationen beim kolorektalen Karzinom vorbeschrieben. So zum Beispiel der EGF-Rezeptor, welcher den RAS/RAF-Kinaseweg aktiviert. Dieser wird bereits bei nichtmutierten K-RAS bzw. B-RAF als therapeutisches Ziel durch Antikörper (Cetuximab und Panitumumab) verwendet (Bahrami et al., 2018). Diese Antikörper sind bereits in den Leitlinien zur Therapie des kolorektalen Karzinoms zugelassen (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft), 2019). Auch die Kinasen des RAS/RAF-Weges werden bereits leitlinienkonform als therapeutisches Ziel für den Multikinase-Inhibitor Regorafenib verwendet (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft), 2019). Aber auch die nachgeschalteten Proteine, wie zum Beispiel c-MYC, sind in diversen Tumoren als mutiert nachgewiesen worden und nehmen eine wichtige Stellung sowohl als therapeutisches Ziel als auch als Onkogen für diese

Tumore ein. Ursprünglich wurde c-MYC beim Burkitt-Lymphom nachgewiesen (Hecht et al., 2000), jedoch konnte eine Schlüsselstelle auch für das kolorektale Karzinom gezeigt werden (Sato et al., 2017). Für alle diese Proteine bzw. die daraus stammenden HLA-Liganden konnte auch eine im Vergleich zum Normalgewebe veränderte Präsentation in der hier durchgeführten Ligandomanalyse nachgewiesen werden.

Obwohl der TGF- $\beta$ -Pfad in vielen kolorektalen Karzinomen inaktiviert ist, zeigte sich in Studien, dass kolorektale Tumore überdurchschnittlich viel TGF- $\beta$  produzieren (Calon et al., 2012). Calon et al. gehen davon aus, dass das TGF- $\beta$  der Karzinome einen wichtigen Beitrag zur Metastasierung leistet, indem es auf Stromagewebe wirkt und damit ein besseres Mikroenvironment für Metastasen schafft (Calon et al., 2012). Diese Ergebnisse werden durch die Studie von Villalba et al. untermauert, die zeigt, dass TGF- $\beta$  das Wachstum von nicht-malignen und Tumorzellen in frühen Stadien reguliert, jedoch in fortgeschrittenen Stadien (metastasierten Stadien) das Tumorwachstum begünstigt (Villalba et al., 2017). Villalba et al. halten daher TGF- $\beta$  sogar für ein gutes Ziel für eine Immuntherapie (Villalba et al., 2017). Diese Erkenntnisse suggerieren eine veränderte Präsentation von Liganden aus Proteinen, die der TGF- $\beta$ -Signalkaskade angehören, welche hier auf Ligandomebene nachgewiesen werden konnte.

Die auf den Tumorproben überpräsentierten MHC-Klasse-I und -II-Liganden wurden abschließend noch mittels Voronoi Diagrammen ihren entsprechenden Ursprungsprozessen zugeordnet (siehe Abbildung 24 und Abbildung 25). Hier zeigt sich eine Zugehörigkeit zu bekannten „*Pathways in cancer*“ und auch eine Überrepräsentation an metabolischen Prozessen, die mit Infektionen einhergehen. Auch Teile des Zellzykluses und der Zellvermehrung sind deutlich überrepräsentiert. Diese Ergebnisse betonen erneut, dass bekannte Veränderungen im Rahmen der Karzinogenese auch im Ligandom der Tumorzellen nachgewiesen werden können (Cancer Genome Atlas, 2012).

Die hier aufgezeigten Veränderungen des Ligandoms in Verbindung mit bekannten Veränderungen des Genoms als auch des Proteoms der Tumorzellen beim kolorektalen Karzinom, beweisen, dass die Änderungen des Ligandoms durch



Änderungen auf jeder Ebene des Zellstoffwechsels also sowohl im Genom, als auch im Proteom, als auch im Metabolismus und den Signalkaskaden, bedingt sein können. Dies unterstreicht die Wichtigkeit einer Ligandomanalyse zum vollständigen Verständnis einer möglichen Immuntherapie.

## **5.6 Limitationen und Ausblick**

Eine wichtige Limitation dieser Arbeit ist die Identifikation geeigneter Zielantigene für den Einsatz in klinischen Studien.

Die als tumorexklusiv klassifizierten Peptidsequenzen stammen aus Proteinen, die nur auf Tumorgewebe nachgewiesen wurden. Die Zuordnung der Sequenzen, sowohl der detektierten Peptide als auch der Peptidsequenzen zu den entsprechenden Quellproteinen, hilft dabei das komplette Ligandom der Tumoren darzustellen, da aus einem Quellprotein bei unterschiedlichen HLA-Typen unterschiedliche Sequenzen präsentiert werden können. Mögliche Zielantigene für eine Immuntherapie zu identifizieren, bedarf aber weiterer Schritte. In dieser Arbeit wurden schlicht die 15 am häufigsten detektierten Quellproteine und die zugehörigen Peptidsequenzen und die 15 am häufigsten detektierten Peptidsequenzen weiter ausgewertet. Auch wenn für fast alle ein vorbeschriebener Zusammenhang entweder mit kolorektalen Karzinomen oder aber mit anderen Tumoren durch die Literaturrecherche hergestellt werden kann, so ist es dennoch möglich, dass diese Auswahl Peptide einschließt, die nicht optimal für eine Immuntherapie sind. Dies hat mehrere Gründe. Zum einen können diese Peptide bzw. Proteine zwar nicht auf dem Normalgewebe des Kolons präsentiert werden, aber auf anderen Normalgeweben, was autoimmune Reaktionen zur Folge haben könnte (Haen et al., 2012). Ein Abgleich der entsprechenden Peptide mit einer Datenbank, die das Ligandom von weiteren Normalgeweben enthält, ist daher als nächster Schritt notwendig. Des Weiteren müssen mögliche Vakzinpeptide synthetisierbar sein, ein Motiv haben, das an HLA-Moleküle bindet (entsprechende Ankeraminosäuren an der richtigen Stelle) (Falk et al., 1991; Rammensee et al., 1995), immunogen sein, sowie realistischer Weise aus Tumorgewebe stammen und nicht aus etwaigem umgebenden Gewebe wie z.B. Stroma, Erythrozyten oder infiltrierenden Leukozyten. Die prinzipielle

Bindungsfähigkeit wurde im Rahmen dieser Arbeit durch Abgleich mit den Datenbanken SYFPEITHI und NetMHC gewährleistet. Zur Sicherheit und endgültigen Auswahl an Zielantigenen sollte jedoch ein Expertenreview erfolgen (Freudenmann et al., 2018; Kowalewski et al., 2013). Sobald Zielantigene definiert wurden, können diese dann synthetisiert werden und eine *in vitro* Immunogenitätstestung kann erfolgen (Haen et al., 2013; Singh-Jasuja et al., 2004; Weinschenk et al., 2002). All diese Schritte liegen außerhalb des Umfangs dieser Arbeit. Einige davon wurden jedoch bereits im Rahmen des mit unter auf diesen Daten basierenden Artikels, der in einer wissenschaftlichen Fachzeitschrift veröffentlicht worden ist, durchgeführt (Löffler et al., 2018a).

Die Hauptlimitation dieser Arbeit ist die fehlende genetische Sequenzierung der Tumorproben. Das Tumorigandom wird von verschiedenen Einflüssen und tumorspezifischen Änderungen geprägt, zum Beispiel in der Genetik, der Epigenetik, im Metabolismus oder aber auch bei den posttranslationalen Modifikationen der Proteine. Diese Veränderungen können dazu führen, dass in den malignen Zellen die Prozessierung und der Abbau von Proteinen verändert wird, was wiederum Einfluss auf die Beladung und die Präsentation von Peptiden auf HLA-Molekülen haben kann (Fearon et al., 1990; Rammensee et al., 2013; Vogelstein et al., 2013). Bei fehlender genetischer Sequenzierung ist aber eine genaue Zuordnung der Änderung im Ligandom zur Ebene der eigentlichen Änderung unmöglich. Zwar konnte durch die Zuordnung zu bekannten veränderten metabolischen Pfaden ein Zusammenhang zwischen dem veränderten Ligandom und dem veränderten Tumormetabolismus und Proteom hergestellt werden, auf welcher Ebene jedoch die Veränderung beginnt, kann nicht aufgeklärt werden. Mutierte Neoepitope sind prinzipiell gute Zielantigene, weil sie zumeist spezifisch für Patient und Tumor sind und gleichzeitig eine starke Immunreaktion gegen den Tumor auslösen können (Gilboa, 1999; Schumacher et al., 2015; Tran et al., 2015). Andererseits sind sie aufgrund dieser extremen Spezifität nur im Rahmen eines individualisierten Therapieansatzes anzuwenden, was wiederum mit sehr viel Aufwand verbunden ist (Wagner et al., 2018).

Um tumorspezifische veränderte MHC-Liganden auf eine bereits in der DNA des Tumors vorliegende Mutation zurückführen zu können, bedarf es einer

Sequenzierung der Tumor-DNA. Um Mutationen in der Tumor-DNA (somatische Mutation) von Mutationen unterscheiden zu können, die bereits in der Patienten DNA vorliegen (Keimbahnmutationen), müsste das ganze Genom des Patienten sequenziert werden (Gubin et al., 2015).

Auch wenn technische und prozedurale Neuerungen eine Ganzgenomsequenzierung in hoher Auflösung, in relativ kurzer Zeit und zu günstigen Bedingungen möglich machen (Arsenic et al., 2015; Gubin et al., 2015; Kwong et al., 2015; Mardis, 2006; Mukhopadhyay, 2009; National Human Genome Research Institute, 2016; Serrati et al., 2016), so wurde in dieser Arbeit aus ethischen Gesichtspunkten trotzdem darauf verzichtet. Die ethischen Bedenken betreffen dabei den Umgang mit Zufallsbefunden, die bei Keimbahnmutationen nicht nur Auswirkungen auf den einzelnen Patienten haben können, sondern auch auf dessen Kinder, respektive dessen Eltern. Aber nicht nur Zufallsbefunde stellen ein Problem dar, auch die Anonymität und die Privatsphäre sowohl des Patienten als auch von dessen Angehörigen sind nicht gewährleistet, wenn in einer Forschungsarbeit Sequenzen aus der jeweiligen Patienten-DNA veröffentlicht werden würden. Es wird daher von mehreren Arbeitskreisen, wie dem EURAT (Ethische und Rechtliche Aspekte der Totalsequenzierung des menschlichen Genoms), dem ACMG (American College of Medical Genetics and Genomics), sowie dem deutschen Ethikrat, in Frage gestellt, ob unter diesen Gesichtspunkten überhaupt ein „*informed consent*“ hergestellt werden kann (Green et al., 2013; Winkler et al., 2016; Woopen, 2013). Zudem würde es sich bei der hier durchgeführten Analyse nicht um eine klinische Diagnostik handeln, sondern um eine Analyse zu Forschungszwecken, von deren Resultaten der Patient selbst wahrscheinlich nicht profitieren würde (Green et al., 2013; van El et al., 2013; Winkler et al., 2016; Woopen, 2013).

Perspektivisch bleibt also zum einen die Frage zu beantworten, ob anhand dieser Erkenntnisse eine bessere Vorhersagbarkeit der Wirksamkeit – von zum Beispiel Checkpointinhibitoren – möglich ist. Zum anderen wirft es die Frage auf, inwieweit Vakzinierungen bzw. andere Immuntherapien individualisiert werden müssen.

Durch das hier angewandte Vorgehen der HLA-Ligandom-Analyse wäre eine Analyse des Tumorgewebes auf individuell in diesem Patienten überrepräsentierte und überhaupt auf HLA-Molekülen präsentierte Zielantigene möglich (Singh-Jasuja et al., 2004). Es könnten dann für diesen einen Patienten zugeschnittene Vakzine bzw. Zielantigene definiert und hergestellt werden. Ein allgemeines Vorgehen kann diese Zielantigene nicht in dieser Präzision anbieten, zumal nicht alle Peptide auf jedem HLA-Typ präsentiert werden können (Haen et al., 2013). Jedoch bedarf solch ein Vorgehen der massenspektrometrischen Analyse des HLA-Ligandoms des Patienten, was mit zeitlichem als auch finanziellem Aufwand verbunden ist.

Eine weitere Möglichkeit ergibt sich aus den hier vorliegenden Analysen. So könnte eine HLA-Typisierung des Patienten durchgeführt werden und anhand des HLA-Typs eine Auswahl an Zielantigenen zusammengestellt werden, die nur Peptide enthält, die auf den HLA-Molekülen des Patienten auch tatsächlich präsentiert werden können. Hierfür wäre nur eine HLA-Typisierung des Patienten notwendig und keine vollständige HLA-Ligandom-Analyse des Tumors des Patienten. Dadurch wäre eine hohe Präzision zu erzielen, ohne vorab Tumorgewebe analysieren zu müssen. Dies hätte den Vorteil deutlich schneller und günstiger vorgehen zu können, da die genaue massenspektrometrische Analyse entfällt und da die entsprechenden Peptide (Zielantigene) vorgehalten werden können und für verschiedene Patienten in unterschiedlichen Vakzinen bzw. Zellprimingansätzen zum Einsatz kommen könnten. Die Grundlage für solch ein *Warehouse* konnte also mittels dieser Arbeit gelegt werden.

## 6 Zusammenfassung

Das kolorektale Karzinom ist das zweithäufigste Karzinom bei beiden Geschlechtern. Vor allem in fortgeschrittenen und metastasierten Stadien ist die 5-Jahres-Überlebensrate sehr niedrig und die Heilungsrate gering. Daher werden hierfür neue Therapieansätze gesucht.

Die Immuntherapie erweist sich in letzter Zeit mit verschiedenen Innovationen als sehr vielversprechender Therapieansatz in solchen Fällen. Im Speziellen die Checkpointinhibitoren können bei einem kleinen Teil der kolorektalen Karzinome (MSI-CRC) bisher zu einer deutlichen Prognoseverbesserung führen. Zudem konnte gezeigt werden, dass die TILs in kolorektalen Karzinomen die Prognose deutlich stärker beeinflussen, als die reine Mutationshäufigkeit im Genom der Tumoren. Dies macht ein tiefgreifendes Verständnis für das HLA-Ligandom der kolorektalen Karzinome unumgänglich. Dieses kann auch für die weiteren immunologischen Therapieansätze benutzt werden um beispielsweise Zielantigene zu definieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher korrespondierende Probenpaare von 36 Probanden durch HLA-Immunaффinitätschromatographie und anschließender uH-PLC aufgetrennt und schließlich massenspektrometrisch analysiert.

Es konnten so 21 269 verschiedene MHC-Klasse-I-Liganden und 7448 verschiedene MHC-Klasse-II-Liganden identifiziert werden. Davon waren bei der Klasse-I 8617 nur auf Tumorgewebe und 4162 nur auf nicht-malignem Gewebe nachzuweisen, bei der Klasse-II entsprechend 2562 und 2177. Die MHC-Klasse-I-Liganden werden dabei auf 13, 18, 14 unterschiedlichen HLA-A, -B und -C Haplotypen präsentiert, was zu einer Abdeckung von 95,6% der kaukasischen Bevölkerung führt. Die MHC-Klasse-I-Liganden stammen dabei insgesamt aus 8678 Quellproteinen (Tumorgewebe: 2366, nicht-malignes Gewebe: 994), die MHC-Klasse-II-Liganden aus 2079 Quellproteinen (Tumorgewebe: 570, nicht-malignes Gewebe: 477)

In einem weiteren Analyseschritt wurden die Ligandome der CRC mit den Ligandomen der korrespondierenden Normalgewebe verglichen. Dadurch konnten über- und unterrepräsentierte MHC-Liganden und deren Quellproteine identifiziert werden, was vor allem zur Identifikation weiterer tumorassoziierter Peptide wichtig ist und zum Gesamtbild des HLA-Ligandoms der CRC beiträgt.

In einem letzten Schritt wurden die so identifizierten tumor-exklusiven HLA-Liganden mittels Datenbanken den metabolischen Prozessen in den Zellen zugeordnet, was eine Zuordnung zu vielen bekannten „*Pathways in Cancer*“ wie zum Beispiel dem Wnt/ $\beta$ -Catenin-Weg, dem Jak/Stat-Signalweg, dem FGF/FGFR-System, der RAS/RAF-Kaskade, dem EGF-Rezeptor, C-myc und TGF- $\beta$ , sowie zu mTOR möglich machte. Es konnte so also gezeigt werden, dass sich die bekannten veränderten metabolischen Prozesse auch im HLA-Ligandom der Tumoren nachweisen lassen.

Trotz einiger Einschränkungen, wie der fehlenden Immunogenitätstestung (mittlerweile wurde die Immunogenitätstestung der Peptide im Rahmen des auf dieser Arbeit aufbauenden Artikels in einer wissenschaftlichen Fachzeitschrift durchgeführt (Löffler et al., 2018a)) und der fehlenden Genomsequenzierung, handelt es sich um die bisher größte und umfassendste Analyse des HLA-Ligandoms (MHC-Klasse-I und -II) des kolorektalen Karzinomes, sowie seines korrespondierenden Normalgewebes. Damit wurde ein breiter Grundstein für die weiteren Analysen des HLA-Ligandoms und für darauf aufbauende Immuntherapien gelegt.

## 7 Referenzen

- Abbas, A., et al. 2010a. Management of anal cancer in 2010. Part 1: Overview, screening, and diagnosis. *Oncology (Williston Park)*, 24, 364-9.
- Abbas, A., et al. 2010b. Management of anal cancer in 2010. Part 2: current treatment standards and future directions. *Oncology (Williston Park)*, 24, 417-24.
- Ahmadi, A., et al. 2009. Colorectal cancer surveillance in inflammatory bowel disease: the search continues. *World J Gastroenterol*, 15, 61-6.
- Ahmed, D., et al. 2012. A tissue-based comparative effectiveness analysis of biomarkers for early detection of colorectal tumors. *Clin Transl Gastroenterol*, 3, e27.
- Aki, M., et al. 1994. Interferon-gamma induces different subunit organizations and functional diversity of proteasomes. *J Biochem*, 115, 257-69.
- Albasri, A., et al. 2011. Cten signals through integrin-linked kinase (ILK) and may promote metastasis in colorectal cancer. *Oncogene*, 30, 2997-3002.
- Albasri, A., et al. 2014. Nuclear expression of phosphorylated focal adhesion kinase is associated with poor prognosis in human colorectal cancer. *Anticancer Res*, 34, 3969-74.
- Altman, D. G., et al. 1994. Diagnostic tests 2: Predictive values. *Bmj*, 309, 102.
- Amado, R. G., et al. 2008. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 26, 1626-34.
- Anand, S., et al. 2017. Label-Based and Label-Free Strategies for Protein Quantitation. *Methods Mol Biol*, 1549, 31-43.
- Andreatta, M., et al. 2016. Gapped sequence alignment using artificial neural networks: application to the MHC class I system. *Bioinformatics*, 32, 511-7.
- Andrews, G. L., et al. 2011. Improving proteome coverage on a LTQ-Orbitrap using design of experiments. *J Am Soc Mass Spectrom*, 22, 773-83.
- Annunziato, F., et al. 2007. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med*, 204, 1849-61.
- Arafat, H., et al. 2011. Tumor-specific expression and alternative splicing of the COL6A3 gene in pancreatic cancer. *Surgery*, 150, 306-15.
- Arsenic, R., et al. 2015. Comparison of targeted next-generation sequencing and Sanger sequencing for the detection of PIK3CA mutations in breast cancer. *BMC Clin Pathol*, 15, 20.
- Artero-Castro, A., et al. 2009. Rplp1 bypasses replicative senescence and contributes to transformation. *Exp Cell Res*, 315, 1372-83.
- Bahrami, A., et al. 2018. Targeting RAS signaling pathway as a potential therapeutic target in the treatment of colorectal cancer. *J Cell Physiol*, 233, 2058-2066.
- Bakke, O., et al. 1990. MHC class II-associated invariant chain contains a sorting signal for endosomal compartments. *Cell*, 63, 707-16.
- Banerjea, A., et al. 2004. Colorectal cancers with microsatellite instability display mRNA expression signatures characteristic of increased immunogenicity. *Mol Cancer*, 3, 21.
- Banerjea, A., et al. 2009. Microsatellite and chromosomal stable colorectal cancers demonstrate poor immunogenicity and early disease recurrence. *Colorectal Dis*, 11, 601-8.
- Bar, J., et al. 2014. Correlation of lactate dehydrogenase isoenzyme profile with outcome in patients with advanced colorectal cancer treated with chemotherapy and bevacizumab or cediranib: Retrospective analysis of the HORIZON I study. *Clin Colorectal Cancer*, 13, 46-53.
- Barbieri, I., et al. 2013. Bromodomains as therapeutic targets in cancer. *Brief Funct Genomics*, 12, 219-30.

- Barnstable, C. J., et al. 1978. Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens-new tools for genetic analysis. *Cell*, 14, 9-20.
- Barra, C., et al. 2018. Footprints of antigen processing boost MHC class II natural ligand predictions. *Genome Med*, 10, 84.
- Bartnik, A., et al. 2012. Peptide Vaccine Therapy in Colorectal Cancer. *Vaccines (Basel)*, 1, 1-16.
- Bassani-Sternberg, M., et al. 2016. Direct identification of clinically relevant neoepitopes presented on native human melanoma tissue by mass spectrometry. *Nat Commun*, 7, 13404.
- Bassani-Sternberg, M., et al. 2015. Mass spectrometry of human leukocyte antigen class I peptidomes reveals strong effects of protein abundance and turnover on antigen presentation. *Mol Cell Proteomics*, 14, 658-73.
- Bauer, S., et al. 1999. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science*, 285, 727-9.
- Beldegrun, A., et al. 1993. Human renal carcinoma line transfected with interleukin-2 and/or interferon alpha gene(s): implications for live cancer vaccines. *J Natl Cancer Inst*, 85, 207-16.
- Bellmunt, J., et al. 2017. Pembrolizumab as Second-Line Therapy for Advanced Urothelial Carcinoma. *N Engl J Med*, 376, 1015-1026.
- Benjamini, Y. 2010. Discovering the false discovery rate. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Statistical Methodology)*, 72, 405-416.
- Benjamini, Y., et al. 1995. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, 57, 289-300.
- Bennett, S. R., et al. 1997. Induction of a CD8+ cytotoxic T lymphocyte response by cross-priming requires cognate CD4+ T cell help. *J Exp Med*, 186, 65-70.
- Berard, F., et al. 2000. Cross-priming of naive CD8 T cells against melanoma antigens using dendritic cells loaded with killed allogeneic melanoma cells. *J Exp Med*, 192, 1535-44.
- Berger, C., et al. 2009. Adoptive transfer of virus-specific and tumor-specific T cell immunity. *Curr Opin Immunol*, 21, 224-32.
- Berlin, C. 2018. Kartierung des HLA-Ligandoms der akuten myeloischen Leukämie zur Entwicklung einer therapeutischen Multipeptidvakzine. 10.15496/publikation-24415.
- Berlth, F., et al. 2015. Both GLUT-1 and GLUT-14 are Independent Prognostic Factors in Gastric Adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol*, 22 Suppl 3, S822-31.
- Bevan, M. J. 1976. Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *J Exp Med*, 143, 1283-8.
- Beyer, H. 1981. Tukey, John W.: Exploratory Data Analysis. Addison-Wesley Publishing Company Reading, Mass. — Menlo Park, Cal., London, Amsterdam, Don Mills, Ontario, Sydney 1977, XVI, 688 S. *Biometrical Journal*, 23, 413-414.
- Beyer, M., et al. 2012. In vivo expansion of naive CD4+ CD25(high) FOXP3+ regulatory T cells in patients with colorectal carcinoma after IL-2 administration. *PLoS One*, 7, e30422.
- Bicknell, D. C., et al. 2005. A mutated HLA-A\*0101 allele in the colorectal cell line HCA-7. *Tissue Antigens*, 66, 231-7.
- Bilich, T., et al. 2018. Abstract: The HLA ligandome landscape of chronic myeloid leukemia delineates novel T-cell epitopes for immunotherapy. *Blood*, Volume 133, Issue 6, ASH Annual Meeting 2018.
- Bjorkman, P. J., et al. 1987. The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature*, 329, 512-8.



- Bodmer, W. F. 1972. Evolutionary significance of the HL-A system. *Nature*, 237, 139-45 passim.
- Bodmer, W. F., et al. 1993. Tumor escape from immune response by variation in HLA expression and other mechanisms. *Ann N Y Acad Sci*, 690, 42-9.
- Bodnar, M., et al. 2016. Proteomic profiling identifies the inorganic pyrophosphatase (PPA1) protein as a potential biomarker of metastasis in laryngeal squamous cell carcinoma. *Amino Acids*, 48, 1469-1476.
- Bogdan, C., et al. 2000. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol*, 12, 64-76.
- Bonneville, M., et al. 2010. Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat Rev Immunol*, 10, 467-78.
- Boon, T., et al. 2006. Human T cell responses against melanoma. *Annu Rev Immunol*, 24, 175-208.
- Borysiewicz, L. K., et al. 1996. A recombinant vaccinia virus encoding human papillomavirus types 16 and 18, E6 and E7 proteins as immunotherapy for cervical cancer. *Lancet*, 347, 1523-7.
- Botteri, E., et al. 2008. Cigarette smoking and adenomatous polyps: a meta-analysis. *Gastroenterology*, 134, 388-95.
- Bouvier, M. 2003. Accessory proteins and the assembly of human class I MHC molecules: a molecular and structural perspective. *Mol Immunol*, 39, 697-706.
- Bouvier, M., et al. 1994. Importance of peptide amino and carboxyl termini to the stability of MHC class I molecules. *Science*, 265, 398-402.
- Brahmer, J. R., et al. 2012. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med*, 366, 2455-65.
- Braumüller, H., et al. 2013. T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence. *Nature*, 494, 361-5.
- Brichard, V., et al. 1993. The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J Exp Med*, 178, 489-95.
- Bronner, C., et al. 2013. Increasing role of UHRF1 in the reading and inheritance of the epigenetic code as well as in tumorigenesis. *Biochem Pharmacol*, 86, 1643-9.
- Bronte, V., et al. 1995. IL-2 enhances the function of recombinant poxvirus-based vaccines in the treatment of established pulmonary metastases. *J Immunol*, 154, 5282-92.
- Brooks, D. L., et al. 2016. ITGA6 is directly regulated by hypoxia-inducible factors and enriches for cancer stem cell activity and invasion in metastatic breast cancer models. *Mol Cancer*, 15, 26.
- Brosh, R., et al. 2009. When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nat Rev Cancer*, 9, 701-13.
- Brunda, M. J., et al. 1993. Antitumor and antimetastatic activity of interleukin 12 against murine tumors. *J Exp Med*, 178, 1223-30.
- Bubeck Wardenburg, J., et al. 1996. Phosphorylation of SLP-76 by the ZAP-70 protein-tyrosine kinase is required for T-cell receptor function. *J Biol Chem*, 271, 19641-4.
- Burnet, F. M. 1959. *The clonal selection theory of acquired immunity*, Cambridge [u.a.], Cambridge Univ. Press [u.a.].
- Burnet, M. 1957. *Cancer—A Biological Approach*.
- Caballero-Banos, M., et al. 2016. Phase II randomised trial of autologous tumour lysate dendritic cell plus best supportive care compared with best supportive care in pre-treated advanced colorectal cancer patients. *Eur J Cancer*, 64, 167-74.
- Cabrera, C. M., et al. 2003. Total loss of MHC class I in colorectal tumors can be explained by two molecular pathways: beta2-microglobulin inactivation in MSI-

- positive tumors and LMP7/TAP2 downregulation in MSI-negative tumors. *Tissue Antigens*, 61, 211-9.
- Callahan, M. K. 2016. Immune Checkpoint Therapy in Melanoma. *Cancer J*, 22, 73-80.
- Calon, A., et al. 2012. Dependency of colorectal cancer on a TGF-beta-driven program in stromal cells for metastasis initiation. *Cancer Cell*, 22, 571-84.
- Cancer Genome Atlas, N. 2012. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*, 487, 330-7.
- Carding, S. R., et al. 2002. Gammadelta T cells: functional plasticity and heterogeneity. *Nat Rev Immunol*, 2, 336-45.
- Carlos, T. M., et al. 1994. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood*, 84, 2068-101.
- Carpfen, J. D., et al. 2007. A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature*, 448, 439-44.
- Casares, N., et al. 2001. Immunization with a tumor-associated CTL epitope plus a tumor-related or unrelated Th1 helper peptide elicits protective CTL immunity. *Eur J Immunol*, 31, 1780-9.
- Celluzzi, C. M., et al. 1996. Peptide-pulsed dendritic cells induce antigen-specific CTL-mediated protective tumor immunity. *J Exp Med*, 183, 283-7.
- Chan, T. S., et al. 2017. Low-dose pembrolizumab for relapsed/refractory Hodgkin lymphoma: high efficacy with minimal toxicity. *Ann Hematol*, 96, 647-651.
- Chang, E., et al. 2010. Detection of colorectal neoplasm using promoter methylation of ITGA4, SFRP2, and p16 in stool samples: a preliminary report in Korean patients. *Hepatogastroenterology*, 57, 720-7.
- Chen, D., et al. 2013. The expression and clinical significance of PA28 gamma in colorectal cancer. *J Investig Med*, 61, 1192-6.
- Chen, Z., et al. 2007a. Immunoglobulin G expression in carcinomas and cancer cell lines. *Faseb j*, 21, 2931-8.
- Chen, Z., et al. 2007b. Distinct regulation of interleukin-17 in human T helper lymphocytes. *Arthritis Rheum*, 56, 2936-46.
- Chlewicki, L. K., et al. 2005. High-affinity, peptide-specific T cell receptors can be generated by mutations in CDR1, CDR2 or CDR3. *J Mol Biol*, 346, 223-39.
- Chothia, C., et al. 1988. The outline structure of the T-cell alpha beta receptor. *Embo j*, 7, 3745-55.
- Choudhary, C., et al. 2010. Decoding signalling networks by mass spectrometry-based proteomics. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11, 427-39.
- Chung, J. K., et al. 1999. Mechanisms related to [18F]fluorodeoxyglucose uptake of human colon cancers transplanted in nude mice. *J Nucl Med*, 40, 339-46.
- Chung, K. Y., et al. 2010. Phase II study of the anti-cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 monoclonal antibody, tremelimumab, in patients with refractory metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 28, 3485-90.
- Ciechanover, A. 2005. Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6, 79-87.
- Clarke, B., et al. 1966. Maintenance of histocompatibility polymorphisms. *Nature*, 211, 999-1000.
- Cohen, M. H., et al. 2007. FDA drug approval summary: bevacizumab plus FOLFOX4 as second-line treatment of colorectal cancer. *Oncologist*, 12, 356-61.
- Colella, T. A., et al. 2000. Self-tolerance to the murine homologue of a tyrosinase-derived melanoma antigen: implications for tumor immunotherapy. *J Exp Med*, 191, 1221-32.
- Coley, W. B. 1893. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893. *Clin Orthop Relat Res*, 3-11.

- Coombes, et al. 2015. Understanding the characteristics of mass spectrometry data through the use of simulation. Available: [https://odin.mdacc.tmc.edu/~jmorris/papers\\_files/Simulation2.pdf](https://odin.mdacc.tmc.edu/~jmorris/papers_files/Simulation2.pdf) [Accessed 26.10.2020].
- Cui, X., et al. 2015. DNAB1 destabilizes PDCD5 to suppress p53-mediated apoptosis. *Cancer Lett*, 357, 307-15.
- Cui, X., et al. 2003. Statistical tests for differential expression in cDNA microarray experiments. *Genome Biol*, 4, 210.
- Cunningham, D., et al. 2010. Colorectal cancer. *Lancet*, 375, 1030-47.
- De Bortoli, M., et al. 2006. Medulloblastoma outcome is adversely associated with overexpression of EEF1D, RPL30, and RPS20 on the long arm of chromosome 8. *BMC Cancer*, 6, 223.
- Decker, T., et al. 1991. Cytoplasmic activation of GAF, an IFN-gamma-regulated DNA-binding factor. *Embo j*, 10, 927-32.
- Degener, T., et al. 1988. Differential expression of HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ and associated invariant chain (Ii) in normal colorectal mucosa, adenoma and carcinoma. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, 412, 315-22.
- Dengjel, J., et al. 2006. Unexpected abundance of HLA class II presented peptides in primary renal cell carcinomas. *Clin Cancer Res*, 12, 4163-70.
- Dengjel, J., et al. 2005. Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 7922-7.
- Deschoolmeester, V., et al. 2010. Tumor infiltrating lymphocytes: an intriguing player in the survival of colorectal cancer patients. *BMC Immunol*, 11, 19.
- Dessen, A., et al. 1997. X-ray crystal structure of HLA-DR4 (DRA\*0101, DRB1\*0401) complexed with a peptide from human collagen II. *Immunity*, 7, 473-81.
- Di Giorgio, A., et al. 1992. The influence of tumor lymphocytic infiltration on long term survival of surgically treated colorectal cancer patients. *Int Surg*, 77, 256-60.
- Dick, T. P., et al. 1996. Coordinated dual cleavages induced by the proteasome regulator PA28 lead to dominant MHC ligands. *Cell*, 86, 253-62.
- Diederichsen, A. C., et al. 2003. Prognostic value of the CD4+/CD8+ ratio of tumour infiltrating lymphocytes in colorectal cancer and HLA-DR expression on tumour cells. *Cancer Immunol Immunother*, 52, 423-8.
- Disario, J. A., et al. 1991. Prevalence and malignant potential of colorectal polyps in asymptomatic, average-risk men. *Am J Gastroenterol*, 86, 941-5.
- Dolcetti, R., et al. 1999. High prevalence of activated intraepithelial cytotoxic T lymphocytes and increased neoplastic cell apoptosis in colorectal carcinomas with microsatellite instability. *Am J Pathol*, 154, 1805-13.
- Drago-Serrano, M. E., et al. 2017. Lactoferrin: Balancing Ups and Downs of Inflammation Due to Microbial Infections. *Int J Mol Sci*, 18.
- Drecoll, E., et al. 2014. Expression analysis of heat shock protein 90 (HSP90) and Her2 in colon carcinoma. *Int J Colorectal Dis*, 29, 663-71.
- Dubrovsky, L., et al. 2016. T cell receptor mimic antibodies for cancer therapy. *Oncimmunology*, 5, e1049803.
- Dudley, D. D., et al. 2005. Mechanism and control of V(D)J recombination versus class switch recombination: similarities and differences. *Adv Immunol*, 86, 43-112.
- Dudley, J. C., et al. 2016. Microsatellite Instability as a Biomarker for PD-1 Blockade. *Clin Cancer Res*, 22, 813-20.
- Dugina, V., et al. 2015. Tumor promotion by gamma and suppression by beta non-muscle actin isoforms. *Oncotarget*, 6, 14556-71.
- Duncan, T. J., et al. 2007. The role of MUC1 and MUC3 in the biology and prognosis of colorectal cancer. *World J Surg Oncol*, 5, 31.
- Dunn, G. P., et al. 2002. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*, 3, 991-8.

- Dunn, G. P., et al. 2004a. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*, 21, 137-48.
- Dunn, G. P., et al. 2004b. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol*, 22, 329-60.
- Durbin, J. E., et al. 2000. Type I IFN modulates innate and specific antiviral immunity. *J Immunol*, 164, 4220-8.
- Dyson, J. K., et al. 2012. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: what is the real magnitude of the risk? *World J Gastroenterol*, 18, 3839-48.
- Edge, S. B., et al. 2010. *AJCC cancer staging manual*, New York, Springer.
- Ehrlich, P. 1909. Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung. *Beiträge zur experimentellen Pathologie und Chemotherapie*, 117-164.
- Eisenach, P. A., et al. 2013. Dipeptidase 1 (DPEP1) is a marker for the transition from low-grade to high-grade intraepithelial neoplasia and an adverse prognostic factor in colorectal cancer. *Br J Cancer*, 109, 694-703.
- Engidawork, E., et al. 2006. Protein chemical identification and characterization of the human variants of far upstream element binding protein in medulloblastoma DAOY cell line. *Int J Oncol*, 29, 721-36.
- Eshhar, Z., et al. 1993. Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 720-4.
- Eswaran, J., et al. 2012. Transcriptomic landscape of breast cancers through mRNA sequencing. *Sci Rep*, 2, 264.
- European Medicines Agency. 2015. *Provenge*. [http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/002513/human\\_med\\_001680.jsp&mid=WC0b01ac058001d124](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/002513/human_med_001680.jsp&mid=WC0b01ac058001d124). Zugriff: [02.03.2020].
- European Medicines Agency. 2018a. *Kymriah*. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/kymriah-epar-medicine-overview\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/kymriah-epar-medicine-overview_en.pdf) Zugriff: [02.03.2020].
- European Medicines Agency. 2018b. *Yescarta*. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/yescarta-epar-medicine-overview\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/yescarta-epar-medicine-overview_en.pdf) Zugriff: [02.03.2020].
- Falk, K., et al. 1991. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature*, 351, 290-6.
- Fang, M., et al. 2016. Common BRAF(V600E)-directed pathway mediates widespread epigenetic silencing in colorectal cancer and melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113, 1250-5.
- Fang, M., et al. 2014. The BRAF oncoprotein functions through the transcriptional repressor MAFG to mediate the CpG Island Methylator phenotype. *Mol Cell*, 55, 904-15.
- Farooqi, A. A., et al. 2019. Overview of the oncogenic signaling pathways in colorectal cancer: Mechanistic insights. *Semin Cancer Biol*, 10.1016/j.semcancer.2019.01.001.
- Fearon, E. R., et al. 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61, 759-67.
- Fellerhoff, B., et al. 2011. The LMP7-K allele of the immunoproteasome exhibits reduced transcript stability and predicts high risk of colon cancer. *Cancer Res*, 71, 7145-54.
- Ferrone, S., et al. 1995. Loss of HLA class I antigens by melanoma cells: molecular mechanisms, functional significance and clinical relevance. *Immunol Today*, 16, 487-94.

- Finkelman, F. D., et al. 1997. Cytokine regulation of host defense against parasitic gastrointestinal nematodes: lessons from studies with rodent models. *Annu Rev Immunol*, 15, 505-33.
- Flajnik, M. F., et al. 2001. Comparative genomics of the MHC: glimpses into the evolution of the adaptive immune system. *Immunity*, 15, 351-62.
- Francipane, M. G., et al. 2014. mTOR pathway in colorectal cancer: an update. *Oncotarget*, 5, 49-66.
- Freed-Pastor, W. A., et al. 2012. Mutant p53: one name, many proteins. *Genes Dev*, 26, 1268-86.
- Freudenmann, L. K., et al. 2018. Mapping the tumour human leukocyte antigen (HLA) ligandome by mass spectrometry. *Immunology*, 154, 331-345.
- Frey, D. M., et al. 2010. High frequency of tumor-infiltrating FOXP3(+) regulatory T cells predicts improved survival in mismatch repair-proficient colorectal cancer patients. *Int J Cancer*, 126, 2635-43.
- Friedrich, A., et al. 2003. [Familial adenomatous polyposis syndrome (FAP): pathogenesis and molecular mechanisms]. *Med Klin (Munich)*, 98, 776-82.
- Fritsche, J., et al. 2018. Translating Immunopeptidomics to Immunotherapy-Decision-Making for Patient and Personalized Target Selection. *Proteomics*, 18, e1700284.
- Fruman, D. A., et al. 2014. PI3K and cancer: lessons, challenges and opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*, 13, 140.
- Fujita, M., et al. 2001. Up-regulation of the ectodermal-neural cortex 1 (ENC1) gene, a downstream target of the beta-catenin/T-cell factor complex, in colorectal carcinomas. *Cancer Res*, 61, 7722-6.
- Gallery, M., et al. 2007. The JAMM motif of human deubiquitinase Poh1 is essential for cell viability. *Mol Cancer Ther*, 6, 262-8.
- Gallou, C., et al. 2016. A general strategy to optimize immunogenicity of HLA-B\*0702 restricted cryptic peptides from tumor associated antigens: Design of universal neo-antigen like tumor vaccines for HLA-B\*0702 positive patients. *Oncotarget*, 7, 59417-59428.
- Galon, J., et al. 2006. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*, 313, 1960-4.
- Gao, D., et al. 2014. Autologous Tumor Lysate-Pulsed Dendritic Cell Immunotherapy with Cytokine-Induced Killer Cells Improves Survival in Gastric and Colorectal Cancer Patients. *PLOS ONE*, 9, e93886.
- Gao, F., et al. 2013. miR-9 modulates the expression of interferon-regulated genes and MHC class I molecules in human nasopharyngeal carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 431, 610-6.
- Garbe, Y., et al. 2011. An MSI tumor specific frameshift mutation in a coding microsatellite of MSH3 encodes for HLA-A0201-restricted CD8+ cytotoxic T cell epitopes. *PLoS One*, 6, e26517.
- Garboczi, D. N., et al. 1996. Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2. *Nature*, 384, 134-41.
- Garnett, M. J., et al. 2004. Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. *Cancer Cell*, 6, 313-9.
- Garon, E. B., et al. 2015. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*, 372, 2018-28.
- Garrido, F., et al. 2016. The urgent need to recover MHC class I in cancers for effective immunotherapy. *Curr Opin Immunol*, 39, 44-51.
- Geary, S. M., et al. 2013. Prostate cancer vaccines: Update on clinical development. *Oncoimmunology*, 2, e24523.
- Gelfo, V., et al. 2016. A module of inflammatory cytokines defines resistance of colorectal cancer to EGFR inhibitors. *Oncotarget*, 10.18632/oncotarget.12354.

- Giaccone, G., et al. 2015. A phase III study of belagenpumatucel-L, an allogeneic tumour cell vaccine, as maintenance therapy for non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer*, 51, 2321-9.
- Gilboa, E. 1999. The makings of a tumor rejection antigen. *Immunity*, 11, 263-70.
- Gimeno-Garcia, A. Z., et al. 2015. Plasma matrix metalloproteinase 9 as an early surrogate biomarker of advanced colorectal neoplasia. *Gastroenterol Hepatol*, 10.1016/j.gastrohep.2015.10.002.
- Giovannucci, E., et al. 1994. Dietary factors and risk of colon cancer. *Ann Med*, 26, 443-52.
- Giusti, R. M., et al. 2007. FDA drug approval summary: panitumumab (Vectibix). *Oncologist*, 12, 577-83.
- Gnjatic, S., et al. 2003. Survey of naturally occurring CD4+ T cell responses against NY-ESO-1 in cancer patients: correlation with antibody responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 8862-7.
- Goldman, J. M., et al. 1982. HLA-DR monoclonal antibodies inhibit the proliferation of normal and chronic granulocytic leukaemia myeloid progenitor cells. *Br J Haematol*, 52, 411-20.
- Gong, J., et al. 1997. Induction of antitumor activity by immunization with fusions of dendritic and carcinoma cells. *Nat Med*, 3, 558-61.
- Green, R. C., et al. 2013. ACMG recommendations for reporting of incidental findings in clinical exome and genome sequencing. *Genet Med*, 15, 565-74.
- Groettrup, M., et al. 1996. A role for the proteasome regulator PA28alpha in antigen presentation. *Nature*, 381, 166-8.
- Groner, B., et al. 2017. Jak Stat signaling and cancer: Opportunities, benefits and side effects of targeted inhibition. *Mol Cell Endocrinol*, 451, 1-14.
- Gross, S., et al. 2016. Short Peptide Vaccine Induces CD4+ T Helper Cells in Patients with Different Solid Cancers. *Cancer Immunol Res*, 4, 18-25.
- Gubin, M. M., et al. 2015. Tumor neoantigens: building a framework for personalized cancer immunotherapy. *J Clin Invest*, 125, 3413-21.
- Gubin, M. M., et al. 2014. Checkpoint blockade cancer immunotherapy targets tumour-specific mutant antigens. *Nature*, 515, 577-81.
- Guermonprez, P., et al. 2003. ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature*, 425, 397-402.
- Guinney, J., et al. 2015. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med*, 21, 1350-6.
- Gutting, T., et al. 2018. Checkpoints and beyond - Immunotherapy in colorectal cancer. *Semin Cancer Biol*, 10.1016/j.semcancer.2018.04.003.
- Haen, S. P., et al. 2012. Tumorstanzinierung. *Der Onkologe*, 18, 795-800.
- Haen, S. P., et al. 2016. Abstract: Unique Alterations in the Immunopeptidome of Colorectal Cancer Reflect Specific Transformations in Cancer-Associated Signaling Pathways and Reveal Tumor-Specific HLA-Ligand Modulations. *Blood*, Volume 128, Issue 22, ASH Annual Meeting 2016.
- Haen, S. P., et al. 2015. Abstract: Interplay Between the Immune System and Colorectal Carcinoma - Towards Tumor-Specific Peptide-Based Vaccination for Any HLA-Type. *Blood*, Volume 126, Issue 23, ASH Annual Meeting 2015.
- Haen, S. P., et al. 2013. The repertoire of human tumor-associated epitopes--identification and selection of antigens and their application in clinical trials. *Curr Opin Immunol*, 25, 277-83.
- Hamilton, S. R., et al. 1995. The molecular basis of Turcot's syndrome. *N Engl J Med*, 332, 839-47.
- Hanahan, D., et al. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144, 646-74.
- Handa, K., et al. 1983. Natural killer (NK) cells as a responder to interleukin 2 (IL 2). IL 2-induced interferon gamma production. *J Immunol*, 130, 988-92.

- Haque, A., et al. 2016. Current Understanding of HSP90 as a Novel Therapeutic Target: An Emerging Approach for the Treatment of Cancer. *Curr Pharm Des*, 22, 2947-59.
- Harrison, R. E., et al. 2002. Phagocytosis and the microtubule cytoskeleton. *Biochem Cell Biol*, 80, 509-15.
- Hazama, S., et al. 2014. A phase II study of five peptides combination with oxaliplatin-based chemotherapy as a first-line therapy for advanced colorectal cancer (FXV study). *J Transl Med*, 12, 108.
- He, Y., et al. 2017. MHC class II expression in lung cancer. *Lung Cancer*, 112, 75-80.
- Hecht, E. S., et al. 2020. Fundamentals and Advances of Orbitrap Mass Spectrometry. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*.
- Hecht, J. L., et al. 2000. Molecular biology of Burkitt's lymphoma. *J Clin Oncol*, 18, 3707-21.
- Heemskerck, B., et al. 2013. The cancer antigenome. *Embo j*, 32, 194-203.
- Hegde, R. S., et al. 2011. Tail-anchored membrane protein insertion into the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12, 787-98.
- Hege, K. M., et al. 2006. GM-CSF gene-modified cancer cell immunotherapies: of mice and men. *Int Rev Immunol*, 25, 321-52.
- Hirono, S., et al. 2010. Molecular markers associated with lymph node metastasis in pancreatic ductal adenocarcinoma by genome-wide expression profiling. *Cancer Sci*, 101, 259-66.
- Hodi, F. S., et al. 2010. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med*, 363, 711-23.
- Holtzman, E. J., et al. 1987. Serum cholesterol and the risk of colorectal cancer. *N Engl J Med*, 317, 114.
- Hope, N. R., et al. 2011. The expression profile of RNA-binding proteins in primary and metastatic colorectal cancer: relationship of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins with prognosis. *Hum Pathol*, 42, 393-402.
- Hsieh, C. S., et al. 1993. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science*, 260, 547-9.
- Hsu, P. K., et al. 2014. TPX2 expression is associated with cell proliferation and patient outcome in esophageal squamous cell carcinoma. *J Gastroenterol*, 49, 1231-40.
- Huang, D. W., et al. 2009a. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res*, 37, 1-13.
- Huang, D. W., et al. 2009b. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc*, 4, 44-57.
- Huang, Y., et al. 2018. Collagen Type VI Alpha 3 Chain Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition in Bladder Cancer Cells via Transforming Growth Factor beta (TGF-beta)/Smad Pathway. *Med Sci Monit*, 24, 5346-5354.
- Hui, R., et al. 2017. Pembrolizumab as first-line therapy for patients with PD-L1-positive advanced non-small cell lung cancer: a phase 1 trial. *Ann Oncol*, 28, 874-881.
- Ikeda, H., et al. 1997. Characterization of an antigen that is recognized on a melanoma showing partial HLA loss by CTL expressing an NK inhibitory receptor. *Immunity*, 6, 199-208.
- Imai, J., et al. 2005. Exogenous antigens are processed through the endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) in cross-presentation by dendritic cells. *Int Immunol*, 17, 45-53.
- Infante, J. R., et al. 2015. A first-in-human dose escalation study of PEGylated recombinant human IL-10 (AM0010) in advanced solid tumors. *J Clin Oncol*.
- Ionov, Y., et al. 1993. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature*, 363, 558-61.

- Iqbal, N., et al. 2014. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) in Cancers: Overexpression and Therapeutic Implications. *Mol Biol Int*, 2014, 852748.
- Ishikawa, T., et al. 2003. Tumor-specific immunological recognition of frameshift-mutated peptides in colon cancer with microsatellite instability. *Cancer Res*, 63, 5564-72.
- Ito, A., et al. 2015. Clinical Development of Immune Checkpoint Inhibitors. *Biomed Res Int*, 2015, 605478.
- Itoh, T., et al. 2002. Immunotherapy of solid cancer using dendritic cells pulsed with the HLA-A24-restricted peptide of carcinoembryonic antigen. *Cancer Immunol Immunother*, 51, 99-106.
- Jager, E., et al. 1998. Simultaneous humoral and cellular immune response against cancer-testis antigen NY-ESO-1: definition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2-binding peptide epitopes. *J Exp Med*, 187, 265-70.
- Jager, E., et al. 2003. Antigen-specific immunotherapy and cancer vaccines. *Int J Cancer*, 106, 817-20.
- Janeway, C. A. 2001. Immunobiology the immune system in health and disease. 5. ed ed. New York, NY: Garland Publ.
- Januchowski, R., et al. 2014. Extracellular matrix proteins expression profiling in chemoresistant variants of the A2780 ovarian cancer cell line. *Biomed Res Int*, 2014, 365867.
- Jenkins, M. K., et al. 1987. Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo. *J Exp Med*, 165, 302-19.
- Jeong, S. H., et al. 2012. Pyrophosphatase overexpression is associated with cell migration, invasion, and poor prognosis in gastric cancer. *Tumour Biol*, 33, 1889-98.
- Jerome, K. R., et al. 1991. Cytotoxic T-lymphocytes derived from patients with breast adenocarcinoma recognize an epitope present on the protein core of a mucin molecule preferentially expressed by malignant cells. *Cancer Res*, 51, 2908-16.
- Jezequel, P., et al. 2012. Validation of tumor-associated macrophage ferritin light chain as a prognostic biomarker in node-negative breast cancer tumors: A multicentric 2004 national PHRC study. *Int J Cancer*, 131, 426-37.
- Ji, F., et al. 2015. Prognostic value and characterization of the ovarian cancer-specific antigen CA166-9. *Int J Oncol*, 47, 1405-15.
- Jin, X., et al. 2016. FXR1 is elevated in colorectal cancer and acts as an oncogene. *Tumour Biol*, 37, 2683-90.
- Jorgensen, K. W., et al. 2010. Structural properties of MHC class II ligands, implications for the prediction of MHC class II epitopes. *PLoS One*, 5, e15877.
- June, C. H., et al. 1987. T-cell proliferation involving the CD28 pathway is associated with cyclosporine-resistant interleukin 2 gene expression. *Mol Cell Biol*, 7, 4472-81.
- Jurikova, M., et al. 2016. Ki67, PCNA, and MCM proteins: Markers of proliferation in the diagnosis of breast cancer. *Acta Histochem*, 10.1016/j.acthis.2016.05.002.
- Kagi, D., et al. 1994. Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature*, 369, 31-7.
- Kallen, K. J., et al. 2014. A development that may evolve into a revolution in medicine: mRNA as the basis for novel, nucleotide-based vaccines and drugs. *Ther Adv Vaccines*, 2, 10-31.
- Kalli, A., et al. 2012. Effect of mass spectrometric parameters on peptide and protein identification rates for shotgun proteomic experiments on an LTQ-orbitrap mass analyzer. *Proteomics*, 12, 21-31.
- Kalli, A., et al. 2013. Evaluation and optimization of mass spectrometric settings during data-dependent acquisition mode: focus on LTQ-Orbitrap mass analyzers. *J Proteome Res*, 12, 3071-86.



- Kantoff, P. W., et al. 2010a. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N Engl J Med*, 363, 411-22.
- Kantoff, P. W., et al. 2010b. Overall survival analysis of a phase II randomized controlled trial of a Poxviral-based PSA-targeted immunotherapy in metastatic castration-resistant prostate cancer. *J Clin Oncol*, 28, 1099-105.
- Karagiannis, G. S., et al. 2012. Proteomic signatures of the desmoplastic invasion front reveal collagen type XII as a marker of myofibroblastic differentiation during colorectal cancer metastasis. *Oncotarget*, 3, 267-85.
- Kardos, G. R., et al. 2014. Growth inhibitory effects of large subunit ribosomal proteins in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*, 27, 801-12.
- Kaufman, H. L., et al. 2008. Combination chemotherapy and ALVAC-CEA/B7.1 vaccine in patients with metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res*, 14, 4843-9.
- Kawamura, J., et al. 2018. Cytotoxic T lymphocyte response to peptide vaccination predicts survival in stage III colorectal cancer. *Cancer Sci*, 109, 1545-1551.
- Keir, M. E., et al. 2008. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol*, 26, 677-704.
- Kersh, E. N., et al. 1998. Fidelity of T cell activation through multistep T cell receptor zeta phosphorylation. *Science*, 281, 572-5.
- Kikuchi, R., et al. 2000. Immunohistochemical detection of membrane-type-1-matrix metalloproteinase in colorectal carcinoma. *Br J Cancer*, 83, 215-8.
- Kim, E. R., et al. 2014. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the risk, pathogenesis, prevention and diagnosis. *World J Gastroenterol*, 20, 9872-81.
- Kim, H., et al. 1994. Clinical and pathological characteristics of sporadic colorectal carcinomas with DNA replication errors in microsatellite sequences. *Am J Pathol*, 145, 148-56.
- Kim, H., et al. 2010. Multi-cancer computational analysis reveals invasion-associated variant of desmoplastic reaction involving INHBA, THBS2 and COL11A1. *BMC Med Genomics*, 3, 51.
- Kim, H. S., et al. 2018. Immune checkpoint inhibitors for urothelial carcinoma. *Investig Clin Urol*, 59, 285-296.
- Kim, M. S., et al. 2012. Expressional analysis of NOLA1, NOLA2, NOLA3 and DKC1, the core proteins in H/ACA riboproteins, in gastric and colorectal cancers. *Pathology*, 44, 576-7.
- Kitamoto, S., et al. 2012. Expression of MUC17 is regulated by HIF1alpha-mediated hypoxic responses and requires a methylation-free hypoxia responsible element in pancreatic cancer. *PLoS One*, 7, e44108.
- Klebanoff, C. A., et al. 2011. Therapeutic cancer vaccines: are we there yet? *Immunol Rev*, 239, 27-44.
- Klein, G., et al. 1960. Demonstration of resistance against methylcholanthrene-induced sarcomas in the primary autochthonous host. *Cancer Res*, 20, 1561-72.
- Klein, O., et al. 2009. Melan-A-specific cytotoxic T cells are associated with tumor regression and autoimmunity following treatment with anti-CTLA-4. *Clin Cancer Res*, 15, 2507-13.
- Kloetzel, P. M., et al. 2004. Proteasome and peptidase function in MHC-class-I-mediated antigen presentation. *Curr Opin Immunol*, 16, 76-81.
- Kobayashi, H., et al. 2002. Identification of an antigenic epitope for helper T lymphocytes from carcinoembryonic antigen. *Clin Cancer Res*, 8, 3219-25.
- Kobayashi, T., et al. 2006. Activation of the ribosomal protein L13 gene in human gastrointestinal cancer. *Int J Mol Med*, 18, 161-70.
- Kochin, V., et al. 2017. HLA-A24 ligandome analysis of colon and lung cancer cells identifies a novel cancer-testis antigen and a neoantigen that elicits specific and strong CTL responses. *Oncoimmunology*, 6, e1293214.

- Kofunato, Y., et al. 2012. UHRF1 expression is upregulated and associated with cellular proliferation in colorectal cancer. *Oncol Rep*, 28, 1997-2002.
- Kohn, J., et al. 1981. Procedures for the analysis of cyanogen bromide-activated Sepharose or Sephadex by quantitative determination of cyanate esters and imidocarbonates. *Anal Biochem*, 115, 375-82.
- Koido, S., et al. 2000. Induction of antitumor immunity by vaccination of dendritic cells transfected with MUC1 RNA. *J Immunol*, 165, 5713-9.
- Koopman, L. A., et al. 2000. Multiple genetic alterations cause frequent and heterogeneous human histocompatibility leukocyte antigen class I loss in cervical cancer. *J Exp Med*, 191, 961-76.
- Kovacsovics-Bankowski, M., et al. 1995. A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science*, 267, 243-6.
- Kowalewski, D. J. 2011. *Massenspektrometrische Analyse von Nierenzellkarzinomen zur Entwicklung neuer Tumorvakzine* Eberhardt Karls Universität Tübingen.
- Kowalewski, D. J., et al. 2015. HLA ligandome analysis identifies the underlying specificities of spontaneous antileukemia immune responses in chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112, E166-75.
- Kowalewski, D. J., et al. 2013. Biochemical large-scale identification of MHC class I ligands. *Methods Mol Biol*, 960, 145-57.
- Kowalewski, D. J., et al. 2016. Carfilzomib alters the HLA-presented peptidome of myeloma cells and impairs presentation of peptides with aromatic C-termini. *Blood Cancer J*, 6, e411.
- Krishn, S. R., et al. 2016. Mucins and associated glycan signatures in colon adenoma-carcinoma sequence: Prospective pathological implication(s) for early diagnosis of colon cancer. *Cancer Lett*, 374, 304-14.
- Krishnan, S., et al. 2014. Streptococcus bovis infection and colorectal neoplasia: a meta-analysis. *Colorectal Dis*, 16, 672-80.
- Kropshofer, H., et al. 1996. Editing of the HLA-DR-peptide repertoire by HLA-DM. *Embo j*, 15, 6144-54.
- Kumai, T., et al. 2017. Optimization of Peptide Vaccines to Induce Robust Antitumor CD4 T-cell Responses. *Cancer Immunol Res*, 5, 72-83.
- Kuo, J. C. 2017. Immune checkpoint inhibitors in the treatment of advanced mucosal melanoma. *Melanoma Manag*, 4, 161-167.
- Kupiec-Weglinski, J. W., et al. 1988. Migration patterns of dendritic cells in the mouse. Traffic from the blood, and T cell-dependent and -independent entry to lymphoid tissues. *J Exp Med*, 167, 632-45.
- Kurniali, P. C., et al. 2014. Management of locally advanced and metastatic colon cancer in elderly patients. *World J Gastroenterol*, 20, 1910-22.
- Kutzler, M. A., et al. 2008. DNA vaccines: ready for prime time? *Nat Rev Genet*, 9, 776-88.
- Kwon, C. H., et al. 2016. PSMB8 and PBK as potential gastric cancer subtype-specific biomarkers associated with prognosis. *Oncotarget*, 10.18632/oncotarget.7411.
- Kwong, J. C., et al. 2015. Whole genome sequencing in clinical and public health microbiology. *Pathology*, 47, 199-210.
- Kwong, Y. L., et al. 2017. Brief report: PD1 blockade with pembrolizumab is highly effective in relapsed or refractory NK/T-cell lymphoma failing l-asparaginase. *Blood*, Volume 129, Issue 17, 2437-2442.
- Kyriakis, J. M., et al. 2012. Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update. *Physiol Rev*, 92, 689-737.
- Lacouture, M. E., et al. 2014. Ipilimumab in patients with cancer and the management of dermatologic adverse events. *J Am Acad Dermatol*, 71, 161-9.

- Ladoire, S., et al. 2011. Prognostic role of FOXP3+ regulatory T cells infiltrating human carcinomas: the paradox of colorectal cancer. *Cancer Immunol Immunother*, 60, 909-18.
- Lambert, R., et al. 2009. Pragmatic classification of superficial neoplastic colorectal lesions. *Gastrointest Endosc*, 70, 1182-99.
- Lane, D. P. 1992. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*, 358, 15-6.
- Larkin, J., et al. 2015. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N Engl J Med*, 373, 23-34.
- Larsson, S. C., et al. 2005. Diabetes mellitus and risk of colorectal cancer: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*, 97, 1679-87.
- Lazar, C., et al. 2016. Accounting for the Multiple Natures of Missing Values in Label-Free Quantitative Proteomics Data Sets to Compare Imputation Strategies. *J Proteome Res*, 15, 1116-25.
- Le, D. T., et al. 2015. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med*, 372, 2509-20.
- Le Gouvello, S., et al. 2008. High prevalence of Foxp3 and IL17 in MMR-proficient colorectal carcinomas. *Gut*, 57, 772-9.
- Leder, P. 1982. The genetics of antibody diversity. *Sci Am*, 246, 102-15.
- Leder, P. 1983. Genetic control of immunoglobulin production. *Hosp Pract (Off Ed)*, 18, 73-82.
- Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft), D. K., Awmf) 2018. Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms, Langversion 1.0.
- Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft), D. K., Awmf) 2019. S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, Langversion 2.1,2019, AWMF Registrierungsnummer: 021/007OL.
- Lemjabbar-Alaoui, H., et al. 2010. Sulf-2, a heparan sulfate endosulfatase, promotes human lung carcinogenesis. *Oncogene*, 29, 635-46.
- Li, C., et al. 2015a. Piezo1 forms mechanosensitive ion channels in the human MCF-7 breast cancer cell line. *Sci Rep*, 5, 8364.
- Li, D., et al. 2017. Development of a T-cell Receptor Mimic Antibody against Wild-Type p53 for Cancer Immunotherapy. *Cancer Res*, 77, 2699-2711.
- Li, W. 2012. Volcano plots in analyzing differential expressions with mRNA microarrays. *J Bioinform Comput Biol*, 10, 1231003.
- Li, X., et al. 2011. The presence of IGHG1 in human pancreatic carcinomas is associated with immune evasion mechanisms. *Pancreas*, 40, 753-61.
- Li, X., et al. 2013. Association between promoters polymorphisms of matrix metalloproteinases and risk of digestive cancers: a meta-analysis. *J Cancer Res Clin Oncol*, 139, 1433-47.
- Li, X. L., et al. 2015b. P53 mutations in colorectal cancer - molecular pathogenesis and pharmacological reactivation. *World J Gastroenterol*, 21, 84-93.
- Li, Y., et al. 2016. Prognostic impact of programmed cell death-1 (PD-1) and PD-ligand 1 (PD-L1) expression in cancer cells and tumor infiltrating lymphocytes in colorectal cancer. *Mol Cancer*, 15, 55.
- Liang, P. S., et al. 2009. Cigarette smoking and colorectal cancer incidence and mortality: systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer*, 124, 2406-15.
- Liang, T. J., et al. 2017. APC hypermethylation for early diagnosis of colorectal cancer: a meta-analysis and literature review. *Oncotarget*, 8, 46468-46479.
- Liebermeister, W., et al. 2014. Visual account of protein investment in cellular functions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, 8488-93.
- Lievre, A., et al. 2006. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res*, 66, 3992-5.

- Lin, C. Y., et al. 2015. Low thrombospondin 2 expression is predictive of low tumor regression after neoadjuvant chemoradiotherapy in rectal cancer. *Am J Transl Res*, 7, 2423-32.
- Lin, Q., et al. 2014. iTRAQ analysis of colorectal cancer cell lines suggests Drebrin (DBN1) is overexpressed during liver metastasis. *Proteomics*, 14, 1434-43.
- Lin, X., et al. 2016. Associations of THBS2 and THBS4 polymorphisms to gastric cancer in a Southeast Chinese population. *Cancer Genet*, 10.1016/j.cancergen.2016.04.003.
- Linnemann, C., et al. 2015. High-throughput epitope discovery reveals frequent recognition of neo-antigens by CD4+ T cells in human melanoma. *Nat Med*, 21, 81-5.
- Lipkin, S. M., et al. 2000. MLH3: a DNA mismatch repair gene associated with mammalian microsatellite instability. *Nat Genet*, 24, 27-35.
- Lissoni, P., et al. 2005. Enhancement of the efficacy of chemotherapy with oxaliplatin plus 5-fluorouracil by pretreatment with IL-2 subcutaneous immunotherapy in metastatic colorectal cancer patients with lymphocytopenia prior to therapy. *In Vivo*, 19, 1077-80.
- Liu, H., et al. 2009. Regulation of ErbB2 receptor status by the proteasomal DUB POH1. *PLoS One*, 4, e5544.
- Liu, H., et al. 2004. A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics. *Anal Chem*, 76, 4193-201.
- Liu, J. J., et al. 2006. Repression of HIP/RPL29 expression induces differentiation in colon cancer cells. *J Cell Physiol*, 207, 287-92.
- Liu, W., et al. 2018. Role of COL6A3 in colorectal cancer. *Oncol Rep*, 39, 2527-2536.
- Liu, Y., et al. 2012. Expression of nucleophosmin/NPM1 correlates with migration and invasiveness of colon cancer cells. *J Biomed Sci*, 19, 53.
- Lo, W., et al. 2019. Immunologic Recognition of a Shared p53 Mutated Neoantigen in a Patient with Metastatic Colorectal Cancer. *Cancer Immunol Res*, 7, 534-543.
- Locardi, C., et al. 1987. Effect of mouse interferon alpha/beta on the expression of H-2 (class I) antigens and on the levels of 2'-5' oligoadenylate synthetase activity in interferon-sensitive and interferon-resistant Friend leukemia cell tumors in mice. *J Biol Regul Homeost Agents*, 1, 189-94.
- Löffler, M. W., et al. 2018a. Mapping the HLA ligandome of Colorectal Cancer Reveals an Imprint of Malignant Cell Transformation. *Cancer Research*, 10.1158/0008-5472.can-17-1745.
- Löffler, M. W., et al. 2018b. Mapping the HLA ligandome of Colorectal Cancer Reveals an Imprint of Malignant Cell Transformation. *Cancer Research*, 10.1158/0008-5472.can-17-1745, canres.1745.2017.
- Logan, C. Y., et al. 2004. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 20, 781-810.
- Lu, L. I., et al. 2015. Overexpression of cofilin 1 in prostate cancer and the corresponding clinical implications. *Oncol Lett*, 9, 2757-2761.
- Lucci-Cordisco, E., et al. 2001. Mutations of the 'minor' mismatch repair gene MSH6 in typical and atypical hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Fam Cancer*, 1, 93-9.
- Lucci-Cordisco, E., et al. 2003. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer and related conditions. *Am J Med Genet A*, 122A, 325-34.
- Lundegaard, C., et al. 2008a. 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.
- Lundegaard, C., et al. 2008b. Accurate approximation method for prediction of class I MHC affinities for peptides of length 8, 10 and 11 using prediction tools trained on 9mers. *Bioinformatics*, 24, 1397-8.

- Lv, X. H., et al. 2016. Integrin alpha4 Induces Lymphangiogenesis and Metastasis via Upregulation of VEGF-C in Human Colon Cancer. *Anat Rec (Hoboken)*, 299, 741-7.
- Lynch, D., et al. 2016. The emerging role of immunotherapy in colorectal cancer. *Annals of Translational Medicine*, 4, 305.
- Lynch, H. T., et al. 2003. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med*, 348, 919-32.
- Ma, Y. L., et al. 2009. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 is identified as a potential biomarker for colorectal cancer based on differential proteomics technology. *J Proteome Res*, 8, 4525-35.
- Maby, P., et al. 2015. Correlation between Density of CD8+ T-cell Infiltrate in Microsatellite Unstable Colorectal Cancers and Frameshift Mutations: A Rationale for Personalized Immunotherapy. *Cancer Res*, 75, 3446-55.
- Magee, M. S., et al. 2018. Human GUCY2C-Targeted Chimeric Antigen Receptor (CAR)-Expressing T Cells Eliminate Colorectal Cancer Metastases. *Cancer Immunol Res*, 6, 509-516.
- Magee, M. S., et al. 2016. GUCY2C-directed CAR-T cells oppose colorectal cancer metastases without autoimmunity. *Oncoimmunology*, 5, e1227897.
- Magro, C. M., et al. 2006. Unusual variants of malignant melanoma. *Mod Pathol*, 19 Suppl 2, S41-70.
- Majumder, S., et al. 2018. A cancer vaccine approach for personalized treatment of Lynch Syndrome. *Sci Rep*, 8, 12122.
- Makarov, A., et al. 2006. Performance evaluation of a hybrid linear ion trap/orbitrap mass spectrometer. *Anal Chem*, 78, 2113-20.
- Maldonado-Lopez, R., et al. 2001. Dendritic cell subsets and the regulation of Th1/Th2 responses. *Semin Immunol*, 13, 275-82.
- Marble, A. 1934. Diabetes and Cancer. *New England Journal of Medicine*, 211, 339-349.
- Mardis, E. R. 2006. Anticipating the 1,000 dollar genome. *Genome Biol*, 7, 112.
- Marijt, K. A., et al. 2018. Identification of non-mutated neoantigens presented by TAP-deficient tumors. *J Exp Med*, 215, 2325-2337.
- Maude, S. L., et al. 2014. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N Engl J Med*, 371, 1507-17.
- Maughan, T. S., et al. 2012. Overall survival of advanced colorectal cancer patients treated with the multi-peptide vaccine IMA910: Results of a matched-pair analysis with Arm C patients from the MRC COIN trial.
- Mayer, F., et al. 2012. A phase I/II trial of the multi-peptide cancer vaccine IMA910 in patients with advanced colorectal cancer (CRC). *ASCO 2012 Gastrointestinal Cancers Symposium*. San Francisco.
- Mcdougall, C. J., et al. 1990. Reduced expression of HLA class I and II antigens in colon cancer. *Cancer Res*, 50, 8023-7.
- Mciver, C. M., et al. 2004. Dipeptidase 1: a candidate tumor-specific molecular marker in colorectal carcinoma. *Cancer Lett*, 209, 67-74.
- Mei, Z., et al. 2014. Tumour-infiltrating inflammation and prognosis in colorectal cancer: systematic review and meta-analysis. *Br J Cancer*, 110, 1595-605.
- Meng, Q., et al. 2018. MPO Promoter Polymorphism rs2333227 Enhances Malignant Phenotypes of Colorectal Cancer by Altering the Binding Affinity of AP-2alpha. *Cancer Res*, 78, 2760-2769.
- Meng, Q. C., et al. 2015. Overexpression of NDC80 is correlated with prognosis of pancreatic cancer and regulates cell proliferation. *Am J Cancer Res*, 5, 1730-40.
- Mikula, M., et al. 2011. Integrating proteomic and transcriptomic high-throughput surveys for search of new biomarkers of colon tumors. *Funct Integr Genomics*, 11, 215-24.

- Mlecnik, B., et al. 2016. Integrative Analyses of Colorectal Cancer Show Immunoscore Is a Stronger Predictor of Patient Survival Than Microsatellite Instability. *Immunity*, 44, 698-711.
- Mlecnik, B., et al. 2011. Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction. *J Clin Oncol*, 29, 610-8.
- Momburg, F., et al. 1986. Loss of HLA-A,B,C and de novo expression of HLA-D in colorectal cancer. *Int J Cancer*, 37, 179-84.
- Mook, O. R., et al. 2004. The role of gelatinases in colorectal cancer progression and metastasis. *Biochim Biophys Acta*, 1705, 69-89.
- Morse, M. A., et al. 1999. A Phase I study of active immunotherapy with carcinoembryonic antigen peptide (CAP-1)-pulsed, autologous human cultured dendritic cells in patients with metastatic malignancies expressing carcinoembryonic antigen. *Clin Cancer Res*, 5, 1331-8.
- Moser, M. 2001. Regulation of Th1/Th2 development by antigen-presenting cells in vivo. *Immunobiology*, 204, 551-7.
- Mosyak, L., et al. 1998. The structure of HLA-DM, the peptide exchange catalyst that loads antigen onto class II MHC molecules during antigen presentation. *Immunity*, 9, 377-83.
- Mueller, D. L., et al. 1989. Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a costimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy. *Annu Rev Immunol*, 7, 445-80.
- Mukherjee, P., et al. 2007. MUC1-specific immune therapy generates a strong anti-tumor response in a MUC1-tolerant colon cancer model. *Vaccine*, 25, 1607-18.
- Mukhopadhyay, R. 2009. DNA sequencers: the next generation. *Anal Chem*, 81, 1736-40.
- Munn, D. H., et al. 2007. Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance. *J Clin Invest*, 117, 1147-54.
- Murphy, K. M., et al. 2009. *Janeway Immunologie*, Heidelberg, Spektrum Akad. Verl.
- Mustafi, R., et al. 2012. Both stromal cell and colonocyte epidermal growth factor receptors control HCT116 colon cancer cell growth in tumor xenografts. *Carcinogenesis*, 33, 1930-9.
- Naftzger, C., et al. 1996. Immune response to a differentiation antigen induced by altered antigen: a study of tumor rejection and autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 14809-14.
- Nagase, H., et al. 1993. Mutations of the APC (adenomatous polyposis coli) gene. *Hum Mutat*, 2, 425-34.
- Nagata, S. 1999. Fas ligand-induced apoptosis. *Annu Rev Genet*, 33, 29-55.
- Nagtegaal, I. D., et al. 2001. Local and distant recurrences in rectal cancer patients are predicted by the nonspecific immune response; specific immune response has only a systemic effect--a histopathological and immunohistochemical study. *BMC Cancer*, 1, 7.
- National Human Genome Research Institute. 2016. *The Cost of Sequencing a Human Genome*. <https://www.genome.gov/sequencingcosts/> Zugriff: [02.03. 2020].
- Nature Publishing Group 2017. The problem with neoantigen prediction. *Nature Biotechnology*, 35, 97.
- Nawroth, R., et al. 2007. Extracellular sulfatases, elements of the Wnt signaling pathway, positively regulate growth and tumorigenicity of human pancreatic cancer cells. *PLoS One*, 2, e392.
- Neefjes, J. J., et al. 1990. The biosynthetic pathway of MHC class II but not class I molecules intersects the endocytic route. *Cell*, 61, 171-83.
- Neilson, K. A., et al. 2011. Less label, more free: approaches in label-free quantitative mass spectrometry. *Proteomics*, 11, 535-53.

- Nelde, A., et al. 2018. HLA ligandome analysis of primary chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells under lenalidomide treatment confirms the suitability of lenalidomide for combination with T-cell-based immunotherapy. *Oncoimmunology*, 7, e1316438-e1316438.
- Nelde, A., et al. 2019. Purification and Identification of Naturally Presented MHC Class I and II Ligands. *Methods Mol Biol*, 1988, 123-136.
- Nemunaitis, J., et al. 2006. Phase II study of belagenpumatucel-L, a transforming growth factor beta-2 antisense gene-modified allogeneic tumor cell vaccine in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*, 24, 4721-30.
- Nemunaitis, J., et al. 2009. Phase II trial of Belagenpumatucel-L, a TGF-beta2 antisense gene modified allogeneic tumor vaccine in advanced non small cell lung cancer (NSCLC) patients. *Cancer Gene Ther*, 16, 620-4.
- Nestle, F. O., et al. 1998. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med*, 4, 328-32.
- Nicastri, A., et al. 2014. N-glycoprotein analysis discovers new up-regulated glycoproteins in colorectal cancer tissue. *J Proteome Res*, 13, 4932-41.
- Nicolaides, N. C., et al. 1994. Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature*, 371, 75-80.
- Nielsen, M., et al. 2003. Reliable prediction of T-cell epitopes using neural networks with novel sequence representations. *Protein Sci*, 12, 1007-17.
- Nishimura, H., et al. 1999. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity*, 11, 141-51.
- Nishimura, H., et al. 2001. Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science*, 291, 319-22.
- Nozawa, Y., et al. 1996. Expression of nucleophosmin/B23 in normal and neoplastic colorectal mucosa. *J Pathol*, 178, 48-52.
- O'haver 2020. Pragmatic Introduction to Signal Processing. Department of Chemistry and Biochemistry, The University of Maryland at College Park.
- Ochsenbein, A. F., et al. 1999. Immune surveillance against a solid tumor fails because of immunological ignorance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 2233-8.
- Ohtani, H. 2007. Focus on TILs: prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human colorectal cancer. *Cancer Immun*, 7, 4.
- Okada, A., et al. 1995. Membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP) gene is expressed in stromal cells of human colon, breast, and head and neck carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 2730-4.
- Okada, F. 2014. Inflammation-related carcinogenesis: current findings in epidemiological trends, causes and mechanisms. *Yonago Acta Med*, 57, 65-72.
- Okolicsanyi, R. K., et al. 2014. Association of the SNP rs2623047 in the HSPG modification enzyme SULF1 with an Australian Caucasian breast cancer cohort. *Gene*, 547, 50-4.
- Otto, A., et al. 2010. Systems-wide temporal proteomic profiling in glucose-starved *Bacillus subtilis*. *Nat Commun*, 1, 137.
- Overman, M. J., et al. 2018. Durable Clinical Benefit With Nivolumab Plus Ipilimumab in DNA Mismatch Repair-Deficient/Microsatellite Instability-High Metastatic Colorectal Cancer. *J Clin Oncol*, 36, 773-779.
- Overwijk, W. W., et al. 1998. gp100/pmel 17 Is a Murine Tumor Rejection Antigen: Induction of "Self"-reactive, Tumoricidal T Cells Using High-affinity, Altered Peptide Ligand. *The Journal of Experimental Medicine*, 188, 277-286.
- Pandurangan, A. K., et al. 2018. Colorectal carcinogenesis: Insights into the cell death and signal transduction pathways: A review. *World J Gastrointest Oncol*, 10, 244-259.

- Parada, L. F., et al. 1982. Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus ras gene. *Nature*, 297, 474-8.
- Pardoll, D. M. 2012. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*, 12, 252-64.
- Pardoll, D. M., et al. 1998. The role of CD4+ T cell responses in antitumor immunity. *Curr Opin Immunol*, 10, 588-94.
- Park, I. A., et al. 2017. Expression of the MHC class II in triple-negative breast cancer is associated with tumor-infiltrating lymphocytes and interferon signaling. *PLoS One*, 12, e0182786.
- Park, S. Y., et al. 2016. Dehydropeptidase 1 promotes metastasis through regulation of E-cadherin expression in colon cancer. *Oncotarget*, 7, 9501-12.
- Participants in the Paris Workshop 2003. The Paris endoscopic classification of superficial neoplastic lesions: esophagus, stomach, and colon: November 30 to December 1, 2002. *Gastrointestinal Endoscopy*, 58, S3-S43.
- Pascolo, S. 2004. Messenger RNA-based vaccines. *Expert Opin Biol Ther*, 4, 1285-94.
- Pascolo, S. 2015. The messenger's great message for vaccination. *Expert Rev Vaccines*, 14, 153-6.
- Pawelec, G., et al. 1985. Dissection of human allostimulatory determinants with cloned T cells: stimulation inhibition by monoclonal antibodies TU22, 34, 35, 36, 37, 39, 43, and 58 against distinct human MHC class II molecules. *Hum Immunol*, 12, 165-76.
- Peltomaki, P., et al. 1993. Microsatellite instability is associated with tumors that characterize the hereditary non-polyposis colorectal carcinoma syndrome. *Cancer Res*, 53, 5853-5.
- Perez-Diez, A., et al. 2007. CD4 cells can be more efficient at tumor rejection than CD8 cells. *Blood*, 109, 5346-54.
- Perkins, D. N., et al. 1999. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*, 20, 3551-67.
- Petrenko, A. A., et al. 2006. Downregulation of genes encoding for subunits of adaptor complex-3 in cervical carcinomas. *Biochemistry (Mosc)*, 71, 1153-60.
- Pianta, A., et al. 2010. Nucleophosmin is overexpressed in thyroid tumors. *Biochem Biophys Res Commun*, 397, 499-504.
- Pindel, A., et al. 2011. The role of protein kinase R in the interferon response. *J Interferon Cytokine Res*, 31, 59-70.
- Prehn, R. T., et al. 1957. Immunity to methylcholanthrene-induced sarcomas. *J Natl Cancer Inst*, 18, 769-78.
- Qiao, J., et al. 2015. Stroma derived COL6A3 is a potential prognosis marker of colorectal carcinoma revealed by quantitative proteomics. *Oncotarget*, 6, 29929-46.
- Qin, Z., et al. 2000. 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.
- Quill, H., et al. 1987. Stimulation of normal inducer T cell clones with antigen presented by purified Ia molecules in planar lipid membranes: specific induction of a long-lived state of proliferative nonresponsiveness. *J Immunol*, 138, 3704-12.
- Rajasagi, M., et al. 2014. Systematic identification of personal tumor-specific neoantigens in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 124, 453-62.
- Ramirez, M. C., et al. 2002. Macrophages and dendritic cells use the cytosolic pathway to rapidly cross-present antigen from live, vaccinia-infected cells. *J Immunol*, 169, 6733-42.
- Rammensee, H., et al. 1999. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics*, 50, 213-9.



- Rammensee, H. G., et al. 1995. MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics*, 41, 178-228.
- Rammensee, H. G., et al. 2013. HLA ligandome tumor antigen discovery for personalized vaccine approach. *Expert Rev Vaccines*, 12, 1211-7.
- Rausch, S., et al. 2014. IMA901 for metastatic renal cell carcinoma in the context of new approaches to immunotherapy. *Future Oncol*, 10, 937-48.
- Reck, M., et al. 2016. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*, 375, 1823-1833.
- Reiser, J. B., et al. 2003. CDR3 loop flexibility contributes to the degeneracy of TCR recognition. *Nat Immunol*, 4, 241-7.
- Reiser, J. B., et al. 2002. A T cell receptor CDR3beta loop undergoes conformational changes of unprecedented magnitude upon binding to a peptide/MHC class I complex. *Immunity*, 16, 345-54.
- Reits, E. A., et al. 2000. The major substrates for TAP in vivo are derived from newly synthesized proteins. *Nature*, 404, 774-8.
- Ren, G. F., et al. 2014. Prognostic impact of NDRG2 and NDRG3 in prostate cancer patients undergoing radical prostatectomy. *Histol Histopathol*, 29, 535-42.
- Resnick, M. A., et al. 2003. Functional mutants of the sequence-specific transcription factor p53 and implications for master genes of diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 9934-9.
- Ressing, M. E., et al. 1995. Human CTL epitopes encoded by human papillomavirus type 16 E6 and E7 identified through in vivo and in vitro immunogenicity studies of HLA-A\*0201-binding peptides. *J Immunol*, 154, 5934-43.
- Ridge, J. P., et al. 1998. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell. *Nature*, 393, 474-8.
- Riera-Knorrenschild, J., et al. 2015. A subgroup with improved overall survival from the phase 2 IMPACT study: Maintenance therapy of metastatic colorectal cancer patients with the TLR-9 agonist MGN1703. *Journal of Clinical Oncology*, 33, 3049-3049.
- Ritter, C., et al. 2017. Epigenetic priming restores the HLA class-I antigen processing machinery expression in Merkel cell carcinoma. *Scientific Reports*, 7, 2290.
- Robbins, P. F., et al. 2013. Mining exomic sequencing data to identify mutated antigens recognized by adoptively transferred tumor-reactive T cells. *Nat Med*, 19, 747-52.
- Robert, C., et al. 2015. Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med*, 372, 2521-32.
- Robert Koch-Institut Und Die Gesellschaft Der Epidemiologischen Krebsregister in Deutschland E.V. 2017. *Krebs in Deutschland für 2013/2014*, .
- Roche, P. A., et al. 1990. Invariant chain association with HLA-DR molecules inhibits immunogenic peptide binding. *Nature*, 345, 615-8.
- Rosen, S. D., et al. 2010. Sulf-2: an extracellular modulator of cell signaling and a cancer target candidate. *Expert Opin Ther Targets*, 14, 935-49.
- Rosenberg, S. A. 2001. Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature*, 411, 380-4.
- Rosenberg, S. A., et al. 1989. Experience with the use of high-dose interleukin-2 in the treatment of 652 cancer patients. *Ann Surg*, 210, 474-84; discussion 484-5.
- Rosenberg, S. A., et al. 2011. Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. *Clin Cancer Res*, 17, 4550-7.
- Rowen, L., et al. 1996. The complete 685-kilobase DNA sequence of the human beta T cell receptor locus. *Science*, 272, 1755-62.
- Rudensky, A., et al. 1991. Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. *Nature*, 353, 622-7.

- Ryder, M., et al. 2014. Endocrine-related adverse events following ipilimumab in patients with advanced melanoma: a comprehensive retrospective review from a single institution. *Endocr Relat Cancer*, 21, 371-81.
- Sadanandam, A., et al. 2013. A colorectal cancer classification system that associates cellular phenotype and responses to therapy. *Nat Med*, 19, 619-25.
- Saeterdal, I., et al. 2001. Frameshift-mutation-derived peptides as tumor-specific antigens in inherited and spontaneous colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 13255-60.
- Said, A. H., et al. 2014. The role of matrix metalloproteinases in colorectal cancer. *Cancers (Basel)*, 6, 366-75.
- Sakthianandeswaren, A., et al. 2011. PHLDA1 expression marks the putative epithelial stem cells and contributes to intestinal tumorigenesis. *Cancer Res*, 71, 3709-19.
- Salama, P., et al. 2009. Tumor-infiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 27, 186-92.
- Salama, P., et al. 2012. FOXP3+ cell density in lymphoid follicles from histologically normal mucosa is a strong prognostic factor in early stage colon cancer. *Cancer Immunol Immunother*, 61, 1183-90.
- Santos, E., et al. 1982. T24 human bladder carcinoma oncogene is an activated form of the normal human homologue of BALB- and Harvey-MSV transforming genes. *Nature*, 298, 343-7.
- Sarin, A., et al. 1997. Target cell lysis by CTL granule exocytosis is independent of ICE/Ced-3 family proteases. *Immunity*, 6, 209-15.
- Satoh, K., et al. 2017. Global metabolic reprogramming of colorectal cancer occurs at adenoma stage and is induced by MYC. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114, E7697-e7706.
- Satow, R., et al. 2010. Combined functional genome survey of therapeutic targets for hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res*, 16, 2518-28.
- Saviozzi, S., et al. 2006. Selection of suitable reference genes for accurate normalization of gene expression profile studies in non-small cell lung cancer. *BMC Cancer*, 6, 200.
- Schmoll, H. J., et al. 2014. Maintenance treatment with the immunomodulator MGN1703, a Toll-like receptor 9 (TLR9) agonist, in patients with metastatic colorectal carcinoma and disease control after chemotherapy: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *J Cancer Res Clin Oncol*, 140, 1615-24.
- Schumacher, T. N., et al. 2015. Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science*, 348, 69-74.
- Schuster, H., et al. 2017. The immunopeptidomic landscape of ovarian carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114, E9942-e9951.
- Schwartz, R. H. 2003. T cell anergy. *Annu Rev Immunol*, 21, 305-34.
- Schwitalle, Y., et al. 2008. Immune response against frameshift-induced neopeptides in HNPCC patients and healthy HNPCC mutation carriers. *Gastroenterology*, 134, 988-97.
- Schwitalle, Y., et al. 2004. Immunogenic peptides generated by frameshift mutations in DNA mismatch repair-deficient cancer cells. *Cancer Immun*, 4, 14.
- Senapati, S., et al. 2010. Expression of intestinal MUC17 membrane-bound mucin in inflammatory and neoplastic diseases of the colon. *J Clin Pathol*, 63, 702-7.
- Senda, T., et al. 2005. Adenomatous polyposis coli (Apc) tumor suppressor gene as a multifunctional gene. *Anat Sci Int*, 80, 121-31.
- Sercarz, E. E., et al. 2003. Mhc-guided processing: binding of large antigen fragments. *Nat Rev Immunol*, 3, 621-9.
- Serrati, S., et al. 2016. Next-generation sequencing: advances and applications in cancer diagnosis. *Onco Targets Ther*, 9, 7355-7365.

- Setiadi, A. F., et al. 2007. Epigenetic Control of the Immune Escape Mechanisms in Malignant Carcinomas. *Molecular and Cellular Biology*, 27, 7886-7894.
- Shao, S., et al. 2011. Membrane protein insertion at the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 27, 25-56.
- Sharma, K., et al. 2000. Death the Fas way: regulation and pathophysiology of CD95 and its ligand. *Pharmacol Ther*, 88, 333-47.
- Shimozono, N., et al. 2015. NUP160-SLC43A3 is a novel recurrent fusion oncogene in angiosarcoma. *Cancer Res*, 75, 4458-65.
- Siegel, R. L., et al. 2020. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin*, 70, 7-30.
- Sigal, L. J., et al. 1999. Cytotoxic T-cell immunity to virus-infected non-haematopoietic cells requires presentation of exogenous antigen. *Nature*, 398, 77-80.
- Sijts, A., et al. 2002. The role of the proteasome activator PA28 in MHC class I antigen processing. *Mol Immunol*, 39, 165-9.
- Sim, B. C., et al. 1996. Control of MHC restriction by TCR Valpha CDR1 and CDR2. *Science*, 273, 963-6.
- Simeone, E., et al. 2017. Anti-PD-1 and PD-L1 antibodies in metastatic melanoma. *Melanoma Manag*, 4, 175-178.
- Singh-Jasuja, H., et al. 2004. The Tübingen approach: identification, selection, and validation of tumor-associated HLA peptides for cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother*, 53, 187-95.
- Singh, N. J., et al. 2006. Primer: mechanisms of immunologic tolerance. *Nat Clin Pract Rheumatol*, 2, 44-52.
- Slattery, M. L., et al. 2010. Genetic variation in a metabolic signaling pathway and colon and rectal cancer risk: mTOR, PTEN, STK11, RPKAA1, PRKAG2, TSC1, TSC2, PI3K and Akt1. *Carcinogenesis*, 31, 1604-11.
- Small, E. J., et al. 2006. Placebo-controlled phase III trial of immunologic therapy with sipuleucel-T (APC8015) in patients with metastatic, asymptomatic hormone refractory prostate cancer. *J Clin Oncol*, 24, 3089-94.
- Smith, C., et al. 2001. Immunotherapy of melanoma. *Immunology*, 104, 1-7.
- Smyth, L. A., et al. 2008. The relative efficiency of acquisition of MHC:peptide complexes and cross-presentation depends on dendritic cell type. *J Immunol*, 181, 3212-20.
- Smyth, M. J., et al. 2006. Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Adv Immunol*, 90, 1-50.
- Smyth, M. J., et al. 2001. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat Immunol*, 2, 293-9.
- Spier, I., et al. 2016. Exome sequencing identifies potential novel candidate genes in patients with unexplained colorectal adenomatous polyposis. *Fam Cancer*, 15, 281-8.
- Spratt, J. S., Jr., et al. 1967. Prevalence and prognosis of individual clinical and pathologic variables associated with colorectal carcinoma. *Cancer*, 20, 1976-85.
- Stead, D. A., et al. 2008. Information quality in proteomics. *Brief Bioinform*, 9, 174-88.
- Stephens, M. A. 1974. EDF Statistics for Goodness of Fit and Some Comparisons. *Journal of the American Statistical Association*, 69, 730-737.
- Stern, L. J., et al. 1994. Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature*, 368, 215-21.
- Stockinger, H., et al. 1981. H-2 restriction as a consequence of intentional priming. Frequency analysis of alloantigen-restricted, trinitrophenyl-specific cytotoxic T lymphocyte precursors within thymocytes of normal mice. *J Exp Med*, 153, 1629-39.
- Storm, L., et al. 2014. Evaluation of complement proteins as screening markers for colorectal cancer. *Cancer Immunol Immunother*, 10.1007/s00262-014-1615-y.
- Stutman, O. 1975. Immunodepression and malignancy. *Adv Cancer Res*, 22, 261-422.

- Sugimasa, H., et al. 2015. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K upregulates the kinetochore complex component NUF2 and promotes the tumorigenicity of colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 459, 29-35.
- Sun, R., et al. 2014. Down regulation of Thrombospondin2 predicts poor prognosis in patients with gastric cancer. *Mol Cancer*, 13, 225.
- Sun, Z. J., et al. 2001. Mechanisms contributing to T cell receptor signaling and assembly revealed by the solution structure of an ectodomain fragment of the CD3 epsilon gamma heterodimer. *Cell*, 105, 913-23.
- Svanborg, C., et al. 1999. Cytokine responses during mucosal infections: role in disease pathogenesis and host defence. *Curr Opin Microbiol*, 2, 99-105.
- Tada, T., et al. 1991. Transforming growth factor-beta-induced inhibition of T cell function. Susceptibility difference in T cells of various phenotypes and functions and its relevance to immunosuppression in the tumor-bearing state. *J Immunol*, 146, 1077-82.
- Tahan, S. R., et al. 1993. Prediction of early relapse and shortened survival in patients with breast cancer by proliferating cell nuclear antigen score. *Cancer*, 71, 3552-9.
- Tanaka, M., et al. 1992. Genes preferentially expressed in embryo stomach are predominantly expressed in gastric cancer. *Cancer Res*, 52, 3372-7.
- Taparowsky, E., et al. 1982. Activation of the T24 bladder carcinoma transforming gene is linked to a single amino acid change. *Nature*, 300, 762-5.
- The Mhc Sequencing Consortium 1999. Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. *Nature*, 401, 921-3.
- Thorpe, H., et al. 2015. Multiple pathways regulate Cten in colorectal cancer without a Tensin switch. *Int J Exp Pathol*, 96, 362-9.
- Tian, Z. Q., et al. 2015. New cancer suppressor gene for colorectal adenocarcinoma: filamin A. *World J Gastroenterol*, 21, 2199-205.
- Toiyama, Y., et al. 2011. DPEP1, expressed in the early stages of colon carcinogenesis, affects cancer cell invasiveness. *J Gastroenterol*, 46, 153-63.
- Tonegawa, S. 1988. Somatic generation of immune diversity. *Biosci Rep*, 8, 3-26.
- Topalian, S. L. 1994. MHC class II restricted tumor antigens and the role of CD4+ T cells in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol*, 6, 741-5.
- Topalian, S. L., et al. 2015. Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. *Cancer Cell*, 27, 450-61.
- Topalian, S. L., et al. 2012. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med*, 366, 2443-54.
- Torre-Amione, G., et al. 1990. A highly immunogenic tumor transfected with a murine transforming growth factor type beta 1 cDNA escapes immune surveillance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 1486-90.
- Tran, E., et al. 2015. Immunogenicity of somatic mutations in human gastrointestinal cancers. *Science*, 350, 1387-90.
- Tran, E., et al. 2014. Cancer immunotherapy based on mutation-specific CD4+ T cells in a patient with epithelial cancer. *Science*, 344, 641-5.
- Trapani, J. A., et al. 1998. Efficient nuclear targeting of granzyme B and the nuclear consequences of apoptosis induced by granzyme B and perforin are caspase-dependent, but cell death is caspase-independent. *J Biol Chem*, 273, 27934-8.
- Trapani, J. A., et al. 2002. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol*, 2, 735-47.
- U.S. Department of Health and Human Services. 2017. *FDA approval brings first gene therapy to the United States.* <https://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm574058.htm> Zugriff: [06.03. 2020].

- Uemura, M., et al. 2003. Identification of the antigens predominantly reacted with serum from patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer*, 97, 2474-9.
- Ushigome, M., et al. 2005. Up-regulation of hnRNP A1 gene in sporadic human colorectal cancers. *Int J Oncol*, 26, 635-40.
- Uyttenhove, C., et al. 2003. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med*, 9, 1269-74.
- Van Buuren, M. M., et al. 2014. High sensitivity of cancer exome-based CD8 T cell neoantigen identification. *Oncoimmunology*, 3, e28836.
- Van Cutsem, E., et al. 2009. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*, 360, 1408-17.
- Van El, C. G., et al. 2013. Whole-genome sequencing in health care. Recommendations of the European Society of Human Genetics. *Eur J Hum Genet*, 21 Suppl 1, S1-5.
- Van Neerven, S. M., et al. 2019. The interplay between intrinsic and extrinsic Wnt signaling in controlling intestinal transformation. *Differentiation*, 10.1016/j.diff.2019.02.002.
- Van Rooij, N., et al. 2013. Tumor exome analysis reveals neoantigen-specific T-cell reactivity in an ipilimumab-responsive melanoma. *J Clin Oncol*, 31, e439-42.
- Vandenabeele, P., et al. 2010. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11, 700-14.
- Vardhana, S., et al. 2018. Strategies for Recognizing and Managing Immune-Mediated Adverse Events in the Treatment of Hodgkin Lymphoma with Checkpoint Inhibitors. *Oncologist*, 10.1634/theoncologist.2018-0045.
- Veelken, H., et al. 1997. A phase-I clinical study of autologous tumor cells plus interleukin-2-gene-transfected allogeneic fibroblasts as a vaccine in patients with cancer. *Int J Cancer*, 70, 269-77.
- Vicente, C. M., et al. 2015. Enhanced tumorigenic potential of colorectal cancer cells by extracellular sulfatases. *Mol Cancer Res*, 13, 510-23.
- Villalba, M., et al. 2017. Role of TGF-beta in metastatic colon cancer: it is finally time for targeted therapy. *Cell Tissue Res*, 370, 29-39.
- Vogelstein, B., et al. 1988. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med*, 319, 525-32.
- Vogelstein, B., et al. 2013. Cancer genome landscapes. *Science*, 339, 1546-58.
- Volpe, E., et al. 2008. A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses. *Nat Immunol*, 9, 650-7.
- Vonderheide, R. H., et al. 1999. The telomerase catalytic subunit is a widely expressed tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity*, 10, 673-9.
- Vyas, J. M., et al. 2008. The known unknowns of antigen processing and presentation. *Nat Rev Immunol*, 8, 607-18.
- Wagner, H., et al. 1981. Frequency analysis of cytotoxic T lymphocyte precursors in chimeric mice. Evidence for intrathymic maturation of clonally distinct self-major histocompatibility complex- and allo-major histocompatibility complex-restricted virus-specific T cells. *J Exp Med*, 153, 1517-32.
- Wagner, S., et al. 2018. Colorectal cancer vaccines: Tumor-associated antigens vs neoantigens. *World J Gastroenterol*, 24, 5418-5432.
- Walter, S., et al. 2013. Single-dose cyclophosphamide synergizes with immune responses to the renal cell cancer vaccine IMA901. *Oncoimmunology*, 2, e22246.
- Walter, S., et al. 2012. Multi-peptide immune response to cancer vaccine IMA901 after single-dose cyclophosphamide associates with longer patient survival. *Nat Med*, 18, 1254-61.

- Wang, B., et al. 2015a. POH1 deubiquitylates and stabilizes E2F1 to promote tumour formation. *Nat Commun*, 6, 8704.
- Wang, F., et al. 2012. UHRF1 promotes cell growth and metastasis through repression of p16(ink(4)a) in colorectal cancer. *Ann Surg Oncol*, 19, 2753-62.
- Wang, H. Y., et al. 2004. Tumor-specific human CD4+ regulatory T cells and their ligands: implications for immunotherapy. *Immunity*, 20, 107-18.
- Wang, P., et al. 2008. A systematic assessment of MHC class II peptide binding predictions and evaluation of a consensus approach. *PLoS Comput Biol*, 4, e1000048.
- Wang, W., et al. 2009. NDRG3 is an androgen regulated and prostate enriched gene that promotes in vitro and in vivo prostate cancer cell growth. *Int J Cancer*, 124, 521-30.
- Wang, X. W., et al. 2014. Targeting mTOR network in colorectal cancer therapy. *World J Gastroenterol*, 20, 4178-88.
- Wang, Y., et al. 1999. Heparin/heparan sulfate interacting protein gene expression is up-regulated in human colorectal carcinoma and correlated with differentiation status and metastasis. *Cancer Res*, 59, 2989-94.
- Wang, Y., et al. 2015b. RPS24 knockdown inhibits colorectal cancer cell migration and proliferation in vitro. *Gene*, 571, 286-91.
- Warner, S. L., et al. 2009. Validation of TPX2 as a potential therapeutic target in pancreatic cancer cells. *Clin Cancer Res*, 15, 6519-28.
- Weber, A., et al. 2008. The FUSE binding proteins FBP1 and FBP3 are potential c-myc regulators in renal, but not in prostate and bladder cancer. *BMC Cancer*, 8, 369.
- Wedgwood, J. F., et al. 1988. Effect of interferon-gamma and tumor necrosis factor on the expression of class I and class II major histocompatibility molecules by cultured human umbilical vein endothelial cells. *Cell Immunol*, 111, 1-9.
- Wei, P., et al. 2013. TPX2 is a novel prognostic marker for the growth and metastasis of colon cancer. *J Transl Med*, 11, 313.
- Weinschenk, T., et al. 2002. Integrated functional genomics approach for the design of patient-individual antitumor vaccines. *Cancer Res*, 62, 5818-27.
- Weiss, A. 1993. T cell antigen receptor signal transduction: a tale of tails and cytoplasmic protein-tyrosine kinases. *Cell*, 73, 209-12.
- Wilk, S. S. S. M. B. 1965. An analysis of variance test for normality (for complete samples). *Biometrika*.
- Willerford, D. M., et al. 1995. Interleukin-2 receptor alpha chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment. *Immunity*, 3, 521-30.
- Wilson, N. J., et al. 2007. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol*, 8, 950-7.
- Winkler, E. C., et al. 2016. Findings made in gene panel to whole genome sequencing: data, knowledge, ethics – and consequences? *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 16, 1259-1270.
- Wittekind, C., et al. 2010. *TNM Klassifikation maligner Tumoren*, Weinheim, Wiley-Blackwell.
- Wolchok, J. D., et al. 2013. Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med*, 369, 122-33.
- Wolff, R. K., et al. 2018. Mutation analysis of adenomas and carcinomas of the colon: Early and late drivers. *Genes Chromosomes Cancer*, 57, 366-376.
- Wolpin, B. M., et al. 2007. Adjuvant treatment of colorectal cancer. *CA Cancer J Clin*, 57, 168-85.
- Wong, C. C., et al. 2009. Comparison of different signal thresholds on data dependent sampling in Orbitrap and LTQ mass spectrometry for the identification of peptides and proteins in complex mixtures. *J Am Soc Mass Spectrom*, 20, 1405-14.

- Wong, J. C., et al. 2013. Nucleophosmin 1, upregulated in adenomas and cancers of the colon, inhibits p53-mediated cellular senescence. *Int J Cancer*, 133, 1567-77.
- Woopen, C. 2013. Die Zukunft der genetischen Diagnostik – von der Forschung in die klinische Anwendung. In: Ethikrat, D. (ed.).
- Wu, N., et al. 2015. Ribosomal L22-like1 (RPL22L1) Promotes Ovarian Cancer Metastasis by Inducing Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *PLoS One*, 10, e0143659.
- Wu, Q., et al. 2016. The role of cofilin-1 in vulvar squamous cell carcinoma: A marker of carcinogenesis, progression and targeted therapy. *Oncol Rep*, 35, 2743-54.
- Wubbolts, R., et al. 1996. Direct vesicular transport of MHC class II molecules from lysosomal structures to the cell surface. *J Cell Biol*, 135, 611-22.
- Xie, X., et al. 2014. Overexpression of collagen VI alpha3 in gastric cancer. *Oncol Lett*, 7, 1537-1543.
- Yadav, M., et al. 2014. Predicting immunogenic tumour mutations by combining mass spectrometry and exome sequencing. *Nature*, 515, 572-6.
- Yamada, H. Y., et al. 2009. BRD8 is a potential chemosensitizing target for spindle poisons in colorectal cancer therapy. *Int J Oncol*, 35, 1101-9.
- Yamamoto, H., et al. 2008. Overexpression of MT1-MMP is insufficient to increase experimental liver metastasis of human colon cancer cells. *Int J Mol Med*, 22, 757-61.
- Yamauchi, T., et al. 2014. The genotype of the transporter associated with antigen processing gene affects susceptibility to colorectal cancer in Japanese. *Environ Health Prev Med*, 19, 265-70.
- Yan, L., et al. 2013. Target protein for Xklp2 (TPX2), a microtubule-related protein, contributes to malignant phenotype in bladder carcinoma. *Tumour Biol*, 34, 4089-100.
- Yang, S., et al. 2007. Molecular basis of the differences between normal and tumor tissues of gastric cancer. *Biochim Biophys Acta*, 1772, 1033-40.
- Yang, X., et al. 2013. NDRG3 and NDRG4, two novel tumor-related genes. *Biomed Pharmacother*, 67, 681-4.
- Yang, X. N., et al. 2014. Piezo1 is as a novel trefoil factor family 1 binding protein that promotes gastric cancer cell mobility in vitro. *Dig Dis Sci*, 59, 1428-35.
- Yang, Y., et al. 2015. Inorganic pyrophosphatase (PPA1) is a negative prognostic marker for human gastric cancer. *Int J Clin Exp Pathol*, 8, 12482-90.
- Yee, C., et al. 2000. Melanocyte destruction after antigen-specific immunotherapy of melanoma: direct evidence of t cell-mediated vitiligo. *J Exp Med*, 192, 1637-44.
- Ying, J., et al. 2014. Dendritic cell vaccine treatment of advanced de novo colorectal cancer in renal transplant patients. *Indian J Cancer*, 51, 338-341.
- Yong, C. S. M., et al. 2017. CAR T-cell therapy of solid tumors. *Immunol Cell Biol*, 95, 356-363.
- Yoshinaga, S. K., et al. 1999. T-cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS. *Nature*, 402, 827-32.
- Yuen, S. T., et al. 2002. Similarity of the phenotypic patterns associated with BRAF and KRAS mutations in colorectal neoplasia. *Cancer Res*, 62, 6451-5.
- Yun, J. P., et al. 2007. Increased expression of nucleophosmin/B23 in hepatocellular carcinoma and correlation with clinicopathological parameters. *Br J Cancer*, 96, 477-84.
- Zhang, H. J., et al. 2016a. Twist2 promotes kidney cancer cell proliferation and invasion by regulating ITGA6 and CD44 expression in the ECM-receptor interaction pathway. *Onco Targets Ther*, 9, 1801-12.
- Zhang, K., et al. 2016b. Meta-analysis of gene expression and integrin-associated signaling pathways in papillary renal cell carcinoma subtypes. *Oncotarget*, 10.18632/oncotarget.12390.

- Zhen, Y. H., et al. 2015. Phase I/II study of adjuvant immunotherapy with sentinel lymph node T lymphocytes in patients with colorectal cancer. *Cancer Immunol Immunother*, 64, 1083-93.
- Zheng, L., et al. 2014. A safety and feasibility study of an allogeneic colon cancer cell vaccine administered with a granulocyte-macrophage colony stimulating factor-producing bystander cell line in patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Surg Oncol*, 21, 3931-7.
- Zhong, Z., et al. 2010. Cyclin D1/cyclin-dependent kinase 4 interacts with filamin A and affects the migration and invasion potential of breast cancer cells. *Cancer Res*, 70, 2105-14.
- Zhu, Q. C., et al. 2014. Effect of a high-fat diet in development of colonic adenoma in an animal model. *World J Gastroenterol*, 20, 8119-29.
- Zhu, S., et al. 2016. Mir-451 Correlates with Prognosis of Renal Cell Carcinoma Patients and Inhibits Cellular Proliferation of Renal Cell Carcinoma. *Med Sci Monit*, 22, 183-90.
- Zinkernagel, R. M., et al. 1974. Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature*, 248, 701-2.
- Zucker, S., et al. 2004. Role of matrix metalloproteinases (MMPs) in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 23, 101-17.



## 8 Veröffentlichungen

### 8.1 Abstracts für Kongresse: Poster und Vorträge

- **The American Society of Hematology, Annual meeting 2015, Blood 2015 (126:1027):** Sebastian P. Haen, Daniel J. Kowalewski, Stefan Stevanovic, Linus Backert, Florian Dengler, Daniel Backes, Stefan Beckert, Silvia Wagner, Ingmar Königsrainer, Hans-Georg Kopp, Oliver Kohlbacher, Alfred Königsrainer, Lothar Kanz, Hans-Georg Rammensee, and Markus W. Löffler:

**Interplay Between the Immune System and Colorectal Carcinoma – Towards Tumor-Specific Peptide-Based Vaccination for any HLA-Type (Haen et al., 2015)**

- **The American Society of Hematology, Annual meeting 2016, Blood 2016 (128:862):** Sebastian P. Haen, Daniel J. Kowalewski, Jörg Bernhardt, Linus Backert, Daniel Backes, Florian Dengler, Stefan Beckert, Ingmar Königsrainer, Hans-Georg Kopp, Oliver Kohlbacher, Alfred Königsrainer, Lothar Kanz, Hans-Georg Rammensee, Stefan Stevanovic, and Markus W. Löffler:

**Unique alterations in the immunopeptidome of colorectal cancer reflect specific transformations in cancer associated signaling pathways and reveal tumor-specific HLA-ligand modulations.**

**(Haen et al., 2016)**

### 8.2 Biomedizinische Fachzeitschrift

- **Cancer Research, Mai 2018, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-17-1745:** Markus W. Löffler, Daniel J Kowalewski, Linus Backert, Jörg Bernhardt, Patrick Adam, Heiko Schuster, Florian Dengler, Daniel Backes, Hans-Georg Kopp, Stefan Beckert, Silvia Wagner, Ingmar Königsrainer, Oliver Kohlbacher, Lothar Kanz, Alfred Königsrainer, Hans-Georg Rammensee, Stefan Stevanovic and Sebastian P. Haen:

**Mapping the HLA ligandome of Colorectal Cancer Reveals an Imprint of Malignant Cell Transformation (Löffler et al., 2018a)**

## 9 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde im Institut für Immunologie unter Betreuung von Prof. Dr. med. Sebastian P. Haen durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Dr. med. Markus W. Löffler und Prof. Dr. med. Sebastian P. Haen in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. rer. nat. Stefan Stevanović und Prof. Dr. rer. nat. Hans-Georg Rammensee.

Sämtliche Versuche wurden (nach Einarbeitung durch Dr. med. Markus W. Löffler, Nico Trautwein und Daniel Kowalewski) von mir eigenständig durchgeführt. Die massenspektrometrische Analyse erfolgte mit Unterstützung von Daniel Kowalewski.

Die Auswertung erfolgte eigenständig durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig nach Anleitung von Prof. Dr. med. Sebastian P. Haen verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Die hier präsentierten Ergebnisse beziehen sich auf denselben Datensatz wie die in der Publikation von Löffler und Kollegen (Cancer Research 2018), stellen aber ergänzende Untersuchungen dar, die in dem Artikel nicht primär schon veröffentlicht wurden.

Tübingen, den 20.06.2021

Florian Dengler

## 10 Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein größter Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Sebastian P. Haen für die Überlassung des interessanten Themas, die freundliche und exzellente Betreuung, sowie dafür auch nach der langen Zeit allzeit dafür Sorge getragen zu haben, dass diese Arbeit erfolgreich abgeschlossen werden kann.

Dr. med. Markus Löffler danke ich zum einen für die hervorragende Einarbeitung, als auch für die Überlassung der Gewebeproben und die freundliche Unterstützung bei allen Fragen.

Daniel Kowalewski danke ich für die lustigste und beste Unterstützung, die ich mir beim Präppen, ZipTippen und sonstigen Fragen und Prozeduren vorstellen konnte. Danke auch für die Durchführung der MS-Analyse.

Prof. Dr. rer. nat. Hans-Georg-Rammensee und Prof. Dr. rer. nat. Stefan Stevanović danke ich für die Möglichkeiten, die mir das Departement für Immunologie geboten hat.

Ich danke Nico Trautwein, Heiko Schuster und Nora Roth für die Beantwortung aller Fragen und die Lösung aller Probleme, die sich im Laboralltag ergeben haben.

Meinen lieben Eltern danke ich, da sie alles dafür getan haben, mein Studium und diese Arbeit zu ermöglichen und da sie mich auch weiterhin in allem unterstützen.

Ich danke meiner wunderbaren Freundin dafür, dass sie immer für mich da ist und dafür mich immer zum Weitermachen ermuntert zu haben.

Zu guter Letzt danke ich meinen Freunden und meinem Bruder für die Unterstützung und die Möglichkeiten der Erholung von dieser Arbeit.