

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Onkologisches Zentrum

II. Medizinische Klinik

Direktor Prof. Dr. med. Carsten Bokemeyer

Die Expression von Cancer-Testis-Antigenen in Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen als mögliche Zielstrukturen für eine antigen-spezifische Immuntherapie

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg
vorgelegt von

Inga Blum
aus Hamburg
Hamburg 2011

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 2.3.2012

Veröffentlicht mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität

Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. C. Bokemeyer

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/In: Prof. Dr. M. Trepel

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/In: PD Dr. R. Simon

INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VI
TABELLENVERZEICHNIS	VII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VIII
1. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG	1-27
1.1. Das Krankheitsbild Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinom	1
1.1.1. Definition und Epidemiologie	1
1.1.2. Ätiologie und Pathogenese	4
1.1.3. Klinik und Diagnostik	5
1.1.4. Therapie	6
1.1.5. Prognose	9
1.2. Tumorimmunologie	12
1.2.1. Immunsuppression bei Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren	14
1.2.2. T-Zell basierte Immuntherapie	16
1.2.3. Tumorassoziierte Antigene	18
1.3. Fragestellung	27
2. MATERIAL UND METHODEN	28-34
2.1. Patientenkollektiv	28
2.2. Proben aus HNSCC-Tumoren und aus gesundem Gewebe	28
2.3. Serumproben	29
2.4. HNSCC-Zelllinien	29
2.5. Studiendesign	29
2.6. Methoden	30
2.6.1. RNA-Isolation	30
2.6.2. cDNA-Gewinnung	30
2.6.3. Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction	31
2.6.3.1. Bewertung der RT-PCR Ergebnisse	32
2.6.4. ELISA	32
2.6.5. Statistik	33

3. ERGEBNISSE	35-47
3.1. Expression von CT-Antigenen in HNSCC-Zelllinien	35
3.2. Eigenschaften des Patientenkollektivs	36
3.3. Expression von CT-Antigenen in Tumor- und in gesundem Gewebe von HNSCC-Patienten	36
3.3.1. Gruppe 1: CT-Antigene mit ähnlicher Expressionshäufigkeit in Tumorgewebe und in gesundem Gewebe	38
3.3.2. Gruppe 2: CT-Antigene die in Tumorgewebe mindestens 50% häufiger exprimiert sind als in gesundem Gewebe	39
3.3.3. Gruppe 3: CT-Antigene die weder in Tumorgewebe noch in gesundem Gewebe exprimiert sind	40
3.3.4. Gruppe 4: CT-Antigene die ausschließlich in Tumorgewebe exprimiert sind	41
3.3.5. Co-Expression von CT-Antigenen der Gruppe 4	43
3.3.6. Expressionskorrelationen in der Gruppe 4	44
3.4. Antikörper gegen CT-Antigene in HNSCC-Patienten	47
3.5. Korrelation von klinischen und pathologischen Merkmalen mit der Expressionshäufigkeit von CT-Antigenen in HNSCC	47
4. DISKUSSION	48-81
4.1. Die Eignung von CT-Antigenen in HNSCC als Zielstrukturen für eine antigen-spezifische Immuntherapie	48
4.1.1. Die Expressionsmuster der Antigene der Gruppen 1 und 2 und ihre Eignung als Zielstrukturen für eine antigen-spezifische Immuntherapie	49
4.1.2. Das Expressionsmuster der Antigene der Gruppe 3 und ihre Eignung als Zielstrukturen für eine antigen-spezifische Immuntherapie	56
4.1.3. Das Expressionsmuster der Antigene der Gruppe 4 und ihre Eignung als Zielstrukturen für eine antigen-spezifische Immuntherapie	57

4.1.3.1. NY-ESO-1	57
4.1.3.2. HOM-TES-85	61
4.1.3.3. BAGE	62
4.1.3.4. SSX1 und SSX2	63
4.1.3.5. Die MAGE-Antigene	65
4.2. Die Co-Expression von CT-Antigenen der Gruppe 4 im Hinblick auf die Entwicklung einer polyvalenten Impfung	71
4.3. Gibt es in Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen CT-Antigene mit Gatekeeper-funktion?	72
4.4. Vergleich der Expressionsmuster der CT-Antigene in HNSCC-Tumorzellen und -Zelllinien	73
4.5. Ist die Expression von CT-Antigenen in HNSCC abhängig von Patientenmerkmalen oder Tumorcharakteristika?	76
4.6. Ausblick	76
5. ZUSAMMENFASSUNG	80
LITERATURVERZEICHNIS	IX
TABELLEN	XXII
PATIENTENAUFKLÄRUNG UND EINVERSTÄNDNISERKLÄRUNG	XXVIII
DANK	XXXII
CURRICULUM VITA	XXXIII
ERKLÄRUNG	XXXIV

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Der Kopf-Hals-Bereich	3
Abbildung 2: RT-PCR	32
Abbildung 3: ELISA	34
Abbildung 4: Expressionshäufigkeit von CT-Antigenen in HNSCC Zelllinien	35
Abbildung 5: Gruppe 1: CT-Antigene mit ähnlicher Expressionshäufigkeit in Tumor- und in gesundem Gewebe	38
Abbildung 6: Gelelektrophorese nach RT-PCR des CT-Antigens FTHL17 in Tumor- und in gesunden Gewebeproben	39
Abbildung 7: Gruppe 2: In Tumor häufiger exprimierte CT-Antigene	40
Abbildung 8: Gruppe 4: Ausschließlich in Tumor exprimierte CT- Antigene	41
Abbildung 9: Gelelektrophorese nach RT-PCR des CT-Antigens MAGEA3 in Tumorproben	42
Abbildung 10: Anzahl der je Tumorprobe exprimierten CT-Antigene der Gruppe 4	43
Abbildung 11: Co-Expression von CT-Antigenen der Gruppe 4	44
Abbildung 12: Co-Expression der CT-Antigene der Gruppe 4 bei MAGEC1-positiven und -negativen HNSCC Proben	46
Abbildung 13: Co-Expression der CT-Antigene der Gruppe 4 bei SSX1-positiven und -negativen HNSCC Proben	46
Abbildung 14: Vergleich der Expression von 23 CT-Antigenen in HNSCC-Tumorproben und -Zelllinien	75

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: TNM-Klassifikation von Lippen- und Mundhöhlenkarzinomen (UICC 2002)	10
Tabelle 2: AJCC-Stadium und geschätzte 5-Jahresüberlebensraten	11
Tabelle 3: Tumorigradung nach der UICC	11
Tabelle 4: Gruppeneinteilung der CT-Antigene nach ihrem Expressionsmuster in Tumorgewebe und in gesundem Gewebe	37
Tabelle 5: Expressionskorrelationen zwischen CT-Antigenen der Gruppe 4	45
Tabelle 6: Statistik: Korrelation von Patientencharakteristika und Tumorklassifikation mit der Anzahl exprimierter CT-Antigene der Gruppe 4	XXII
Tabelle 7: Primersequenzen, Annealing Temperaturen und Genproduktlängen der untersuchten CT-Antigene	XXIV
Tabelle 8: Reagenzien und Geräte	XXVI
Tabelle 9: HNSCC-Zelllinien	XXVII
Tabelle 10: Rekombinante Proteine	XXVII

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AJCC	American Joint Committee on Cancer
AMV	Avian Myeloblastosis Virus
APZ	Antigen präsentierende Zelle
Bp	Basenpaare
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Complementary deoxynucleic acid
CT	Cancer testis
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
GAPDH	Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
HNSCC	Head and Neck Squamous Cell Carcinoma
HPV	Humanes Papillomavirus
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
MHC	Major histocompatibility complex
mRNA	Messenger ribonucleic acid
PBS	Phosphate buffered saline
RNA	Ribonucleic acid
RT-PCR	Reverse transcription-polymerase chain reaction
TGF	Transforming growth factor
UICC	Union internationale contre le cancer
VEGF	Vascular endothelial growth factor

1. EINLEITUNG

Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches (HNSCC) gehören zu den häufigsten menschlichen Krebsarten. Leider kommt es nach rein chirurgischer Therapie in ca. der Hälfte der Fälle zum lokalen Wiederauftreten der Tumorerkrankung oder zu Metastasierung. Trotz Fortschritten in der Diagnose und Behandlung dieser Erkrankung konnte das Überleben in den letzten Jahrzehnten nicht wesentlich verbessert werden (McMahon und Chen 2003). Deshalb ist die Entwicklung von neuen Therapien und ihre Integration in aktuelle Therapieregime von großer klinischer Bedeutung. Eine aktive Immuntherapie könnte eine solche therapeutische Möglichkeit darstellen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von 23 Cancer-Testis(CT)-Antigenen als mögliche Zielstrukturen für eine Immuntherapie in Tumorproben von 51 HNSCC-Patienten und in angrenzendem gesundem Gewebe von 26 dieser Patienten untersucht. Zudem wurde autologes Serum von 39 Patienten auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen 3 CT-Antigene untersucht, um einen Einblick in die Immunogenität von CT-Antigenen in HNSCC zu gewinnen.

1.1. Das Krankheitsbild Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinom

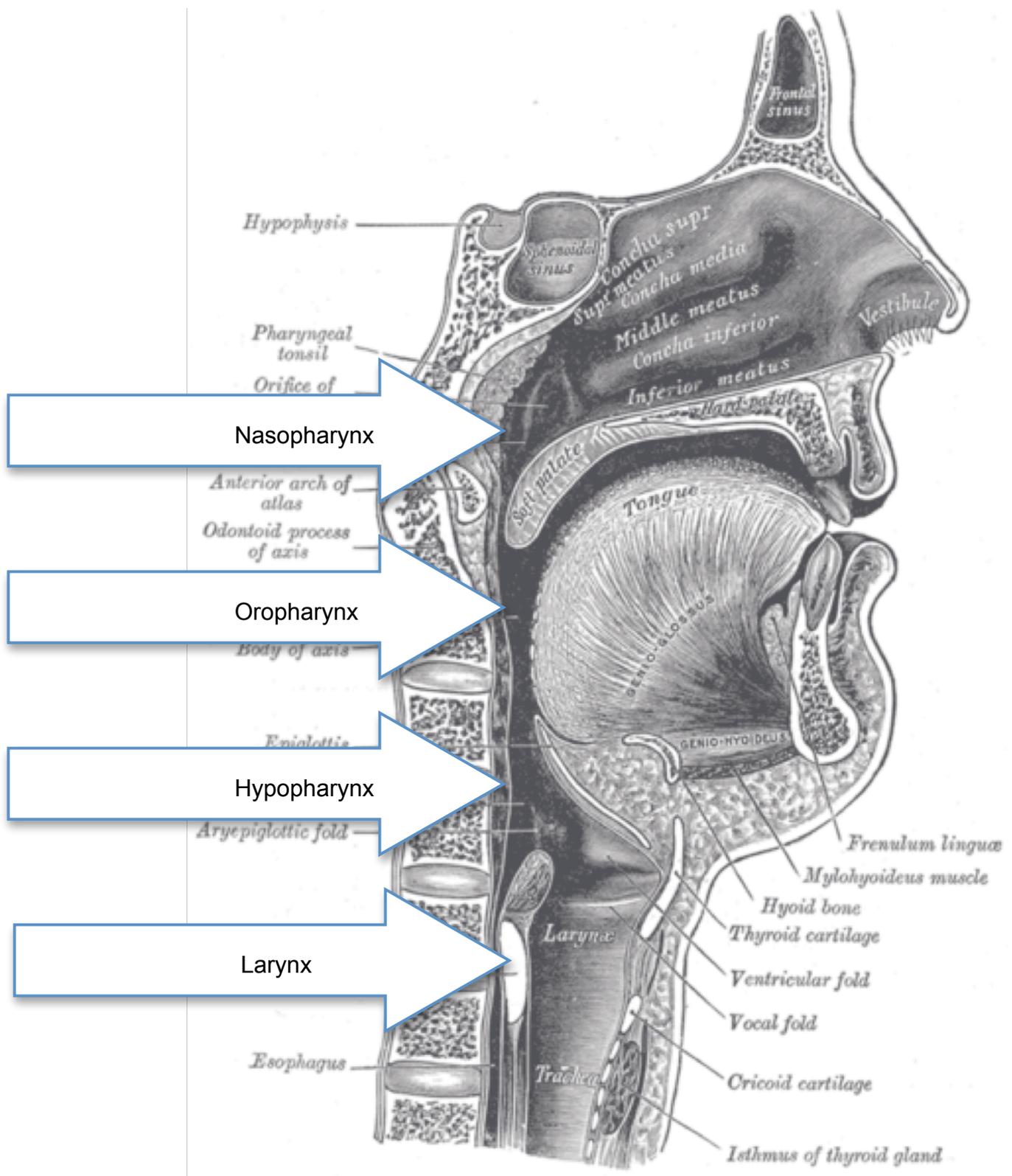
1.1.1. Definition und Epidemiologie

Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinome sind bösartige epitheliale Tumoren des oberen Atmungs- und Verdauungstrakts. Histologisch müssen die Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs von den ebenfalls im Kopf-Hals-Bereich vorkommenden Adenokarzinomen unterschieden werden. Plattenepithelkarzinome gehen von den Epithelzellen der Epidermis oder den Schleimhäuten aus, während Adenokarzinome ihren Ursprung im Epithelgewebe v.a. in exokrinen, seltener endokrinen, Drüsen oder in zylinderzellartiger Schleimhaut haben (De Gruyter et al. 2004).

Im Gegensatz zu den verhornenden Plattenepithelkarzinomen der Epidermis sind die Plattenepithelkarzinome der Schleimhäute, zu denen die Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinome gehören, nicht verhornend. Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinome können nach ihren häufigsten Lokalisationen in Karzinome des Larynx, des Pharynx und der Mundhöhle unterteilt werden, wobei die nasopharyngealen Karzinome meist als separate Gruppe betrachtet werden (Argiris et al. 2008). Die Karzinome des Larynx können in subglottische, glottische und supraglottische unterteilt werden. Die Karzinome des Pharynx werden häufig nach ihrer Lokalisation im Hypopharynx, Oropharynx oder Nasopharynx unterteilt (Siehe Abbildung 1). Die Karzinome der Mundhöhle sind die häufigsten HNSCC und können in den Lippen, der Zunge, dem Mundboden, dem Zahnfleisch, den Speicheldrüsen, der Wangenschleimhaut und dem Gaumen auftreten (Stupp und Vokes 2003, Preiß und Schmieder 2006).

In den Jahren 2003-2004 betrug die Inzidenz der HNSCC in Deutschland nach Angaben des Robert Koch Instituts 10.400, davon 7.600 bei Männern und 2.800 bei Frauen. Die Mortalität bei Männern betrug 3.450 Sterbefälle, was 3.1% aller Krebssterbefälle entsprach. Das mittlere Erkrankungsalter lag bei Männern bei 61 und bei Frauen bei 63 Jahren (Robert-Koch-Institut 2008). Weltweit lag die Inzidenz im Jahre 2002 bei ungefähr 650.000. Damit ist das HNSCC der sechst-häufigste maligne Tumor beim Mann (Parkin et al. 2005).

Abbildung 1: Der Kopf-Hals-Bereich



1.1.2. Ätiologie und Pathogenese

Die wichtigsten Risikofaktoren für die Entwicklung eines HNSCC sind Tabak- und Alkoholkonsum, deren schädliche Wirkungen sich gegenseitig verstärken und die kombiniert bei 75% aller Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren vorliegen (Vinjeis et al. 2004, Blott et al. 1988, Tuyns et al. 1988). Auch der Konsum von Kautabak und Betelpriem begünstigt die Entstehung von HNSCC, vor allem in der Mundhöhle. Ein weiterer Risikofaktor ist fehlende Mundhygiene (Preiß und Schmieder 2006). Neuere Studien zeigen, dass Infektionen mit Humanen Papillomaviren eine kausale Rolle bei der Entstehung von HNSCC spielen (Chung und Gillison 2009). Der Großteil der HNSCC tritt sporadisch auf, es ist jedoch auch eine familiäre Häufung beschrieben worden. Personen mit erblicher Krebsneigung, wie z.B. mit Hereditärer Polyposis oder dem Li-Fraumeni Syndrom haben ein erhöhtes Erkrankungsrisiko (Argiris et al. 2008). Es gibt signifikante regionale Unterschiede in der Häufigkeit von HNSCC, so treten Mundhöhlenkarzinome besonders häufig in Südzentralasien, Melanesien, in West- und Südeuropa und in Südafrika auf. Larynxkarzinome sind am häufigsten in West- und Südeuropa, in Südamerika sowie in Westasien. Der Konsum von Obst und Gemüse ist mit einem niedrigeren Risiko der Entwicklung eines HNSCC assoziiert worden (Argiris et al. 2008).

1.1.2.1. Pathogenese

Leuko- und Erythroplakie sind klinisch detektierbare Präkanzerosen des HNSCC, die dieselben Hauptrisikofaktoren aufweisen. Jährlich kommt es zur malignen Entartung von etwa 0.13-2.2% der Leuko- und Erythroplakien der Mundhöhle (Napier und Speight 2008). Eine Vielzahl genetischer Mechanismen kann die Entstehung von HNSCC sowohl direkt, z.B. durch die Expression von Wachstumsfaktorrezeptoren, als auch indirekt durch den Verlust von genetischen Reparatursystemen begünstigen.

Wichtige Beispiele für Wachstumsfaktorrezeptoren sind der Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) und der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF),

deren Aktivierung über Signalketten zur Transkription von für die Tumorgenese wichtigen Genen führt (Argiris et al. 2008, Califano et al. 1996, Perez-Ordenez et al. 2006, Ha und Califano 2006). Die Überexpression von VEGF oder EGFR in HNSCC ist mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Grandis und Tweardy 1993, Smith et al. 2000).

Eine indirekte genetische Schädigung, die die Entstehung von HNSCC begünstigt, ist die Inaktivierung des Enzyms Telomerase, die für 90% aller HNSCC beschrieben wurde. Dieses Enzym ist für den Zelltod verantwortlich und seine Inaktivierung führt zum Erhalt schädlicher Mutationen (McCaul et al. 2002). Für 70-80% aller HNSCC sind zudem Mikrodeletionen des Chromosoms 9p21 beobachtet worden. Andere in HNSCC häufig auftretende genetische Veränderungen sind die Inaktivierung des Chromosoms p16, der Verlust von 3p, die Amplifikation von 11q13 sowie Punktmutationen im Tumorsuppressorgen p53, die in 50% aller HNSCC auftreten (Perez-Ordenez et al. 2006, Mao et al. 1996, Rocco und Sidransky 2001, Balz et al., Pignataro et al. 1998, Carpaccio et al. 2000). Auch die durch das Humane Papillomavirus exprimierten Onkoproteine E6 und E7 führen zur Destabilisierung von p53 (Chung und Gillison 2009).

Eine Besonderheit von Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen ist ihre Fähigkeit, der Immunabwehr zu entkommen. Auf die wichtigsten bekannten Mechanismen, die hierzu beitragen, wird im Abschnitt 1.2.1. Immunsuppression bei Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren eingegangen.

1.1.3. Klinik und Diagnostik

Die Symptome eines HNSCC sind abhängig von der Lokalisation und dem Stadium, sie können sich als Fremdkörper- oder Globusgefühl äußern, als Heiserkeit, Schluckstörungen, Mundulzerationen, Zungenschmerzen, Husten oder als orale Blutungen. Trotz dem Vorhandensein von Warnsymptomen kommen viele Patienten erst spät zur Primärdiagnostik, da sie durch den häufig vorhandenen starken Alkoholkonsum oft relativ indolent sind. Die

Primärdiagnostik besteht aus der körperlichen Untersuchung bei der auf Ulzerationen und Tumoren im Mund/Rachenraum, auf Schwellungen im Halsbereich, auf vergrößerte und verhärtete Lymphknoten, gelähmte Stimmlippen und auf Schluckstörungen geachtet werden sollte. Zur Sicherung der Diagnose muss eine Biopsie entnommen und histologisch untersucht werden. Bildgebende Verfahren zur Feststellung der Tumorausbreitung sind die Ösophagoskopie, die Bronchoskopie, die CT, die MRT, die PET, das native Thoraxröntgen und nach Bariumschluck, sowie die Sonographie der Halslymphknoten zum Ausschluss von Halslymphknotenmetastasen. Das Staging ist entscheidend für die nachfolgenden Therapieentscheidungen und sollte deshalb mit großer Sorgfalt durchgeführt werden. Der häufigste Metastasierungsort des HNSCC ist die Lunge, gefolgt von mediastinalen Lymphknoten, Leber und Knochen. Die Lunge sollte bereits initial untersucht werden, da sich hier nicht nur häufig Metastasen finden lassen, sondern oft auch ein zweiter Primärtumor diagnostiziert werden kann (Argiris et al. 2008, Stupp und Vokes 2003, Preiß und Schmieder 2006). Anhand der erhobenen Befunde wird das Tumorstadium nach dem TNM System der UICC eingeteilt (Tabelle 1).

1.1.4. Therapie

Die Therapie des HNSCC beinhaltet operative, radiologische und chemotherapeutische Behandlungsmethoden, deren Auswahl von der Lokalisation, dem Tumorstadium und dem Zustand des Patienten abhängig ist. Im Frühstadium ($T_{1-2}N_0M_0$) können >90% aller HNSCC-Patienten mittels Operation und Strahlentherapie geheilt werden, leider leiden über 60% der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung jedoch bereits unter einem weiter fortgeschrittenen Stadium, in diesen Fällen ist ein multimodales Vorgehen und die gute Kooperation der Fachabteilungen von besonderer Wichtigkeit (Stupp und Vokes 2003, Preiß und Schmieder 2006).

1.1.4.1. Operative Therapie

Bei der operativen Therapie wird zwischen Eingriffen mit kurativer und palliativer Zielsetzung unterschieden. Kurativ operierbar sind in der Regel Tumoren der Stadien $T_{1-3}N_0M_0$ (Preiß und Schmieder 2006). Außerdem darf bei einer Operation mit kurativer Zielsetzung in der Regel keine Tumordinfiltration in die Arteria Carotis, die Schädelbasis oder die prävertebrale Muskulatur vorliegen (Argiris et al. 2008). Kurative Operationen haben die vollständige Entfernung des Tumors mit R_0 -Resektion zum Ziel. Zusätzlich zur Entfernung des Tumors erfolgt meist eine so genannte „neck dissection“ d.h. eine Entfernung zervikaler Lymphknotengruppen. Häufig werden hierbei Mikro-metastasen entdeckt, das Staging wird dann entsprechend heraufgestuft und die adjuvanten Therapieentscheidungen angepasst. Ab Stadium $T_{1-4}N_1M_0$ oder $T_{1-4}N_xM_1$ ist die Prognose relativ schlecht und es kann außerhalb eines multimodalen Therapiekonzeptes nur in Einzelfällen kurativ operiert werden. Die Therapieentscheidung muss dann vom Einzelfall und Zustand des Patienten abhängig gemacht und in enger Kooperation zwischen den beteiligten Fach-abteilungen getroffen werden. Wenn eine Operation mit palliativer Zielsetzung erfolgt, z.B. zur Linderung von Schluckstörungen dann ist das oberste Prinzip, dass die durch den Eingriff erfolgenden Einschränkungen nicht stärker als die tumorbedingten Einschränkungen sein dürfen (Preiß und Schmieder 2006).

1.1.4.2. Strahlentherapie

Die Strahlentherapie ist ein Standardverfahren in der Behandlung von HNSCC (Preiß und Schmieder 2006). Sie kann entweder als primäre Therapie mit palliativer Zielsetzung bei inoperablen Patienten durchgeführt werden, als kurative Therapie im Frühstadium von Glottiskarzinomen, Zungenbasis-karzinomen und Tonsillenkarcinomen (Argiris et al. 2008), oder im häufigsten Fall als postoperative adjuvante Therapie. Auf Grundlage von Spiral-CT, MRT oder PET Bildern wird ein dreidimensionaler Bestrahlungsplan erstellt. Es folgt

eine intensitätsmodulierte Bestrahlung, die die höchste Strahlendosis auf das Tumorgewebe konzentriert, während das gesunde Gewebe weniger belastet wird. Normalerweise wird eine tumorzide Dosis von 66-72 Gy verabreicht, aufgeteilt auf Tagesdosen von 2 Gy für 5 Tage pro Woche (Preiß und Schmieder 2006).

1.1.4.3. Chemotherapie

Die Chemotherapie wird vor allem begleitend zur operativen Therapie und zur Strahlentherapie in Form einer simultanen oder rasch alternierenden Radiochemotherapie eingesetzt. In Ausnahmefällen ist eine Induktionschemotherapie sinnvoll, wenn eine organerhaltende Therapie beim Larynx- oder Hypopharynxkarzinom angestrebt wird (Stupp und Vokes 2003). Palliativ kann eine Chemotherapie bei Fernmetastasen oder bei „ausgestrahltem“ Karzinom zur Tumorregression führen, was jedoch aufgrund des schlechten Allgemeinzustands in diesem Stadium häufig nicht mehr durchführbar ist. Das Standardregime besteht aus Cisplatin und 5-Fluoruracil, mit dem Ansprechraten von >90% erreicht werden (Preiß und Schmieder 2006). Andere wirksame Chemotherapeutika sind Carboplatin, Methotrexat, Paclitaxel, Docetaxel, Vinorelbin, Ifosfamid oder Gemcitabin. Ein für die Therapie von HNSCC relativ neu zugelassenes Medikament ist Cetuximab, ein monoklonaler Antikörper gegen den Wachstumsfaktor EGFR (Argiris et al. 2008). Die Wahl der Chemotherapeutika und die Kombination mit der Strahlentherapie, ob simultan oder alternierend, ist Gegenstand laufender Studien.

1.1.4.4. Therapiekomplikationen

Die häufig mutilierenden Operationsverfahren, mit Entfernung des Larynx oder Teilen der Mundhöhle bedeuten erhebliche Beeinträchtigungen für den Patienten. Auch die Strahlentherapie im Kopf-Hals Bereich verursacht eine Vielzahl akuter Nebenwirkungen wie Mukositis, vermehrter Speichelfluss, Schluckstörungen, Geschmacksverlust und Heiserkeit. Langfristige Strahlenfolgen sind eine dauerhafte Schädigung der Speicheldrüsen, Xerostomie, Karies, Osteonekrosen, Schilddrüsendysfunktion, sensoneurinaler Hörverlust sowie Larynx- und Pharynxstenosen (Argiris et al. 2008).

1.1.5. Prognose

Entscheidend für die Prognose sind die Lokalisation des Tumors und das Stadium der Erkrankung zum Zeitpunkt der Diagnosestellung. Wird der Tumor im Stadium I-II erkannt, so kann meist Heilung erreicht werden; bei Diagnosestellung in einem späteren Stadium (>60%) können meist nur palliative Ergebnisse und eine Verlängerung der Überlebenszeit erreicht werden. Neben dem Stadium ist die Lokalisation des Tumors entscheidend für die Prognose, so haben Tonsillenkarzinome z.B. eine bessere Prognose als Zungengrund- oder Hypopharynxkarzinome. Das TNM-Stadium der UICC wird für jede Tumorlokalisation etwas anders definiert. In Tabelle 1 ist als Beispiel die TNM-Klassifikation für Lippen- und Mundhöhlenkarzinome von 2002 angegeben. Tabelle 2 stellt die AJCC-(American Joint Committee on Cancer) Stadien und die geschätzten 5-Jahresüberlebensraten dar (Preiß und Schmieder 2006, Stupp und Vokes 2003). In Tabelle 3 ist das Gradingssystem der UICC, d.h. die Klassifikation von Tumoren nach ihrem Differenzierungsgrad zusammengefasst, wobei eine höhere Gradingstufe einem niedrigerem Differenzierungsgrad und einer schlechteren Prognose entspricht.

Tabelle 1: TNM-Klassifikation von Lippen- und Mundhöhlenkarzinomen (UICC 2002)

Primärtumor	
Tx	Primärtumor nicht beurteilbar/ Unbekannt
T1	Tumor < 2 cm
T2	Tumor > 2 cm, < 4 cm
T3	Tumor > 4 cm
T4	Tumorinvasion in benachbarte Strukturen (Knochen, Knorpel, Weichteile)
Lymphknoten	
N0	Keine regionalen Lymphknotenmetastasen
N1	Solitäre ipsilaterale Lymphknotenmetastasen < 3 cm
N2	Lymphknoten > 3 cm, < 6 cm
N2a	Solitäre ipsilaterale Lymphknotenmetastase
N2b	Multiple ipsilaterale Lymphknotenmetastasen
N2c	Bilaterale oder kontralaterale Lymphknotenmetastasen
N3	Lymphknotenmetastasen > 6 cm
Fernmetastasen	
M0	Keine Fernmetastase
M1	Fernmetastase(n)

Tabelle 2: AJCC-Stadium und geschätzte 5-Jahresüberlebensraten (5-JÜR)

AJCC Stadium	T	N	M	5-JÜR (in %)
I	T1	N0	M0	75-90
II	T2	N0	M0	40-70
III	T3	N0	M0	20-50
	T1-3	N1	M0	
IVA	T4	N0-1	M0	10-30
	T1-4	N2	M0	
IVB	T1-4	N3	M0	10-30
IVC	T1-4	N0-3	M1	10-30

Tabelle 3: Tumorgrading nach der UICC

GX	Differenzierungsgrad kann nicht bestimmt werden
G1	Gut differenziert
G2	Mäßig differenziert
G3	Schlecht differenziert
G4	Undifferenziert

1.2. Tumorimmunologie

Tumorzellen können vom Immunsystem erkannt und zerstört werden. Neben einer Schutzfunktion durch das nicht-adaptive (angeborene) Immunsystem, spielen das adaptive (erworbene) Immunsystem und vor allem T-Zellen eine entscheidende Rolle. Die Entdeckung der adaptiven Schutzfunktion des Immunsystems gelang durch Experimente mit Mäusen, die mit durch Bestrahlung inaktivierten Tumorzellen geimpft wurden und später bei der Inokulierung mit aktiven Tumorzellen eine Immunantwort gegen den Tumor erzeugten. Die Beobachtungen, dass dieses Experiment in Mäusen mit T-Zellmangel nicht funktionierte und dass der Transfer von T-Zellen von immunen Mäusen auf nicht-immune Mäuse zu einem Transfer der Immunität führte, ließen darauf schließen, dass T-Zellen eine entscheidende Rolle für die Tumorimmunität spielen. Dabei ist die Präsentation von Tumorantigenen auf MHC (Major Histocompatibility Complex)-Molekülen, die auf der Zelloberfläche lokalisiert sind, eine wichtige Voraussetzung für die Erkennung des Tumors durch T-Zellen (Murphy et al. 2008). Antigene sind Substanzen, die von einem Organismus als fremd erkannt werden und eine spezifische Immunantwort, d.h. die Bildung von Antikörpern oder immunkompetenten Lymphozyten auslösen (De Gruyter et al. 2004). Tumoren verfügen über eine Vielzahl von Mechanismen, um der Immunabwehr zu entkommen, so dass es zu einem „Kampf“ zwischen Immunsystem und Tumor kommt. Dieser „Kampf“ ist von der US-Amerikanischen Forschungsgruppe um R. Schreiber in 3 Phasen unterteilt worden (Dunn et al. 2004):

1. Eliminationsphase
2. Equilibriumsphase
3. Escapephase

Die erste Phase ist die Eliminationsphase, in der die Tumorzellen in einem komplexen Zusammenspiel des adaptiven und nicht-adaptiven Immunsystems erkannt und vernichtet werden. Das adaptive Immunsystem, v.a. CD8+ und

CD4+ T-Zellen, kann Tumorantigene, die an der Oberfläche von Zellen auf MHC-Klasse-I und -II Proteinen präsentiert werden, erkennen und so Tumorzellen von gesunden Zellen unterscheiden. Zu den so identifizierbaren Tumorantigenen gehören unter anderem die in dieser Arbeit untersuchten Cancer-Testis-Antigene. (Siehe Abschnitte 1.2.2. T-Zell basierte Immuntherapie und 1.2.3. Tumorassozierte Antigene).

Werden während der Eliminationsphase nicht alle Tumorzellen vernichtet, so kommt es zur zweiten Phase, der Equilibriumphase, in der sich einige Tumorzellen durch Mutationen verändern, um der Erkennung durch das Immunsystem zu entkommen, während andere Tumorzellen keine Veränderung durchlaufen und weiterhin erkannt und vernichtet werden. Man stellt sich die Equilibriumphase als einen Gleichgewichtszustand zwischen der Entstehung und der Vernichtung von Tumorzellen vor. Die in den Tumorzellen ständig stattfindenden Mutationen werden durch die hohe Instabilität des Tumorgenoms ermöglicht. Durch den Selektionsdruck des Immunsystems werden die Tumorzellen, die vom Immunsystem nicht oder nur schlecht erkannt werden, selektiert und können sich vermehren. Dieser Prozess wird auch Immun-Editing genannt (Dunn et al. 2004). Sobald einige Tumorzellen durch Immun-Editing nicht mehr vom Immunsystem erkannt werden kommt es zur Escapephase, in der der Tumor ungebremst wächst. Neben der Herabregulation von immunogenen Strukturen durch Mutationen und Selektion, nutzen Tumorzellen viele weitere Mechanismen wie die Aktivierung von regulatorischen T-Zellen wie z.B. den CD4+CD25+T-regulatorischen Zellen, die die lokale Immunreaktion abschwächen (Sakaguchi 2000a, Sakaguchi 2000b) oder die Sezernierung von immunsuppressiven Zytokinen. Einige weitere Escape-Mechanismen der Tumorzellen werden auch im nächsten Abschnitt (1.2.1. Immunsuppression bei Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren) beschrieben.

Die Tatsache, dass die meisten Tumoren nicht gehäuft in immundefizienten Patienten vorkommen, könnte natürlich dafür sprechen, dass das Immunsystem auch bei Gesunden keine große Rolle bei der Verhinderung der Entstehung dieser Tumoren spielt (Murphy et al. 2008). Jedoch haben Erfahrungen aus der Transplantationsmedizin und Studien mit in-vitro aktivierten Immunzellen und

monoklonalen Antikörpern gezeigt, dass es prinzipiell möglich ist, Krebserkrankungen mittels Immuntherapie zu heilen oder zumindest aufzuhalten. Ein Beispiel von besonderer Relevanz für die T-Zell basierte Immuntherapie ist die Behandlung von Leukämiepatienten mittels Transfusion von allogenen Spender-T-Lymphozyten, wodurch eine sogenannte Graft-versus-leukemia (GVL) Reaktion hervorgerufen wird, d.h. eine gezielte Bekämpfung der Leukämiezellen durch die Spenderlymphozyten (Kolb 2008).

1.2.1. Immunsuppression bei Patienten mit Kopf Hals-Tumoren

Für Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren ist ein besonderer Status der Immunsuppression beschrieben worden. Frühe Studien haben gezeigt, dass diese Patienten eine verminderte Reaktion im verzögerten Hypersensitivitäts-Hauttest zeigten (Hadden 1997, Atanackovic et al. 2006). Bei diesem Test kommt es nach Injektion von Tuberkulin-Peptiden bei Menschen, die bereits mit dem Tuberkulosebakterium in Kontakt gekommen sind, nach 24-72 Stunden zu einer T-Zell vermittelten, lokalen Entzündungsreaktion (Murphy et al. 2008). Eine schwache Hautreaktion ist bei Menschen, die bereits mit dem Tuberkulosebakterium in Kontakt gewesen waren, somit ein Hinweis auf eine verminderte T-Zell-Funktion. Später wurde nachgewiesen, dass Patienten mit HNSCC eine Reduktion von CD3+, CD4+ und CD8+ Zellen im peripheren Blut aufweisen, die noch Jahre nach einer kurativen Operation anhalten kann (Kuss et al. 2004). Direkte Mechanismen von HNSCC zur Abschwächung der T-Zell-Reaktion umfassen die Produktion von immunsupprimerenden Faktoren wie dem Prostaglandin E2 und den Zytokinen IL-4, IL-6, IL-10 und TGF- β .

Ein indirekter Mechanismus ist die Verschiebung der Immunantwort in Richtung eines T-helfer-2-Typs in der Umgebung des Tumors (Atanackovic et al. 2006). T-helfer-(Th)-1- und T-helfer-(Th)-2-Zellen sind CD4+T-Zellen, die verschiedene Zytokine produzieren und auf unterschiedliche Weise an der Immunabwehr beteiligt sind (Petrides und Ansorge 2003). Während Th1-Zellen negativ auf den Tumor wirken, indem sie zytotoxische T-Zellen und Makrophagen zur

Zerstörung von Tumorzellen stimulieren und Zytokine produzieren, die das Tumorwachstum hemmen, führt das Überwiegen von Th2-Zellen nicht nur zu einer Abnahme der Th1-Zellen und ihrer Antitumor-Effekte. Ein weiterer immunsuppressiver und somit Tumor-begünstigender Effekt von Th2-Zellen ist die Produktion von Zytokinen, die die Reifung Antigenpräsentierender Zellen (APZ) behindern und die Effektivität zytotoxischer T-Lymphozyten verringern. Eine positive Eigenschaft von Th2-Zellen ist, dass sie prinzipiell B-Zellen zur Produktion von tumorspezifischen Antikörpern stimulieren können, die an die Tumorzelle binden und eine antikörpervermittelte Zerstörung der Zelle induzieren können. Dies ist in der Immunabwehr von Tumoren jedoch nur wenig effektiv, im Gegensatz zu der hocheffizienten antikörpervermittelten Zerstörung infektiöser Mikroorganismen im Blut. Ein Zytokin-Milieu vom Th2-Typ kann nicht nur von Th2-Zellen, sondern auch von anderen Antigenpräsentierenden Zellen produziert werden (Young et al. 2009). Ein weiterer indirekter Mechanismus, durch den HNSCC-Tumoren der Immunabwehr entgehen, ist die Anlockung von immunsuppressiven CD34+ Zellen durch die Produktion von GM-CSF durch den Tumor. CD34+Zellen hemmen die Aktivität der T-Zellen im Tumorgewebe durch die Produktion von TGF- β (Young 2004, Atanackovic et al. 2006). Die Menge und die Vielfalt der Mechanismen, deren HNSCC sich bedienen, um einer Immunantwort zu entkommen, könnte befürchten lassen, dass die Überwindung dieser Mechanismen und die Schaffung einer effektiven Immunantwort unmöglich sind. Andererseits könnte man jedoch auch annehmen, dass HNSCC gerade deshalb so viele Escape-Mechanismen besitzen, weil sie besonders empfindlich gegenüber der Immunabwehr sind (Atanackovic et al. 2006). Diese Vermutung wird durch eine Reihe von Studien gestützt, die gezeigt haben, dass die Infiltration von HNSCC mit T-Zellen und/oder dendritischen Zellen ein prognostisch günstiger Faktor ist (Wolf et al. 1986, Guo et al. 1987, Gallo et al. 1991a und 1991b, Goldmann et al. 1998, Duvoux et al. 1999). Außerdem gibt es zahlreiche Berichte über einen aggressiveren Verlauf der Erkrankung bei immunsupprimierten Patienten sowie eine Studie über einen aggressiveren Krankheitsverlauf im Falle von Defekten in der MHC-I-Antigen Prozessierung (Haagsma et al. 2001, Barone et al. 1990, Morrison et

al.1994, Mihalov et al. 1996, Seder et al. 1987, Penn 1977, Epstein und Scully 1992, Thomas et al. 1993, Bhatia et al. 2001, King et al. 1995, Curtis et al. 1997, Ades et al. 2004, Deeg et al. 1996, Rosenberg et al. 2005, Kaplan et al. 1985 und Meissner et al. 2005).

1.2.2. T-Zell basierte Immuntherapie

Das Immunsystem kann die maligne Entartung von Zellen mit Hilfe von Tumorantigenen erkennen, die mittels MHC-I- oder MHC-II-Proteinen auf der Zelloberfläche präsentiert werden. MHC-I-Proteine finden sich auf allen kernhaltigen Zellen während MHC-II-Proteine vor allem von Antigen-präsentierenden Zellen des Immunsystems exprimiert werden (Petrides und Ansorge 2003). Es wurden jedoch auch Tumoren beschrieben, die selbst MHC-II-Moleküle exprimieren und darüber Tumorantigene präsentieren.

MHC-I- und MHC-II-Moleküle werden auf unterschiedliche Weise mit Antigen beladen: Zur Beladung der MHC-I-Moleküle werden intrazellulär synthetisierte Proteine in Proteasomen in Peptide gespalten (Van der Bruggen und Van den Eynde 2006). Die so entstandenen Antigenpeptide werden mit Hilfe der Transportproteine TAP1 und TAP2 in das endoplasmatische Retikulum (ER) geschleust, wo sie an ein MHC-I-Molekül gebunden werden, um dann über den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche transportiert zu werden.

Die Präsentation der MHC-II-Antigen-Komplexe auf Antigenpräsentierenden Zellen kann normalerweise erst erfolgen, nachdem eine APZ ein extrazelluläres Antigen durch Endozytose aufgenommen hat. Im Inneren der APZ wird das Antigen in Endosomen durch Proteasen fragmentiert, im endoplasmatischen Retikulum an ein MHC-II-Protein geknüpft und anschliessend wiederum an die Zelloberfläche transportiert (Petrides und Ansorge 2003). Die erwähnte Präsentation von Tumorantigenen auf MHC-II-Molekülen, die auf den Tumorzellen selbst lokalisiert sind, wie es z.B. für das in dieser Arbeit untersuchte CT-Antigen MAGEA3 beschrieben wurde, könnte durch

Autophagozytose bedingt sein (Van der Bruggen et al. 2002, Van der Bruggen und Van den Eynde 2006).

MHC-I-Peptid-Komplexe können von zytotoxischen CD8+T-Zellen erkannt werden. Die aktivierten CD8+T-Zellen können durch die Freisetzung von Enzymen, die beispielsweise Apoptose induzieren oder Poren in der Zellwand bilden, zur direkten Zerstörung der Tumorzelle führen.

MHC-II-Peptidkomplexe können von CD4+T-helfer-Zellen erkannt werden, die die Immunantwort mittels Ausschüttung von Zytokinen auf unterschiedliche Weise beeinflussen (Petrides und Ansorge 2003, Murphy et al. 2008). (Siehe hierzu auch Abschnitt 1.2.1 Immunsuppression bei Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren). Da diese natürliche Immunantwort jedoch nur selten ausreicht, um einen Tumor zu eliminieren, ist das Ziel der Immuntherapie nicht nur die Identifizierung von immunogenen Tumorantigenen, sondern auch die Erzeugung bzw. die Verstärkung der Immunreaktion darauf. Einige Tumorantigene werden im Folgenden beschrieben:

1.2.3. Tumorassoziierte Antigene

1.2.3.1. Tumorspezifische Antigene

Antigene, die ausschließlich auf Tumorzellen vorkommen, sind Peptide, die durch eine Punktmutation während der Onkogenese entweder eine neue Bindungsstelle für die Bindung an MHC-I-Moleküle, oder ein neues Epitop für die Erkennung durch T-Zellen erlangt haben (Houghton 1994). Die mutierten Peptide binden jedoch häufig nur schlecht an MHC-Moleküle oder werden nicht richtig prozessiert, so dass sie nur bedingt in der Lage sind, eine Immunantwort zu produzieren (Murphy et al. 2008). Ein weiterer Nachteil im Hinblick auf die Entwicklung einer antigen-spezifischen Immuntherapie ist, dass diese Punktmutationen für jeden Patienten spezifisch sind. Beispiele für diese Klasse der

Tumorantigene sind CDK4 und β -Catenin im malignen Melanom oder Caspase-8 im Plattenepithelkarzinom (Murphy et al. 2008).

1.2.3.2. In Tumoren überexprimierte Antigene

Bestimmte Antigene werden von Tumorzellen stärker exprimiert als von normalen Zellen. Beispiele hierfür sind der Tyrosinkinase-Rezeptor HER-2/neu, HER-3 und -4, der Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR), der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), das Karzinoembryonale-Antigen (CEA) und das Epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM). Eine Überexpression des Karzinoembryonalen-Antigen (CEA) kommt in epithelialen Tumoren wie dem Kolorektalen Karzinom, dem Lungenkarzinom oder dem Ovariakarzinom vor. VEGF spielt eine wichtige Rolle für die Tumorangiogenese (Zafir-Lavie et al. 2007) und korreliert wie auch EGFR bei HNSCC-Patienten mit einer schlechten Prognose (Smith et al. 2000). EGFR ist neben seiner Expression in HNSCC in vielen weiteren malignen Tumoren überexprimiert, wie zum Beispiel in Lungen-, Gehirn-, Nieren-, Brust- und Ovariakarzinomen. In geringerem Maße kommt EGFR auch auf gesunden Geweben wie Lunge, Kolon, Rektum, Nieren, Brust und Ovarien vor und ist dort mitverantwortlich für Proliferation, Differenzierung und Überleben der Zellen. Monoklonale Antikörper gegen EGFR und VEGF werden in der Therapie bestimmter Tumorarten angewendet. Zur Behandlung von Kopf-Hals-Tumoren hat sich Cetuximab, ein monoklonaler Antikörper gegen EGFR, bewährt (Zafir-Lavie et al. 2007).

1.2.3.3. Differenzierungsantigene

Differenzierungsantigene sind Antigene, die nicht nur von Tumorzellen sondern auch von gesunden Zellen desselben Ursprungsgewebes in bestimmten Differenzierungsstadien präsentiert werden. So präsentiert z.B. das maligne Melanom Antigene, die auch von gesunden Melanozyten und von pigmentierten

Retinazellen gebildet werden, wie das Enzym Tyrosinase oder das Antigen Melan-A/MART-1 (Houghton 1994). Antikörper gegen diese Antigene können einerseits zu der Autoimmunerkrankung Vitiligo führen, bei der Autoantikörper zu einer Zerstörung von Melanozyten und dadurch zu weissen Flecken auf der Haut führen, andererseits kann das Vorhandensein dieser Antikörper auch die Progression eines Malignen Melanoms hemmen. Vitiligo-Patienten, die an einem Malignen Melanom erkranken, haben deshalb eine günstigere Prognose als die durchschnittliche Bevölkerung. In vitro Studien haben gezeigt, dass das Serum von Patienten mit Vitiligo die Proliferation von Malignen Melanomzellen behindern kann (Ram et al. 2007).

1.2.3.4. Onkovirale Antigene

Onkovirale Antigene sind Proteine, die von in die DNA eingeschleusten viralen Onkogenen kodiert werden, und die eine wichtige Rolle bei der malignen Entartung einer Zelle spielen können. So führt z.B. das Epstein-Barr-Virus, welches an der Entstehung vieler Tumoren beteiligt ist, nach der Infektion von B-Lymphozyten zur Expression von viruskodierten Antigenen, die eine spezifische T-Zell Antwort hervorrufen (Rickinson, Moss 1997).

Wie bereits seit längerem für das Zervixkarzinom bekannt, kann das humane Papillomavirus (HPV) Typ 16 nach neueren Studien auch bei der Entstehung von Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen eine kausale Rolle spielen. HPV führt zur Expression der viralen Onkoproteine E6 und E7, die die Tumorsuppressorgene p53 und pRb destabilisieren. HPV-positive Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinome haben in der Regel eine günstigere Prognose als HPV-negative Tumoren (Chung und Gillison 2009) und bemerkenswerter Weise ist auch die Immuntherapie bei Patienten mit Virus-induzierten Tumoren besonders erfolgreich (Murphy et al. 2008).

1.2.3.5. Cancer-Testis-Antigene (CT-Antigene)

CT-Antigene sind eine Gruppe von 44 Antigenfamilien, die definitionsgemäß von Tumorzellen, Keimbahnzellen und Trophoblasten exprimiert werden, jedoch maximal von 2 gesunden Gewebearten (Simpson et al. 2005). Für viele CT-Antigene ist die Erzeugung einer tumorspezifischen Immunantwort bekannt, wobei Keimbahnzellen und Trophoblasten nicht angegriffen werden, da sie keine MHC-I-Moleküle aufweisen und zusätzlich durch eine Blut-Hoden- bzw. Blut-Plazenta-Schranke geschützt sind (Caballero und Chen 2009, Arfsten 2008).

Nachdem das erste in einer Melanom-Zelllinie nachgewiesene CT-Antigen MAGE, als Akronym für Melanoma associated AntiGEn genannt wurde, wurden auch viele der im Folgenden entdeckten Antigene mit auf –AGE endenden Namen benannt (BAGE, CAGE etc). Da diese Nomenklatur nicht konsequent fortgeführt wurde und auch für die stetig wachsende Zahl der CT-Antigene nicht geeignet ist, wurde von Scanlan et al. eine Klassifizierung vorgeschlagen, die chronologisch nach dem Entdeckungsdatum geordnet ist (MAGE heisst somit als erstes entdecktes CT-Antigen CT1). Dabei sollen die Mitglieder einer Genfamilie ebenfalls mittels Nummern unterschieden werden (MAGEA3 ist z.B. CT1.3) (Scanlan et al. 2004). Durch diese uneinheitlich verwendeten Nomenklaturen ist das Lesen der Literatur zu CT-Antigenen etwas erschwert, in dieser Arbeit werden die CT-Antigene mit den Namen bezeichnet, unter denen sie zuerst beschrieben wurden.

Die Entdeckung von CT-Antigenen begann in den 70er und 80er Jahren durch Autologes Typing (Old 1981). Bei dieser Methode werden Zellkulturen aus Tumorzellen und aus gesunden Zellen eines Patienten simultan mit autologem Serum versetzt. Eine Immunreaktion auf Zelloberflächenantigene wird mittels Adsorptionsverfahren nachgewiesen, wobei angestrebt wird, Antigene zu identifizieren die sich ausschließlich auf Tumorzellen, nicht jedoch auf gesunden Zellen finden (Old 1981).

Die 1991 von Boon et al. (Boon et al. 1991, Van der Bruggen et al. 1991) entwickelte Technik der Klonierung von T-Zell-Epitopen führte zur

Identifizierung der Gensequenz der CT-Antigene MAGEA1, BAGE und GAGE (Scanlan et al. 2004). Hierbei werden T-Zellen aus dem Blut von Tumorpatienten gewonnen und *in vitro* expandiert (Boon et al. 1991). In einem Zytotoxizitätstest (Chrom-release Test) werden mit intrazellulärem radioaktivem Chrom markierte Zellen den zytolytischen T-Zellen ausgesetzt. Lysiert werden nur die Zellen, die das entsprechende Antigen tragen. Je mehr Zellen lysiert werden, desto höher ist die Menge an freigesetztem und somit messbarem Chrom (Pezzutto et al. 2007). Im nächsten Schritt wird die DNA der antigenträgenden Zellen isoliert und auf mehrere 100.000 Cosmide (Plasmide aus dem Lambda-Phagen mit sog. *cos*-sites = DNA Sequenzen, über die das Phagenchromosom einen stabilen Ring bilden kann) verteilt. Die einzelnen Cosmide werden wieder in die DNA von Zellen eingeschleust. Die Zellen werden dann auf die Expression des gesuchten Antigens getestet, in dem ihre Fähigkeit zur Aktivierung und zur Proliferation von zytolytischen T-Zellen untersucht wird. Die Aktivierung von antigenspezifischen T-Zellen setzt das Vorhandensein des Antigens voraus. Die Cosmide, die zu einer Antigenexpression in den Wirtszellen führen, werden mittels Restriktionsenzymen weiter unterteilt, bis die kleinste DNA-Basengruppe identifiziert ist, die das gesuchte Antigen kodiert und die bei ihrer Einschleusung in Wirtszellen zu seiner Expression und Erkennung durch T-Zellen führen kann (Boon et al. 1991, Pezzutto et al. 2007, Löffler und Petrides 2003).

Der nächste wichtige Schritt in der Identifizierung von CT-Antigenen war die Entwicklung der SEREX- (Serological identification of antigens by Recombinant Expression Cloning) Methode, bei der cDNA-Datenbanken von Tumorzellen erstellt werden. Hierfür wird die gesamte cDNA einer Tumorzelle mittels Phagen in *E. coli* Bakterien eingeschleust und die Genprodukte werden mit autologen Antikörpern auf Tumorantigene gescreent. Positive Klone werden isoliert und sequenzanalysiert (Sahin et al. 1995, Sahin et al. 1997). Zu den ersten mit dieser Methode identifizierten CT-Antigenen gehörten NY-ESO-1 und SSX2 (Scanlan et al. 2004). Weitere gentechnische Methoden, die zur Identifizierung der mRNA von CT-Antigenen führten, sind die sog. representational difference analysis (RDA), bei der Unterschiede in der Genexpression durch den Vergleich

von zwei verschiedenen cDNA Populationen identifiziert werden. Diese Methode führte zur Entdeckung von MAGEC2, LAGE1 und SAGE (Güre et al. 2000). Ebenfalls eine neuere Methode ist die Expressed sequence tag (EST) Methode, die u.a. zur Identifizierung von LDHC und TPTE führte. Bei dieser Methode wird cDNA mittels bekannter Nukleotidsequenzen auf das Vorhandensein von bekannten Genen gescreent (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/About/primer/est.html>, Stand 27.03.2011).

Die bisher am gründlichsten auf die Expression von CT-Antigenen untersuchten Tumorarten sind Blasenkrebs, Brustkrebs, Kolonkarzinom, Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom, Prostatakrebs, Nierenkrebs und das Maligne Melanom. Die häufigste Expression von CT-Antigenen wurde in Blasenkrebs, Nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom und im Malignen Melanom festgestellt. In über 20% der Tumorproben wurden mindestens 50% der untersuchten CT-Antigene nachgewiesen.

Für 19 der 44 CT-Antigenfamilien konnte die Anregung einer zellulären und/oder humoralen Immunantwort in Menschen nachgewiesen werden, u.a. für die in dieser Arbeit untersuchten CT-Antigenfamilien MAGEA, MAGEC, BAGE, GAGE, SSX, NY-ESO-1, CAGE, CTAGE und HOM-TES (Scanlan et al. 2004). Scanlan et al. (2004) betonen, dass streng zwischen CT-Antigenen, die mittels mRNA Expressionsanalyse nachgewiesen wurden, und solchen, die mit immunologischen Verfahren entdeckt wurden, unterschieden werden muss. Nur für letztere ist die Immunogenität belegt.

Außerdem wird unterschieden zwischen CT-Antigenen, gegen die lediglich eine humorale Immunantwort nachgewiesen wurde und anderen, die mittels der Klonierung von T-Zellen identifiziert wurden. Es gibt jedoch auch zunehmend Hinweise darauf, dass eine koordinierte humorale und zelluläre Immunantwort gegen CT-Antigene stattfindet. So wurden beispielsweise gegen MAGEA, SSX und NY-ESO-1 sowohl spezifische Antikörper als auch spezifische T-Zellen nachgewiesen (Van der Bruggen et al. 1991, Stockert et al. 1998).

Unterschiede gibt es auch zwischen der Expression der mRNA eines CT-Antigens in Tumorgewebe und seiner tatsächlichen Proteinexpression durch den Tumor (Jungbluth et al. 2001, Chen et al. 1997). Dies könnte durch die

heterogene Expression eines CT-Antigens durch den Tumor bedingt sein (Caballero und Chen 2009), durch Unterschiede in der Sensitivität der diagnostischen Verfahren oder auch durch die Abhängigkeit der Präsentation eines CT-Antigens auf der Zelloberfläche von Mechanismen der Antigenprozessierung (Simpson et al. 2005).

Das Problem, dass es auch bei Patienten, die eine Immunantwort gegen CT-Antigene aufweisen, zu einem Fortschreiten der Krebserkrankung kommt, wirft die Frage auf, ob CT-Antigene überhaupt geeignete Zielstrukturen für eine antigenspezifische Immuntherapie sind. Es ist unklar, ob eine Krebserkrankung ohne das Vorhandensein von Tumorantigenen schneller voranschreiten würde. Die genannte Eigenschaft einiger CT-Antigene, sowohl humorale als auch zellulär vermittelte Immunantworten zu erzeugen, erscheint jedoch vielversprechend für die Entwicklung einer aktiven Immuntherapie (Scanlan et al. 2004). Mit einer aktiven Immuntherapie ist die Induktion einer andauernden körpereigenen Immunantwort gegen ein Antigen gemeint, z.B. durch eine Impfung. So besteht das Prinzip einer Tumorimpfung darin, nach der operativen oder strahlentherapeutischen Behandlung eines Tumors gezielt gegen Antigene des Tumors zu impfen, um die Entstehung von Tumorrezidiven durch die körpereigene adaptive Immunantwort zu verhindern oder abzuschwächen. Im Gegensatz dazu werden in der passiven Immuntherapie in vitro hergestellte oder modifizierte Immunmediatoren wie z.B. monoklonale Antikörper transfundiert.

Studien zur Erprobung unterschiedlicher Impfverfahren gegen die CT-Antigene NY-ESO-1 und MAGEA3 haben gezeigt, dass die Erzeugung einer starken zellulären und humoralen Immunantwort gegen CT-Antigene durch eine Impfung prinzipiell möglich ist (Old 2008, Gnjatic et al. 2009, Aoki et al. 2009).

In einigen Studien konnte auch eine Korrelation von guten antigenspezifischen Immunantworten mit günstigeren Verläufen der Tumorerkrankungen beobachtet werden. (Davis et al. 2004, Karbach et al. 2010, Jager et al. 2000, Thurner et al. 1999, Marchand et al. 2003). In einer Arbeit zur Erprobung einer DNA Impfung gegen das CT-Antigen NY-ESO-1 an Patienten mit einem nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom, Ösophagus- oder Prostatakarzinom gelang es in über 90%

der Patienten eine zelluläre antigenspezifische Immunantwort zu erzeugen. In dieser Studie konnte das Vorhandensein von antigenspezifischen T-Zellen den Verlauf der Tumorerkrankungen jedoch nicht verzögern. Auch war die zelluläre Immunantwort in vivo häufig nur für eine kurze Zeit nachweisbar. Nach in vitro Depletierung der regulatorischen CD4+CD25+ T-Zellen kam es zur Erholung der antigenspezifischen T-Zellen. Dies zeigt, dass regulatorische T-Zellen eine wichtige Rolle bei der Antitumor-Immunantwort spielen und dass es möglicherweise erforderlich ist, nicht nur eine Immunität gegen Tumorantigene zu erzeugen, sondern gleichzeitig eine Supprimierung der körpereigenen regulatorischen T-Zellen der Patienten durchzuführen (Gnjatic et al. 2009, Old 2008).

Aus pragmatischen Gründen wurden und werden CT-Antigene –wie in den eben genannten Beispielen- vor allem im Hinblick auf ihren Nutzen in der Krebstherapie und in erster Linie als Zielstrukturen für die Entwicklung einer antigenspezifischen Impfung erforscht (Scanlan et al. 2004). Dennoch gibt es auch einige Erkenntnisse über ihre biologische Funktion, die darauf hindeuten, dass sie möglicherweise eine wichtige Rolle in der Entstehung von Tumoren spielen, so dass ein besseres Verständnis ihrer Funktion von Bedeutung für die Krebsforschung im Allgemeinen sein könnte. Zum besseren Verständnis der Rolle der CT-Antigene in der Tumorgenese wurden zunächst ihre Lokalisation im Genom, ihre Gemeinsamkeiten zu anderen Genen und die Mechanismen, die zu ihrer Aktivierung führen, untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass 22 der 44 bekannten CT-Antigenfamilien auf dem X-Chromosom lokalisiert sind während die anderen CT-Antigene eher zufällig über das Genom verteilt sind. CT-X Gene bilden im Gegensatz zu den Nicht-CT-X Genen zum Teil Genfamilien mit ähnlicher oder identischer Basensequenz und vermutlich verwandtem Ursprung, deren Genprodukte ähnliche Funktionen ausüben. Beispiele für solche Genfamilien sind: MAGEA, MAGEB, MAGEC, SSX, GAGE, XAGE und PAGE. Im Gegensatz zu den nicht CT-X-Antigenen werden CT-X-Antigene von Tumoren häufig coexprimiert (Simpson et al. 2005). Es wurde gezeigt, dass die Aktivierung von CT-X Genen über die Hypomethylierung von

Genpromoterregionen erfolgen kann, ein Prozess der während der Tumorgenese abläuft (Weber et al. 1994, Güre et al. 2002).

Eine alte Theorie, die mit der Entdeckung der CT-Antigene neue Bedeutung gewonnen hat, ist, dass in Tumorzellen ein ähnliches genetisches Programm abläuft wie in Keimzellen. Da es neben der Expression von CT-Antigenen viele weitere Ähnlichkeiten zwischen Tumorzellen und Keimzellen gibt: So z.B. die Fähigkeit der Immunabwehr zu entkommen, die Produktion von Gonadotropinen, die globale Hypomethylierung der DNA, das invasive Wachstum, die zelluläre Unsterblichkeit und das Migrationsverhalten der Zellen (Scanlan et al. 2004, Simpson et al. 2005). Genetische Keimzell-Programme sind in gesunden Zellen inaktiv und es wird vermutet, dass sie durch Mutationen oder durch Prozesse wie die Hypo- oder Hypermethylierung von DNA aktiviert werden können und dann zur malignen Entartung von Zellen führen bzw. dazu beitragen können. Durch die Identifikation der auslösenden Faktoren für die Aktivierung solcher genetischer Keimzell-Programme könnten sich zahlreiche neue therapeutische Optionen ergeben. Daher ist die weitere Erforschung der Mechanismen der CT-Antigen-Expression sowie ihrer Funktion in Keimzellen und in Tumoren von großer Bedeutung (Simpson et al. 2005). Neben ihrer möglichen Rolle in einem genetischen Programm der Tumorgenese ist für einzelne CT-Antigene auch etwas über ihren konkreten Wirkmechanismus bekannt. So wurde beispielsweise festgestellt, dass Mitglieder der GAGE-Genfamilie eine Resistenz der Zelle gegenüber der Interferon- γ induzierten Apoptose bewirken können (Cilensek et al. 2002). Für einige MAGE-Antigene ist eine Proteinbindungsstelle bekannt, über die sie an einer Reihe von zellulären Signalketten beteiligt sind (Laduron et al. 2004, Bai et al. 2005). Wie für GAGE wurde auch für einige der MAGE-Antigene nachgewiesen, dass ihre Expression zu einer verminderten Sensibilität von Tumorzellen gegenüber Tumornekrosefaktor führen kann (Park et al. 2002).

Atanackovic et al. konnten 2009 nachweisen, dass die Expression von MAGEC1 und MAGEA3 die Apoptosehäufigkeit von Myelom-Zellen reduziert und somit die Überlebenschancen der Tumorzellen auch unter Chemotherapie erhöht (Atanackovic et al. 2009). Dies entspricht Studienergebnissen, die eine

Korrelation zwischen einer hohen Expressionshäufigkeit von CT-X-Antigenen und einer schlechteren Prognose gezeigt haben (Riener et al. 2009, Sharma et al. 2006) und würde ebenfalls zu der Theorie passen, dass CT-Antigene eine Rolle in einem genetischen Programm der Tumorentstehung spielen.

Während CT-X Antigene vor allem in den früheren Stadien der Keimzellentwicklung wie den Spermatogonien vorkommen (Jungbluth et al. 2000a), werden die nicht CT-X-Antigene im Hoden vor allem in späteren Stadien der Keimzeldifferenzierung wie den Spermatozyten exprimiert (Türeci et al. 1998a, Xu et al. 2004). Zu diesem Zeitpunkt findet die Meiose statt, und für einige Nicht-CT-X Antigene wie z.B. SCP1 und SPO11 gibt es Hinweise, dass sie direkt daran beteiligt sind (Keeney et al. 1997, Pousette et al. 1997).

1.3. Fragestellung

Das Auftreten und die Immunogenität von Cancer-Testis-Antigenen wurde bereits für zahlreiche maligne Tumoren untersucht. Es wurde vor dieser Arbeit jedoch noch keine umfassende Analyse von Cancer-Testis-Antigenen in HNSCC durchgeführt. Da HNSCC zu den häufigen Tumorarten gehören, die bis heute eine hohe Morbidität aufweisen und da ihre Therapie mit stark beeinträchtigenden Nebenwirkungen verbunden ist, ist die Identifizierung von Antigenen als Zielstrukturen für eine antigen-spezifische Immuntherapie als neues Therapieverfahren für HNSCC ein wichtiges Ziel.

Die Immuntherapie bei Patienten mit HNSCC beschränkt sich zur Zeit auf passive Verfahren. So wird der monoklonale Antikörper Cetuximab gegen den in Kopf-Hals-Tumoren überexprimierten Wachstumsfaktor EGFR erfolgreich in der Therapie von HNSCC eingesetzt (Argiris et al. 2008), der Transfer von in vitro aktivierten und modifizierten zytotoxischen Zellen wird derzeit erprobt (Pezzutto et al. 2007).

In dieser Arbeit werden die Expressionshäufigkeit und die Expressionsmuster der mRNA von 23 CT-Antigenen in HNSCC und angrenzendem gesunden Gewebe untersucht, mit dem Ziel CT-Antigene zu identifizieren, die aufgrund ihrer hohen Expressionshäufigkeit und ihrer Tumorspezifität in HNSCC ideale Kandidaten für die Entwicklung einer aktiven Immuntherapie, wie z.B. einer Impfung, sind. Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Expressionsmuster von CT-Antigenen in HNSCC-Tumoren werden neben den Tumorgewebe-proben auch HNSCC-Zelllinien auf das Vorhandensein der gleichen 23 CT-Antigene untersucht. Außerdem wird das Serum von 39 der HNSCC-Patienten auf 3 der untersuchten CT-Antigene untersucht, um erste Aussagen über die Immunogenität der CT-Antigene in HNSCC treffen zu können. Diese ist neben der Expressionshäufigkeit und der Tumorspezifität eine weitere entscheidende Voraussetzung für die Entwicklung einer aktiven Immuntherapie.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Patientenkollektiv

Es wurden 51 Patienten in die Studie eingeschlossen. Die Proben wurden während Routineoperationen von Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen gewonnen. Alle Patienten wurden im Zeitraum März 2004-Juli 2005 entweder in der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf oder in der Klinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde des Helios Klinikums Krefeld operiert. Die Aufklärung der Patienten und die Einholung einer schriftlichen Einverständniserklärung über die Gewinnung von Gewebe- und Blutproben wurde durch die behandelnden HNO-Ärzte durchgeführt (Siehe Patientenaufklärung und Einverständniserklärung im Anhang).

2.2. Proben aus Tumorgewebe und aus gesundem Gewebe der HNSCC Patienten

Es wurden Tumorproben und Proben aus dem angrenzenden gesundem Gewebe von allen 51 Patienten gewonnen. Für die Gewinnung des gesunden Gewebes wurde vom Operateur ein Sicherheitsabstand von ca. 5 cm zum Tumor eingehalten. Die Größe der Proben variierte zwischen maximal 1,5 cm Durchmesser bei den Tumorproben und maximal 3 mm Durchmesser bei den gesunden Proben. Es war nur von 26 Patienten eine ausreichende Menge gesunden Gewebes für die Untersuchung aller 23 CT-Antigene vorhanden. Die Gewebe wurden in RNAlater bei -80°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

2.3. Serumproben der HNSCC-Patienten

Von 39 Patienten war Serum für die Analyse immunologischer Reaktionen gegen CT-Antigene verfügbar. Das Serum wurde ebenfalls bei -80°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

2.4. HNSCC-Zelllinien

Es wurden 9 Zelllinien aus Plattenepithelkarzinomen des Mundes, der Zunge, des Nasenseptums, des Pharynx und der Schilddrüse auf dieselben CT-Antigene untersucht wie die Patientenproben. Alle Zelllinien wurden über die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen bezogen (DSMZ) (Siehe Tabelle 9 im Anhang).

2.5. Studiendesign

Es handelt sich um eine experimentelle Studie zum Nachweis von CT-Antigenen in HNSCC-Gewebeproben. Das Studiendesign ist auf Vergleichbarkeit ausgelegt. Um nachzuweisen, dass die Expression von CT-Antigenen im Kopf-Hals-Bereich auf malignes Gewebe beschränkt ist, sind die an den Tumor angrenzenden gesunden Gewebeproben auf die Expression derselben CT-Antigene untersucht worden. Zur Überprüfung der Ergebnisse der CT-Antigenexpression in HNSCC-Tumorproben wurden 9 HNSCC-Zelllinien auf dieselben CT-Antigene untersucht. Um Informationen über die Immunogenität der in HNSCC vorkommenden CT-Antigene zu gewinnen, wurde das Serum von 39 Patienten auf Antikörper gegen 3 ausgewählte CT-Antigene untersucht.

2.6. Methoden

2.6.1. RNA-Isolation

Für die Extrahierung der kompletten RNA aus dem Gewebe wurde eine Denaturierung mit Guanidinium Thiocyanat durchgeführt (Übersicht über die verwendeten Reagenzien und Geräte siehe Tabelle 8). Die Denaturierung, d.h. die Zerstörung der zellulären Proteine ist erforderlich, da die RNA, die isoliert werden soll, andernfalls sofort nach Zerstörung der Zelle von zelleigenen RNAsen zerstört werden würde (Chirgwin et al. 1979).

Anschließend wurde über Nacht eine Ultrazentrifugation über einen Cäsiumchlorid-Gradienten mit 36.000 Umdrehungen pro Minute bei 4°C durchgeführt (Siehe Tabelle 8 im Anhang). Cäsiumchlorid wirkt ebenfalls denaturierend (Chomczynski und Sacchi 1987). Bei der Ultrazentrifugation über Cäsiumchlorid bildet sich ein Dichtegradient aus und die RNA setzt sich am Boden des Zentrifugenröhrchens als Pellet ab. Nach dem der Überstand vorsichtig abpipettiert wurde, wurde die gewonnene RNA in TE (Iris EDTA)-Puffer gelöst, mit 100% Ethanol und 3M Natrium Azetat versetzt und mit 70% Ethanol gewaschen. Nach Lösung in Wasser wurde die Konzentration der RNA mittels Fotospektrometrie bestimmt.

2.6.2. cDNA-Gewinnung

Die komplette RNA wurde nach ihrer Gewinnung in cDNA umgeschrieben, da diese stabiler und weniger anfällig für enzymatischen Abbau ist. Hierfür wurden 2µg der RNA mit Puffer, MgCl₂, Random primer, dNTPs (dATP, dGTP, dUTP, dCTP) und AMV-Reverse Transkriptase gemischt. Die Reverse Transkription wurde im Eppendorf Master Cycler für 45 Minuten bei 42°C durchgeführt mit Hitzeinaktivierung des Enzyms bei 95°C für 5 Minuten. Die Transkriptionsreaktion wird dabei durch Anlagerung des random primer an das 3'-Ende der

RNA gestartet, dann synthetisiert das Enzym Reverse Transkriptase aus dem RNA Einzelstrang eine komplementäre Doppelstrang cDNA.

2.6.3. Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

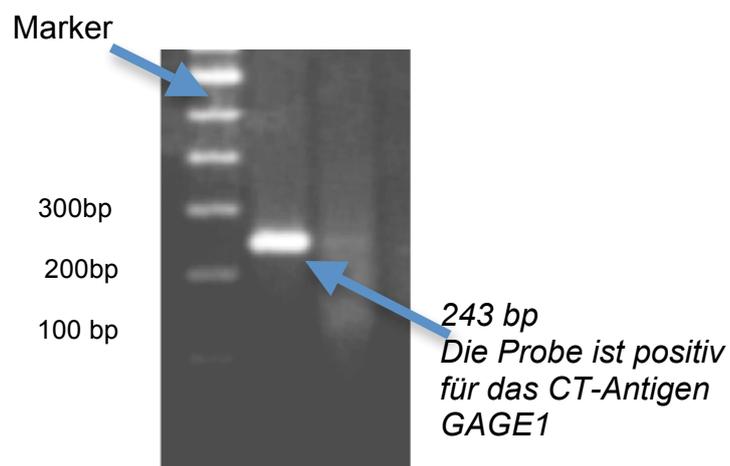
Die PCR-Primer und die Reaktionsbedingungen, die für die RT-PCR Analyse von AKAP3 (Hasegawa et al. 2004), ZNF165 (Dong et al. 2004), SLLP1 (Wang et al. 2004) und NY-TLU-57 (Lee et al. 2004) verwendet wurden, sind in den Primärpublikationen beschrieben worden. Die Analyse aller anderen CT-Antigene wurde unter den PCR Bedingungen durchgeführt, die in der CT Gen-Datenbank der Academy of Immunology beschrieben sind (www.cancerimmunity.org/CTdatabase/, Stand 02.05.2011).

Eine Übersicht über die Primersequenzen, Genproduktlängen und Annealing Temperaturen gibt Tabelle 7 im Anhang. Für die PCR-Analyse der Expression der einzelnen CT-Antigene wurde 1µl Erst-Strang cDNA mit Hilfe von transkriptionsspezifischen Oligonukleotiden vervielfältigt (10pMol). Hierfür wurden 2 U AmpliTaq Gold und 10nMol von jedem dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) mit 1.67mM MgCl₂ und der cDNA in eine 25µL Reaktion gegeben. Die PCR-Produkte wurden auf 1,5% Agarosegel separiert und mit Ethidiumbromid gefärbt. Anschließend wurden sie mit UV Licht sichtbar gemacht und mit einer CCD (charge-coupled device) Kamera fotografiert. Die Größe der PCR-Produkte wurde beurteilt, indem ein Marker neben den Proben auf das Agarosegel aufgetragen wurde. Der Marker läuft mit den Proben über das Gel und erzeugt alle 100 Basenpaare eine Markierung, mit deren Hilfe die Anzahl der Basenpaare der Proben bestimmt werden kann (Siehe Abbildung 2). Zur Überprüfung der Qualität der cDNA wurde eine RT-PCR mit Primern für das Haushältergen GAPDH durchgeführt. Alle RT-PCR Experimente wurden mindestens zweimal durchgeführt. Negativkontrollen ohne cDNA und Positivkontrollen mit cDNA aus gesundem menschlichem Hoden wurden in allen PCR-Reaktionen durchgeführt.

2.6.3.1. Bewertung der RT-PCR Ergebnisse

Als positiv gewertet wurden deutlich sichtbare Banden mit der dem Antigen entsprechenden Produktlänge, wenn die Kontrolle ohne cDNA negativ war (Andernfalls müsste man von einer Verunreinigung beim Auftragen auf das Agarosegel ausgehen und die Ergebnisse könnten nicht verwertet werden).

Wenn die Bande nur schwach sichtbar war, wurde die PCR unter den gleichen technischen Bedingungen wiederholt. War Probe beim zweiten Durchgang ebenfalls nur schwach sichtbar oder negativ, so wurde sie insgesamt als negativ gewertet. War sie hingegen deutlich positiv, so galt sie als positiv.



**Abb. 2: RT-PCR
CT-Antigen GAGE1. 243 Basenpaare (bp)**
*Deutlich positive Bande direkt neben dem Markerstreifen.
Rechts daneben eine sehr schwach positive Bande, die
zugehörige Probe musste erneut untersucht werden.*

2.6.4. ELISA

Mittels ELISA wurden die IgG Antikörper gegen MAGEA3, NY-ESO-1 und SSX2-Proteine im Serum gemessen (Übersicht über die verwendeten Proteine siehe Tabelle 10 im Anhang). Dazu wurden nach der Methode von Stockert et al. (1998), mit einigen Modifikationen, rekombinante komplette Proteine

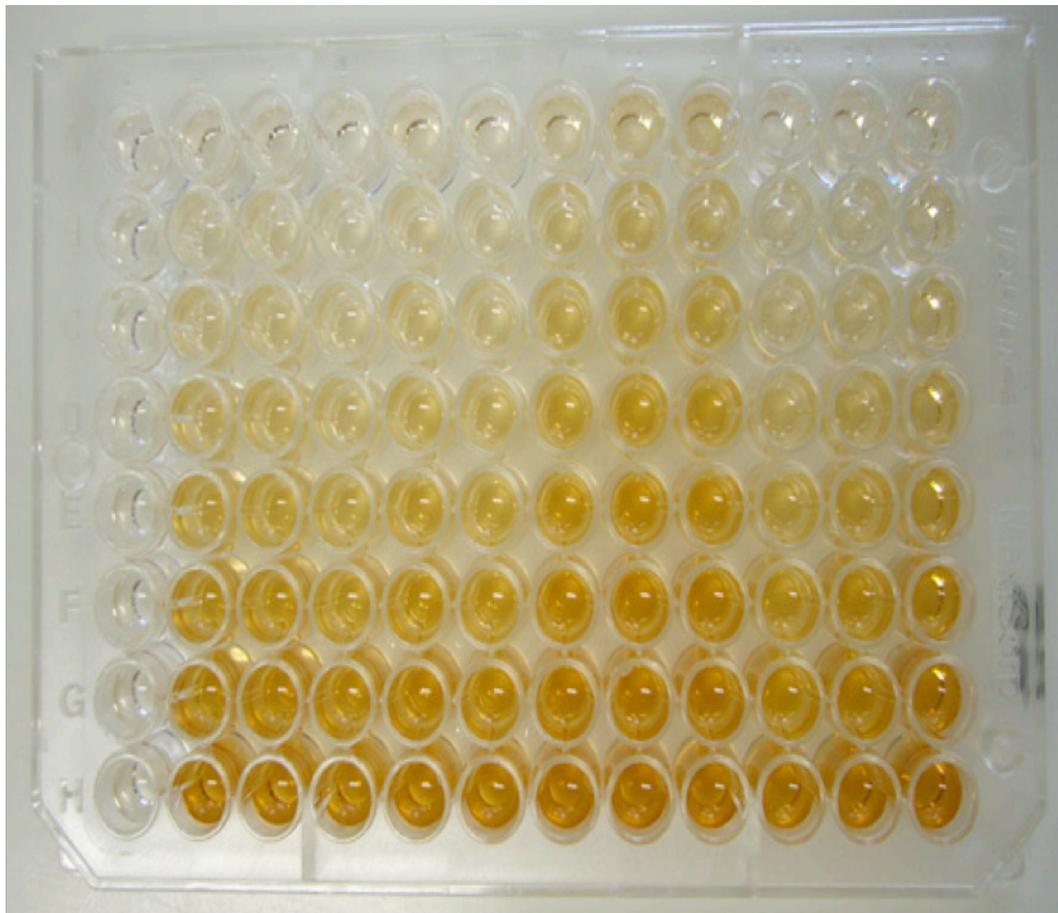
verwendet. Jedes Well einer 96-er Flachboden Polystyrene Mikroplatte wurde mit 30µl Proteinlösung, bestehend aus 1 µg/l rekombinantem Protein und Puffer (15mmol/INa₂CO₃, 30mmol/INaHCO₃, pH9,6) beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Als Negativkontrolle, um unspezifische Reaktionen, gegen z.B. bakterielle Kontamination, auszuschließen, wurde Keyhole limpet hemocyanin Protein genutzt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS-T (0.2% Tween in Phosphate Buffer Saline) und einmaligem Waschen mit PBS wurden die Platten mit Blockierungspuffer (5% in PBS gelöste Magermilch) blockiert. Nach Abschütteln und erneutem zweimaligem Waschen mit PBS-T und einmaligem Waschen mit PBS wurden alle Wells mit 30µl 4-fach seriell verdünntem Patientenserum (1:100, 1:400, 1:1.600, 1:64.000) befüllt und 4 Stunden inkubiert. Nach Abschütteln der Platten wurde zweimal mit PBS gewaschen und anschließend an AP (Alkalische Phosphatase) konjugierter, anti-humaner Ziegen-IgG 1:3000 für eine Stunde als zweiter Antikörper aufgetragen. Es wurde erneut zweimal mit PBS-T und einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Platten mit P-Nitrophenyl Phosphat in einer Konzentration von 1.0mg/ml beschichtet und für 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Durch Zugabe von 15µl 3N NaOH in jedes Well wurden die Reaktionen gestoppt. Die Absorption wurde mittels eines ELISA-Lesegerätes bei 405-620 nm ausgelesen (Siehe Abbildung 3). Der positive Grenzwert war der Mittelwert von 8 Negativkontrollen plus 3 Standardabweichungen bei einer 1:100 Verdünnung.

2.6.5. Statistik

Die statistische Analyse wurde mit Hilfe von SPSS-Software durchgeführt. (SPSS Inc., Chicago, IL). Um die Korrelationen zwischen Patientenalter und Geschlecht und der CT-Antigen Expressionshäufigkeit zu bestimmen, wurde der T-Test mit unabhängigen Variablen durchgeführt. Die Korrelationen zwischen Tumoreigenschaften und der CT-Antigenexpressionshäufigkeit wurden mittels Varianzanalysen ermittelt. Die Korrelationen zwischen der

Expressionshäufigkeit in Tumorzellen und in gesunden Zellen und zwischen Tumorzellen und Zelllinien wurden mit Hilfe der binären logistischen Regression bestimmt. Zur Untersuchung der Co-Expression von CT-Antigenen wurde der Chi-Quadrat-Test nach Pearson verwendet. War dabei die Zahl der zu vergleichenden Proben kleiner als 5, so wurde der Exakte Test nach Fisher verwendet. Die Ergebnisse wurden als Signifikant betrachtet wenn $p < 0,05$.

Abbildung 3: ELISA



Die Wells werden mit einem CT-Antigen beschichtet und mit Patientenserum in serieller Verdünnung inkubiert. Sind im Patientenserum antigenspezifische IgG Antikörper vorhanden, so binden sie an das CT-Antigen. Im nächsten Schritt wird ein an das Enzym Alkalische Phosphatase gekoppelter Antikörper gegen menschliches IgG hinzugegeben. Nach hinzufügen eines Substrats kommt es zum Farbumschlag, dessen Intensität Informationen über die Menge der Antigen-Antikörper Komplexe und damit über das spezifische IgG im Patientenserum liefert.

Bildquelle:<http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Datei:ELISA.jpg&filetimestamp=20080503153744#globalusage>
Stand 30.04.2011 (Veröffentlicht als gemeinfrei).

3. ERGEBNISSE

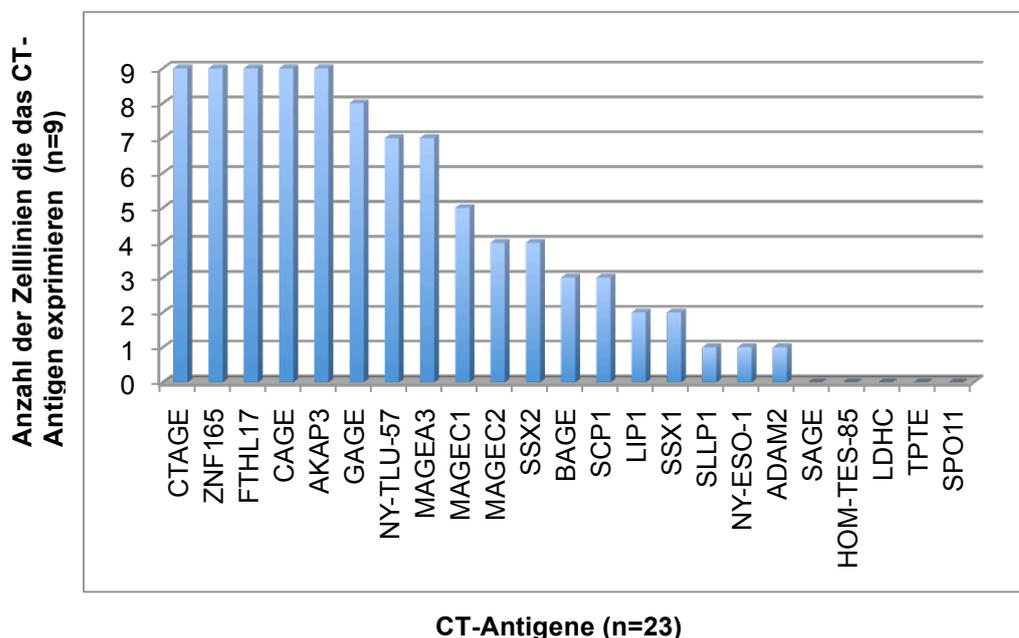
3.1. Expression von CT-Antigenen in HNSCC-Zelllinien

Es wurden 9 HNSCC Zelllinien auf die Expression von 23 CT-Antigenen untersucht (Siehe Abbildung 4). 5 der untersuchten CT-Antigene waren in keiner Zelllinie exprimiert (SPO-11, TPTE, LDHC, HOM-TES-85 und SAGE).

Insgesamt 9 CT-Antigene wiesen eine niedrige bis mittlere Expressionshäufigkeit in 1-4 Zelllinien auf: ADAM2, NY-ESO-1 und SLLP1 waren jeweils nur in einer Zelllinie exprimiert, SSX1 und LIP1 wurden von 2 Zelllinien exprimiert. SCP1 und BAGE wurden von 3 Zelllinien exprimiert und MAGEC2 und SSX2 wurden von 4 Zelllinien exprimiert.

9 weitere CT-Antigene wiesen eine hohe Expressionshäufigkeit auf und waren je in 5-9 der 9 untersuchten Zelllinien exprimiert: MAGEC1 war in 5 Zelllinien positiv, MAGEA3 und NY-TLU-57 waren in 7 Zelllinien exprimiert und GAGE fand sich in 8 der 9 Zelllinien. 5 CT-Antigene waren ubiquitär in allen 9 Zelllinien exprimiert (AKAP3, CAGE, FTHL17, ZNF165 und CTAGE).

Abbildung 4: Expressionshäufigkeit von CT-Antigenen in HNSCC Zelllinien



3.2. Eigenschaften des Patientenkollektivs

Alle Patienten hatten ein histologisch gesichertes Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereiches. Die klinischen und pathologischen Merkmale der Patienten sind in Tabelle 6 zusammengefasst. Das Alter der Patienten zum Operationszeitpunkt lag zwischen 44 und 83 Jahren mit einem Durchschnittsalter von 62 Jahren. Es wurden 40 Männer und 11 Frauen in die Studie eingeschlossen. Die meisten Patienten litten unter einer fortgeschrittenen Erkrankung, entsprechend Tumorstadium III ($T_3N_0M_0$ oder $T_{1-3}N_1M_0$) und IV (T_4 und/oder N_{2-3} und/oder M_1). 8 Patienten litten unter einem Tumorrezidiv.

3.3. Expression von CT-Antigenen in Tumor- und in gesundem Gewebe von HNSCC-Patienten

Die PCR-Analyse von 23 zuvor als CT-Antigene beschriebenen Antigenen in den Tumor- und gesunden Gewebeproben von Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren ergab beachtliche Unterschiede der Antigen-Expressionsmuster. Demzufolge wurden die Antigene in 4 Gruppen eingeteilt (Siehe Tabelle 4). Alle 23 untersuchten Antigene konnten in gesundem Hodengewebe nachgewiesen werden.

Tabelle 4:

Gruppeneinteilung der CT-Antigene nach ihrem Expressionsmuster in Tumorgewebe und in gesundem Gewebe

Gruppe 1
CT-Antigene mit ähnlicher Expressionshäufigkeit in Tumorgewebe und in gesundem Gewebe
ZNF165, CTAGE, CAGE, FTHL17, AKAP3, SLLP1, SCP1, LIP1, ADAM2

Gruppe 2
CT-Antigene die in Tumorgewebe mindestens 50% häufiger exprimiert sind als in gesundem Gewebe
NY-TLU-57, GAGE1, SAGE1

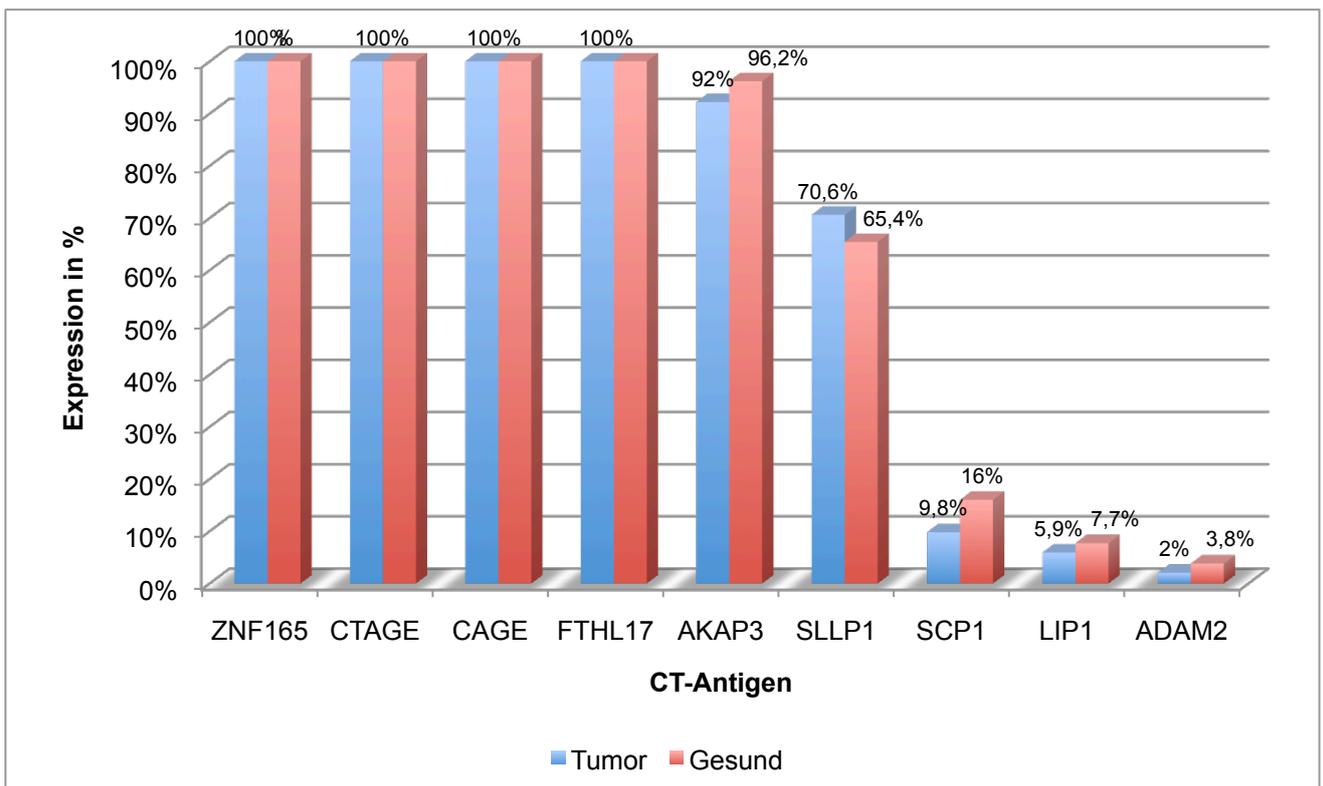
Gruppe 3
CT-Antigene die weder in Tumor- noch in gesundem Gewebe exprimiert sind
TPTE, LDHC, SPO11

Gruppe 4
CT-Antigene die ausschließlich in Tumorgewebe exprimiert sind
MAGEA3, SSX1, MAGEC2, MAGEC1, BAGE, SSX2, HOM-TES-85, NY-ESO-1

3.3.1. Gruppe 1: CT-Antigene mit ähnlicher Expressionshäufigkeit in Tumorgewebe und in gesundem Gewebe

Die Gruppe 1 besteht aus CT-Antigenen, die in Tumorgewebe und in gesundem Gewebe ähnlich häufig exprimiert sind. Alle Antigene waren zudem in gesundem Hodengewebe exprimiert. Die maximale Abweichung der Expressionshäufigkeit zwischen Tumorproben und gesunden Proben als Anteil der positiven Proben an den insgesamt untersuchten Proben beträgt 6,2% (Siehe Abbildungen 5 und 6). Unter diesen Antigenen waren FTHL17, CAGE, ZNF165 und CTAGE in allen untersuchten Tumorproben und in allen gesunden Proben exprimiert. Die übrigen Antigene dieser Gruppe zeigten unterschiedliche Expressionshäufigkeiten. AKAP3 und SLLP1 waren in den meisten –jedoch nicht in allen- Tumor- und gesunden Proben exprimiert. SCP1, LIP1 und ADAM2 waren nur in wenigen Tumorproben und auch nur in wenigen gesunden Proben exprimiert.

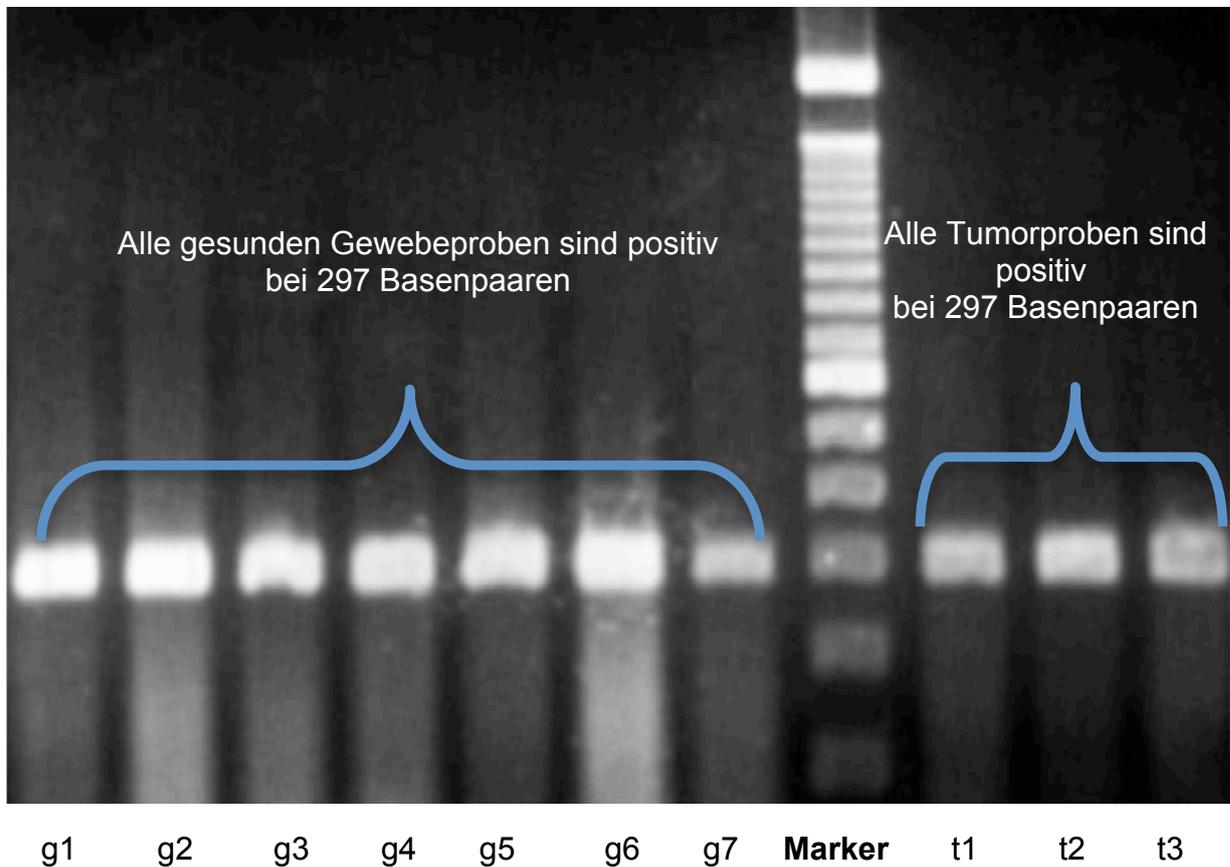
Abbildung 5: Gruppe 1: CT-Antigene mit ähnlicher Expressionshäufigkeit in Tumor- und in gesundem Gewebe



HNSCC-Tumorproben n=51,

Gesunde Proben aus dem Kopf-Hals-Bereich von Patienten mit HNSCC Tumoren n=26

Abbildung 6: Gelelektrophorese nach RT-PCR des CT-Antigens FTHL17 in Tumor- und in gesunden Gewebeproben



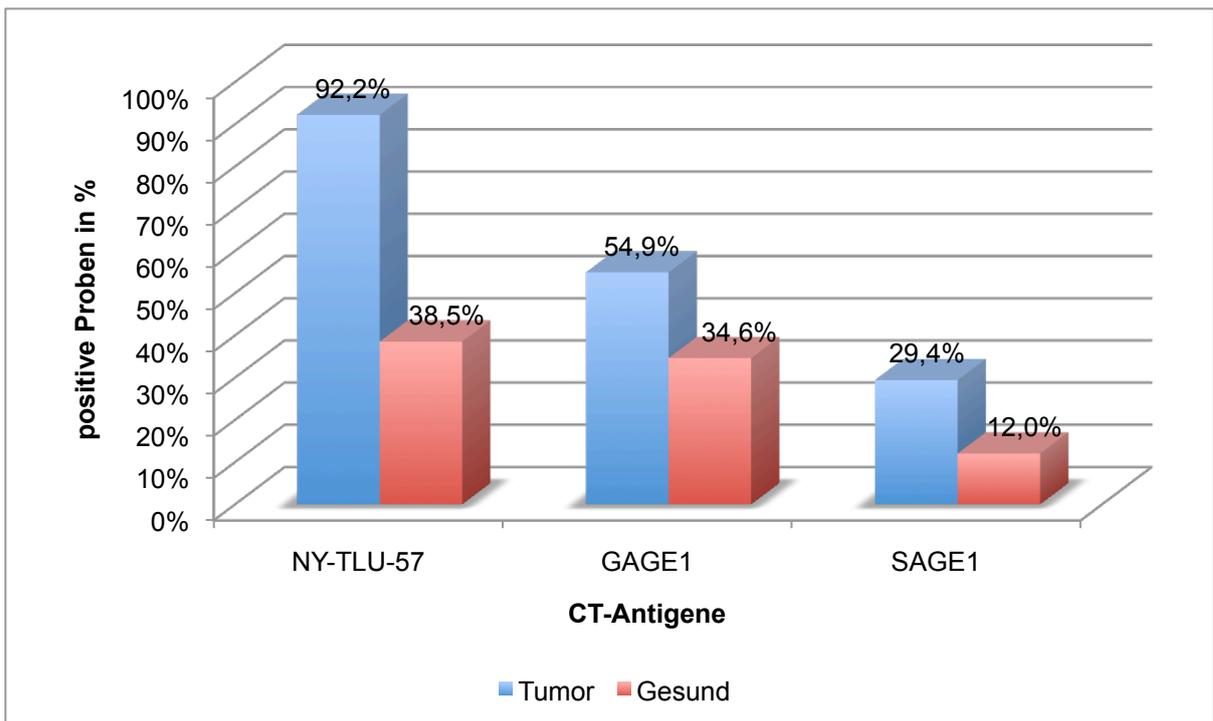
Das CT-Antigen FTHL17 (297 Basenpaare) ist in allen untersuchten gesunden Proben (g1-g7) und in allen Tumorproben (t1-t3) exprimiert und gehört somit zur Gruppe 1.

3.3.2. Gruppe 2: CT-Antigene die in Tumorgewebe mindestens 50% häufiger exprimiert sind als in gesundem Gewebe

Die zweite Gruppe der CT-Antigene (NY-TLU-57, GAGE1 und SAGE1) besteht aus Genen, die häufiger in Tumor- als in gesundem Gewebe exprimiert sind. Bei allen 3 Antigenen dieser Gruppe waren die Tumorproben um mindestens 50% häufiger positiv als die gesunden Gewebeprobe. Bei NY-TLU-57 und bei SAGE1 waren die Tumorproben prozentual sogar mehr als doppelt so häufig

positiv wie die gesunden Gewebeprobe, für NY-TLU-57 war dieser Unterschied hoch signifikant ($p < 0,001$) (Siehe Abbildung 7). Auch alle Antigene dieser Gruppe waren in gesundem Hodengewebe exprimiert.

Abbildung 7: Gruppe 2: In Tumor häufiger exprimierte CT-Antigene



HNSCC-Tumorproben n=51,

Gesunde Proben aus dem Kopf-Hals-Bereich von Patienten mit HNSCC-Tumoren n=26

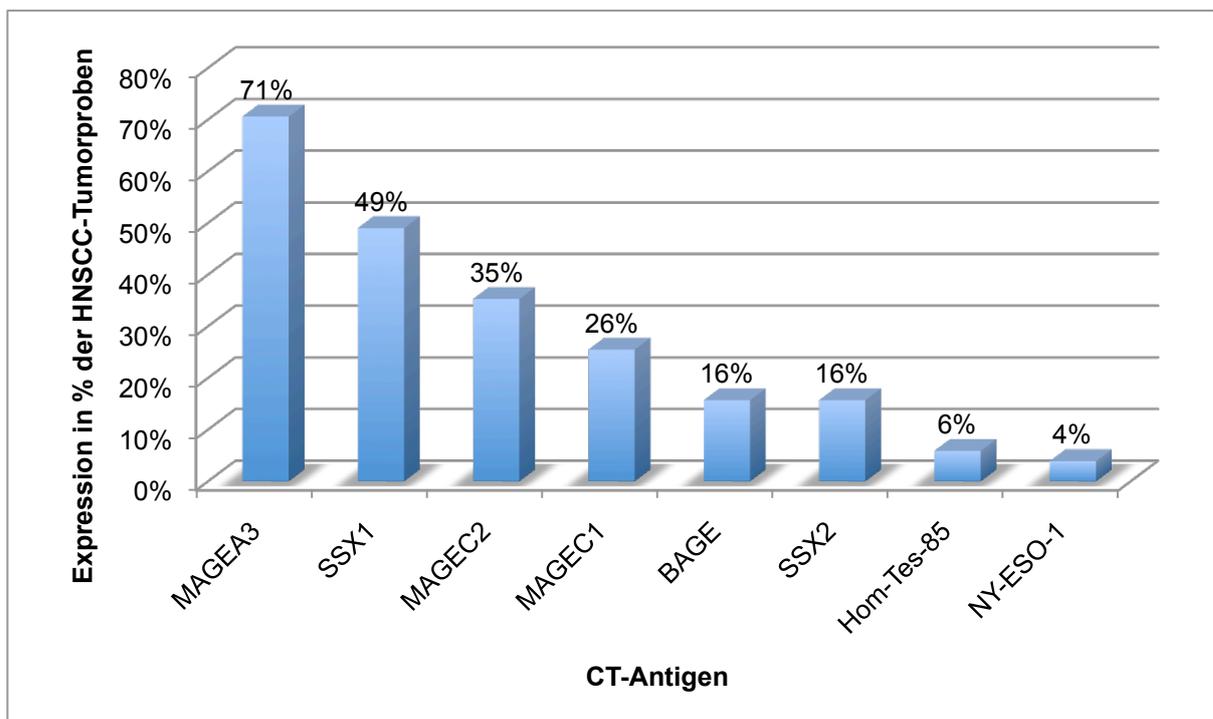
3.3.3. Gruppe 3: CT-Antigene die weder in Tumorgewebe noch in gesundem Gewebe exprimiert sind

Die dritte Gruppe der CT-Antigene (TPTE, LDHC und SPO11) war in gesundem Hodengewebe exprimiert, jedoch in keiner der untersuchten Tumorproben und in keiner der gesunden Gewebeprobe.

3.3.4. Gruppe 4: CT-Antigene die ausschließlich in Tumorgewebe exprimiert sind

Schließlich zeigte die vierte Antigengruppe eine sehr spezifische Antigenexpression. Die Antigene waren ausschließlich in den Tumorproben und in gesundem Hodengewebe exprimiert, jedoch in keiner der gesunden Gewebeproben aus dem Kopf-Hals-Bereich der HNSCC Patienten. Die 8 Antigene dieser Gruppe stellen daher CT-Antigene im strengsten Sinne dar. CT-Antigene dieser Gruppe, die nur verhältnismäßig selten exprimiert waren, waren HOM-TEs-85 und NY-ESO-1. BAGE und SSX2 zeigten mittlere Expressionshäufigkeiten. Am häufigsten exprimiert waren MAGEC1, MAGEC2, SSX1 und MAGEA3 (Siehe Abbildungen 8 und 9).

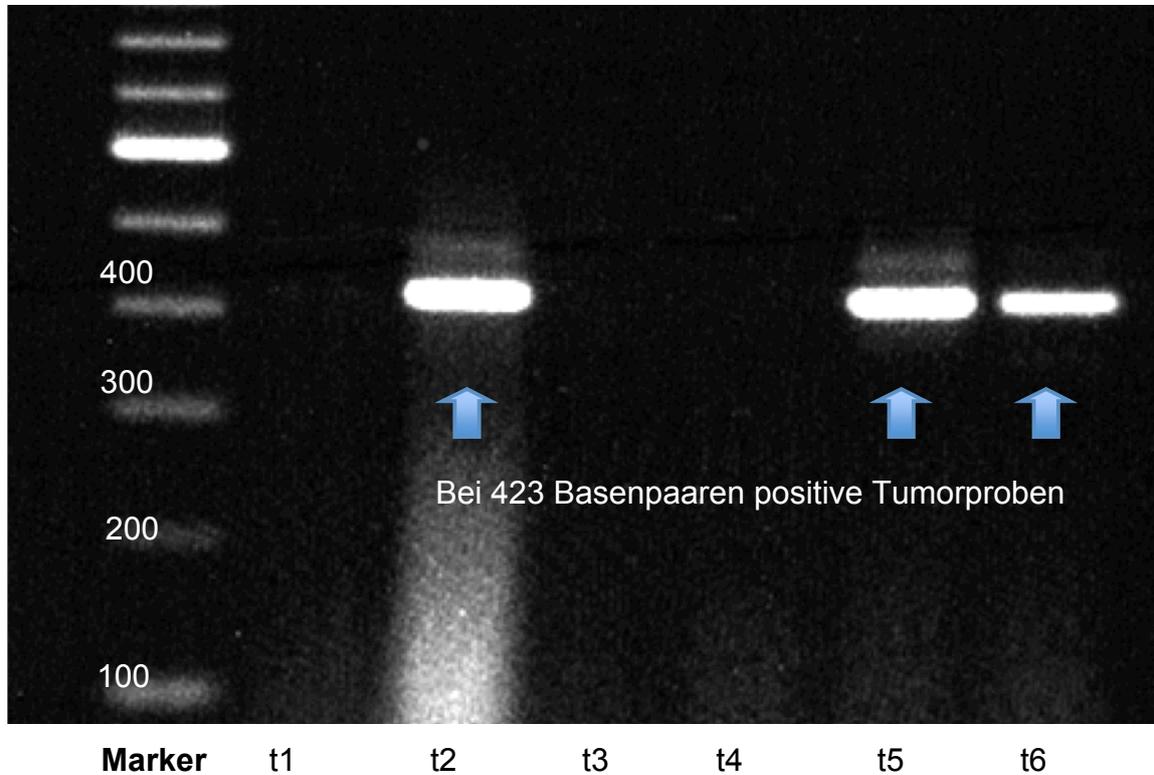
Abbildung 8: Gruppe 4: Ausschließlich in Tumor exprimierte CT-Antigene



HNSCC-Tumorproben n=51

Abbildung 9:

Gelelektrophorese nach RT-PCR des CT-Antigens MAGEA3 in Tumorproben

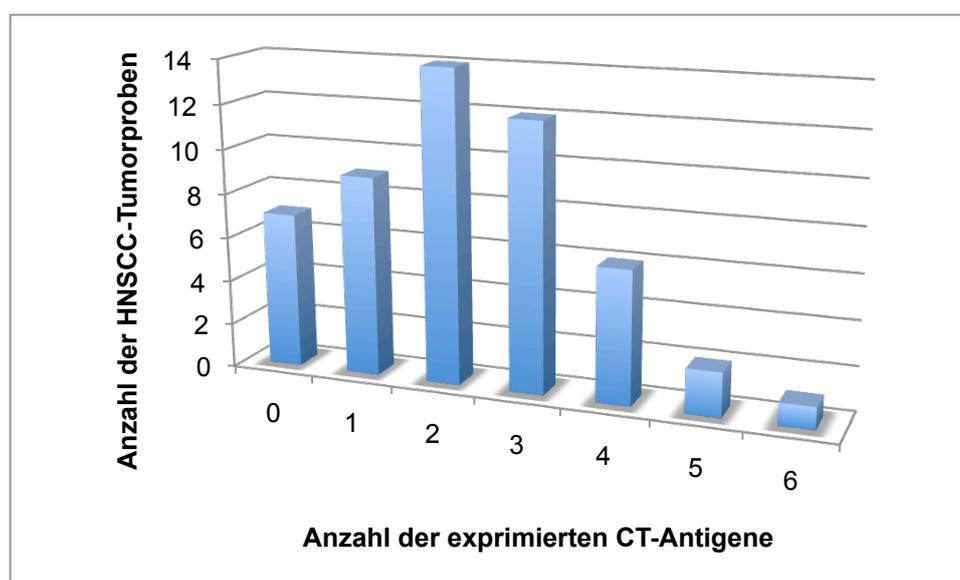


Nach Durchführung der RT-PCR zur Untersuchung der HNSCC-Tumorproben auf das CT-Antigen MAGEA3 und Gelelektrophorese der PCR-Produkte sind neben dem Marker mehrere deutlich positive Banden (t2,t5 und t6) auf Höhe der MAGEA3 entsprechenden Basenpaarmenge zu sehen (423 Basenpaare). Wo keine Banden sichtbar sind, sind die Tumorproben negativ für MAGEA3.

3.3.5. Co-Expression von CT-Antigenen der Gruppe 4

Die Anzahl der pro Tumorprobe exprimierten CT-Antigene der tumor-spezifischen Gruppe 4 variierte zwischen 0 und 6, durchschnittlich exprimierte jede HNSCC-Tumorprobe 2,2 CT-Antigene der Gruppe 4 (Siehe Abbildung 10).

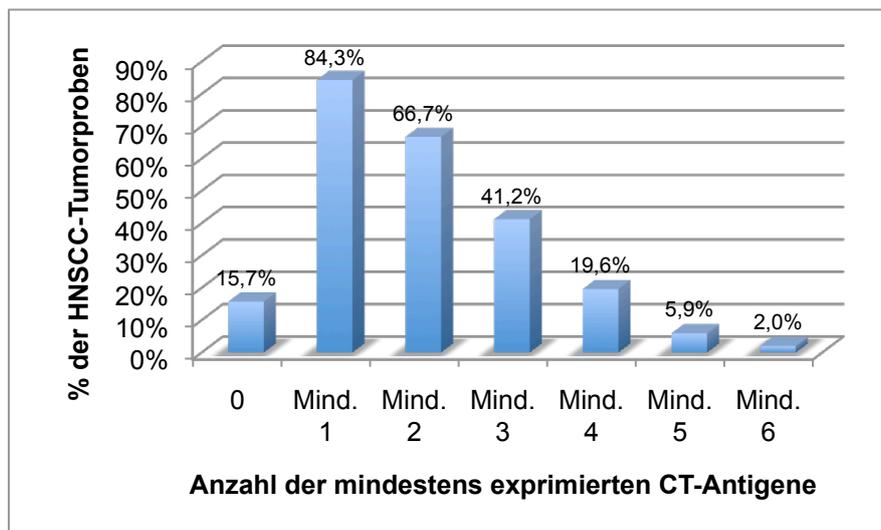
Abbildung 10: Anzahl der je Tumorprobe exprimierten CT-Antigene der Gruppe 4



HNSCC-Tumorproben n=51

In Abbildung 11 ist dargestellt, wie viele der HNSCC-Tumorproben eine bestimmte Mindest-Coexpression von CT-Antigenen der Gruppe 4 aufweisen. 84,3% der HNSCC-Proben exprimierten mindestens 1 CT-Antigen der Gruppe 4, bei 66,7% lag eine Co-Expression von mindestens 2 gleichzeitig exprimierten CT-Antigenen vor, mit 41,2% exprimierten immerhin mehr als 1/3 der untersuchten HNSCC Proben gleichzeitig 3 Antigene. Ebenfalls noch relativ häufig war die gleichzeitige Expression von 4 Antigenen der Gruppe 4 mit 19,6%. Seltener war die Co-Expression von 5 oder sogar 6 CT-Antigenen mit 5,9% bzw. 2% der HNSCC-Tumorproben (Siehe Abbildung 11).

Abbildung 11: Co-Expression von CT-Antigenen der Gruppe 4



HNSCC-Tumorproben n=51

3.3.6. Expressionskorrelationen zwischen CT-Antigenen der Gruppe 4

Da für einige CT-Antigene eine gehäufte Co-Expression mit bestimmten anderen CT-Antigenen beschrieben wurde (Kienstra et al. 2003, Simpson et al. 2005), insbesondere innerhalb von CT-X-Antigen Familien wie MAGE oder SSX, wurde auch in dieser Arbeit untersucht, ob bestimmte CT-Antigene der Gruppe 4 gehäuft gemeinsam auftreten. Es wurde festgestellt, dass 100% (2/2) der NY-ESO-1-positiven Proben, 92% (12/13) der MAGEC1-positiven Proben (Siehe Abbildung 12) und 80% (20/25) der SSX1-positiven Proben (Siehe Abbildung 13) gleichzeitig auch für MAGEA3 positiv waren (Siehe Tabelle 5). Allerdings war nur eine einzige Korrelation statistisch signifikant und zwar für MAGEC2 und SSX2 ($p=0,02$). Um bessere Aussagen über die Signifikanz der von uns beobachteten Co-Expressionen zu erhalten wäre die Wiederholung der Untersuchung an einer größeren Probenzahl sinnvoll, da die niedrige Zahl der für bestimmte CT-Antigene positiven Proben die Wahrscheinlichkeit eines signifikanten Ergebnisses für die Co-Expression mit einem anderen CT-Antigen senkt.

Tabelle 5: Expressionskorrelationen zwischen CT-Antigenen der Gruppe 4

CT-Antigen	Coexprimiertes CT-Antigen							
	MAGE A3	MAGE C2	MAGE C1	SSX 1	SSX 2	BAGE	HOM-TES-85	NY-ESO-1
MAGEA3		36% (13/36) p=0,85	33% (12/36) p=0,08	56% (20/36) p=0,15	17% (6/36) p=1,00*	17% (6/36) p=1,00*	3% (1/36) p=0,20*	6% (2/36) p=1,00*
MAGEC2	72% (13/18) p=0,85		39% (7/18) p=0,18*	61% (11/18) p=0,25	33% (6/18) p=0,02*	17% (3/18) p=1,00*	11% (2/18) p=0,28*	6% (1/18) p=1,00*
MAGEC1	92% (12/13) p=0,08	54% (7/13) p=0,18*		62% (8/13) p=0,30	31% (4/13) p=0,18*	15% (2/13) p=1,00*	0% (0/13) p=1,00*	0% (0/13) p=0,29*
SSX1	80% (20/25) p=0,15	44% (11/25) p=0,25	32% (8/25) p=0,30		16% (4/25) p=1,00*	24% (6/25) p=0,14*	4% (1/25) p=1,00*	4% (1/25) p=1,00*
SSX2	75% (6/8) p=1,00*	75% (6/8) p=0,02*	50% (4/8) p=0,18*	50% (4/8) p=1,00*		13% (1/8) p=1,00*	13% (1/8) p=0,41*	13% (1/8) p=0,29*
BAGE	75% (6/8) p=1,00*	38% (3/8) p=1,00*	25% (2/8) p=1,00*	75% (6/8) p=0,14*	13% (1/8) p=1,00*		13% (1/8) p=0,41*	13% (1/8) p=0,29*
HOM-TES-85	33% (1/3) p=0,20*	66% (2/3) p=0,28*	0% (0/3) p=0,56*	33% (1/3) p=1,00*	33% (1/3) p=0,41*	33% (1/3) p=0,41*		0% (0/3) p=1,00*
NY-ESO-1	100% (2/2) p=1,00*	50% (1/2) p=1,00*	0% (0/2) p=1,00*	50% (1/2) p=1,00*	50% (1/2) p=0,29*	50% (1/2) p=0,29*	0% (0/2) p=1,00*	

Die p-Werte, die nicht mit einem * gekennzeichnet sind, wurden mit Hilfe des Chi-Quadrat-Test nach Pearson berechnet. Die mit einem * gekennzeichneten p-Werte wurden mit dem Exakten Test nach Fisher berechnet. Die statistisch signifikanten p-Werte (<0,05) sind rot markiert.

Abbildung 12: Co-Expression der CT-Antigene der Gruppe 4 bei MAGEC1-positiven und -negativen HNSCC-Proben

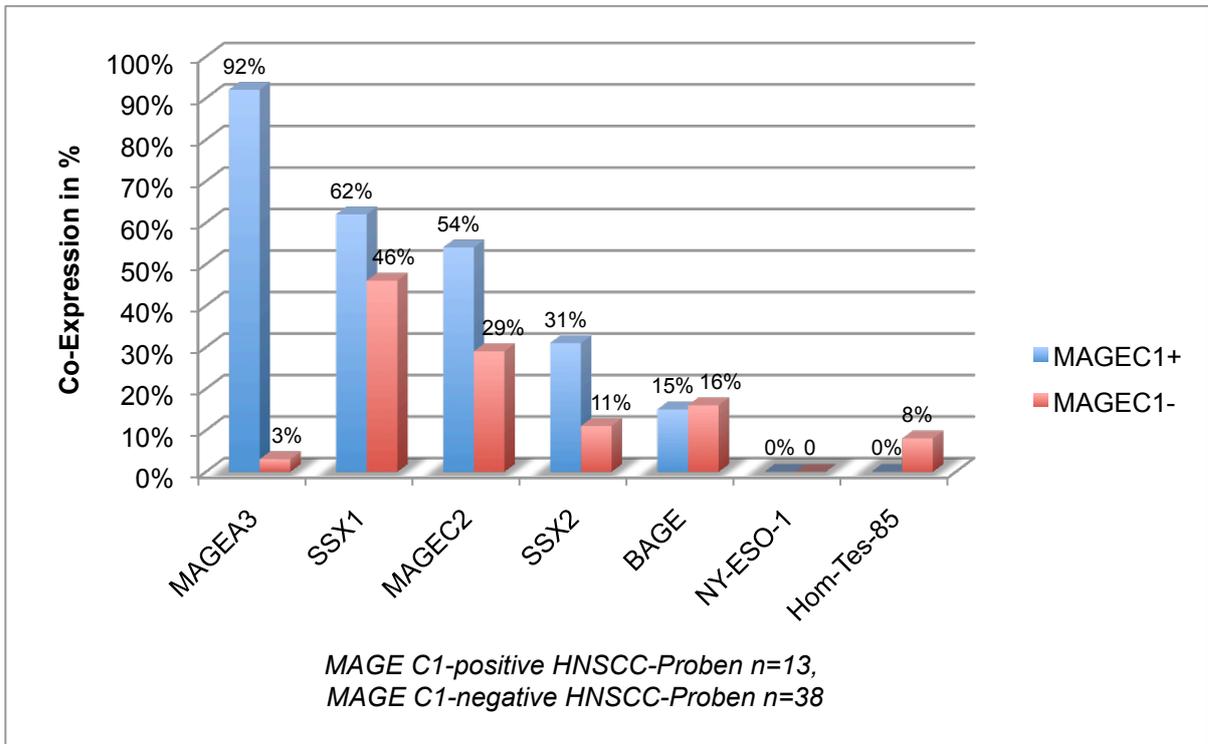
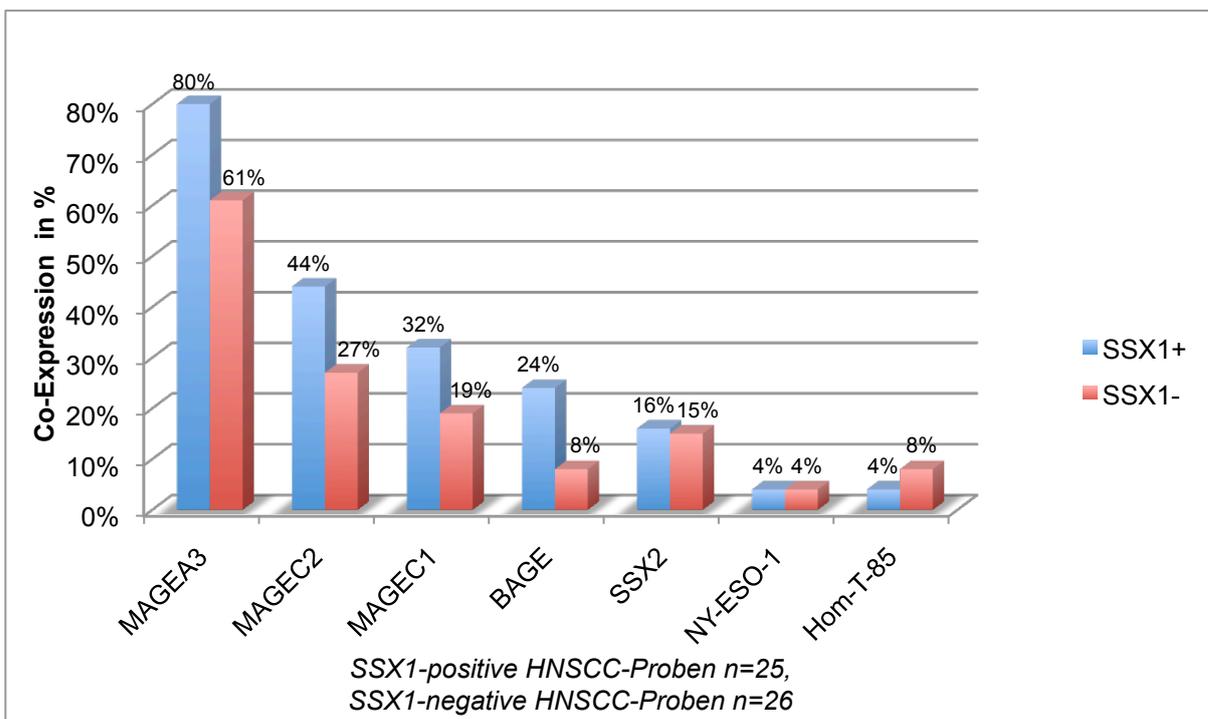


Abbildung 13: Co-Expression der CT-Antigene der Gruppe 4 bei SSX1-positiven und -negativen HNSCC-Proben



3.4. Antikörper gegen CT-Antigene in HNSCC-Patienten

Angesichts der relativen Häufigkeit von CT-Antigenen in Patienten mit Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen wurde analysiert, ob HNSCC-Patienten, die die entsprechende mRNA exprimieren auch eine IgG-Antikörperantwort gegen die Proteine MAGEA3, SSX2 oder NY-ESO-1 aufweisen. Es wurden keine Antikörper gegen MAGEA3 oder SSX2 in den Patientensera gefunden. In 3 der 39 analysierten Sera wurden niedrig-titrige, jedoch signifikante IgG Antikörper gegen NY-ESO-1 nachgewiesen. Die Tumoren von 2 dieser Patienten exprimierten NY-ESO-1-RNA, der Tumor des dritten Patienten mit NY-ESO-1-Antikörpernachweis war negativ für NY-ESO-1. Insgesamt wurde nur in 2 der 51 untersuchten HNSCC-Tumoren NY-ESO-1-RNA nachgewiesen, in beiden Fällen fanden sich im Serum Antikörper gegen NY-ESO-1 so dass man von einer 100%igen Immunogenität von NY-ESO-1 sprechen kann.

3.5. Korrelation von klinischen und pathologischen Merkmalen mit der Expressionshäufigkeit von CT-Antigenen in HNSCC

Es wurde untersucht, ob die Expression der 8 tumorspezifischen Antigene, die in den Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen exprimiert waren, mit bestimmten Patientencharakteristika oder mit pathologischen Tumormerkmalen korrelieren. Hierbei konnte keine signifikante Beziehung zwischen dem Alter und Geschlecht der Patienten, der Tumorlokalisierung, der pathologischen Klassifikation und der Anzahl exprimierter CT-Antigene festgestellt werden. Es konnte ebenfalls kein Zusammenhang zwischen der Unterscheidung in Primärtumor oder Rezidivtumor und der Anzahl exprimierter CT-Antigene festgestellt werden (Siehe Tabelle 6 im Anhang).

4. DISKUSSION

4.1. Die Eignung von CT-Antigenen in HNSCC als Zielstrukturen für eine antigen-spezifische Immuntherapie

Nach PCR-Analyse der Expression von 23 CT-Antigenen in Tumor- und in gesunden Gewebeproben von Patienten mit Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen wurden die Antigene entsprechend ihrer Expressionsmuster in Tumor- und in gesundem Gewebe in vier Gruppen eingeteilt. Definitionsgemäss konnten alle untersuchten CT-Antigene in gesundem Hodengewebe nachgewiesen werden. Die erste Gruppe besteht aus CT-Antigenen, die in Tumor- und in gesundem Gewebe ähnlich häufig exprimiert sind und die daher auf den ersten Blick ungeeignet für eine antigen-spezifische Immuntherapie zu sein scheinen, da anzunehmen ist, dass es hierbei zu einer Autoimmunreaktion gegen gesundes Gewebe aus dem Kopf-Hals-Bereich kommen könnte.

Die CT-Antigene der Gruppe 2 sind in Tumorgewebe deutlich häufiger exprimiert als in gesunden Gewebeproben. Auch bei einer spezifischen Immuntherapie gegen diese Antigene ist jedoch eine Autoimmunreaktion zu befürchten, wenn auch in geringerem Ausmaß als bei den CT-Antigenen der Gruppe 1. Mögliche Ursachen für die Expression der zuvor als Tumor-Hodenspezifisch beschriebenen CT-Antigene der Gruppen 1 und 2 in gesundem Gewebe werden erörtert und es wird diskutiert, unter welchen Umständen die Antigene dieser Gruppen trotz ihrer mangelnden Tumorspezifität in der Therapie von HNSCC nützlich sein könnten.

Die dritte Gruppe der CT-Antigene wurde weder in Tumor- noch in gesunden Proben nachgewiesen und scheint daher für HNSCC-Tumoren nicht relevant zu sein. Immerhin wird ihre Klassifikation als klassische CT-Antigene, im Gegensatz zu den Antigenen der Gruppen 1 und 2, zumindest nicht in Frage gestellt, da sie nicht in gesundem Gewebe nachgewiesen wurden. Schließlich besteht die vierte Gruppe aus CT-Antigenen, die ausschließlich in HNSCC-Tumorproben nachgewiesen wurden, nicht jedoch in benachbartem gesundem

Gewebe und die daher für eine antigen-spezifische Immuntherapie bei Patienten mit HNSCC am interessantesten sind, insbesondere da sie aufgrund ihrer häufigen Co-Expression für eine polyvalente Immuntherapie in Frage kommen könnten. Diese 8 CT-Antigene werden einzeln ausführlich diskutiert. Obwohl in dieser Arbeit mit der Untersuchung von Patientensera auf Antikörper gegen 3 CT-Antigene nur ein kleiner Einblick in die Immunogenität von CT-Antigenen genommen wurde, wird im letzten Abschnitt ein Ausblick darauf gegeben, warum die weitere Erforschung der Immunantwort auf CT-Antigene in HNSCC von großem Interesse ist. Außerdem werden mögliche klinische Verwendungen von CT-Antigenen in der Diagnostik und Therapie von HNSCC diskutiert.

4.1.1. Die Expressionsmuster der Antigene der Gruppen 1 und 2 und ihre Eignung als Zielstrukturen für eine antigen-spezifische Immuntherapie

Gruppe 1: CT-Antigene mit ähnlicher Expressionshäufigkeit in Tumorgewebe und in gesundem Gewebe

Gruppe 2: CT-Antigene die in Tumorgewebe mindestens 50% häufiger exprimiert sind als in gesundem Gewebe

Zur Einordnung und zum Vergleich der Antigene der Gruppen 1 und 2 mit bereits existierender Forschung zu Cancer-Testis-Antigenen wird im Folgenden eine 2004 von Scanlan et al. am Ludwig Institute for Cancer Research publizierte Übersichtsarbeit zu Cancer-Testis-Antigenen herangezogen. Darin sind zahlreiche Studien zu Cancer-Testis-Antigenen zusammengefasst und ergänzt durch RT-PCR Untersuchungen von 13 gesunden Nicht-Keimbahngeweben auf die Expression von 44 Cancer-Testis-Antigenen (Kolon, Leukozyten, Prostata, Milz, Thymus, Gehirn, Herz, Niere, Leber, Lunge,

Skelettmuskel, Pankreas und Dünndarm). Hiernach wird folgende Einteilung der CT-Antigene vorgenommen (Scanlan et al. 2004):

- a) CT-Antigene mit ausschließlich auf Tumor- und Hodengewebe beschränkter Expression,
- b) CT-Antigene mit zusätzlich auf 2 Nicht-Keimbahngewebe beschränkter Expression
- c) CT-Antigene mit sog. differentieller Expression, d.h. neben Tumor- und Hodengewebe auf 3-6 nicht-Keimbahngewebe beschränkter Expression
- d) CT-Antigene mit ubiquitärer Expression

Unter den von Scanlan et al. untersuchten Nicht-Keimbahngeweben befand sich kein Gewebe aus dem Kopf-Hals-Bereich, so dass die hier vorliegende Arbeit wichtige Ergänzungen dazu liefern kann. In der Arbeit von Scanlan et al. wurde die Expression von einigen, jedoch nicht von allen, der auch in dieser Arbeit untersuchten CT-Antigene in gesundem Gewebe untersucht.

Die erste Gruppe der in dieser Arbeit untersuchten CT-Antigene, FTHL17, CTAGE, CAGE, AKAP3, SLLP1, SCP1, LIP1, ADAM2 und ZNF165, war in Tumorgewebe und in benachbarten gesundem Gewebe ähnlich häufig exprimiert. FTHL17, CTAGE, CAGE und ZNF165 waren in allen Tumor- und in allen gesunden Gewebeproben exprimiert, AKAP 3 und SLLP1 in der Mehrzahl aller Tumor- und gesunden Gewebeproben und SCP1, LIP1 und ADAM2 jeweils in wenigen der untersuchten Tumor- und gesunden Gewebeproben.

FTHL17, CTAGE und LIP1 sind von Scanlan et al. zuvor als CT-Antigene mit streng Hoden- und Tumor-spezifischer Expression beschrieben worden. Dies kann nach den vorliegenden Ergebnissen nicht bestätigt werden.

Auch für ZNF165, AKAP3 und SLLP1 wurde in dieser Arbeit eine signifikante mRNA Expression in allen bzw. in einer großen Mehrheit der gesunden Gewebeproben beobachtet. Diese Antigene, die von Scanlan et al. nicht untersucht wurden, gehören interessanterweise zu einer Gruppe erst kürzlich beschriebener CT-Antigene (Hasegawa et al. 2004, Dong et al. 2004, Wang et al. 2004, Atanackovic et al. 2006) deren Expression bisher noch nicht

ausführlich in einer größeren Zahl maligner und nicht maligner Gewebe untersucht wurde. Es sollte daher in weiteren Studien geklärt werden, ob diese Gene tatsächlich als CT-Antigene beschrieben werden können.

CAGE, ADAM2 und SCP1 gehören zu den von Scanlan et al. als „differentiell exprimiert“ bezeichneten CT-Antigenen, die bereits in 3-6 gesunden, nicht-Keimbahn-Geweben nachgewiesen wurden. So ist die Expression von CAGE in gesundem Gewebe aus Pankreas und Gehirn und in gesunden Leukozyten nachgewiesen worden, ADAM2 und SCP1 sind von Scanlan et al. in gesundem Pankreasgewebe nachgewiesen worden. Mit der in dieser Arbeit festgestellten ähnlichen Expressionshäufigkeit in Tumorgewebe und in gesundem Gewebe passen die Antigene der Gruppe 1 noch in die Kategorie der differentiell exprimierten CT-Antigene. Mit einer wachsenden Anzahl der gesunden Gewebearten, die die entsprechenden Antigene exprimieren, sinkt jedoch ihre Tumor-Hoden-Spezifität und somit steigt das Risiko des Auftretens von Autoimmunreaktionen bei einer antigenspezifischen Immuntherapie.

Die zweite Gruppe der CT-Antigene, NY-TLU-57, GAGE1 und SAGE1, besteht aus Genen, die zu mindestens 50% häufiger in Tumor als in gesundem Gewebe exprimiert waren (Siehe Abbildung 7). Für NY-TLU-57 und SAGE1 war der Anteil der positiven Tumorproben an den gesamten Tumorproben mehr als doppelt so hoch wie der Anteil der positiven gesunden Proben an den gesamten gesunden Proben, für NY-TLU-57 war der Unterschied zwischen der Expression in 92,2% aller Tumorproben und in nur 38,5% der gesunden Proben sogar hochsignifikant ($p < 0,001$).

Auch die mRNA-Expression dieser drei Antigene ist zuvor von Scanlan et al. als strikt Hoden-spezifisch beschrieben worden. Im Fall von GAGE1 wurde jedoch auch schon in einer früheren Studie nachgewiesen, dass es bei Patienten mit hepatozellulärem Karzinom auch in einer substantiellen Menge von nicht-malignem Gewebe aus der Nähe des Karzinoms exprimiert war (Shi et al. 2005). Eine vergleichbare Expressionshäufigkeit von GAGE1 in Kopf-Hals Plattenepithelkarzinomen wurde bereits vor dieser Arbeit beschrieben, die betreffenden Autoren haben jedoch kein benachbartes gesundes Gewebe der

Patienten mit Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen untersucht. Stattdessen haben sie Mukosaproben aus dem Kopf-Hals-Bereich von 10 gesunden Probanden untersucht, hier fand sich keine Expression von GAGE1 (Gotte et al. 2002).

4.1.1.1. Erklärungen für die Expression von vermeintlich Tumor-Hoden-spezifischen CT-Antigenen in gesundem Gewebe aus dem Kopf-Hals-Bereich

Eine Erklärung für die eben genannten, von den Ergebnissen dieser Arbeit abweichenden, Ergebnisse zur Expression von GAGE1 in gesundem Gewebe könnte sein, dass in der Studie von Gotte et al. (2002) nur eine relativ geringe Anzahl von 10 gesunden Proben untersucht wurde und dass die statistische Aussagekraft somit begrenzt ist. Eine andere Möglichkeit wäre, dass die CT-Antigene im gesunden Gewebe von Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen exprimiert werden, nicht jedoch in Gewebe aus dem Kopf-Hals-Bereich von Probanden, die nicht an einem Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinom leiden.

Weitere denkbare Erklärungen für die von uns nachgewiesene Expression der CT-Antigene der Gruppen 1 und 2 in gesundem Gewebe, die zuvor als strikt Tumor-Hoden-spezifisch beschrieben worden waren (FTHL17, CTAGE, LIP1, NY-TLU-57, GAGE1 und SAGE1) sind, dass die Expression von CT-Antigenen durch Faktoren gesteuert wird, die zeitgleich eine Expression von CT-Antigenen in der Umgebung des Tumors bewirken, wie z.B. die Demethylierung von DNA (Caballero und Chen 2009). In einer Arbeit von Young et al. wurde nachgewiesen, dass auch prämaligne Läsionen im Kopf-Hals-Bereich Tumorantigene exprimieren (Young et al. 2007). Da die Mehrzahl der Patienten mit HNSCC Risikofaktoren für prämaligne Läsionen, wie Leuko- und Erythroplakien aufweist, scheint es denkbar, dass das in dieser Arbeit untersuchte gesunde Gewebe bereits prämaligne verändert war. Andererseits war NY-ESO-1, im Gegensatz zu der Arbeit von Young et al. in keiner der 26 vermeintlich

gesunden Gewebeproben exprimiert, was wiederum dafür sprechen könnte, dass es sich nicht um prämalignes Gewebe handelt.

In jedem Fall wäre es sehr interessant, ob weitere umfassende Untersuchungen zur Expression der CT-Antigene der Gruppen 1 und 2 in verschiedenen gesunden Gewebetypen bestätigen, dass die Expression dieser Antigene nicht nur auf Tumor- und Keimzellgewebe beschränkt ist, oder ob diese CT-Antigene andernfalls neben ihrer Spezifität für Tumor- und Keimzellgewebe spezifisch für gesundes Gewebe aus dem Kopf-Hals-Bereich von Patienten mit HNSCC sind. Eine weitere mögliche Ursache für die von uns nachgewiesene Expression dieser zuvor als Tumor-Hoden-spezifisch beschriebenen Antigene der Gruppen 1 und 2 in gesundem Gewebe ist, dass sie, mit Ausnahme von CAGE, FTHL17, GAGE1 und SAGE1, zu den nicht auf dem X-Chromosom lokalisierten CT-Genen gehören. Im Gegensatz dazu sind die CT-Gene der Gruppe 4, die ausschließlich auf Tumor exprimiert sind, fast alle auf dem X-Chromosom lokalisiert, mit BAGE als einziger Ausnahme. Die nicht-CT-X-Gene sind dafür bekannt, weniger Tumor-Hoden-spezifisch zu sein als die CT-X Gene und häufiger in gesundem Gewebe vorzukommen (Caballero und Chen 2009, Hofmann et al. 2008). Zu dieser Hypothese würde passen, dass mit GAGE1 und SAGE1 zwei der drei –zwar nicht ausschließlich- jedoch relativ tumorspezifischen CT-Antigene der Gruppe 2 zu den CT-X-Antigenen gehören. Gegen die Hypothese spricht, dass NY-TLU-57, welches ein Nicht-CT-X Antigen ist, unter den CT-Antigenen der Gruppen 1 und 2 die höchste Tumorspezifität aufweist. FTHL17 wiederum gehört zwar zu den CT-X-Antigenen, ist in dieser Arbeit jedoch ubiquitär in Tumor- und gesundem Gewebe exprimiert. Daher kann die Unterscheidung in CT-X und nicht CT-X-Gene möglicherweise eine Mitursache, jedoch sicherlich nicht die einzige Erklärung für die von uns nachgewiesene Expression der CT-Antigene der Gruppen 1 und 2 in gesundem Gewebe sein. Entscheidender ist vermutlich, dass insbesondere die neueren CT-Antigene ZNF165, AKAP3 und SLLP1 bisher noch nicht in einer größeren Anzahl von Tumor- und gesunden Gewebeproben untersucht worden sind und sich somit noch nicht als CT-Antigene im klassischen Sinne bewährt haben. Auch die Klassifikation der CT-

Antigene von Scanlan et al. bezog sich lediglich auf 13 gesunde Gewebearten, ohne die Expression von CT-Antigenen in gesundem Gewebe aus dem Kopf-Hals-Bereich zu berücksichtigen. Die in dieser Arbeit festgestellte Expression von CT-Antigenen in gesundem Gewebe aus dem Kopf-Hals-Bereich ist somit eine wichtige Ergänzung zu dem bisher vorhandenen Wissen über CT-Antigene, nach unseren Ergebnissen muss die Bezeichnung CT-Antigen für einige der beschriebenen Antigene möglicherweise neu überdacht werden.

4.1.1.2. Eignung der CT-Antigene der Gruppen 1 und 2 als Zielstrukturen für eine antigen-spezifische Immuntherapie in Patienten mit HNSCC

Auf den ersten Blick scheinen die CT-Antigene der Gruppen 1 und in geringerem Maße auch der Gruppe 2, die nicht nur in HNSCC sondern auch in gesundem Gewebe exprimiert sind, nicht besonders gut als Zielstrukturen für die antigen-spezifische Immuntherapie geeignet zu sein. Die Befürchtung ist zum Einen, dass es durch die Erzeugung einer antigen-spezifischen Immunantwort gegen diese Antigene zu einer Autoimmunreaktion gegen gesundes Gewebe kommen könnte. Zum Anderen könnte man vermuten, dass durch das Vorhandensein der Antigene im gesunden Gewebe eine Toleranz des Immunsystems gegenüber diesen Antigenen besteht, wodurch die Erzeugung einer antigen-spezifischen Immunantwort erschwert wäre. Diese Befürchtungen gelten insbesondere für die Antigene der Gruppe 1, die in Tumor- und in gesundem Gewebe ähnlich häufig und teils sogar ubiquitär exprimiert sind; prinzipiell jedoch auch für die Antigene der Gruppe 2.

Angesichts von Studien, in denen mit quantitativen Messverfahren nur ein sehr niedriger Expressionsgrad von CT-Antigenen in gesundem Gewebe nachgewiesen wurde (Scanlan et al. 2004), erscheint es dennoch als möglich, dass die CT-Antigene der Gruppen 1 und 2 trotz ihrer mangelnden Tumorspezifität als Zielstrukturen für eine antigenspezifische Immuntherapie in Frage kommen könnten. So wurde beispielsweise in gesundem Pankreas- und Lebergewebe

zwar die mRNA von CT-Antigenen, wie dem besonders immunogenen NY-ESO-1 sowie MAGEA1, nachgewiesen, es konnte jedoch keine Immunreaktion darauf festgestellt werden (Jungbluth et al. 2000b, Jungbluth et al. 2001, Caballero und Chen 2009). Daher könnte man vermuten, dass CT-Antigene in gesundem Gewebe nur so schwach exprimiert sind, dass sie keine relevante Immunreaktion gegen gesundes Gewebe auslösen (Scanlan et al. 2004). Andere Tumorantigene, die von Tumoren häufiger exprimiert werden als von gesundem Gewebe, werden trotz ihres Vorkommens in gesundem Gewebe erfolgreich als Zielstrukturen für die antigenspezifische Immuntherapie eingesetzt, so z.B. Cetuximab, ein Antikörper gegen den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor EGFR, der erfolgreich in der Therapie von Kopf-Hals-Tumoren eingesetzt wird (Argiris et al. 2008). Um beurteilen zu können, ob es tatsächlich eine Autoimmunreaktion gegen Cancer-Testis-Antigene in gesundem Gewebe geben würde, welches Ausmaß sie hätte und ob durch das Vorhandensein bestimmter CT-Antigene in gesundem Gewebe eine immunologische Toleranz induziert wird, sind weitere Untersuchungen zur Quantifizierung, zur Proteinexpression und zur Immunogenität der in gesundem Gewebe exprimierten CT-Antigene erforderlich.

Außerdem sollte weiter untersucht werden, ob die CT-Antigene der Gruppen 1 und 2 nur dann in gesundem Gewebe des Kopf-Hals-Bereiches exprimiert sind, wenn gleichzeitig auch ein Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinom vorliegt. Dies könnte Hinweise über die Expressionsmechanismen und über die Funktion der CT-Antigene liefern. Zudem ist es natürlich auch für die Entwicklung von antigen-spezifischen Immuntherapien im Allgemeinen entscheidend, ob die CT-Antigene der Gruppen 1 und 2 generell in Gewebe des Kopf-Hals-Bereiches exprimiert sind (auch wenn kein Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinom vorliegt) um dem Auftreten von Autoimmunreaktionen vorzubeugen.

4.1.2. Das Expressionsmuster der Antigene der Gruppe 3 und ihre Eignung als Zielstrukturen für eine antigen-spezifische Immuntherapie

Gruppe 3: CT-Antigene die in Tumorgewebe mindestens 50% häufiger exprimiert sind als in gesundem Gewebe

Die Antigene der dritten Gruppe, TPTE, LDHC und SPO11 waren nicht in gesundem Gewebe exprimiert, sie waren jedoch auch in keiner der Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomproben exprimiert. Lediglich in gesundem Hodengewebe konnte eine Expression nachgewiesen werden. TPTE ist erstmalig in Leber- und Nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom nachgewiesen worden (Dong et al. 2003), die Expression von LDHC ist für Mamma-, Kolon-, Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom, Malignes Melanom, Ovarialkarzinom, Prostata- und Nierenzellkarzinom beschrieben worden. Die Expression von SPO11 ist bisher nur im Malignen Melanom nachgewiesen worden (Scanlan et al. 2004).

4.1.2.1. Eignung der Antigene der Gruppe 3 als Zielstrukturen für eine antigen-spezifische Immuntherapie in Patienten mit HNSCC

Da die Antigene der Gruppe 3 nicht in den untersuchten HNSCC-Proben exprimiert waren, sind sie vermutlich nicht für die antigen-spezifische Immuntherapie in Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen geeignet. Sie könnten jedoch wichtige Ziele in der Immuntherapie anderer Tumorarten darstellen, nach den Ergebnissen dieser Arbeit besteht kein Anhalt für die Befürchtung der Erzeugung einer Autoimmunreaktion gegen diese CT-Antigene in gesundem Kopf-Hals-Gewebe. Allerdings gehören alle 3 CT-Antigene dieser Gruppe zu den nicht auf dem X-Chromosom kodierten CT-Antigenen, die häufig als den CT-X-Genen nachrangig beschrieben werden, da sie im Vergleich zu den CT-X-Antigenen eine geringere Hoden-Testis-Spezifität aufweisen und eine

schwächere Immunogenität besitzen. Alle Studien zur Entwicklung einer Impfung gegen Cancer-Testis-Antigene haben sich bisher auf CT-X-Antigene konzentriert (Caballero und Chen 2009), so dass abzuwarten bleibt, inwiefern nicht CT-X-Antigene wie TPTE, LDHC und SPO11 in Zukunft klinische Bedeutung erlangen.

4.1.3. Das Expressionsmuster der Antigene der Gruppe 4 und ihre Eignung als Zielstrukturen für eine antigen-spezifische Immuntherapie

Gruppe 4: CT-Antigene die ausschließlich in Tumorgewebe exprimiert sind

Die vierte Gruppe der CT-Antigene (MAGEA3, SSX1, MAGEC2, MAGEC1, BAGE, SSX2, HOM-TES-85 und NY-ESO-1) war in gesundem Hodengewebe und in Proben der Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinome exprimiert, jedoch in keiner einzigen Probe des benachbarten gesunden Gewebes. Diese 8 Antigene sind daher CT-Antigene im strengsten Sinne und sind möglicherweise ideale Zielstrukturen für die Entwicklung antigen-spezifischer Immuntherapien bei Patienten mit Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen. Sie sollen im Folgenden einzeln diskutiert werden. Die CT-Antigene, die bereits besonders gut bekannt sind bzw. die aufgrund von bereits existierendem Wissen als vielversprechend für die Entwicklung einer antigen-spezifischen Immuntherapie gelten, wie NY-ESO-1 und die SSX- und MAGE-Antigene, werden besonders ausführlich besprochen.

4.1.3.1. NY-ESO-1

Das CT-Antigen der Gruppe 4 mit dem niedrigsten Expressionsgrad war NY-ESO-1, es wurde nur von 2 der 51(3,9%) untersuchten Tumorproben exprimiert. Dennoch soll es im Folgenden ausführlich besprochen werden, da es das CT-

Antigen ist, welches aufgrund seiner starken Immunogenität bisher am besten untersucht ist und gegen das bereits mehrere Impfungen in der klinischen Erprobung sind (Gnjatic et al. 2003, Caballero und Chen 2009).

NY-ESO-1 wurde 1996 mittels SEREX, d.H. durch das Screenen von Tumorproteinen auf Antigene mittels autologen Antikörpern entdeckt (Chen et al. 1997). Es ist auf dem X-Chromosom lokalisiert und seine Expression ist unter anderem für Blasen-, Mamma-, Leber-, Nicht-kleinzellige Lungenkarzinome, Prostatakarzinome und Kopf-Hals-Karzinome bekannt (Scanlan et al. 2004), wohingegen es sich nicht in Kolon- und Magenkarzinomen findet (Kienstra et al. 2003). In gesundem Gewebe ist die Expression von NY-ESO-1 für Hoden, Plazenta, Pankreas und Leber beschrieben worden (Scanlan et al. 2004).

Beide Tumoren, bei denen in der vorliegenden Arbeit eine Expression von NY-ESO-1 nachgewiesen wurde, entstammen dem Hypopharynxbereich und waren mindestens im Stadium T3. Dies entspricht der Erfahrung aus früheren Studien, dass NY-ESO-1 vor allem von fortgeschrittenen Tumoren exprimiert wird (Stockert et al. 1998). In einer anderen Arbeit von Kienstra et al. zur Expression von NY-ESO-1, MAGEA1 und MAGEA3 in Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen wurde ebenfalls nur eine relative seltene Expression von NY-ESO-1 in 6,7% der untersuchten Proben gefunden. Auch hier waren alle Proben, die NY-ESO-1 exprimierten, mindestens im Stadium 3, sie entstammten allerdings nicht aus dem Hypopharynx sondern aus Larynx und Mundboden (Kienstra et al. 2003). Die beiden Patienten, deren Tumoren in dieser Arbeit positiv für NY-ESO-1 waren, waren beide auch positiv für MAGEA3. Dies stimmt ebenfalls mit der Studie von Kienstra et al. (2003) überein und könnte auch die dort geäußerte Vermutung bestärken, dass die Expression von NY-ESO-1 die Expression von MAGEA3 voraussetzt.

4.1.3.1.1. Spontane Immunantworten gegen NY-ESO-1

Bei über 50% der Patienten, deren Tumor NY-ESO-1 exprimiert, ist in früheren Arbeiten eine Immunreaktion gegen dieses Antigen nachgewiesen worden. Dabei finden simultan eine humorale sowie auch eine zelluläre Immunantwort statt, die durch CD4+ und CD8+T-Zellen vermittelt wird (Jäger et al. 2000a, Gnjatic et al. 2003). In dieser Arbeit wurden im Serum beider Patienten, die NY-ESO-1 in ihrem Tumor exprimieren, Antikörper gegen NY-ESO-1 nachgewiesen, während keine Antikörper gegen die CT-Antigene MAGEA3 und SSX2 nachgewiesen werden konnten. Dies bestätigt erneut die starke Immunogenität von NY-ESO-1. Nach den genannten Erkenntnissen zur simultanen humoralen und zellulären Immunantwort auf NY-ESO-1 lässt sich vermuten, dass bei den Patienten, in deren Serum NY-ESO-1-Antikörper nachgewiesen wurden, auch NY-ESO-1 spezifische Immunzellen vorliegen. Außerdem wurden NY-ESO-1-Antikörper auch im Serum eines Patienten gefunden in dessen Tumorprobe keine NY-ESO-1-mRNA nachgewiesen wurde. Dies lässt sich möglicherweise durch die Heterogenität der Expression von CT-Antigenen erklären. So sind Tumoren beschrieben worden, in denen einzelne Tumorzellen eine starke Expression von CT-Antigenen aufweisen, während über 99% der Tumorzellen kein CT-Antigen exprimieren (Caballero und Chen 2009). Die untersuchte Probe entstammt möglicherweise aus einer Region des Tumors, die NY-ESO-1 nicht exprimiert, während eine andere Region NY-ESO-1 exprimiert und so die Antikörperbildung induziert hat. Andere Erklärungsmöglichkeiten sind, dass eine effektive Immunantwort gegen NY-ESO-1 die NY-ESO-1 exprimierenden Tumorzellen bereits zerstört oder zu ihrer Herabregulation geführt haben könnte (Atanackovic et al. 2006).

4.1.3.1.2. Eignung von NY-ESO-1 als Zielstruktur für eine antigen-spezifische Immuntherapie in Patienten mit HNSCC

In dieser Arbeit wurde in Übereinstimmung mit früheren Studien zur Expression von NY-ESO-1 in HNSCC nur eine relativ geringe Expressionshäufigkeit beobachtet. Bei einem unselektierten Patientenkollektiv mit HNSCC ist eine ausschließlich gegen NY-ESO-1 gerichtete Immuntherapie daher vermutlich nicht sinnvoll. Ist die Expression von NY-ESO-1 durch das Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinom eines Patienten jedoch bereits nachgewiesen, so könnte es für die Therapie nützlich sein, eine Immunantwort darauf zu verstärken oder zu erzeugen. Dies würde jedoch die individuelle Anpassung der Therapie an die Tumorantigene des einzelnen Patienten erfordern. Weniger aufwändig und daher wünschenswerter wäre eine Immuntherapie, die bei einem Großteil der Patienten wirksam ist. Eine Möglichkeit dazu wäre die Entwicklung einer polyvalenten Impfung, die gleichzeitig gegen mehrere Tumorantigene gerichtet ist. Dadurch erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, dass zumindest einige der Tumorantigene eines Patienten durch die Therapie identifiziert und angegriffen werden. Außerdem könnte eine polyvalente Immuntherapie dazu beitragen, die Herabregulation der Tumorantigene in der Escapephase zu verhindern. Trotz der nur geringen Expressionshäufigkeit in HNSCC ist NY-ESO-1 aufgrund seiner starken Immunogenität, die in dieser Arbeit erneut belegt wurde, ein wichtiger Kandidat für die Entwicklung einer aktiven Immuntherapie gegen HNSCC.

Zahlreiche Impfverfahren gegen das NY-ESO-1-Antigen wurden und werden bereits erprobt; in einigen dieser Studien konnte eine Korrelation zwischen der Erzeugung einer für NY-ESO-1 spezifischen Immunantwort und einer Verbesserung der Prognose beobachtet werden (Davis et al. 2004, Karbach et al. 2010, Jager et al. 2000, Thurner et al. 1999, Marchand et al. 2003).

Von Bedeutung für die Rolle von NY-ESO-1 bei der Immuntherapie von Kopf-Hals-Tumoren ist außerdem, dass es auch in prä-malignen Läsionen im Kopf-Hals-Bereich nachgewiesen wurde. Dies lässt hoffen, dass Patienten mit einer

prämaligen Läsion im Kopf-Hals-Bereich, die ein hohes Risiko für das Auftreten eines Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinoms haben, durch eine gezielte Immunisierung gegen Antigene prämaliger Läsionen vor dem Auftreten weiterer prämaliger Läsionen oder eines HNSCC geschützt werden könnten. Es konnte gezeigt werden, dass Immunzellen, die gegen autologe prämalige Läsionen sensibilisiert wurden (von denen unter anderem NY-ESO-1 exprimiert wurde), eine Wirkung gegen heterologe HNSCC-Proteine entwickeln. Die Erzeugung einer Immunantwort mittels einer Impfung gegen eine prämalige Läsion ist möglicherweise effektiver als wenn bereits ein HNSCC vorliegt, da in diesem Stadium noch nicht die für HNSCC typische Immunsuppression besteht (Young et al. 2007).

4.1.3.2. HOM-TES-85

HOM-TES-85 wurde ebenfalls durch SEREX entdeckt und ist daher erwiesenermaßen in der Lage, eine humorale Immunantwort auszulösen.

Es gehört wie NY-ESO-1 zu den auf dem X-Chromosom lokalisierten CT-Antigenen. Nach seiner Erstbeschreibung durch Türeci et al. bei einem Patienten mit einem Seminom wurde es auch in Kolon-, Leber-, Lungen- und Ovarialkarzinomen sowie in Malignen Melanomen und Gliomen nachgewiesen (Türeci et al. 2002, Scanlan et al. 2004). In dieser Arbeit wurde für HOM-TES-85 eine Expressionshäufigkeit von 6% in HNSCC nachgewiesen, der Vergleich mit anderen Forschungsergebnissen ist nicht möglich, da die Expression von HOM-TES-85 in HNSCC zuvor noch nicht untersucht wurde. In der Übersichtsarbeit von Scanlan et al. (2004) variieren die Expressionsraten von HOM-TES-85 in Hirn-, Kolon-, Leber-, Lungen und Ovarialtumoren sowie Malignen Melanomen zwischen 10% in Kolonkarzinomen und 36% in Malignen Melanomen. Die von uns nachgewiesene Häufigkeit von 6% in HNSCC ist also vergleichsweise niedrig. Es ist vermutlich nicht ausreichend, dies mit dem besonderen Status der Immunsuppression in HNSCC-Patienten zu erklären, da in den HNSCC-Zelllinien – die ja keiner generalisierten Immunsuppression

unterliegen- kein HOM-TES-85 nachgewiesen werden konnte. Aufgrund seiner relativ niedrigen Expressionshäufigkeit in HNSCC ist HOM-TES-85 vermutlich ebenfalls am besten für eine polyvalente Impfung geeignet. Seine Fähigkeit eine humorale Immunantwort auszulösen ist eine vielversprechende Voraussetzung hierfür. Ziel einer zukünftigen Studie könnte eine Untersuchung der humoralen und zellulären Immunantwort auf HOM-TES-85 speziell bei Patienten mit HNSCC sein.

4.1.3.3. BAGE

BAGE wurde erstmals 1995 mittels autologer T-Zellen in Malignen Melanomen identifiziert (Boel et al. 1995). Neben der Expression in Malignen Melanomen ist seine Expression auch für Blasenkarzinome, Mammakarzinome, Nicht-kleinzellige Lungenkarzinome, Ovariakarzinome und Sarkome bekannt. Die Expressionshäufigkeit von BAGE in HNSCC ist in der Übersichtsarbeit von Scanlan et al. mit 8% angegeben worden, es ist jedoch vor dieser Arbeit noch keine systematische Untersuchung seiner Expression in einer größeren Anzahl von HNSCC-Tumorproben durchgeführt worden. In dieser Arbeit war es in 15,7% der untersuchten Tumorproben exprimiert.

Als einziges CT-Antigen der Gruppe 4 gehört BAGE zu den Nicht-CT-X Genen, die als weniger Tumor-Hoden-spezifisch beschrieben werden und für die eine geringere Immunogenität als für die CT-X-Antigene angenommen wird. Dennoch ist es bisher nicht in gesundem Gewebe nachgewiesen worden (Scanlan et al. 2004) und entsprechend sensibilisierte zytotoxische T-Zellen sind in der Lage, BAGE exprimierende Tumorzellen zu erkennen und zu lysieren (Boel et al. 1995). Daher scheint BAGE, obwohl nicht zu den CT-X-Genen gehörend, in Bezug auf seine Qualität als Cancer-Testis Antigen und als Zielstruktur für die antigenspezifische Immuntherapie mit den anderen CT-Antigenen der Gruppe 4 vergleichbar zu sein. Durch seine nur mäßige Expressionshäufigkeit in HNSCC scheint es für die Immuntherapie von Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen jedoch weniger gut geeignet zu sein als

besonders häufig von Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen exprimierte CT-Antigene wie MAGEA3 und SSX1. Denkbar ist daher wiederum die Verwendung als eine von mehreren Zielstrukturen in einer polyvalenten Impfung. Wie bei HOM-TES-85 wäre die genauere Erforschung der Immunantwort gegen BAGE einer der nächsten erforderlichen Schritte vor Entwicklung einer Impfung.

4.1.3.4. SSX1 und SSX2

Die CT-Antigene SSX1 und SSX2 gehören zu einer Familie von 9 auf dem X-Chromosom lokalisierten Genen, den sogenannten synovial sarcoma on x-chromosome Genen, die eine Rolle bei der Entstehung von synovialen Sarkomen spielen. Alle Mitglieder dieser Genfamilie weisen eine hohe Homogenität untereinander auf, so sind ihre Nukleotidsequenzen zu 88% bis 95% identisch zueinander und ihre Aminosäuresequenzen gleichen sich zu 71-95%. SSX2 wurde initial mittels SEREX entdeckt, während seiner weiteren Erforschung wurde ein Gen entdeckt, das ihm in der Nukleotidsequenz zu 89% identisch ist: SSX1. SSX2 wurde bereits vor dieser Arbeit in Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen sowie auch in Gliomen, CML-Zellen, Multiplen Myelom Zellen, in Lungen-, Blasen-, Kolon-, Brust-, Leber-, Nieren-, Prostatakarzinomen, Sarkomen und Malignen Melanomen nachgewiesen (Scanlan et al. 2004). Lediglich in einer Arbeit wurde fraglich eine Expression von SSX2 in gesundem Schilddrüsengewebe beschrieben (Sahin et al. 1995). Die Expression von SSX1 ist ebenfalls bekannt für Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinome sowie für Mammakarzinome, Endometriumkarzinome, Kolorektale Karzinome, Maligne Melanome, Lungen- und Blasenkarzinome (Türeci et al. 1998b). In der Studie von Türeci et al. (1998b) wurden 14 Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinome untersucht und es wurde eine Expression von SSX1 in 21% und von SSX2 in 36% der HNSCC-Tumorproben festgestellt. In der hier vorliegenden Arbeit wurde eine größere Probenzahl untersucht und eine Expression von 15,7% für SSX2 und sogar 49% für SSX1 beobachtet.

4.1.3.4.1. Spontane Immunantworten gegen SSX2

In dieser Arbeit konnten in den untersuchten Patientensera keine Antikörper gegen SSX2 festgestellt werden. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre der besondere Status der Immunsuppression von Patienten mit HNSCC.

In anderen Arbeiten wurden Antikörper gegen SSX1,-2,-3 und -4 in Sera von Patienten mit malignem Melanom, Kolon- und Brustkarzinomen nachgewiesen und es wurde gezeigt, dass natürlich auftretende Antikörper gegen eines der SSX-Gene auch mit anderen SSX-Genen reagieren. Außerdem konnten CD8+ T-Zellen gegen SSX2-Peptide nachgewiesen werden, wodurch bewiesen wurde, dass SSX-Antigene prinzipiell sowohl eine humorale als auch eine zelluläre Immunabwehr erzeugen können (Güre et al. 1997).

4.1.3.4.2. Eignung der CT-Antigene SSX1 und SSX2 als Zielstrukturen für eine antigen-spezifische Immuntherapie in Patienten mit HNSCC

Vor allem SSX1, welches in etwa der Hälfte der untersuchten Tumorproben nachgewiesen wurde, scheint eine gute Zielstruktur für eine antigenspezifische Immuntherapie in Patienten mit HNSCC zu sein. Sowohl für SSX1 als auch für SSX2 ist eine humorale und eine zelluläre Immunantwort bekannt.

Die große Homogenität der SSX-Antigene untereinander und der Nachweis von Kreuzreaktionen von SSX-Antikörpern mit mehreren Mitgliedern der SSX-Familie lässt hoffen, dass es möglich ist, durch eine Impfung eine Immunantwort nicht nur gegen eines, sondern gegen möglichst viele Mitglieder der SSX-Familie zu erzeugen (Song et al. 2008). In dieser Arbeit waren 57% der untersuchten Tumorproben positiv für mindestens eines der beiden untersuchten SSX-Gene, in der Studie von Song et al. (2008) konnte mRNA von mindestens einem von 9 untersuchten SSX-Antigen in 72,7% der untersuchten HNSCC-Proben nachgewiesen werden. Von einer Impfung, die

gleichzeitig gegen mehrere SSX-Antigene wirksam ist, könnte daher die Mehrheit der Patienten mit Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen profitieren.

Die hohe Ähnlichkeit der SSX-Gene auf Ebene der Nukleotid- und Aminosäuresequenzen hat zudem die Entwicklung von Primern ermöglicht, die während einer einzigen RT-PCR gleichzeitig an mehrere Mitglieder der SSX-Genfamilie binden können und so die Suche nach CT-Antigenen stark vereinfachen. Von Song et al. (2008) wird daher vorgeschlagen, SSX- und MAGEA-Antigene als Tumormarker in Patienten mit HNSCC einzusetzen. Anhand des Nachweises von SSX1-9 im induzierten Sputum konnten sie 77,8% aller histologisch gesicherten T2- Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinome und 100% aller T1-Tumoren bestätigen. In Kombination mit der Untersuchung auf die CT-Antigene MAGEA1-6 konnte die Diagnose HNSCC bei einem Kollektiv von 18 Patienten mit einem gesicherten HNSCC über den Nachweis von CT-Antigenen im Sputum zu 94,4% bestätigt werden (Song et al. 2008).

4.1.3.5. Die MAGE-Antigene

Unter den 4 am häufigsten ausschließlich in HNSCC-Tumoren und in Hodengewebe exprimierten CT-Antigenen befinden sich 3 Mitglieder der MAGE-Genfamilie: MAGEA3 war in 70,6% der Tumorproben exprimiert, MAGEC2 in 35,3% und MAGEC1 in 25,5%. Das erste CT-Antigen, das 1991 durch autologes Typing einer Melanom-Zelllinie entdeckt wurde, war MAGEA1, das in dieser Arbeit nicht untersucht wurde (Van der Bruggen et al. 1991). In Folge wurden zwei weitere cDNA-Spezies entdeckt, die ebenfalls mit MAGEA1 hybridisieren und deren Nukleotidsequenzen große Ähnlichkeiten zu MAGEA1 aufwiesen: MAGEA2 und das in dieser Arbeit untersuchte MAGEA3. Alle MAGEA-Proteine stimmen in ihrer Aminosäuresequenz zu 53-94% miteinander überein und sind auf dem Chromosom Xq28 kodiert. Die Expression von MAGEA3 ist abgesehen von Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen bekannt für Maligne Melanome, Lungenkarzinome, Kolorektale Karzinome, Mamma-karzinome, Blasentumoren, Sarkome und Prostatakzinome.

Es findet sich jedoch mit Ausnahme von Hodengewebe nicht in gesundem Gewebe (Gaugler et al. 1992).

MAGEC1 wurde 1998 durch RDA (Representational Difference Analysis) identifiziert. Es ist in der Nachbarschaft zu den MAGEA-Genen auf dem Chromosomenloкус Xq26 lokalisiert (Lucas et al. 1998). Unabhängig davon wurde es etwas später von einer anderen Arbeitsgruppe mittels SEREX identifiziert (Jungbluth et al. 2002). Die Expression von MAGEC1 ist bekannt für Blasen-tumoren, Mammakarzinome, Kolorektale Karzinome, HNSCC, Lungenkarzinome, Maligne Melanome und Sarkome (Scanlan et al. 2004). MAGEC2 wurde ebenfalls mittels RDA identifiziert. Seine Aminosäuresequenz ist zu 87% identisch zu MAGEC1 und in geringerem Ausmaß zu den anderen Genen der MAGE-Familie. Es findet sich auf Chromosomloкус Xq27. Die Expression von MAGEC2 ist neben Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen bekannt für Maligne Melanome, Urothelkarzinome, Mammakarzinome und Lungenkarzinome (Güre et al. 2000).

MAGEC2 und MAGEA3 werden von zytolytischen T-Zellen erkannt und lösen außerdem eine humorale Immunantwort aus (Gaugler et al. 1992, Lopez et al. 2004, Ma et al. 2004, Germeau et al. 2005, Güre et al. 2005, Wang et al. 2009). Für MAGEC1 ist bisher nur die Auslösung einer humoralen Immunantwort beschrieben worden (Scanlan et al. 2004). Von mehreren Autoren wird eine gehäufte Co-Expression der MAGE-Gene untereinander beschrieben (Kienstra et al. 2003, Gaugler et al. 1992, Simpson et al. 2005).

4.1.3.5.1. MAGEC1

1998 wurde MAGEC1 von Lucas et al. in 9,5% der untersuchten Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinome nachgewiesen. Ebenfalls 1998 wurde es von Chen et al. in 36% der untersuchten HNSCC-Tumoren nachgewiesen, so dass die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene Expressionshäufigkeit von 25,5% realistisch erscheint. Von Lucas et al. (1998) wurde eine starke Korrelation zwischen der Expression von MAGEC1- und MAGEA-Genen beschrieben: 94%

der Melanome, die MAGEC1 exprimieren, exprimieren mindestens ein MAGEA-Gen. Dies kann für die in dieser Arbeit untersuchten HNSCC-Gene bestätigt werden: 92,3% der für MAGEC1 positiven HNSCC-Tumorproben exprimierten auch MAGEA3. Diese Korrelation ist bemerkenswert, obwohl statistisch nicht signifikant, was jedoch auch an der relativ geringen Probenzahl liegen könnte. In einer Arbeit von Riener et al. (2009) zur Expression von CT-Antigenen in hepatozellulären Karzinomen war die Expression von MAGEC1 mit einer reduzierten Überlebensrate assoziiert, gleichzeitig wurden in fast allen CT-antigen-präsentierenden Tumoren FOXP3-regulatorische T-Zellen nachgewiesen. Dies könnte als Hinweis auf eine lokal unterdrückte Immunabwehr gewertet werden, was möglicherweise ursächlich für die schlechte Prognose sein könnte.

4.1.3.5.2. MAGEC2

MAGEC2 wurde 2000 von Güre et al. in 36% der untersuchten HNSCC-Proben nachgewiesen, dies stimmt gut mit der in dieser Arbeit nachgewiesenen Expressionshäufigkeit von 35,3% überein. Wie für MAGEC1 lässt sich auch für MAGEC2 eine häufige, jedoch statistisch nicht signifikante Co-Expression mit MAGEA3 beobachten, 72,3% der MAGEC2-positiven HNSCC-Tumorproben exprimierten gleichzeitig MAGEA3. Die einzige statistisch signifikant häufige Co-Expression, die in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, war die Co-Expression von MAGEC2 und SSX2. 75% (6 von 8) der Tumoren, die SSX2 exprimierten, waren ebenfalls positiv für MAGEC2. Die Häufigkeit der Co-Expression ist allerdings abhängig von der Expressionshäufigkeit eines CT-Antigens, d.h. es exprimierten zwar nur 6 von 18 MAGEC2-positiven Tumoren gleichzeitig SSX2, es waren jedoch auch insgesamt nur 8 Tumoren positiv für SSX2, die Co-Expression könnte also maximal 8 von 18 = 44% betragen. Mittels ELISA mit rekombinantem MAGEC2-Protein konnten in früheren Arbeiten Antikörper gegen MAGEC2 in Sera von Patienten mit Malignem Melanom und hepatozellulärem Karzinom nachgewiesen werden (Güre et al.

2000, Wang et al. 2002). Zudem wurden zytotoxische T-Lymphozyten gegen MAGEC2-Epitope in Malignen Melanom-Patienten nachgewiesen (Ma 2004, Germeau 2005).

4.1.3.5.3. MAGEA3

MAGEA3 ist das CT-Antigen, das in dieser Arbeit am häufigsten -in 70,6% aller HNSCC-Tumorproben- nachgewiesen wurde. Dies ist die bisher häufigste beschriebene Expression für MAGEA3 in HNSCC. Eura et al. (1995) hatten eine Expression in 56% der untersuchten Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinome festgestellt, Albaitero et al. (2004) hatten eine Expressionshäufigkeit in über 50% der untersuchten HNSCC-Tumoren nachgewiesen und Kienstra et al. (2003) und Gaugler et al. (1994) hatten jeweils eine Expression in 44% der HNSCC-Tumoren nachgewiesen.

In der hier vorliegenden Arbeit waren beide HNSCC-Tumorproben, die NY-ESO-1 exprimierten, gleichzeitig auch positiv für MAGEA3. Trotz der nur geringen Anzahl NY-ESO-1-positiver Proben deckt sich diese Korrelation mit einer Studie von Kienstra et al. (2003), in der eine ebenfalls nur geringe Gesamtzahl NY-ESO-1-positiver Proben zu 100% positiv für MAGEA3 waren.

In der bereits im Abschnitt 4.1.3.4.3 zu den SSX-Antigenen erwähnten Studie von Song et al. (2008) wurde ein Verfahren entwickelt und angewendet, in dem die cDNA von MAGEA1-6 in einer einzigen PCR detektiert wurde, indem mehrere Primer in der gleichen Reaktion verwendet wurden. Außerdem wurde ein Primer entwickelt, der nicht nur an ein einzelnes CT-Gen, sondern gleichzeitig an MAGEA1-6 binden kann. Aufgrund der hohen Expressionshäufigkeit von MAGEA in HNSCC wird daher vorgeschlagen, solche Kombinationsassays als sensitives diagnostisches Instrument zur Detektion von HNSCC-Tumorzellen im Gewebe und im Sputum zu nutzen (Song et al. 2008).

4.1.3.5.4. Spontane Immunantworten gegen MAGEA3

In den 39 untersuchten Patientensera konnten keine Antikörper gegen MAGEA3 nachgewiesen werden, dies könnte wiederum durch die Immunsuppression in Patienten mit HNSCC mitbedingt sein. In jedem Fall ist es jedoch auch ein weiterer Beleg für die geringe Immunogenität von MAGEA3. Auch in Studien mit Melanom Patienten, die hohe Expressionsraten für MAGEA1 und MAGEA3 aufwiesen, konnten nur in weniger als 3% der Patientensera Antikörper gegen diese Antigene nachgewiesen werden (Caballero und Chen 2009).

Es wird jedoch berichtet, dass viele Patienten nach einer aktiven Impfung mit rekombinantem MAGEA3-Protein Antikörper gegen MAGEA3 produzieren (Atanackovic et al. 2008).

4.1.3.5.5. Eignung der MAGE-Antigene als Zielstrukturen für die antigen-spezifische Immuntherapie in Patienten mit HNSCC

Aufgrund ihrer hohen Expressionshäufigkeit scheinen die MAGE-Antigene gute Zielstrukturen für die antigenspezifische Immuntherapie in HNSCC-Patienten zu sein. Eine effektive Immuntherapie gegen MAGEA3 könnte nach den Ergebnissen unserer Arbeit bei 70,6% der Patienten mit HNSCC zu einer Besserung führen. Eine polyvalente Immuntherapie gegen die 3 von uns untersuchten MAGE-Antigene könnte sogar einer noch größeren Patientenzahl helfen, da 72,5% (37 von 51) unserer HNSCC-Proben mindestens 1 der 3 MAGE-Antigene aufwiesen (MAGEC1, MAGEC2 oder MAGEA3), 37,3% wiesen mindestens 2 MAGE-Antigene auf und 11,8% der HNSCC-Proben waren für alle 3 untersuchten MAGE-Antigene positiv. Dass gegen alle in dieser Arbeit untersuchten MAGE-Antigene in früheren Studien eine humorale Immunantwort nachgewiesen wurde und gegen MAGEA3 und MAGEC2 auch zelluläre Immunantworten bekannt sind, belegt das prinzipiell immunogene Potential dieser Antigene. Der fehlende Nachweis von Antikörpern gegen

MAGEA3 in dieser Arbeit und die Tatsache, dass auch in früheren Arbeiten nur selten eine spontane Antikörperreaktion beobachtet wurde spricht andererseits dafür, dass es für eine effektive Therapie erforderlich sein könnte, die Immunantwort gegen MAGE-Antigene gezielt zu verstärken bzw. immunsuppressive Faktoren zu reduzieren.

Es ist denkbar, dass die in einigen Studien nachgewiesene Korrelation zwischen einer hohen Expressionshäufigkeit von MAGE-Antigenen und einer schlechten Prognose (Riener et al. 2009, Sharma et al. 2006) mit einer unzureichenden Tumorabwehr durch ein geschwächtes Immunsystem zusammenhängt. Dies ist besonders interessant, da eine ähnlich hohe Expressionshäufigkeit für MAGEA3, wie sie in dieser Arbeit in HNSCC nachgewiesen wurde, bisher nur für die Expression von MAGEA3 in Malignen Melanomen bekannt ist (Gaugler et al. 1994). Gleichzeitig ist für Patienten mit Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen ein besonderer Status der Immunsuppression bekannt. Es stellt sich daher die Frage nach einem Zusammenhang zwischen der hohen Expressionshäufigkeit von MAGEA3 in Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen und dem besonderen Status der Immunsuppression in diesen Patienten. Von Riener et al. (2009) wurde in MAGEA3 exprimierenden Tumoren eine erhöhte Anzahl von FOXP3-regulatorischen T-Zellen nachgewiesen, die immunsuppressiv wirken. Es könnte daher vermutet werden, dass die hohe Expressionshäufigkeit von MAGEA3 in HNSCC-Tumoren eine der Ursachen für die bekannte Immunsuppression bei Kopf-Hals-Tumoren ist oder auch dass andersherum die Immunsuppression in Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen die Expression von MAGEA3 begünstigt. Denkbar wäre auch, dass die Immunsuppression in HNSCC-Patienten und die Expression von MAGEA3 nicht direkt voneinander abhängig sind, sondern dass beide Phänomene desselben genetischen Programms sind, z.B. eines normalerweise inaktiven Keimzellprogramms.

Noch eine Erklärung für die mit MAGE Antigenen assoziierte schlechtere Prognose könnte eine besondere Aggressivität der MAGE exprimierenden Tumorzellen sein. Atanackovic et al. haben 2009 beschrieben, dass der Knockdown (d.h. die genetische Inaktivierung) von MAGEA3 und MAGEC1 in

Multiplen Myelomzellen zu einer bis zu 80% erhöhten Apoptoserate führt (Atanackovic et al. 2009). Es wäre sehr interessant, ob die Inaktivierung von MAGEA3 und MAGEC1 in HNSCC ebenfalls zu einer erhöhten Apoptoserate und damit verbunden zu einer erhöhten Sensibilität gegenüber Chemotherapie führt.

Abgesehen von ihrer Eignung als Zielstrukturen für spezifische Immuntherapien in Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen könnten MAGE-Antigene, dank ihrer hohen Expressionshäufigkeit in HNSCC, wie von Song et al. (2008) vorgeschlagen, auch geeignete diagnostische Marker für HNSCC sein.

4.2. Die Co-Expression von CT-Antigenen der Gruppe 4 im Hinblick auf die Entwicklung einer polyvalenten Impfung

Sollte es gelingen, eine effektive Immunantwort gegen ein von einem HNSCC Tumor exprimiertes CT-Antigen zu erzeugen, so bestünde die Gefahr, dass durch Mutationen im Tumorgenom Zellen entstehen, die das Antigen nicht mehr exprimieren. Diese würden von der Immunabwehr nicht mehr erkannt und könnten sich in der Escapephase (Dunn et al. 2004) ungehindert vermehren. Um die Wahrscheinlichkeit des Entkommens von Tumorzellen zu verringern wäre es sinnvoll, eine effektive Immunabwehr zu erzeugen, die gleichzeitig gegen mehrere CT-Antigene gerichtet ist. Ginge ein CT-Antigen auf einer Tumorzelle durch Mutationen verloren, so könnte eine solche breite Immunabwehr die Zelle anhand anderer CT-Antigene trotzdem noch erkennen. Dies könnte durch eine polyvalente Impfung erreicht werden. Im Hinblick darauf wurde in dieser Arbeit untersucht, wie viele der 8 ausschließlich in Tumor exprimierten CT-Antigene der Gruppe 4 von HNSCC-Tumorzellen gleichzeitig exprimiert werden. Wir stellten fest, dass bei 66,7% der untersuchten HNSCC-Tumorproben eine Co-Expression von mindestens 2 CT-Antigenen vorlag, und das 41,2% gleichzeitig 3 CT-Antigene exprimierten. Ebenfalls noch relativ häufig war die Expression von 4 Antigenen mit 19,6%. Eine effektive polyvalente Impfung gegen die 8 CT-Antigene der Gruppe 4 würde die

Wahrscheinlichkeit des Vorhandenseins eines dieser CT-Antigene in einem HNSCC-Tumor daher deutlich erhöhen und das Risiko des Entkommens von Tumorzellen vor der Immunabwehr deutlich reduzieren.

In anderen Studien zu CT-Antigenen in HNSCC wurde eine häufige Expression von weiteren, in dieser Arbeit nicht untersuchten CT-Antigenen aus den MAGE- und SSX-Familien nachgewiesen (Kienstra et al. 2003, Eura et al. 1993, Song et al. 2008, Albaitero et al. 2004). Diese sollten im Hinblick auf eine mögliche zukünftige Entwicklung einer polyvalenten Impfung gegen HNSCC ebenfalls berücksichtigt werden.

4.3. Gibt es in Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen CT-Antigene mit Gatekeeper-Funktion?

Von Arfsten wurde 2008 beschrieben, dass die Expressionshäufigkeit von CT-Antigenen in Multiplen Myelomzellen von der Anwesenheit der CT-Antigene MAGEA3, MAGEC2 und vor allem MAGEC1 abhängig ist. Waren diese 3 Antigene nicht exprimiert, so waren auch die anderen CT-Antigene seltener exprimiert. Es wurde daher postuliert, dass diese CT-Antigene eine Gatekeeper-Funktion besitzen. Das heisst, dass ihre Expression die Expression anderer CT-Antigene ermöglicht oder zumindest erleichtert (Arfsten 2008). Eine Erklärungsmöglichkeit hierfür wäre, dass die Expression von CT-Antigenen im Rahmen eines relativ vorgeschriebenen Programms der Tumorgenese abläuft.

In der Hoffnung, über die Identifikation von ähnlichen Co-Expressionen Hinweise zur Entstehung von Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen bzw. zur Funktionsweise der untersuchten CT-Antigene zu erhalten, wurde auch in dieser Arbeit untersucht, welchen Einfluss die Ab- bzw. Anwesenheit einzelner CT-Antigene der Gruppe 4 auf die anderen CT-Antigene dieser Gruppe hatte (Siehe Tabelle 5). Dabei war im Gegensatz zu der Arbeit von Arfsten nur eine einzige Korrelation statistisch signifikant und zwar für MAGEC2 und SSX2. 6 von 8 (75%) der Tumoren, die SSX2 exprimierten, exprimierten auch MAGEC2 ($p=0,02$). Dies könnte bedeuten, dass MAGEC2 eine Torwächter-Funktion für

SSX2 besitzt. Die Co-Expression eines CT-Antigens ist jedoch abhängig von seiner Expressionsstärke und die Ergebnisse sind aufgrund der zum Teil relativ niedrigen Expressionsstärken der untersuchten CT-Antigene statistisch nur eingeschränkt zu verwerten. Trotz fehlender Signifikanz sind dennoch einige der von uns beobachteten Co-Expressionen bemerkenswert, so z.B. dass 100% (2/2) der für NY-ESO-1 positiven Proben; 92% (12/13) der für MAGEC1 positiven Proben und 80% (20/25) der für SSX1 positiven Proben gleichzeitig auch MAGEA3 exprimieren. Auch Kienstra et al. (2003) hatten beschrieben, dass NY-ESO-1 nur von HNSCC-Tumoren exprimiert wird, die auch MAGEA3 oder MAGEA1 exprimieren. Es wurde vermutet, dass die Expression von NY-ESO-1 erst spät in der Tumorgenese stattfindet und die Expression von MAGEA3 oder MAGEA1 voraussetzt. Diese Vermutung wurde jedoch im nächsten Schritt wieder relativiert, da NY-ESO-1, wie auch in dieser Arbeit, nur in einer sehr geringen Zahl der untersuchten HNSCC-Tumoren (3/45) nachgewiesen werden konnte, was von Kienstra et al. als nicht repräsentativ eingeschätzt wurde. In unserer Arbeit ist die Expressionshäufigkeit von NY-ESO-1 noch geringer (2/51). Da NY-ESO-1 jedoch ebenfalls nur in MAGEA3-positiven Tumoren exprimiert ist, wird die Hypothese der Coexpression von MAGEA3 und NY-ESO-1 trotz der geringen Fallzahlen bestärkt.

4.4. Vergleich der Expressionsmuster der CT-Antigene in HNSCC Tumorzellen und Zelllinien

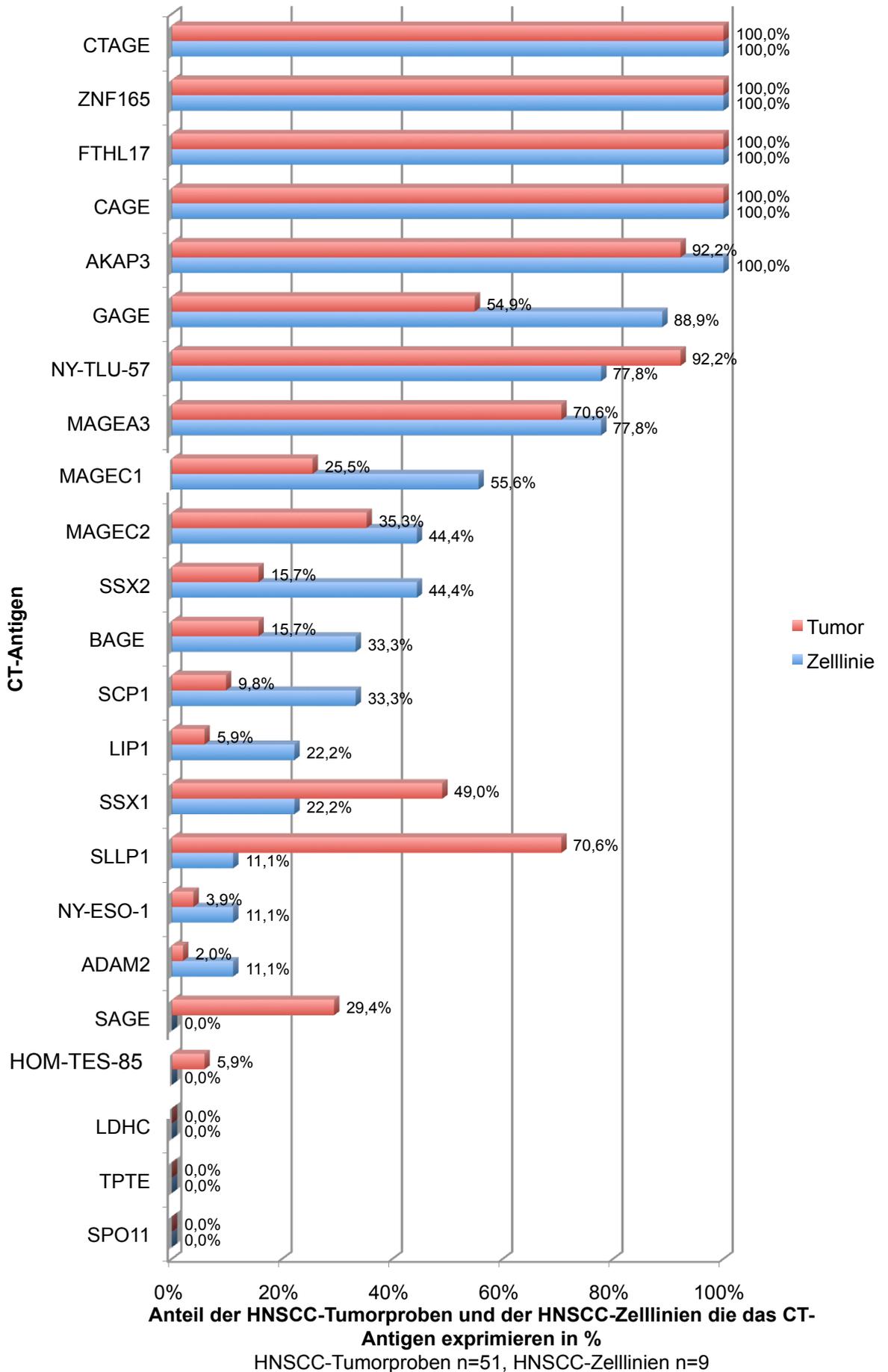
Mit der Untersuchung von 9 HNSCC-Zelllinien auf dieselben CT-Antigene, die auch in den Tumorzellen untersucht wurden, sollten die Ergebnisse aus den Tumorzellen überprüft werden. Außerdem sollte analysiert werden, ob Unterschiede in der Expressionsstärke zwischen Tumorzellen und Zelllinien Hinweise auf den Einfluss von in vivo vorhandenen Faktoren liefern würden, die die Expression der CT-Antigene beeinflussen. Insgesamt bestätigten die Zelllinien den Trend der Ergebnisse aus den Tumorzellen sehr gut.

Die Ranglisten der Expressionshäufigkeiten stimmten zu 74% überein (Siehe Abbildung 14), was die Reliabilität der vorliegenden Ergebnisse erhöht.

Die Antigene, die in keiner Tumor- und in keiner gesunden Gewebeprobe exprimiert waren, waren auch in keiner Zelllinie exprimiert. 3 der 4 CT-Antigene, die in allen Tumor- und in allen gesunden Gewebeproben exprimiert waren, waren auch in allen Zelllinien exprimiert.

Die durchschnittliche CT-Antigenexpressionshäufigkeit war jedoch in den Zelllinien etwas höher als in den Tumorproben, auffällig war vor allem der Unterschied zwischen durchschnittlich 3 pro Zelllinie im Gegensatz zu durchschnittlich 2,2 pro Tumorprobe exprimierten tumorspezifischen CT-Antigenen der Gruppe 4. Dies ist zwar statistisch nicht signifikant ($p=0,249$), was unter anderem an der geringen Anzahl der untersuchten Zelllinien liegen könnte, es weist jedoch zumindest darauf hin, dass die Bedingungen für die Expression von CT-Antigenen in HNSCC-Gewebe *in vitro* möglicherweise günstiger sein könnten als *in vivo*.

Abbildung 14: Vergleich der Expression von 23 CT-Antigenen in HNSCC-Tumorproben und -Zelllinien



4.5. Ist die Expression von CT-Antigenen in HNSCC abhängig von Patientenmerkmalen oder Tumorcharakteristika?

Es konnte keine signifikante Korrelation zwischen den Patientenmerkmalen Alter und Geschlecht, der Unterscheidung in Primärtumoren und Rezidive, der pathologischen Tumorklassifikation, dem Differenzierungsgrad und zwischen der Anzahl der exprimierten tumorspezifischen CT-Antigene der Gruppe 4 festgestellt werden (Siehe Tabelle 6). Dies könnte einerseits an der limitierten Fallzahl der Studie liegen. Andererseits könnte es jedoch auch darauf hinweisen, dass die CT-Antigenexpression in Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen unabhängig von diesen Faktoren ist. In diesem Fall würde eine zukünftige CT-Antigen-spezifische Immuntherapie als therapeutische Option für Patienten aller hier untersuchten Altersgruppen und Tumorstadien in Frage kommen.

4.6. Ausblick

Der besondere Reiz einer antigen-spezifischen Immuntherapie liegt darin, dass Tumorzellen gezielt angegriffen werden, während das gesunde Gewebe verschont bleibt. Zudem besteht die begründete Hoffnung, dass ein genaueres Verständnis der Expressionsmechanismen und der Funktion von CT-Antigenen neue therapeutische Möglichkeiten eröffnet. Nicht zuletzt könnten Antigene, die eine hohe Expressionshäufigkeit und Spezifität in Tumoren aufweisen, auch als Marker zur Früherkennung von Tumoren oder prämaligen Veränderungen dienen.

Diese Arbeit hat vor allem mit den CT-Antigenen der Gruppe 4 potentielle Zielstrukturen für eine antigen-spezifische Immuntherapie in HNSCC-Patienten identifiziert. Die Tumorspezifität eines Antigens allein ist jedoch wahrscheinlich nicht ausreichend; für die Entwicklung einer aktiven Immuntherapie gegen ein Antigen kommt es auch auf seine Immunogenität an. Wir haben hier nur einen kleinen Einblick in die Immunogenität der untersuchten CT-Antigene unternommen, durch das Screenen von 39 autologen Patientensera auf

Antikörper gegen 3 CT-Antigene der Gruppe 4. Eine wichtige Aufgabe zukünftiger Arbeiten könnte daher darin bestehen, Sera von HNSCC-Patienten auf Antikörper gegen weitere CT-Antigene zu testen. Für die immunologische Tumorabwehr sind Antikörper zwar weniger wichtig als die zelluläre Immunabwehr, sie sind jedoch ein relativ einfach zu erfassender Parameter, der Aussagen über die Immunogenität eines Antigens macht. Hohe Antikörpertiter gegen ein CT-Antigen sprechen für seine Erkennung durch CD4⁺T-Zellen (Stockert et al. 1998). Besonders bei Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen scheint die T-Zell basierte Immunabwehr eine große Rolle zu spielen, wie in Kapitel 1.2.1 beschrieben. Zum besseren Verständnis des Wechselspiels zwischen Immunabwehr und Tumorwachstum ist daher die genauere Erforschung der Tumorgenese von HNSCC und der Immunreaktion darauf von großem Interesse. Vor allem die T-Zell-Antwort auf CT-Antigene in Patienten mit HNSCC sollte genauer untersucht werden. Welches Ausmaß hat sie? Sind spezifisch geprägte T-Zellen in der Lage Tumorzellen zu lysieren?

Obwohl sie auf den ersten Blick weniger gut für die antigen-spezifische Immuntherapie geeignet scheinen, ist auch die Rolle der in dieser Arbeit weniger bis gar nicht tumorspezifischen Antigene in HNSCC von Interesse und sollte weiter erforscht werden. Ist die Expression von zuvor als Tumor-/Hodenspezifisch beschriebenen CT-Antigenen der Gruppe 1 typisch für gesundes Gewebe aus dem Kopf-Hals-Bereich, so dass man eine Autoimmunreaktion gegen Gewebe aus dem Kopf-Hals-Bereich befürchten müsste wenn diese Antigene in der Immuntherapie verwendet werden? Ist die Expression von CT-Antigenen der Gruppe 2, die überwiegend in Tumor, jedoch in geringerem Maße auch in gesundem Gewebe, nachgewiesen wurden ein Hinweis darauf, dass das gesunde Gewebe bereits prämalig verändert ist?

Wie in Kapitel 1.2.3 beschrieben gibt es Hinweise darauf, dass auch differentiell exprimierte CT-Antigene als Zielstrukturen für die antigen-spezifische Immuntherapie in Frage kommen, da sie in gesundem Gewebe häufig nur in sehr geringer Menge exprimiert werden. Ein wichtiges Ziel zukünftiger Forschung wäre daher die Quantifizierung der Proteinexpression von CT-Antigenen in HNSCC, mittels Immunhistochemie oder mittels Bestimmung der

Konzentration von MHC/CT-Antigen-Peptid-Komplexen in gesundem Gewebe, wie von Scanlan et al. vorgeschlagen (2004).

Die vorliegende Arbeit liefert Hinweise darauf, dass einige CT-Antigene in HNSCC gehäuft Expressionskorrelationen aufweisen, diese Ergebnisse waren jedoch überwiegend statistisch nicht signifikant, was auch an der relativ niedrigen Probenzahl bzw. an der niedrigen Zahl der für bestimmte CT-Antigene positiven Proben liegen könnte. Auch die häufigere Expression von CT-Antigenen in den Zelllinien im Gegensatz zu den Tumorzellen war bemerkenswert, jedoch ebenfalls nicht signifikant. Um sicherere Aussagen treffen zu können wäre daher die Wiederholung der durchgeführten Untersuchungen an einer größeren Probenzahl sinnvoll.

Das perfekte Ziel-Antigen für eine antigen-spezifische Immuntherapie wäre nicht nur in hohem Maße tumorspezifisch und immunogen, sondern es sollte bestenfalls auch eine entscheidende Rolle in der Tumorgenese spielen, so dass die Zerstörung einer Antigen-tragenden Zelle dem Tumor insgesamt schaden würde. Wie in Kapitel 1.2.1 diskutiert, könnte die große Anzahl der Escape-Mechanismen von HNSCC-Tumoren bedeuten, dass diese Tumoren besonders vulnerabel gegenüber der Immunabwehr sind (Atanackovic et al. 2006). Aus diesen Gründen sollten neben der Untersuchung der Immunantwort gegen CT-Antigene in HNSCC-Patienten auch die Expressions- und Suppressionsmechanismen sowie die zelluläre Funktion von CT-Antigenen in HNSCC genauer erforscht werden. Beispielsweise könnte, ähnlich wie in einer Arbeit von Atanackovic et al. (2009a), untersucht werden, welchen Einfluss bestimmte CT-Antigene auf die Proliferation, die Zell-Adhäsion, die Empfindlichkeit gegenüber Chemotherapie, die Bildung von Zellkolonien und die Apoptose von HNSCC-Zellen haben.

Auch wäre es wünschenswert, mehr über die Expression von CT-Antigenen in HNSCC-Tumoren über einen längeren Zeitraum in Erfahrung zu bringen. Korreliert ihre Expression mit dem Fortschreiten und der Prognose der Tumorerkrankung? In dieser Arbeit konnte keine Korrelation zwischen dem Tumorstadium und der Anzahl der exprimierten CT-Antigene festgestellt werden; eine longitudinal angelegte Studie, in der HNSCC-Tumorzellen der-

selben Patienten wiederholt auf die Expression von CT-Antigenen untersucht werden, könnte jedoch sicherlich genauere Informationen zu Korrelationen zwischen Tumorentwicklung, CT-Antigenexpression und Prognose liefern. Eine solche Studie an Multiplen Myelom-Patienten wurde ebenfalls von Atanackovic et al. publiziert (2009b). Eine Schwierigkeit bei der Untersuchung von HNSCC-Tumoren ist allerdings, dass es nur während einer therapeutisch indizierten Operation möglich ist, an Tumorzellen zu gelangen. Eine Alternative könnte die Untersuchung von Sputum sein, wie dies von Song et al. (2008) erfolgreich durchgeführt wurde. Insbesondere in Hinblick auf die mögliche Eignung von CT-Antigenen als Marker zur Früherkennung von HNSCC-Tumoren, wie ebenfalls von Song et al. (2008) vorgeschlagen, ist es entscheidend mehr über die Korrelation der CT-Antigenexpression mit dem Tumorstadium bzw. über eine mögliche Expression von CT-Antigenen bereits in prämaligne verändertem Gewebe zu wissen.

Abschließend lässt sich die Frage nach der Eignung von CT-Antigenen als Zielstrukturen für eine antigen-spezifische, aktive Immuntherapie, die die Hauptmotivation dieser Arbeit war, vermutlich nur durch die klinische Erprobung von Impfungen beantworten. Frühere Studien haben gezeigt, dass Peptidimpfungen gegen CT-Antigene wenige Risiken bergen und relativ einfach durchführbar sind (Jäger et al. 2000c), eine aktuellere Studie zu einer Proteinimpfung gegen HPV-16-Onkoproteine hat bei Frauen mit intra-epithelialen Neoplasien der Vulva eine hohe Remissionsrate gezeigt (Kenter et al. 2009). Es sollten verschiedene Peptide und Adjuvantien erprobt werden um eine Impfstrategie zu entwickeln, die eine möglichst effektive Immunreaktion erzeugt.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Angesichts der hohen Inzidenz und der schlechten Prognose von Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen (HNSCC) ist die Entwicklung von neuen Therapien und diagnostischen Verfahren von großer klinischer Relevanz. Cancer-Testis-Antigene sind aufgrund ihrer auf Tumor- und Keimzellgewebe beschränkten Expression potentielle Zielstrukturen für eine antigen-spezifische Immuntherapie in Tumorpatienten. In dieser Arbeit wurden HNSCC-Tumorproben von 51 Patienten und angrenzendes gesundes Gewebe von 26 dieser Patienten sowie 9 HNSCC-Zelllinien mittels RT-PCR auf die Expression von 23 CT-Antigenen untersucht. Autologes Serum von 39 der Patienten wurde mittels ELISA auf eine spontane Immunantwort gegen 3 der untersuchten CT-Antigene untersucht. Entsprechend ihres Expressionsmuster wurden die CT-Antigene in 4 Gruppen eingeteilt. Bei den Antigenen der Gruppen 1 und 2, die sowohl in Tumorgewebe als auch in gesundem Gewebe nachgewiesen wurden, wird die bestehende Klassifikation als CT-Antigene im strengen Sinne in Frage gestellt, da es bei einer Immuntherapie gegen diese Antigene zu einer Autoimmunreaktion gegen gesundes Gewebe aus dem Kopf-Hals-Bereich kommen könnte. Im Gegensatz dazu konnten die CT-Antigene der Gruppe 3 zwar definitionsgemäß nicht in gesundem Gewebe, jedoch auch in keiner HNSCC-Tumorprobe nachgewiesen werden und scheinen somit prinzipiell nicht relevant für die antigen-spezifische Therapie von Kopf-Hals-Tumoren zu sein. Ideale Zielstrukturen für eine antigen-spezifische Immuntherapie in HNSCC-Patienten könnten schließlich die 8 streng tumorspezifischen CT-Antigene der Gruppe 4 sein. Unter diesen waren NY-ESO-1 und Hom-Tes-85 relativ selten exprimiert, SSX2, BAGE und MAGEC1 waren mäßig häufig exprimiert und sehr häufig konnten MAGEC2, SSX1 und MAGEA3 in 35%, 49% bzw. 71% der Tumorproben nachgewiesen werden. Eine polyvalente Immuntherapie, die gleichzeitig gegen die 8 CT-Antigene der Gruppe 4 gerichtet ist, könnte bei der Mehrheit der in dieser Arbeit untersuchten HNSCC-Patienten wirken, da 84% mindestens 1, 67% mindestens 2 und 41% mindestens 3 der CT-Antigene der Gruppe 4 exprimierten.

In dieser Arbeit konnte über den Nachweis von spontan aufgetretenen Antikörpern erneut die starke Immunogenität von NY-ESO-1 belegt werden. Der fehlende Nachweis von Antikörpern gegen MAGEA3 und SSX2 deutet darauf hin, dass es erforderlich sein könnte, die Immunantwort auf CT-Antigene gezielt zu verstärken. Dies, sowie auch die genauere Erforschung der Immunantwort auf die hier identifizierten potentiellen Zielstrukturen für eine antigen-spezifische Immuntherapie in Kopf-Hals-Tumoren, bleibt Aufgabe zukünftiger Studien.

LITERATURVERZEICHNIS

- Ades L, Mary JY, Robin M, Ferry C, Porcher R, Esperou H, Ribaud P, Devergie A, Traineau R, Gluckman E, and Socie G (2004). Long-term outcome after bone marrow transplantation for severe aplastic anemia. *Blood*. 103:2490-7.
- Aoki M, Ueda S, Nishikawa H et al. (2009). Antibody responses against NY-ESO-1 and HER2 antigens in patients vaccinated with combinations of cholesteryl pullulan (CHP)-NY-ESO-1 and CHP-HER2 with OK-432. *Vaccine*. 27: 6854-6861.
- Arfsten J (2008). Untersuchung des Expressionsmuster von Cancer/Testis Antigenen im Knochenmark von Patienten mit Multiplem Myelom. Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.
- Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL (2008). Head and Neck Cancer. *Lancet*. 371:1695-1709.
- Atanackovic D, Blum I, Cao Y, Wenzel S, Faltz C, Hossfeld DK, Hegewisch-Becker DS, Bokemeyer C, Leuwer R (2006). Expression of cancer testis antigens as possible targets for antigen specific immunotherapy in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Bio Ther*. 5;9:1218-25.
- Atanackovic D, Altorki NK, Cao Y, Ritter E, Ferrara CA, Ritter G, Hoffmann EW, Bokemeyer C, Old LJ, Gnjatic S (2008). Booster vaccination of cancer patients with MAGE-A3 reveals long-term immunological memory or tolerance depending on priming. *Proc Natl Acad Sci*. 105:5:1650-1655.
- Atanackovic D, Hildebrandt Y, Yadcak A, Cao Y, Luetken T, Meyer S, Kobold S, Bartels K, Pabst C, Lajmi N, Gordic M, Stahl T, Zander R, Bokemeyer C, Kröger N (2009a). Cancer-testis antigens MAGE-C1/CT7 and MAGE-A3 promote the survival of multiple myeloma cells. *Haematologica*. 95:5:785-793.
- Atanackovic D, Luetkens T, Hildebrandt Y, Arfsten J, Bartels K, Horn C, Stahl T, Cao Y, Zander AR, Bokemeyer C, Kröger N (2009b). Longitudinal analysis and prognostic effect of cancer-testis antigen expression in multiple myeloma. *Clin Cancer Res*. 15(4):1343-52.
- Bai S, He B, Wilson EM (2005). Melanoma antigen gene protein MAGE-11 regulates androgen receptor function by modulating the interdomain interaction. *Mol Cell Biol*. 25: 1238-1257.

- Balz V, Scheckenbach K, Gotte K, Bockmuhl U, Petersen I, Bier H (2003). Is the p53 inactivation frequency in squamous cell carcinoma of the head and neck underestimated? Analysis of p53 exons 2-11 and human papillomavirus 16/18 transcripts in 123 unselected tumor specimens. *Cancer Res.* 63:1188-91.
- Barone JG, Hutchinson D, Cuppari AL, and Barone JE (1990). Squamous cell cancer of the larynx in an intravenous drug user with AIDS. *N J Med.* 87:811-2.
- Bhatia S, Louie AD, Bhatia R, O'Donnell MR, Fung H, Kashyap A, Krishnan A, Molina A, Nademanee A, Niland JC, Parker PA, Snyder DS, Spielberger R, Stein A, and Forman SJ (2001). Solid cancers after bone marrow transplantation. *J Clin Oncol.* 464-71.
- Blott WJ, McLaughlin JK, Winn DM et al (1988). Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res.* 48: 3282-87.
- Boel P, Wildmann C, Sensi ML et al. (1995). BAGE: A new gene encoding an antigen recognized on human melanoma by cytolytic t- lymphocytes. *Immunity.* 2:167-175.
- Boon T, Van den Eynde B, Lethé B et al. (1991). The gene coding for a major tumor rejection antigen of Tumor P815 is identical to the normal gene of syngeneic DBA/2 mice. *J exp med.* V. 173.
- Caballero OL, Chen YT (2009). Cancer/testis (CT) antigens: Potential targets for immunotherapy?, *cancerscience.* Vol.100, No.11, 2014-2021.
- Califano J, Van der Riet P, Westra W, et al (1996). Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerisation. *Cancer Res.* 56:2488-92.
- Carpaccio P, Pruneri G, Carboni N, et al. (2000). Cyclin D1 expression is predictive of occult metastasis in head and neck cancer patients with clinical negative cervical lymph nodes. *Head Neck.* 22:234-40.
- Chen YT, Güre AO, Tsang S, Stockert E, Jager E, Knuth A, Old LJ (1998). Identification of multiple cancer/testis antigens by allogenic antibody screening of a melanoma cell line library. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95:6919-23.
- Chen YT, Scanlan MJ, Sahin U (1997). A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94:1914-1918.

- Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ (1979). Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry*. 18: 5294-5299.
- Chomczynski P, Sacchi N (1987). Single-step method of RNA Isolation by acid guanidinium-thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Analytical biochemistry* 162, 156-159.
- Chung CH, Gillison ML (2009). Human Papillomavirus in Head and Neck Cancer: Its role in pathogenesis and clinical implications. *Clin Cancer Res*. 15:67586762.
- Cilensek ZM, Yehiely F, Kular RK, Deiss LP (2002). A member of the GAGE family of tumour antigens is an anti-apoptotic gene that confers resistance to Fas/CD95/APO-1, Interferon- γ , taxol and γ -irradiation. *Cancer Biol Ther*. 1: 380-387.
- CT Gene Database. <http://www.cancerimmunity.org/CTdatabase/>. Stand 02.05.2011
- Curtis RE, Rowlings PA, Deeg HJ, Shriner DA, Socie G, Travis LB, Horowitz MM, Witherspoon RP, Hoover RN, Sobocinski KA, Fraumeni JF Jr., and Boice JD Jr (1997). Solid cancers after bone marrow transplantation. *N Engl J Med*. 336:897-904.
- Dai Won Song, Seung Jin Shin et al. (2008). Detection of MAGE and SSX Gene Expression by RT-nested PCR using common primers in Head and neck cancer. *Clinical and experimental Otorhinolaryngology*. Vol11, No 2: 97-102.
- Davis ID, Chen W, Jackson H, Parente P, Shackleton M, Hopkins W, Chen Q, Dimopoulos N, Luke T, Murphy R, Scott AM, Maraskovsky E, McArthur G, MacGregor D, Sturrock S, Tai TY, Green S, Cuthbertson A, Maher D, Miloradovic L, Mitchell SV, Ritter G, Jungbluth AA, Chen YT, Gnjatic S, Hoffman EW, Old LJ, Cebon JS (2004). Recombinant NY-ESO-1 protein with ISCOMATRIX adjuvant induces broad integrated antibody and CD4+ and CD8+ T-cell responses in humans. *Proc Nat Ac Sci*. Vol.101, no 29, 10697-10702.
- De Gruyter W, Dörner T, Feldkamp J, Kunze J, Pfitzmann R, Radke M, Schöberger B, Springer G, Straube E, Straube W (Hrsg.) (2004). *Psychrembel Klinisches Wörterbuch*, 260. Auflage, Walter de Gruyter Verlag. Berlin, New York. S. 19,95.

- Deeg HJ, Socie G, Schoch G, Henry-Amar M, Witherspoon RP, Devergie A, Sullivan KM, Gluckman E, and Storb R (1996). Malignancies after marrow transplantation for aplastic anemia and fanconi anemia: a joint Seattle and Paris analysis of results in 700 patients. *Blood*. 87:386-92.
- Dong XY, Su YR, Qian X-P (2003). Identification of two novel CT antigens and their capacity to elicit antibody response in hepatocellular carcinoma patients. *Br J Cancer*. 89: 291-297.
- Dong XY, Yang XA, Wang YD, and Chen WF (2004). Zinc-finger protein ZNF165 is a novel cancer-testis antigen capable of eliciting antibody response in hepatocellular carcinoma patients. *Br J Cancer*. 91:1566-70.
- Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD (2004). The Immunobiology of Cancer, Immunosurveillance and Immunoediting. *Immunity*. 21: 137-148.
- Duvoux C, Delacroix I, Richardet JP, Roudot-Thoraval F, Metreau JM, Fagniez PL, Dhumeaux D, and Cherqui D (1999). Increased incidence of oropharyngeal squamous cell carcinomas after liver transplantation for alcoholic cirrhosis. *Transplantation*.67:418-21.
- Epstein JB and Scully C (1992). Neoplastic disease in the head and neck of patients with AIDS. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 21:219-26.
- Eura M, Ogi K, Chikamatsu K, Lee KD, Nakano K, Masuyama K, Itoh K and Ishikawa T (1995). Expression of the MAGE gene family in human head-and-neck squamous-cell carcinomas. *Int J Cancer*. 64:304-8.
- Gallo O, Bianchi S, Giannini A, Gallina E, Libonati GA, and Fini-Storchi O (1991a). Correlations between histopathological and biological findings in nasopharyngeal carcinoma and its prognostic significance. *Laryngoscope*.101:487-93.
- Gallo O, Libonati GA, Gallina E, Fini-Storchi O, Giannini A, Urso C, and Bondi R (1991b). Langerhans cells related to prognosis in patients with laryngeal carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 117:1007-10.
- Gaugler B, van den Eynde B, van der Bruggen P et al. (1992). Human gene MAGE A3 codes for an antigen recognized on a melanoma by autologous cytolytic T-lymphocytes. *J Exp Med*. 176:1453-1457
- Germeau C, Ma W, Schiavetti F et al. (2005). High frequency of antitumor T cells in the blood of melanoma patients before and after vaccination with tumor antigens. *J Exp Med* 2005; 201:241-8.
- Gnjjatic S, Atanackovic D, Jäger E et al. (2003). Survey of naturally occurring CD4+ T cell responses against NY-ESO-1 in cancer patients: Correlation with antibody responses, *Proc Nat Ac Sci*. Vol 100, No.15:8862-8867.

- Gnjatic S, Atorki NK, Ng Tang D et al. (2009). NY-ESO-1 DNA Vaccine Induces T-Cell responses that are suppressed by regulatory T cells. *Clin Cancer Res.* 15.
- Goldman SA, Baker E, Weyant RJ, Clarke MR, Myers JN, and Lotze MT (1998). Peritumoral CD1a-positive dendritic cells are associated with improved survival in patients with tongue carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.*124:641-6.
- Gotte K, Usener D, Riedel F, Hormann K, Schadendorf D, and Eichmuller S (2002). Tumor-associated antigens as possible targets for immune therapy in head and neck cancer: comparative mRNA expression analysis of RAGE and GAGE genes. *Acta Otolaryngol* ;122:546-52.
- Grandis JR, Tweardy DJ (1993). Transforming levels of elevated growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer. *Cancer Res.* 53: 3579-48.
- Guo M, Rabin BS, Johnson JT, and Paradis IL (1987). Lymphocyte phenotypes at tumor margins in patients with head and neck cancer. *Head Neck Surg.* 9:265-71.
- Güre AO et al. (1997). SSX: A multigene family with several members transcribed in normal testis and human cancer. *Int J cancer.* 72:965-71.
- Güre AO et al. (2002). The SSX Gene family: characterization of 9 complete genes. *Int J Cancer.* 101: 448-453.
- Güre OA, Stockert E, Arden KC et al. (2000). CT10: A new cancer-testis antigen homologous to CT7 and the MAGE family, identified by representational-difference analysis. *Int j Cancer:* 85, 726—732.
- Güre OA, Chua R, Williamson B et al (2005). Cancer-testis genes are coordinately expressed and are markers of poor outcome in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Research.* 11:8055-62.
- Ha PK, Califano JA (2006). Promoter methylation and inactivation of tumor-suppressor genes in oral squamous cell carcinoma. *Lancet Oncol.* 7: 77-82.
- Haagsma EB, Hagens VE, Schaapveld M, van den Berg AP, de Vries EG, Klompaker IJ, Slooff MJ, and Jansen PL (2001). Increased cancer risk after liver transplantation: a population-based study. *J Hepatol.* 34:84-91.
- Hadden JW (1997). The immunopharmacology of head and neck cancer: an update. *Int J Immunopharmacol.*19:629-44.

- Hasegawa K, Ono T, Matsushita H, Shimono M, Noguchi Y, Mizutani Y, Kodama J, Kudo T, and Nakayama E (2004). A-kinase anchoring protein 3 messenger RNA expression in ovarian cancer and its implication on prognosis. *Int J Cancer*. 108:86-90.
- Hofmann O, Caballero OL, Stevenson BJ et al. (2008). Genome-wide analysis of cancer/testis gene expression. *Proc Natl Acad Sci*. Vol.105, No.51: S.20422-20427.
- Houghton AN (1994). Cancer Antigens: immune recognition of self- and altered self. *J exp medicine*. 180: 1-4.
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/About/primer/est.html>, Stand 02.05.2011
- <http://www.wissenschaft-online.de/abo/lexikon/bio/44288> (Stand:06.07.2008).
- Jäger E, Nagata Y, Gnjatich S, Wada H, Stockert E, Karbach J, Dunbar PR, Lee SY, Jungbluth A, Jäger D, Arand M, Ritter G, Cerundolo V, Dupont B, Chen YT, Old LJ, Knuth A (2000a). *Proc Natl Acad Sci*. 97:4760-4765.
- Jäger E, Gnjatich S, Nagata Y, Stockert E, Jäger D, Karbach J, Neumann A, Rieckenberg J, Chen YT, Ritter G, Hoffman E, Arand M, Old LJ, Knuth A (2000b). Induction of primary NY-ESO-1 immunity: CD8+T lymphocyte and antibody responses in peptide Vaccinated patients with NY-ESO-1+ cancers. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97:12198-203.
- Jäger E, Jäger D, Knuth A (2000c). Peptide vaccination in clinical oncology. *Onkologie*. 23:410-415.
- Jungbluth AA et al (2000a). Monoclonal antibody MA454 reveals a heterogeneous expression pattern of MAGE-1 antigen in formalin-fixed paraffin embedded lung tumours. *Br J Cancer*. 83: 493-497.
- Jungbluth AA, Busam KJ, Kolb D (2000b). Expression of Mage-antigens in normal tissues and cancer. *Int J Cancer*. 15; 85 (4):460-5.
- Jungbluth AA, Chen YT, Stockert E (2001). Immunohistochemical analysis of NY-ESO-1 antigen expression in normal and malignant human tissues. *Int J Cancer*. 92(6):856-60.
- Jungbluth AA, Chen YT et al. (2002). CT7 (MAGE-C1) Antigen Expression in Normal and neoplastic tissues. *Int J Cancer*. 99: 839-845.
- Kaplan MJ, Sabio H, Wanebo HJ, and Cantrell RW (1985). Squamous cell carcinoma in the immunosuppressed patient: Fanconi's anemia. *Laryngoscope*. 95:771-5.

- Karbach J, Gnjatic S, Bender A et al. (2010). Tumor reactive CD8+ T-cell responses after vaccination with NY-ESO-1 peptide, CpG 7909 and Montanide® ISA 51: Association with survival. *Int J Cancer*: 000,000-000.
- Keeney S, Giroux CN, Kleckner N (1997). Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by SPO11, a member of a widely conserved protein family. *Cell*. 88: 375-384.
- Kenter GG, Welters MJ, Valentijn AR, Lowik MJ, Berends-van der Meer DM, Vloon AP, Essahsah F, Fathers LM, Offringa R, Drijfhout JW, Wafelman AR, Oostendorp J, Fleuren GJ, van der Burg SH, Melief CJ (2009). Vaccination against HPV-16 oncoproteins for vulvar intraepithelial neoplasia. *N Engl J Med* 5;361(19):1838-47.
- Kienstra MA, Neel HB, Strome SE, and Roche P (2003). Identification of NY-ESO-1, MAGE-1, and MAGE-3 in head and neck squamous cell carcinoma. *Head and Neck*. 25:457-63.
- King GN, Healy CM, Glover MT, Kwan JT, Williams DM, Leigh IM, Worthington HV, and Thornhill MH (1995). Increased prevalence of dysplastic and malignant lip lesions in renal-transplant recipients. *N Engl J Med*. 332:1052-7.
- Kolb HJ (2008). Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes, *Blood*. 112:4371-4383.
- Kuss I, Hathaway B, Ferris RL, Gooding W, Whiteside TL (2004). Decreased absolute count of T-lymphocytes subsets and their relation to disease in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res*. 10:3755-62.
- Laduron S. et al. (2004). MAGEA1 interacts with adaptor SKIP and the deacetylase HDAC1 to repress transcription. *Nucleic Acids Res*. 32:4340-4350.
- Lee KD, Chang HK, Jo YK, Kim BS, Lee BH, Lee YW, Lee HK, Huh MH, Min YG, Spagnoli GC and Yu TH (1999). Expression of the MAGE 3 gene product in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Anticancer Res*. 9:5037-4.
- Lee SY, Williamson B, Caballero OL, Chen YT, Scanlan MJ, Ritter G, Jongeneel CV, Simpson AJ and Old LJ (2004). Identification of the gonad-specific anion transporter SLCO6A1 as a cancer/testis (CT) antigen expressed in human lung cancer. *Cancer Immun*. 4:13.
- Löffler G, Petrides PE (2003). *Biochemie und Pathobiochemie*. 7.Auflage. Springer Verlag. Berlin Heidelberg.

- Lopez Albaitero A, Liqiang Xi, Jun Wang et al. (2004). Expression and Immunogenicity of MAGE-3 and MAGE-6 in Squamous Cell carcinoma of the Head and Neck. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery*. Research Posters.
- Lucas S, De Smet C, Boon T et al. (1998). Identification of a new MAGE Gene with Tumor-Specific Expression by Representational Difference Analysis, *Cancer research*. 58:743-752.
- Ma W, Germeau C, Vigneron N et al (2004). Two new tumor-specific antigenic peptides encoded by gene MAGE-C2 and presented to cytolytic T-lymphocytes by HLA-A2. *Int J Cancer*. 109:698-702.
- MacKie, RM, Reid R, and Junor B (2003). Fatal melanoma transferred in a donated kidney 16 years after melanoma surgery. *N. Engl. J. Med*. 348: 567-568.
- Mao L, Lee JS, Fan YH, et al (1996). Frequent microsatellite alterations at chromosome 9p21 and 3p14 in oral premalignant lesions and their value in cancer risk assessment. *Nat Med*. 2: 682-86.
- Marchand M, Punt CJ, Aamdal S et al. (2003). Immunisation of metastatic cancer patients with MAGE-3 protein combined with adjuvant SBAS-2: a clinical report. *Eur J Cancer*. 39:70-7.
- McCaul JA, Gordon KE, Clark LJ, Parkinson EK (2002). Telomerase inhibition and the future management of head-and-neck cancer. *Lancet Oncol*. 3: 280-88.
- McMahan S, Chen AY (2003). Head and neck cancer. *Cancer metastasis rev*. 22:21-24.
- Meissner M, Reichert TE, Kunkel M, Gooding W, Whiteside TL, Ferrone S, and Seliger B (2005). Defects in the human leukocyte antigen class I antigen processing machinery in head and neck squamous cell carcinoma: association with clinical outcome. *Clin Cancer Res*. 11:2552-60.
- Mihalov ML, Gattuso P, Abraham K, Holmes EW, and Reddy V (1996). Incidence of post-transplant malignancy among 674 solid-organ-transplant recipients at a single center. *Clin Transplant*. 10:248-55.
- Morrison AE, O'Grady J, Parker AC, and McLaren K (1994). Metastatic papillary carcinoma of thyroid in a patient undergoing allogeneic BMT for CML. *Br J Haematol*. 86:873-5.
- Murphy K, Travers P, Walport M (2007). *Janeway Immunologie*. 7. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg. S. 849, 852, 738, 44-45, 854-855, 852.

- Napier SS, Speight PM (2008). Natural history of potential malignant oral lesions and conditions: an overview of the literature. *J Oral Pathol Med.* 37:1-10.
- Oksuzoglu B, Yalcin S (2002). Squamous cell carcinoma of the tongue in a patient with Fanconi's anemia: a case report and review of the literature. *Ann hematol.* 81:294-298.
- Old LJ (1981). Cancer immunology: The search for specificity: G.H.A. Clowes memorial lecture. *Cancer Res* 1981. 41: 361-75.
- Old LJ (2008). Cancer Vaccines:an overview. *Cancer Immunity.* Vol. 8, Suppl.1, p1.
- Park JH, Kong GH, Lee SW (2002). hMAGE-A1 overexpression reduces TNF- α cytotoxicity in ME 180 cells. *Mol. Cells* 14, 122-129.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P (2005). Global cancer statistics 2002. *CA Cancer J Clin.* 55:74-108.
- Penn I (1977). Malignancies associated with renal transplantation. *Urology.*10:57-63.
- Petrides PE und Ansorge S (2003). Immunsystem. In: *Biochemie und Pathobiochemie.* Löffler G, Petrides PE (Hrsg).7.Auflage. Springer Verlag. Berlin Heidelberg. S. 1127-1129, 1124-1125, 1133.
- Perez-Ordóñez B, Beauchemin M, Jordan RC (2006). Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Pathol.* 59:445-53.
- Pezzutto A, Ulrichs T, Burmester GM (2007). *Taschenatlas der Immunologie.* 2.Auflage.Georg Thieme Verlag, Stuttgart. S. 104, 170.
- Pignataro N, Pruneri G, Carboni N et al (1998). Clinical relevance of cyclin D1 overexpression in laryngeal squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 16: 3069-77.
- Pousette A et al. (1997). Presence of synaptonemal complex protein 1 transversal filament-like protein in human primary spermatocytes. *Hum Reprod.* 12: 2414-2417.
- Preiß J, Schmieder A (2006). Kopf-Hals-Tumoren. In: *Onkologie integrativ Koventionelle und komplementäre Therapie.* Pfeifer B, Preiß J, Unger C (Hrsg). 1.Auflage. Urban & Fischer Verlag. S. 563-569.
- Ram M, Shoenfeld Y (2007). Harnessing autoimmunity (vitiligo) to treat melanoma: A myth or reality? *Ann NY Acad Sci.* Sep. 1110.

- Resser JR and Carbone DP (1998). Immunotherapy of head and neck cancer. *Curr Opin Oncol.* 10:226-32.
- Rickinson AB, Moss DJ (1997). Human cytotoxic T-lymphocyte responses to Epstein-Barr virus infection. *Annu. Rev. Immunol.* 15:405-31.
- Riener MO, Wild PJ, Soll C et al. (2009). Frequent Expression of the novel antigen MAGE-C2/CT10 in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer.* 124: 352-357.
- Ries J, Schultze-Mosgau S, Neukam F, Diebel E, and Wiltfang J (2005). Investigation of the expression of melanoma antigen-encoding genes (MAGE-A1 to -A6) in oral squamous cell carcinomas to determine potential targets for gene-based cancer immunotherapy. *Int J Oncol* 2005. 6:817-24.
- Robert-Koch-Institut (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.(Hrsg.) (2008). *Krebs in Deutschland 2003-2004. Häufigkeiten und Trends.* 6. überarbeitete Auflage. Berlin.
- Rocco JW, Sidransky D (2001). p16 (MTS1/CDKN2/INK4A) in cancer progression. *Exp Cell Res.* 264: 42-55.
- Rosenberg PS, Socie G, Alter BP, and Gluckman E (2005). Risk of head and neck squamous cell cancer and death in patients with Fanconi anemia who did and did not receive transplants. *Blood.*105:67-73.
- Sahin U, Türeci Ö, Pfreundschuh M (1997). Serological identification of human tumor antigens. *Current opinion in immunology.* 9: 709-716.
- Sahin U, Türeci O, Schmitt H et al. (1995). Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc Natl Acad Sci USA.* 5;92(25):11810-3.
- Sakaguchi S (2000a). Animal models of autoimmunity and their relevance to human disease. *Curr. Opin. Immunol.* 12: 684-690.
- Sakaguchi S (2000b). Regulatory T-cells: Key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell* 101, 455-458
- Scanlan MJ, Simpson AJ, and Old LJ (2004). The cancer/testis genes: review, standardization, and commentary. *Cancer Immun.* 4:1.
- Seder RH, Vaughan CW, Oh SK, Keggins JJ, Hayes JA, Blanchard GC, Vincent ME, and Katz AE (1987). Tumor regression and temporary restoration of immune response after plasmapheresis in a patient with recurrent oral cancer. *Cancer.* 60:318-25.

- Sharma P, Shen Y, Wen S, Bajorin DF, Reuter VE, Old LJ, Jungbluth AA (2006). Cancer-testis antigens: expression and correlation with survival in human urothelial carcinoma. *Clin Cancer Res.* 12:5442-7.
- Shi YY, Wang HC, Yin YH, Sun WS, Li Y, Zhang CQ, Wang Y, Wang S, and Chen WF (2005). Identification and analysis of tumour-associated antigens in hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer.* 92:929-34.
- Simpson AJ, Caballero OL, Jungbluth A, Chen Y-T, Old LJ (2005). Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nature rev.* 5:1-11.
- Smith BD, Smith GL, Carter D, Sasaki CT, Haffty BG (2000). Prognostic significance of vascular endothelial growth factor protein levels in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 18:2046-52.
- Smyth MJ, Godfrey DI, Trapani JA (2001). A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nature Immunology.* Vol 2, 4:293-301.
- Song DW et al. (2008). Detection of MAGE and SSX Gene Expression in Head and neck cancer. *Clinical and experimental otorhinolaryngology.* Vol 1, 2: 97-102.
- Stockert E, Jäger E, Chen Y-T, Scanlan MJ, Gout I, Karbach J, Arand M, Knuth A, and Old LJ (1998). A survey of the humoral immune response of cancer patients to a panel of human tumor antigens. *J. Exp. Med.* 187:1349-54.
- Stupp R, Vokes EE (2003). Kopf- und Halstumoren. In: *Therapiekonzepte Onkologie.* Seeber S, Schütte J (Hrsg). 4. Auflage. Springer Verlag. Berlin Heidelberg New York. S. 562-605.
- Tataka RJ, Krishnan N, Rao RS, Fakih AR, Gangal SG (1989). Lymphokine-activated killer-cell function of lymphocytes from peripheral blood, regional lymph nodes and tumor tissues of patients with oral cancer. *Int J Cancer.* 43:560-566.
- Thomas DW, Seddon SV, and Shepherd JP (1993). Systemic immunosuppression and oral malignancy: a report of a case and review of the literature. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 31:391-3.
- Thurner B, Haendle I, Roder C et al. (1999). Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte,-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T-cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. *J Exp Med.* 190:1669-78.

- Türeci O, Sahin U, Zwick K, Koslowski M, Seit G and Pfreundschuh M (1998a). Identification of a meiosis-specific protein as a member of the class of cancer/testis antigens. *Proc Natl Acad Sci. USA* 95:5211-5216.
- Türeci O, Chen YT, Sahin U, Gure AO, Zwick C, Villena C, Tsang S, Seitz G, Old LJ, and Pfreundschuh M (1998b). Expression of SSX genes in human tumors. *Int J Cancer*. 77:19-23.
- Türeci Ö, Sahin U, Koslowski M, Buss B, Bell Carolin, Ballweber P, Zwick C, Eberle T, Zuber M, Villena H C, Seitz G, Pfreundschuh M (2002). A novel tumour associated leucine zipper protein targeting to sites of gene transcription and splicing. *Oncogene*. 21:3879-3888.
- Tuyns AJ, Esteve J, Raymond L et al. (1988). Cancer of the larynx/hypopharynx, tobacco and alcohol: IARC international case control study in Turin and Varese (Italy), Zaragoza and Navarra (Spain), Geneva (Switzerland) and Calvados (France). *Int J Cancer*. 41: 483-91.
- Van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Boon T et al. (1991). A gene encoding an antigen recognized by T-lymphocytes on a human melanoma. *Science*. 254 (5038):1643-7.
- Van Der Bruggen P, Zhang Y, Chaux P, Stroobant V, Panichelli C, Schultz ES, Chapiro J, Van Den Eynde BJ, Brasseur F, Boon T (2002). Tumorspecific shared antigenic peptides recognized by human T-cells. *Immunol Rev*. 188:51-64
- Van der Bruggen P, Van den Eynde B (2006). Processing and presentation of tumor antigens and vaccination strategies. *Current opinion in Immunology*. 18;98-104.
- Vinjeis P, Alavanja M, Buffler P (2004). Tobacco and cancer: recent epidemiological incidence. *J Natl Cancer Inst*. 96: 99-106.
- Wang Y, Han KJ Pang XW et al. (2002). Large scale identification of human hepatocellular carcinoma-associated antigens by autoantibodies. *J Immunol*. 169:1102-9.
- Wang Z, Zhang Y, Mandal A, Zhang J, Giles FJ, Herr JC and Lim SH (2004). The spermatozoa protein, SLLP1, is a novel cancer-testis antigen in hematologic malignancies. *Clin Cancer Res*.10:6544-50.
- Weber J et al. (1994). Expression of the MAGE-1 Tumour antigen is upregulated by demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Res*. 54: 1766-1771.

- Wolf GT, Hudson JL, Peterson KA, Miller HL, and McClatchey KD (1986). Lymphocyte subpopulations infiltrating squamous carcinomas of the head and neck: correlations with extent of tumor and prognosis. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 95:142-52.
- Xu HP, Yuan L, Shan J, Feng H (2004). Localization and expression of TSP50 protein in human and rodent testes. *Urology.* 64:826-832.
- Young MR (2004). Trials and tribulations of immunotherapy as a treatment option for patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Immunol Immunother.* 53:375-82.
- Young MR, Agada FO, Alhamarneh O, Stafford ND, Greenman J (2009). Immunotherapy in head and neck cancer: current practice and future possibilities. *The journal of Laryngology and Otology.* 123:19-28.
- Young MR, Neville BW, Chi AC (2007). Oral premalignant lesions induce immune reactivity to both premalignant oral lesions and head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother.* 56:1077-1086.
- Zafir-Lavie I, Michaeli Y, Reiter Y (2007). Novel antibodies as anticancer agents. *Oncogene.* 26;3714:33.

TABELLEN

Tabelle 6: Statistik: Korrelation von Patientencharakteristika und Tumorklassifikation mit der Anzahl exprimierter CT-Antigene der Gruppe 4

Merkmalsgruppe	Anzahl der Patienten pro Merkmalsgruppe	Anzahl der pro Patient exprimierten CT-Antigene	
Gesamtzahl	51	2.2 (1.5)	
Alter			p=0.62
<60 Jahre	21	2.1 (1.6)	
≥60 Jahre	30	2.3 (1.3)	
Geschlecht			p=0.49
Männlich	41	2.2 (1.5)	
Weiblich	10	2.5 (1.3)	
Lokalisation des Tumors			p=0,45
Mundhöhle	12	2.3 (1.7)	
Oropharynx	8	2.0 (1.1)	
Hypopharynx	7	3.3 (1.4)	
Larynx	16	2.0 (1.4)	
Tonsille	5	1.8 (1.8)	
CUP	3	2.0 (1.0)	
Primärtumor/Rezidiv/CUP			p=0,86
Primärtumor	40	2.3 (1.4)	
Rezidiv (keine Klassifikation)	8	2 (1.8)	
CUP (kein pT und kein AJCC Stadium)	3	2 (1.0)	
pT Status			p=0,98
pT ₁	11	2.3 (1.6)	
pT ₂	7	2.4 (1.3)	
pT ₃	9	2.3 (1.8)	
pT ₄	14	2.1 (1.3)	
T unbekannt	10	2.1 (1,6)	
pN status			p=0,70
pN ₀	16	2.2 (1.3)	
pN ₁	7	2.0 (0.8)	
pN ₂	17	2.1 (1.7)	

pN ₃	4	3.3 (0.5)	
N unbekannt	7	2.1(1,9)	
AJCC Stadium			p=0,79
I	4	2.8 (1.5)	
II	8	2.4 (1.3)	
III	5	1.6 (1.1)	
IV	26	2.3 (1.6)	
AJCC Stadium unbekannt	8	2.0 (1.8)	
Grading			p=0.10
Gut differenziert (G1-2)	2	0.0 (0.0)	
Mäßig differenziert (G2)	34	2.4 (1.4)	
Schlecht differenziert (G2-3)	11	1.9 (1.3)	
Grading unbekannt	4	2.8 (1.5)	

Insgesamt 51 Patienten mit HNSCC wurden nach ihren klinischen Eigenschaften und nach den pathologischen Merkmalen ihrer Tumoren in Merkmalsgruppen eingeteilt. Die Anzahl der pro Merkmalsgruppe exprimierten tumorspezifischen CT-Antigene der Gruppe 4 werden als Mittelwert angegeben, die Standardabweichung steht in Klammern.

Die p-Werte für die Korrelationen des Geschlechts und des Alters mit der Anzahl der exprimierten CT-Antigene wurden mit Hilfe des T-Tests mit unabhängigen Variablen bestimmt, die Korrelationen zwischen den pathologischen Merkmalen der Tumoren mit der Anzahl der exprimierten CT-Antigene wurden mittels Varianzanalysen berechnet.

Tabelle 7: Primersequenzen, Annealing Temperaturen und Genproduktlängen der untersuchten CT-Antigene

Gene	Primersequenz		Temp. (°C)	Länge (bp)
MAGEC2	For:	5'-CGG ATC GAA GGC ATT TGT GAG-3'	55	884
	Rev:	5'- GTG AAC TCA CGG GCT CTC TTG AG-3'		
MAGEA3	For:	5'- GAA GCC GGC CCA GGC TCG-3'	60	423
	Rev:	5'- GAA GTC CTC ATA GGA TTG GCT-3'		
MAGEC1	For:	5'-GACGAGGATCGTCTCAGGTCAGC-3'	60	631
	Rev:	5'-ACATCCTCACCTCAGGAGGG-3'		
NY-ESO1	For:	5'-CAG GGC TGA ATG GAT GCT GCA GA-3'	60	332
	Rev:	5'-GCG CCT CTG CCC TGA GGG AGG-3'		
SSX1	For:	5'-CTA AAG CAT CAG AGA AGA GAA GC-3'	60	421
	Rev:	5'-AGA TCT CTT ATT AAT CTT AGA AA-3'		
SSX2	For:	5'-GTG CTC AAA TAC CAG AGA AGA TC-3'	60	434
	Rev:	5'-TTT TGG GTC CAG ATC TCT CGT G-3'		
BAGE	For:	5'-TGG CTC GTC TCA CTC TGG-3'	60	285
	Rev:	5'-CCT CCT ATT GCT CCT GTT G-3'		
GAGE1	For:	5'-GAC CAA GAC GCT ACG TAG-3'	58	243
	Rev:	5'-CCA TCA GGA CCA TCT TC-3'		
SAGE1	For:	5'-GTG ACC CAC CAG TTA CAG TA-3'	57	171
	Rev:	5'-TGT ACC TCT TCA AGC AAA AT-3'		
CTAGE	For:	5'-CCT TAT TGT ACA CTG GGG CTT C-3'	60	600
	Rev:	5'-CAG ACA CAA GGA ACT GAA GTA ACG-3'		
CAGE	For:	5'-GGT GCC GAT ACT CCC ACT AT-3'	60	300
	Rev:	5'-TTG CTT CAG ATT CCC CGT TT-3'		
FTHL17	For:	5'-TGG CCC TGG AGA ACT TCT T-3'	56	297
	Rev:	5'-ATG GTC TTG ACT TGC TCG TG-3'		
TPTE	For:	5'-CCA CAA TGG TCC ACC CAC AAA TG-3'	65	1768
	Rev:	5'-AAC ATG TGG CAG GGT TGG AAA GAA-3'		

AKAP3	For:	5'-CTA ACT TCG GCC TTC CCA GA-'3	60	460
	Rev:	5'-AGT GGG GTT GCC GAT TAC AG-'3		
NY-TLU-57	For:	5'-TCA TAT GCC TAG CTC TGT CAA AAG-'3	60	554
	Rev:	5'-TCC CGG GTC TGG CAT CAA TAA AAT-'3		
SLLP1	For:	5'-AAG CTC TAC GGT CGT TGT GAA CTG-'3	66	387
	Rev:	5'-CTA GAA GTC ACA GCC ATC CAC CCA-'3		
ZNF165	For:	5'-CCC AGA GAG TGG AGA GGA GGC AG-'3	60	425
	Rev:	5'-AAC CTT CAT CCT GGG CAG ACG AG-'3		
SPO11	For:	5'-AAG ATA CAT CGA GGA AGA TGG-'3	60	676
	Rev:	5'-CTC TGG CAA TCA GAG TTC TTC-'3		
HOM- TES-85	For:	5'-GGA GAG GCT ACT CAA GAT GCA GAA GC-'3'	57	1228
	Rev:	3'-GTT CAG CTG CCC AAA GAT ACA TCT ACC-'3'		
ADAM2	For:	5'-AGG AAT TAT GAA ACC ACT TG-'3'	60	369
	Rev:	5'-GAC AAC AGT TGT ATC AGA CC-'3'		
LIP1	For:	5'-ACA AGA CTA GCT TAT GTG TGG-'3'	60	325
	Rev:	5'-TTG AGC AAG AAT CTT TGA CTT C-'3'		
LDHC	For:	5'-TGC CGT AGG CAT GGC TTG TGC-'3'	60	823
	Rev:	5'-CAA CAT CTG AGA CAC CAT TCC-'3'		
SCP1	For:	5'-GTA CAG CAG AAA GCA AGC AAC TGA ATG-'3'	55	564
	Rev:	5'-GAA GGA ACT GCT TTA GAA TCC AAT TTC C-'3'		
GAPDH	For:	5'-TGA TGA CAT CAA GAA GGT GG-'3'	60	246
	Rev:	5'-TTT CTT ACT CCT TGG AGG CC-'3'		

Tabelle 8: Reagenzien und Geräte

Reagenzien	
Reagenz	Hersteller
RNA Later	Ambion, Austin, Texas, USA
Guanidinium Thiocyanat	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Cäsium Chlorid	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
TE Puffer	Qiagen GmbH, Hilden
100% Ethanol	Merck
70% Ethanol	Merck
3M Natrium Azetat	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Puffer	Promega, Mannheim
Random Primer	Invitrogen, Karlsruhe
dNTPs (dATP, dGTP, dUTP, dCTP)	Invitrogen, Karlsruhe
AMV Reverse Transkriptase	Promega, Mannheim
AmpliAq Gold	Perkin Elmer, Weiterstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
cDNA aus gesundem menschlichen Hodengewebe	Ambion, Austin, Texas, USA
KLH Protein (Keyhole limpet Hemo-cyanin)	Sigma München
PBS (Phosphatpuffer)	Invitrogen
PBS-T (0,2% Tween in PBS)	PBS: Invitrogen Tween: Sigma-Aldrich
AP(Alkalische Phosphatase) konjugierter anti-humaner Ziegen IgG	Southern Biotech, Birmingham, AL
P-Nitrophenyl-Phosphat (p-NPP)	Southern Biotech, Birmingham, AL
PCR Marker	Invitrogen

Geräte	
Gerät	Hersteller
Ultrazentrifuge	Beckmann
CCD (Charge coupled device) Kamera	Kamera: Appligene UV-Tisch: Transilluminator von Stratagene
Eppendorf Master Cycler	Firma Eppendorf, Hamburg
ELISA Lesegerät	SLT Laborinstrumente, Salzburg
SPSS Software	SPSS Inc., Chigaco, IL

Tabelle 9: HNSCC Zelllinien

Bezugsquelle: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

HNSCC Zelllinien
RPMI2650
SW579
FADU
UMSCC
HT1-7
Cal-27
Cal-33
HN
BHY

Tabelle 10: Rekombinante Proteine

Protein	Bezugsquelle
NY-ESO-1	Ludwig Institute for Cancer Research, NY
SSX2	Ludwig Institute for Cancer Research, NY
MAGEA3	Glaxo Smith Kline

Patientenaufklärung und Einverständniserklärung
Zur Untersuchung von Tumorgewebe, gesundem Gewebe und Blut

Für das Forschungsprojekt:
**Die Expression von Cancer-Testis-Antigenen in Kopf-Hals-
Plattenepithelkarzinomen als mögliche Zielstrukturen für eine
antigen-spezifische Immuntherapie**

Vorname, Name und Geburtsdatum des Patienten bzw. Patientenaufkleber

Patienteninformation

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

bei Ihnen soll eine Operation an einem Kopf-Hals-Tumor durchgeführt werden. Für ein Forschungsprojekt möchten wir Sie bitten, eine Probe aus dem während der Operation entfernten Tumorgewebe, eine gesunde Gewebeprobe von maximal 3mm Durchmesser aus dem an den Tumor angrenzenden Gewebe und eine Blutprobe entnehmen zu dürfen.

Es steht mittlerweile fest, dass das Immunsystem einen Einfluss auf die Entstehung und den Verlauf vieler Erkrankungen, einschließlich bösartiger Tumoren, hat. Wir möchten anhand der Ihnen entnommenen Tumorproben untersuchen, ob das Tumorgewebe genetische Merkmale aufweist, die vom Immunsystem als „fremd“ erkannt werden. Das gesunde Gewebe soll auf dieselben Merkmale getestet werden, um festzustellen inwiefern es sich vom Tumorgewebe unterscheidet.

Außerdem möchten wir ermitteln, ob Ihr Immunsystem bereits auf das mögliche Vorhandensein „fremder“ Strukturen aufmerksam geworden ist. Hierzu möchten wir Sie um eine zusätzliche Blutprobe (20 ml) bitten, die im Rahmen der routinemäßig entnommenen Blutproben mit gewonnen werden kann.

Um künftig bei Patienten, die an einem ähnlichen Leiden wie Sie erkrankt sind, Therapieentscheidungen noch besser treffen zu können, aber auch, um an Ihrem Material vielleicht später neue Erkenntnisse zu gewinnen, möchten wir Sie um Zustimmung bitten, dass diese Gewebe- und Blutproben asserviert, d. h. aufbewahrt, und später gesondert untersucht werden kann. Das Gewebe- und Blutmaterial wird im Forschungslabor der II. Medizinischen Klinik des UKE

in Hamburg aufbewahrt. Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung werden die Tumorproben und die gesunden Gewebeprobe auf das Vorliegen bestimmter Gene hin untersucht werden, die Tumoren für das menschliche Immunsystem erkennbar und damit angreifbar machen. Die Blutproben sollen daraufhin untersucht werden, ob eine solche durch Antikörper- oder Immunzellen vermittelte Anti-Tumor-Antwort bereits vorliegt.

Durch diese zusätzlichen Untersuchungen entstehen für Sie keine Unannehmlichkeiten bzw. Aufwendungen. Außerdem birgt die zusätzliche Entnahme von einer maximal 3mm durchmessenden gesunden Gewebeprobe keine Risiken. Es handelt sich bei dem hier beschriebenen Projekt um ein reines Forschungsprojekt und nicht um eine klinische Studie. Falls im Rahmen eines späteren Forschungsprojekts anhand Ihrer Gewebe- und Blutproben klinische Daten notwendig sind, bitten wir schon jetzt um Ihre Zustimmung, die klinischen Daten Ihres Krankheitsverlaufs zu erheben. Diese Daten werden pseudonymisiert, d. h. es erfolgt das Ersetzen des Namens und anderer Identifikationsmerkmale (z. B. Geschlecht) durch eine spezielle Kennzeichnung zu dem Zweck, die Bestimmung des Betroffenen auszuschließen oder wesentlich zu erschweren. Diese Maßnahme dient dazu, die Kenntnisnahme der klinischen Daten und der Materialdaten durch Dritte ohne Ihre Einwilligung auszuschließen. Die Untersuchungsergebnisse können in medizinischen Fachzeitschriften veröffentlicht werden, allerdings ohne Offenlegung Ihrer persönlichen Daten. Bei der Verarbeitung Ihrer personenbezogenen Daten werden die Bestimmungen des Bundesdatenschutzgesetzes eingehalten werden.

Die geplanten Untersuchungen werden ausschließlich in der II. Medizinischen Klinik des UKE durchgeführt. Eine Weitergabe an Dritte ist nur in Ausnahmefällen vorgesehen. Diese Ausnahmefälle liegen vor, wenn bestimmte wissenschaftliche Methoden nur in entsprechenden Speziallabors durchgeführt werden können. In diesem Fall werden die Daten pseudonymisiert, d. h. die personenbezogenen Daten werden so verändert, dass die Einzelangaben über persönliche und sachliche Verhältnisse nicht mehr oder nur mit einem unverhältnismäßig großen Aufwand an Zeit, Kosten, Arbeitskraft einer bestimmten oder bestimmbarer natürlichen Personen zugeordnet werden können.

Sollten andere Forschungslaboratorien oder Universitätskliniken sich an gemeinsamen Forschungsprojekten beteiligen, so werden die von uns bei Ihnen erhobenen Daten, insbesondere die klinischen Daten, ebenfalls nur in pseudonymisierter Form weitergegeben.

Aus diesem Grunde bitten wir Sie, diese Aufklärung durch Ihre Unterschrift zu bestätigen. Für eine ggf. sich ergebende Fragestellung, die nicht im Zusammenhang mit Ihrer derzeitigen Grunderkrankung steht, würden wir Sie gesondert kontaktieren und um Ihre Zustimmung bitten.

Über die konkreten Ergebnisse der jeweiligen Begleituntersuchungen werden Sie nicht gesondert informiert. Die Informationen aus diesen Untersuchungen werden erst bei künftig zu behandelnden Patienten, die an der gleichen Erkrankung wie Sie leiden, verwendet werden können. Selbstverständlich besteht jedoch die Möglichkeit, dass Ihnen auf Anfrage die Ergebnisse der Untersuchung mitgeteilt werden. Sollten die Daten jedoch vollständig anonymisiert werden, schließt das auch eine Information über Untersuchungs-

ergebnisse Ihnen gegenüber aus. Die gesammelten Untersuchungsergebnisse werden getrennt von Ihrer Patientenakte aufbewahrt.

Ihre Zustimmung zur Untersuchung des Gewebe bzw. Blutmaterials ist vollkommen freiwillig und kann von Ihnen jederzeit widerrufen werden. In diesem Falle erfolgt die Löschung all Ihrer gespeicherten Daten und die Vernichtung vorhandenen Gewebe- und Blutmaterials. Dieser Widerruf muss schriftlich erfolgen.

Ihre Zustimmung zur Untersuchung Ihres Gewebes und Ihres Bluts ist unabhängig von Ihrer ggf. vorliegenden Zustimmung zur Teilnahme an einer Therapiestudie.

**Einverständniserklärung zur
Untersuchung von Tumorgewebe und gesundem Gewebe sowie Blut
(einschl. genetischer Untersuchung)**

**Für das Forschungsprojekt:
Die Expression von Cancer-Testis-Antigenen in Kopf-Hals-
Plattenepithelkarzinomen als mögliche Zielstrukturen für eine
antigen-spezifische Immuntherapie**

**Vorname, Name und Geburtsdatum des
Patienten bzw. Patientenaufkleber**

Ich willige ein, dass Tumorgewebe und eine maximal 3mm durchmessende Probe gesunden Gewebes, die im Rahmen einer medizinisch indizierten Operation meines Kopf-Hals-Tumors gewonnen wurde, und eine Blutprobe von mir zu Forschungszwecken verwendet werden, die ausschließlich im Zusammenhang mit meiner o. g. Erkrankung stehen.

Ich weiß, dass die im Rahmen dieser Studie erhobenen Daten und persönlichen Mitteilungen der ärztlichen Schweigepflicht unterliegen und zur Verarbeitung und Auswertung nur ohne meinen Namen (pseudonymisiert) zusammengeführt werden dürfen. Ich weiß, dass die Untersuchungsergebnisse in medizinischen Fachzeitschriften veröffentlicht werden können, allerdings ohne Offenlegung meiner persönlichen Daten. Ich wurde darüber aufgeklärt, dass bei der Verarbeitung meiner personenbezogenen Daten die Bestimmungen des Bundesdatenschutzgesetzes eingehalten werden.

Ich versichere, dass ich die Patientenaufklärung sorgfältig gelesen und sie verstanden habe und dass ich keine weiteren Fragen habe.

Ort / Datum (Eigenhändig unterzeichnet: Name, Datum und Unterschrift) Patientin/Patient

Ort / Datum (Eigenhändig unterzeichnet: Name, Datum und Unterschrift) Aufklärende(r)
Ärztin/Arzt

DANK

An **Dr. med. Djordje Atanackovic** für die fachlich kompetente Betreuung dieser Arbeit und seine ansteckende Begeisterung für die Tumorimmunologie.

An **Katrin Bartels** für die strukturierte Anleitung und die große Geduld bei der Begleitung meiner Laborarbeiten.

An **Dr. med. Yanran Cao** und **Dr. med. Julia Arfsten** für Hilfen im Labor und bei der Gliederung der schriftlichen Arbeit.

An **Dr. rer. pol. Christine zu Eulenburg** vom Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie für die Hilfe bei den statistischen Berechnungen.

An **Dr. med. Jörg Wohlleben** für das Korrekturlesen und die Ermutigungen.

An meinen Vater, **Dr. rer. nat. Roger Blum**, der mich für das Medizinstudium und zu dieser Arbeit motiviert hat und dessen früherer Krebstod mich hoffen lässt, dass Tumorimpfungen bald erfolgreich sind.

CURRICULUM VITA

Inga Doris Blum

17.10.1979 Geboren in Hamburg

Nationalität	Deutsch
Familienstand	Ledig

Schulische und berufliche Ausbildung

1999	Abitur in Hamburg
1999-2000	Soziales Jahr in Kamerun
2001-2007	Medizinstudium an der Universität Hamburg
01-06/2008	Werkauftrag am Zentrum für Naturwissenschaft und Friedensforschung der Universität Hamburg
Seit 09/2008	Assistenzärztin in der Facharztweiterbildung Neurologie an der Asklepios Klinik Harburg in Hamburg
2004-2011	Dissertation im Onkologischen Zentrum des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

ERKLÄRUNG

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.