

Aus dem
CharitéCentrum 14 - Tumormedizin
Klinik für Innere Medizin mit Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie und
Tumorimmunologie
Campus Benjamin Franklin
Ärztlicher Leiter: Univ.-Prof. Dr. med. Antonio Pezzutto

Habilitationsschrift

Immun-Escape-Mechanismen bei Tumoren und ihre Bedeutung für Prognose und Entwicklung immuntherapeutischer Therapieansätze

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Innere Medizin mit Schwerpunkt Hämatologie und Internistische Onkologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

**Dr. med. Antonia Busse
aus Göttingen**

Eingereicht: März 2017

Dekan: Professor Dr. med. A. R. Pries

1. Gutachter: Prof. Dr. Peter Brossart, Bonn

2. Gutachterin: Prof. Dr. Marion Subklewe, München

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG	1
1.1 Interaktion von Immunsystem und Tumoren: Das Konzept des „Immunoeditings“	1
1.2 Zelluläre Immunantwort gegen Tumore	2
1.3 T-Box Transkriptionsfaktoren T-bet und Eomesodermin	4
1.4 Prozessierung von MHC-Klasse-I-Epitopen durch das Proteasom	5
1.5 Tumorantigene	7
1.6 T-Zell-basierte Immuntherapie	7
1.7 Immun-Escape-Mechanismen von Tumoren	8
1.8 Zielgerichtete Therapie zur Behandlung des metastasierten Nierenzellkarzinoms	11
1.8.1 Sorafenib	12
1.9 Adjuvante Therapie mit Interferon α zur Behandlung des lokal fortgeschrittenen Melanoms	13
1.9.1 Immunmodulatorische Aktivität von Interferon α	14
2 FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG	15
3 EIGENE ARBEITEN	17
3.1 Der embryonale Transkriptionsfaktor WT1 als therapeutisches Target bei der akuten lymphatischen Leukämie (ALL)	17
3.2 Immun-Escape durch Antigenverlust und durch Defekte in der Antigenprozessierung und -präsentation	25
3.2.1. Verlust der Expression oder Mutation von WT1 sind nicht Ursache für Rezidive nach Induktion einer WT1-spezifischen T-Zell-Antwort durch Impfung	25
3.2.2 Die Zusammensetzung der Proteasomen variiert in B-Zell-Neoplasien und soliden Tumoren	31
3.2.3 Tumorsphären entgehen der T-Zell-vermittelten Immunantwort durch Herunterregulation von HLA-Molekülen	44
3.3 Immun-Escape durch Immunmodulation – prognostische Bedeutung beim Nierenzellkarzinom und Melanom	56

3.3.1 Prognostische Bedeutung des Immunphänotyps im peripheren Blut bei Patienten mit metastasiertem Nierenzellkarzinom	56
3.3.2 Prognostische und prädiktive Bedeutung des Immunphänotyps im peripheren Blut bei Melanompatienten unter adjuvanter Therapie mit pegyliertem Interferon alpha	86
4 DISKUSSION	99
4.1 Immun-Escape bei Verwendung Tumor-assoziiertes Antigen als T-Zell-therapeutische Targets	99
4.1.1 Neoantigene versus TAA als Targets für T-Zell-vermittelte Immuntherapie	99
4.1.2 WT1 als Target für T-Zell-vermittelte Immuntherapie	99
4.1.3 Expression von TAA in Tumorsphären	101
4.2 Fehlende Antigenprozessierung und -präsentation als Immun-Escape-Mechanismus	102
4.2.1 Immun-Escape in AML-Patienten nach Vakzinierung mit dem WT1 ₁₂₆₋₁₃₄ -Peptid durch fehlende Prozessierung des WT1 ₁₂₆₋₁₃₄ -Epitopes?	102
4.2.2 Immun-Escape von Tumorsphären durch Verlust der HLA-Oberflächenexpression	104
4.3 Immun-Escape durch Induktion immunsuppressiver Zellen und Expression immunsuppressiver Zytokine	106
4.3.1 Periphere Immundysregulation bei lokal fortgeschrittenem Melanom	106
4.3.2 Peripherer Immunphänotyp als potentieller Biomarker mit prognostischer Bedeutung bei lokalisierter und metastasierter Tumorerkrankung	106
4.3.3 Prognostische und prädiktive Bedeutung des peripheren Immunphänotyps bei mit PEG-IFN α behandelten Hochrisiko-Melanompatienten	108
4.3.4 Prognostische Bedeutung der peripheren Immundysbalance beim metastasierten Nierenzellkarzinom unter zielgerichteter Therapie	109
4.3.5 Immunmodulation durch Tyrosinkinaseinhibitoren – in-vivo-Effekte von Sorafenib beim mRCC	112
4.4 Ausblick: Perspektiven der Immuntherapie in der Ära der Präzisionsmedizin	114
5 ZUSAMMENFASSUNG	117
6 LITERATURVERZEICHNIS	120
DANKSAGUNG	139
ERKLÄRUNG	140

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ADCC	Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität
AICD	Aktivierungs-induzierter Zelltod
ALL	Akute lymphatischer Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
APC	Antigenpräsentierende Zelle
APM	Antigen-Prozessierungs-Maschinerie
ATT	Adoptiver T-Zelltransfer
bp	Basenpaare
CCL5	CC-Chemokin-Ligand 5 (C-C Motif Chemokine Ligand 5)
CD	Cluster of Differentiation
CSC	Tumorstammzellen (cancer stem cells)
CTA	Cancer-Testis-Antigen
CTL	Zytotoxischer T-Lymphozyt
CTLA-4	Cytotoxic Lymphocyte Antigen-4
CXCL10	CXC-Ligand 10 (C-X-C Motif Chemokine Ligand 10)
DC	Dendritische Zelle
DMFS	Fernmetastasenfreies Überleben
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
Eomes	Eomesodermin
EORTC	European Organization for Research and Treatment of Cancer
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FAB	French-American-British (cooperative group Klassifikation)
Flt3	FMS-like tyrosine kinase 3
FoxP3	Forkhead-Box-Protein P3
GITR	Glucocorticoid-Induced Tumor Necrosis Factor Receptor
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierende Faktor
HLA	Histokompatibilitätsantigen (Human Leukocyte Antigen)
HR	Hazard Ratio
iTreg	Induzierte regulatorische T-Zellen
ICOS	Inducible T-cell Costimulator
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IFN	Interferon

ISG	Interferon stimuliertes Gen
JAK	Januskinase
IL	Interleukin
Kb	Kilobasen
mRCC	metastasiertes Nierenzellkarzinom
mRNA	Boten-RNA
MDSC	myeloide Suppressorzellen
MDS	Myelodysplastischem Syndrom
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MSKCC	Memorial Sloan-Kettering Cancer Center
mTOR	Mechanistic Target of Rapamycin
nTreg	natürliche regulatorische T-Zellen
NFκB	Nukleärer Faktor κB
NK	Natürliche Killerzelle
OS	Gesamtüberleben (overall survival)
PAX2	Paired-box-Gen 2
pB	Peripheres Blut
PBMC	Periphere mononukleäre Zellen des Blutes
PD-1	Programmed cell death protein 1
PD-L1	Programmed death-ligand 1
PGE2	Prostaglandin E2
PEG-IFNα-2b	Pegyliertes Interferon alpha-2b
PFS	Progressionsfreies Überleben
PDGFR	Platelet-derived growth-factor receptor
Raf	rapidly accelerated fibrosarcoma
RCC	Nierenzellkarzinom
RFS	Rezidivfreies Überleben
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SOCS	Suppressors of Cytokine Signalling
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TAA	Tumorassoziiertes Antigen
TAM	Tumorassoziierte Makrophagen
TAP	Antigenpeptid-Transporter

T-bet/Tbx21	T-box expressed in T cells / T-box Transkriptionsfaktor TBX21
T _C	Zytotoxische T-Zelle
T _{CM}	Zentrale Gedächtnis-T-Zelle
TCR	T-Zell-Rezeptor
T _E	Effektor-T-Zelle
T _{EM}	Effektor-Gedächtnis-T-Zelle
T _H	T-Helfer-Zelle
T _{FH}	Follikuläre T-Helfer-Zelle
TM	Gedächtnis-T-Zelle
T _N	Naïve T-Zelle
TIL	Tumor-infiltrierender Lymphocyt
TKI	Tyrosinkinaseinhibitoren
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	Regulatorische T-Zelle
TSA	Tumorspezifisches Antigen
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WT1	Wilms-Tumor-Protein

1 EINLEITUNG

1.1 Interaktion von Immunsystem und Tumoren: Das Konzept des „Immunoeditings“

Schon 1909 stellte Paul Ehrlich die Hypothese auf, dass Tumore in vivo zwar spontan entstehen, aber das Immunsystem in der Lage ist, sie zu erkennen und zu bekämpfen (1). In den späten 1950er Jahren stellten Lewis Thomas (2) und MacFarlane Burnet (3) die Theorie der Immunüberwachung (Surveillance) auf. Sie geht davon aus, dass das Immunsystem nicht nur gegen körperfremde Krankheitserreger, sondern auch gegen körpereigene entartete Zellen aktiv ist. Entsprechend dieser Theorie werden spontan auftretende Tumore, sofern sie durch genetische Veränderungen als fremd erkannt werden, durch ständige Überwachung durch das Immunsystem bekämpft; Tumore entstehen somit als Folge eines nicht intakten Immunsystems. Diese Theorie wird nicht nur durch einige Mausmodelle untermauert [Übersicht (4)], sondern könnte auch klinische Beobachtungen erklären wie z. B. Spontanremissionen von Tumoren, natürliche Immunantwort gegen Tumore, prognostische Bedeutung von spezifischen Immunzellinfiltraten in Tumoren oder auch die erhöhte Inzidenz von Tumoren bei Patienten mit Immunschwäche durch AIDS-Erkrankung oder Immunsuppression nach Transplantation (5). Hierbei handelt es sich allerdings vor allem um Virus-assoziierte Tumore, die normalerweise von einem intakten Immunsystem aufgrund der Expression viraler Antigene eher als fremd erkannt werden als nicht Virus-assoziierte Tumore. Nach Transplantation werden aber auch vermehrt epitheliale Tumore beobachtet (6, 7).

Das Immunsystem schützt aber nicht immer vor Tumoren; eine inadäquate Immunantwort kann auch die Entstehung von Tumoren fördern. Dies wurde initial schon von Virchow beschrieben (8-10). Chronische, nicht protektive Inflammation, auch Tumor-induzierte Inflammation, fördert hingegen maligne Transformation und Tumorwachstum. Dvorak et al verglichen Tumore mit einer Wunde, die niemals heilt (11).

Das Immunsystem spielt also eine duale Rolle bei der Interaktion mit Tumoren. Dies wird im Konzept des „Immunoeditings“ beschrieben (4, 12): Die Interaktion des Immunsystems mit Tumoren ist ein dynamischer Prozess, der aus drei Phasen, den „drei Es“ besteht: Elimination, Equilibrium und Escape. Die erste Phase der Elimination repräsentiert das klassische Konzept der Immunüberwachung. In der darauffolgenden Phase des Equilibriums entziehen sich bereits eine Vielzahl von Tumorzellen der Erkennung und Zerstörung durch das Immunsystem, es kommt noch nicht zum Tumorwachstum, jedoch im Verlauf durch das Immunsystem zur Selektion von Tumorzellen mit reduzierter Antigenität und Immunogenität. Diese selektierten Zellen bestimmen letztlich die Phase des Escapes, in der es dann zum

Tumorwachstum durch viele verschiedene, parallel vorhandene, aber auch individuell auftretende Immun-Escape-Mechanismen kommt. Das Immunsystem kontrolliert nun nicht mehr den Tumor, sondern der Tumor das Immunsystem durch Schaffung einer immunsuppressiven Mikroumgebung.

1.2 Zelluläre Immunantwort gegen Tumore

Viele Tumoren weisen eine Infiltration durch eine heterogene Population von Immunzellen wie Makrophagen, B-Zellen, NK-Zellen und T-Zellen auf. Tumorerinfiltrierende CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen konnten in verschiedenen soliden Tumoren nachgewiesen werden, in einigen, aber nicht allen Tumoren, mit positiver prognostischer Bedeutung (13-16). Sowohl den CD8⁺ zytotoxische T-Zellen (T_C-Zellen) (13, 14) als auch den CD4⁺ T-Helfer-Zellen (T_H-Zellen) (17) wird eine wesentliche Rolle bei der Anti-Tumor-Immunantwort zugeschrieben. Grundsätzlich spielen aber sowohl Zellen des adaptiven Immunsystems als auch des angeborenen Immunsystems eine Rolle bei der Immunüberwachung. Sie ist ein multivariabler Prozess, beeinflusst von Tumorursprung, Immunogenität und Mikroenvironment (4).

CD8⁺ T-Zellen erkennen Peptidfragmente von endogenen Antigenen, die auf der Zelloberfläche durch Proteine des Haupthistokompatibilitätskomplexes der Klasse I (major histocompatibility complex class I, MHC-I) präsentiert werden. Bindet eine CD8⁺ T-Zelle mit Hilfe des T-Zell-Rezeptors (TCR) an einen Peptid-MHC-I-Komplex, und wird das präsentierte Epitop als „fremd“ erkannt, kommt es zur Aktivierung der T-Zelle. Die Peptide, sogenannte Epitope, werden durch das Proteasom und extraproteasomale Proteasen im Zytosol erzeugt und in das endoplasmatische Retikulum (ER) von Antigenpeptid-Transportern (TAPs, transporters associated with antigen presentation) transportiert. Dort binden sie an MHC-I-Moleküle. Diese Komplexe werden dann an die Zelloberfläche transportiert (18).

T_H-Zellen erkennen mit ihrem TCR Peptide, die von MHC-Klasse-II (MHC-II)-Molekülen auf professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APCs) wie z. B. B-Zellen, Makrophagen oder dendritischen Zellen (DCs), präsentiert werden (19). Nach Endozytose werden exogene Antigene im sauren Milieu der Endosomen zu Peptiden degradiert, die im Austausch gegen die invariante Kette, assistiert vom humanen Leukozytenantigen DM (HLA-DM), in MHC-II-Moleküle eingelagert und mit ihnen an die Zelloberfläche transportiert werden (20, 21).

CD4⁺ T_H-Zellen werden unterteilt in T_H1, T_H2 und regulatorische T-Zellen. Weitere Subtypen wie T_H17 Zellen, folliculäre T-Helfer-Zellen (T_{FH}), T_H9-Zellen und T_H22-Zellen sind teilweise beschrieben (19, 22). Nach Interaktion mit dem MHC-II-Peptidkomplex wird die Differenzierung vorwiegend durch das Zytokinmilieu in der unmittelbaren Umgebung reguliert (22). Die Polarisierung von T_H1-Zellen aus T_H0-Zellen wird von Interleukin (IL) 12 und

Interferon (IFN) γ gesteuert (19, 22, 23). T_H1 -Zellen produzieren vor allem IFN γ , IL2, Tumornekrosefaktor (TNF) α und Lymphotoxin (19) und fördern die pro-inflammatorische Zell-vermittelte Immunität und regen zudem B-Lymphozyten zur Bildung von opsonierenden Antikörpern an (14, 24, 25). Die T_H2 -Zellen entstehen aus T_H0 -Zellen unter der Einwirkung von IL4 (19, 22, 23). Sie produzieren IL4, IL5, IL6, IL10 und IL13 und fördern die humorale Immunität (19, 22). Durch Sekretion von IL4 und IL10 bremsen sie die inflammatorische Immunantwort und Entwicklung von T_H1 -Zellen. Außerdem hemmen die T_H2 -Zellen über IL4 die Aktivierung von Makrophagen und über IL10 die Bildung von IFN γ in T-Zellen und Makrophagen.

T_H17 -Zellen sind charakterisiert durch die Produktion von IL17 und können Tumorprogression sowohl fördern als auch bekämpfen (14).

$CD8^+$ T-Zellen können ebenso analog zu $CD4^+$ T-Zellen in T_C1 -, T_C2 - und T_C17 T-Zellen mit den charakteristischen Zytokinprofilen differenzieren (26).

Entsprechend ihres funktionellen Status können T-Zellen in naive T-Zellen (T_N), Effektor-T-Zellen (T_E) - und Gedächtnis (Memory)-T-Zellen (T_M) unterteilt werden (19). Nach Aktivierung durch Kontakt mit dem MHC-Komplex differenzieren T_N -Zellen schnell in T_E -Zellen, die entsprechend ihres Zytokinprofils, wie oben beschrieben, unterschieden werden können (19). Im Gegensatz zu T_N -Zellen benötigen sie keine kostimulatorischen Moleküle mehr. In der Kontraktionsphase, d.h. nach effektiver Kontrolle des Pathogens, stirbt die Mehrheit der T_E -Zellen durch Aktivierungs-induzierten Zelltod („activation induced cell death“, AICD) ab (27). T-Zellen, die die Kontraktionsphase überleben, entwickeln sich zu T_M -Zellen (27-30). Sie vermitteln Langzeitimmunität. In einigen Tumoren ist der Nachweis intratumoraler T_M -Zellen mit besserem Überleben und geringerer Metastasierung assoziiert (24, 31).

Basierend auf der Expression von Aktivierungsmarkern, Chemokin- und Homing-Rezeptoren, der Proliferationskapazität und der Effektorfunktion können $CD4^+$ und $CD8^+$ T_M -Zellen in $CD44^{high}CD45R0^+CD45RA^-CD62L^+CCR7^+$ zentrale Gedächtnis (Central Memory)-T-Zellen (T_{CM}) und $CD44^{high}CD45R0^+CD45RA^+CD62L^-CCR7^-$ Effektor-Gedächtnis (Effector Memory)-T-Zellen (T_{EM}) unterteilt werden (32-35). T_{CM} -Zellen migrieren zu lymphatischen Organen aufgrund der Expression von CCR7 und CD62L und haben bei reduzierter zytotoxischer Aktivität keine unmittelbare Effektorfunktion. T_{CM} -Zellen können nach erneutem Kontakt mit dem ursprünglichen Antigen schnell proliferieren, sezernieren IL12 und differenzieren in T_E -Zellen. T_{EM} -Zellen haben ein hohes zytotoxisches Potential, wandern in periphere Gewebe und produzieren Zytokine wie IFN γ und zytotoxische Moleküle. $CD4^+$ und $CD8^+$ T_M -Zellen benötigen für ihre Homeostase die Zytokine IL7 und IL15, jedoch keine MHC-Interaktionen (32-34).

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sind wichtige Effektorzellen des angeborenen (innate) Immunsystems. Sie spielen nicht nur eine Rolle für die Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC), sondern haben auch die Fähigkeit, Zielzellen Antigen- und MHC-unabhängig zu lysieren und durch Sekretion von immunregulatorischen Zytokinen das adaptive Immunsystem zu aktivieren (36). NK-Zellen exprimieren im allgemeinen CD161 und CD56, und sind CD3 negativ. Sie sind jedoch eine heterogene Population. Fünf verschiedene Subtypen sind basierend auf der Dichte der Oberflächenexpression von CD56 und CD16 definiert worden: (1) CD56^{bright}CD16⁻, (2) CD56^{bright}CD16^{dim}, (3) CD56^{dim}CD16⁻, (4) CD56^{dim}CD16^{bright}, (5) CD56⁻CD16^{bright}. Die Mehrheit der peripheren NK-Zellen hat den CD56^{dim} CD16^{bright} Phänotyp (36, 37). Die einzelnen NK-Zell-Subtypen unterscheiden sich in ihrer zytotoxischen Aktivität, Ansprechen auf Zytokinaktivierung und Fähigkeit, Zytokine zu produzieren: CD56^{bright} NK-Zellen produzieren vorwiegend immunregulatorische Zytokine wie IFN γ , TNF α , TNF β , IL10 und IL13 nach Stimulation und haben nur ein geringes zytotoxisches Potential im Gegensatz zu CD56^{dim} NK-Zellen, die ein hohes zytotoxisches Potential besitzen, jedoch nur wenig Zytokine produzieren (36, 37). Des Weiteren unterscheiden sie sich im Migrationsverhalten: CD56^{bright} NK-Zellen exprimieren CCR7 und CD62L und migrieren zu sekundären lymphatischen Organen, während CD56^{dim} NK-Zellen CCR7 und CD62L negativ sind und zum Ort der Inflammation migrieren. Basierend auf den funktionellen und phänotypischen Eigenschaften werden CD56^{bright} NK-Zellen als unreife Vorstufen von differenzierten CD56^{dim} NK-Zellen definiert (36, 37).

1.3 T-Box Transkriptionsfaktoren T-bet und Eomesodermin

Die T-Box-Transkriptionsfaktoren T-bet und Eomesodermin (Eomes) wurden als Schlüsselfaktoren für die Entwicklung und zytolytische Funktion von Immunzellen identifiziert. Sie werden hoch exprimiert in Typ-1-Immunzellen wie T_H1, T_C1 und $\gamma\delta$ T-Zellen sowie NK- und NKT-Zellen. Ihre Expression steigt mit zunehmender Differenzierung der Zellen an, außer in NK-Zellen. Die differenzierten CD56^{dim} NK-Zellen exprimieren weniger Eomes als ihre Vorgänger CD56^{bright} NK-Zellen (38). Das Verhältnis der Expression von Eomes und T-bet beeinflusst, ob CD8⁺ T-Zellen in Gedächtnis- oder Effektorzellen differenzieren (39). Hohe Expression von T-bet begünstigt die Entwicklung von Effektorzellen; bei der Differenzierung in Gedächtniszellen, hingegen sinkt die Expression von T-bet, während die Expression von Eomes ansteigt (38, 40). Die Generierung potenter Gedächtniszellen ist wichtig für eine protektive, langanhaltende Immunantwort (41-43). T-bet und Eomes fördern außerdem die CD8⁺ T-Zell-Differenzierung zu Tc1-Zellen, indem sie die Differenzierung zu Tc17 oder Tc2-Zellen verhindern (44). T-bet scheint ein kritischer Faktor für die Effektorfunktionen von T_H1 T-Zellen und NK-Zellen zu sein, aber nur teilweise für die Effektorfunktionen von Tc1-Zellen erforderlich zu sein. Im Gegensatz dazu spielt Eomes, das

nur schwach in CD4⁺ T-Zellen exprimiert wird, eine zentrale Rolle für die Effektorfunktionen von CD8⁺ T-Zellen (38, 45). Interessanterweise sind T-bet und Eomes wohl nicht entscheidend für die Generierung einer systemischen CTL-Immunantwort gegen Tumore, jedoch für die Tumordinfiltration durch CD8⁺ T-Zellen, indem sie die Expression von Chemokinrezeptoren regulieren (38).

Bei der NK-Zell-Entwicklung spielen T-bet und Eomes komplementäre Rollen. Eomes ist wichtig für die Generierung und Aufrechterhaltung reifer NK-Zellen, während T-bet notwendig ist für die terminalen Differenzierungsschritte (38, 41, 42).

1.4 Prozessierung von MHC-Klasse-I-Epitopen durch das Proteasom

Peptidfragmente von intrazellulären Proteinen, sogenannte Epitope, werden auf der Zelloberfläche durch Proteine des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC, major histocompatibility complex) präsentiert. CD8⁺ T-Zellen erkennen an MHC-I gebundene Epitope. Die Mehrheit der Klasse-I-Epitope wird vom Proteasom und extraproteasomalen Proteasen im Cytosol erzeugt und in das ER von TAP-Transportern transportiert. Dort binden sie an MHC-I-Moleküle und werden dann an die Zelloberfläche transportiert (18).

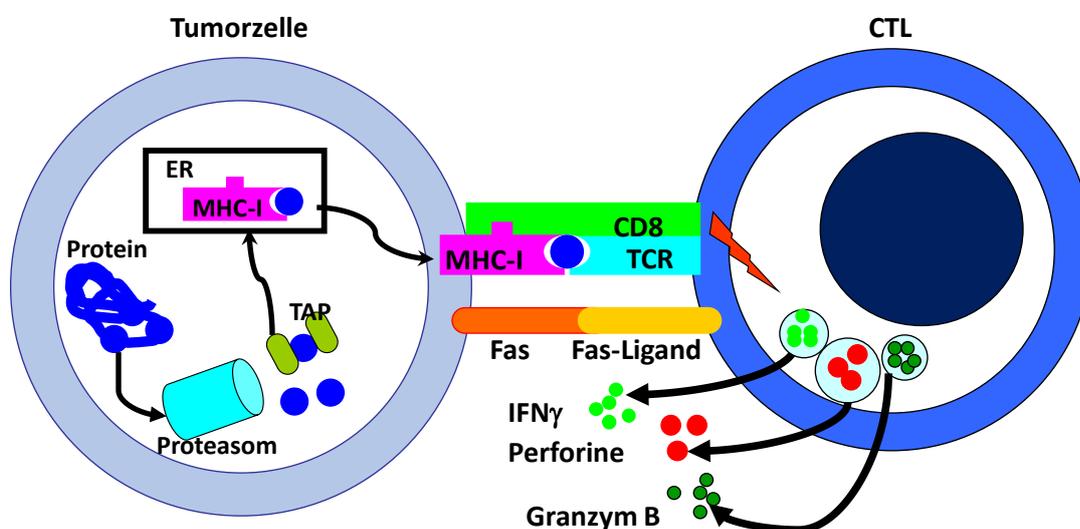


Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung der Prozessierung und Präsentation von MHC-I-Antigenen. CTL, zytotoxische T-Zelle; ER, endoplasmatisches Retikulum; MHC-I, Haupthistokompatibilitätskomplex der Klasse I; TAP, Antigenpeptid-Transporter; TCR, T-Zell-Rezeptor.

Das 26S Proteasom ist ein multikatalytischer Proteasekomplex, der sich aus dem 20S katalytischen Kern und der 19S regulatorischen Untereinheit zusammensetzt. Die proteolytische Aktivität ist im 20S Kern lokalisiert. Drei enzymatisch aktive Untereinheiten sind bekannt: $\beta 5$ mit chymotryptischer Aktivität und einer Schnittpräferenz nach hydrophoben

bzw. aromatischen Resten, $\beta 1$ mit tryptischer Aktivität, d.h. mit Schnittpräferenz nach sauren Resten und Caspase-ähnlicher Aktivität und $\beta 2$ mit einer Trypsin-ähnlichen Aktivität, die nach basischen Resten schneidet. Diese Untereinheiten können durch IFN γ -induzierbare Untereinheiten LMP2 ($\beta 1i$), LMP7 ($\beta 5i$) und MECL-1 ($\beta 2i$) ersetzt werden. Sie bilden dann das Immunoproteasom (46, 47). Das Immunoproteasom ist konstitutiv in professionellen APCs wie z.B. DCs exprimiert (48, 49). Aufgrund der Expression unterschiedlicher katalytischer Untereinheiten unterscheidet sich das Immunoproteasom vom Standardproteasom sowohl quantitativ als auch qualitativ in der Prozessierung, dem proteolytischen Verdau, von Peptiden (50, 51). Die Schnittpräferenzen der Proteasomen wird nicht nur von der unmittelbar an der Schnittstelle vorhanden Aminosäure bestimmt, sondern ist auch abhängig von der die Schnittstelle umgebenden Aminosäuresequenz (52-56). Neben dem Standardproteasom und dem Immunoproteasom existieren aber noch zwei intermediäre Proteasomtypen, die sowohl Standardproteasomuntereinheiten als auch Immunoproteasomuntereinheiten enthalten und sich ebenfalls in ihrer proteolytischen Aktivität unterscheiden: $\beta 1\beta 2\beta 5i$ und $\beta 1i\beta 2\beta 5i$ (57). Aufgrund der unterschiedlichen proteolytischen Aktivität gibt es Epitope, die nicht von allen Proteasomtypen, möglicherweise nur von einem Proteasomtyp, prozessiert werden können (58, 59). Nur ein geringer Anteil (5%) der vom Proteasom prozessierten Peptide kann direkt an MHC gebunden werden, die Mehrheit der generierten Peptidfragmente ist zu kurz und ca. 20% sind zu lang für eine Bindung an MHC-I-Moleküle. Der N-Terminus kann auch durch Aminopeptidasen im Cytosol und ER auf die korrekte Länge getrimmt werden, der C-Terminus wird in der Regel vom Proteasom bestimmt (60, 61).

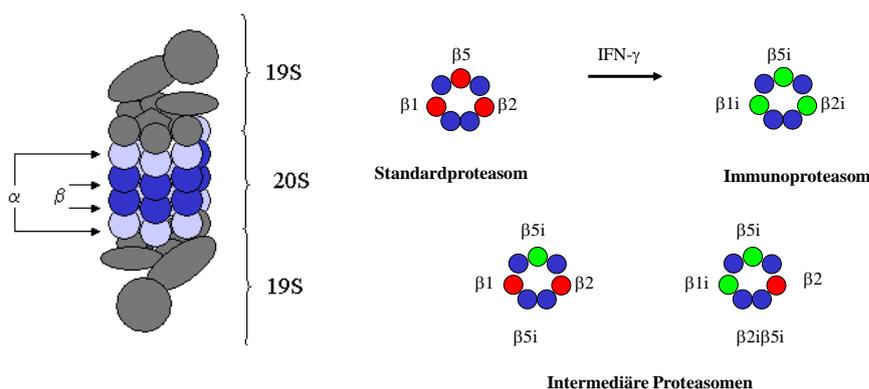


Abbildung 2: Das Proteasom **A** Aufbau des 26S Proteasoms; **B** Enzymatisch aktive Untereinheiten in den verschiedenen Proteasomtypen.

Einige Epitope benötigen aber auch zur Generierung des korrekten C-Terminus extraproteasomale Proteasen oder werden gänzlich Proteasom-unabhängig prozessiert (61). Einige an der Prozessierung beteiligten Proteasen sind identifiziert worden, wie z.B.

Tripeptidylpeptidase II (TPPII), Caspasen, Thimet-Oligopeptidase (TOP), Nardilysin oder Insulin-abbauendes Enzym (Insulin Degrading Enzyme, IDE) (61-65).

1.5 Tumorantigene

Das erste Tumorantigen wurde 1991 identifiziert (66). Seitdem sind eine Vielzahl von Tumorantigenen identifiziert und kloniert worden. Sie können in 5 Gruppen unterteilt werden (67): (1) Differenzierungsantigene, die gewebespezifisch und deshalb auch von einigen Normalgeweben exprimiert werden wie z.B. die Melanozyten-Differenzierungsantigene Melan-A/MART-1, Tyrosinase oder gp-100; (2) durch vermehrte Transkription oder Genamplifikation überexprimierte Antigene, wie z.B. HER-2/neu; (3) Cancer-Testis-Antigene (CTAs), die außer in Tumorzellen vorwiegend nur in Keimzellen exprimiert werden aufgrund von Genom-Demethylierung, wie z.B. Proteine der MAGE-Familie oder NY-ESO-1; (4) Neoantigene, die durch Mutationen oder Translokationen entstehen wie bcr-abl oder mutiertes p53 und (5) virale Antigene, die nur in virusinfizierten Zellen exprimiert werden wie EBV und HPV. Nur virale Antigene und Neoantigene sind tumorspezifische Antigene (TSAs), Differenzierungsantigene, überexprimierte Antigene und CTAs sind sogenannte tumorassoziierte Antigene (TAAs), da sie – wenn auch auf niedrigem Expressionslevel – von normalem Gewebe exprimiert werden können. Dies gilt es bei der Entwicklung von immuntherapeutischen Strategien zu berücksichtigen.

Das ideale Tumorantigen sollte für eine breite Anwendung in möglichst vielen Tumorentitäten exprimiert sein und ein niedriges Risiko für Antigen-Verlust haben. Des Weiteren sollte es keine signifikante Expression im gesunden Gewebe aufweisen, um die Induktion von Autoimmunität zu vermeiden. Abgesehen von TSA wie Neoantigene und virale Antigene stellen TAA wie die CTAs oder überexprimierte Antigene wie Wilms-Tumor-Protein 1 (WT1) potentielle Targets dar.

1.6 T-Zell-basierte Immuntherapie

Das Immunsystem bietet keinen vollständigen Schutz gegen Tumorerkrankungen, es ist aber prinzipiell in der Lage, entartete Zellen zu erkennen und zu bekämpfen (12, 25). Diese Eigenschaft kann therapeutisch genutzt werden. Eine wesentliche Rolle bei der Immunantwort gegen Tumore spielen $CD8^+$ T_C -Zellen (13, 14), aber auch $CD4^+$ T_H -Zellen (17). T-Zell-vermittelte Immuntherapie kann unterteilt werden in passiven, adoptiven T-Zelltransfer (ATT) und aktive Tumorimpfung (68, 69). Für beide Strategien existieren Antigen/Epitop-undefinierte Ansätze oder Antigen/Epitop-definierte Ansätze. Nicht definierte, personalisierte Strategien wie Vakzinierung mit autologen Tumorzellen oder mit Tumor-RNA transfizierte DCs oder ATT von Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TILs) haben den Vorteil,

dass sie ohne genaue Kenntnis des Antigenrepertoires des Tumors eingesetzt werden können und ggf. auf eine Vielzahl von Tumorantigenen abzielen. Allerdings ist ihre Herstellung zeitaufwendig und teuer und benötigt ausreichend Tumormaterial, was nicht immer vorhanden ist.

Antigen- oder Epitope-basierte Strategien können, sofern ein ubiquitär exprimiertes Antigen eingesetzt wird, nach einmaliger Herstellung kurzfristig einer Vielzahl von Patienten verabreicht werden und sind weniger kostenträchtig. Als Immunogene dienen bei der Tumoringung Peptide, Proteine, DCs beladen mit Peptiden oder transfiziert mit Antigen/Epitop-spezifischer Tumor-RNA sowie DNA oder virale Vektoren, die für die entsprechenden Antigene/Epitope kodieren (70, 71). Eine andere Möglichkeit ist der Transfer genmodifizierter T-Zellen. Für diese Therapie werden in der Regel autologe T-Zellen mit einem tumorantigenspezifischen TCR (72-74) oder chimären Antigenrezeptor (CAR) (75) ausgestattet. Hierdurch erhalten die T-Zellen eine neue, gegen den Tumor gerichtete Spezifität. Die tumorspezifischen TCRs können dabei aus TILs oder mittels transgener Mäuse, die humane TCRs ausprägen, gewonnen werden (76, 77). Auch mithilfe von Antikörper-ähnlichen Strukturen, den chimären Antigenrezeptoren (CARs), können T- oder NK-Zellen gezielt gegen Krebszellen stimuliert werden. Im Gegensatz zu TCRs zielen CARs auf Oberflächenantigene ab und können unabhängig von dem jeweiligen HLA-Haplotyp der Patienten eingesetzt werden. Während die klinische Effektivität von Tumorzellen bisher begrenzt war, zumindest in der Monotherapie und in der metastasierten Situation, wurde dem AT 2013 von der FDA "Breakthrough Therapy Status" verliehen (78). Dies beruhte vorwiegend auf den Erfolgen der CD19-CAR-T-Zelltherapie bei B-Zell-Neoplasien, die bei mehr als 50 Prozent der Patienten in den ersten klinischen Studien langanhaltende Remissionen erzeugte [Übersicht (79, 80)]. Aber auch erste Studien mit genmodifizierten TCRs bei metastasierten soliden Tumoren sind vielversprechend und zeigen Ansprechraten von bis zu 67% (72).

Während die Tumoringung auf eine in vivo-Induktion einer Immunantwort durch Aktivierung und Expansion präexistenter T-Zellen in einem immunsupprimierten Patienten abzielt, können mittels AT hoch potente, funktionell überlegene Immun-Effektorzellen mit ggf. neuer Tumorspezifität therapeutisch genutzt werden und die endogene Toleranz umgangen werden.

1.7 Immun-Escape-Mechanismen von Tumoren

Tumore entwickeln diverse Strategien, um dem Immunsystem zu entgehen. Diese Eigenschaft wurde 2011 dem initialen Konzept der „Hallmarks of Cancer“ von Hanahan und Weinberg hinzugefügt (81). Wie in dem Konzept des Immunoediting beschrieben, treten

Immun-Escape-Mechanismen schon sehr früh in der Tumorentwicklung auf. Schon in der Phase des Equilibriums, in der es nach anfänglicher Kontrolle des Tumors durch das Immunsystems zwar noch nicht zu weiterem Tumorwachstum kommt, entziehen sich bereits eine Vielzahl von Tumorzellen der Erkennung und Zerstörung durch das Immunsystem bis es nach Immunselektion von Tumorzellen mit reduzierter Antigenität und Immunogenität zum Tumor-Escape und Tumorwachstum kommt. Dies wird außerdem durch Generierung eines immunsuppressiven Mikroenvironments gefördert (25).

Der Verlust der Antigenität führt zur fehlender T-Zell-Erkennung bzw. Ignoranz. Dies kann bedingt sein durch Verlust immunogener Epitope, sei es durch Verlust der Antigenexpression oder Mutation des Antigens, aber auch durch Herabregulierung oder Verlust von Molekülen der Antigen-Prozessierungs-Maschinerie (APM-Molekülen) oder HLA-Molekülen. Hier kommen sowohl genetische Mechanismen wie Verlust der Heterozygotie oder Genmutationen zum Tragen, aber auch epigenetische, transkriptionale, post-transkriptionale und post-translationale Mechanismen wie z.B. Promotormethylierung und Promotormutationen oder Defekte im IFN γ -Signalweg (82, 83).

Der Verlust der Immunogenität beruht auf Manipulation von Funktion und Proliferation von Immuneffektorzellen. Diese Immunmodulation kann durch verschiedene Mechanismen geschehen. Tumore können Moleküle exprimieren, die zur Resistenz gegen T-Zell- und NK-Zell-Zytotoxizität und zur Produktion von immunsuppressiven T-Zellen führen wie z.B. HLA-G (84) und Apoptose assoziierte Moleküle wie u.a. FasL oder CD70 (85, 86). Des Weiteren ist häufig die Expression von Immun-Checkpoint-Molekülen dysreguliert, wie z.B. von Glycoproteinen der B7-Familie, u.a. B7-H1, auch bekannt als Programmed Death Ligand 1 (PD-L1), oder Galactin-9 (87). Immun-Checkpoint-Pathways regulieren normalerweise die physiologische Immunantwort im peripheren Gewebe und verhindern Autoimmunität. Im Tumorgewebe stellen sie jedoch einen wesentlichen Immun-Escape-Mechanismus dar, v.a. gegen die T-Zell-spezifische Immunantwort.

Ein anderer Mechanismus ist die aktive Suppression von Immuneffektorzellen durch lösliche Sekretion von Zytokinen wie u.a. TNF α , TGF β , IL1 β , IL6, IL8 oder IL10 oder Wachstumsfaktoren wie Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) oder Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) (88-91). Diese Faktoren fördern nicht nur Tumorwachstum und Angiogenese, sondern induzieren auch T-Zell- und NK-Zell-Apoptose, blockieren Homing und Aktivierung von Lymphozyten und behindern die Funktion von Makrophagen und DCs (92-96). Nicht nur die Tumorzellen produzieren diese immunsuppressiven löslichen Faktoren, sondern auch das Tumormikroenvironment bestehend aus Immunzellen, Stroma und Endothelzellen (90, 97, 98).

Nukleärer Faktor κ B (NF κ B) ist einer der wesentlichen Regulatoren für die Expression dieser immunsuppressiven Faktoren (99, 100). Die immunsuppressiven Zytokine und

Wachstumsfaktoren wiederum aktivieren Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT) 3 in Tumorzellen und Immunzellen, was zur Inhibition von immunstimulatorischen und weiteren Induktion von immunsuppressiven Faktoren führt (101-104). Daneben kann STAT3 auch konstitutiv von Tumorzellen exprimiert werden und so durch verminderte Expression von CXC-Ligand 10 (CXCL10, C-X-C Motif Chemokine Ligand 10) und CC-Chemokin-Ligand 5 (CCL5, C-C Motif Chemokine Ligand 5) die Lymphozyteninfiltration in den Tumor verhindern.

Neben Zytokinen und Wachstumsfaktoren exprimieren Immun- und Tumorzellen auch Enzyme wie Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO), das durch Depletion von Tryptophan zur T-Zelldysfunktion führt (105, 106).

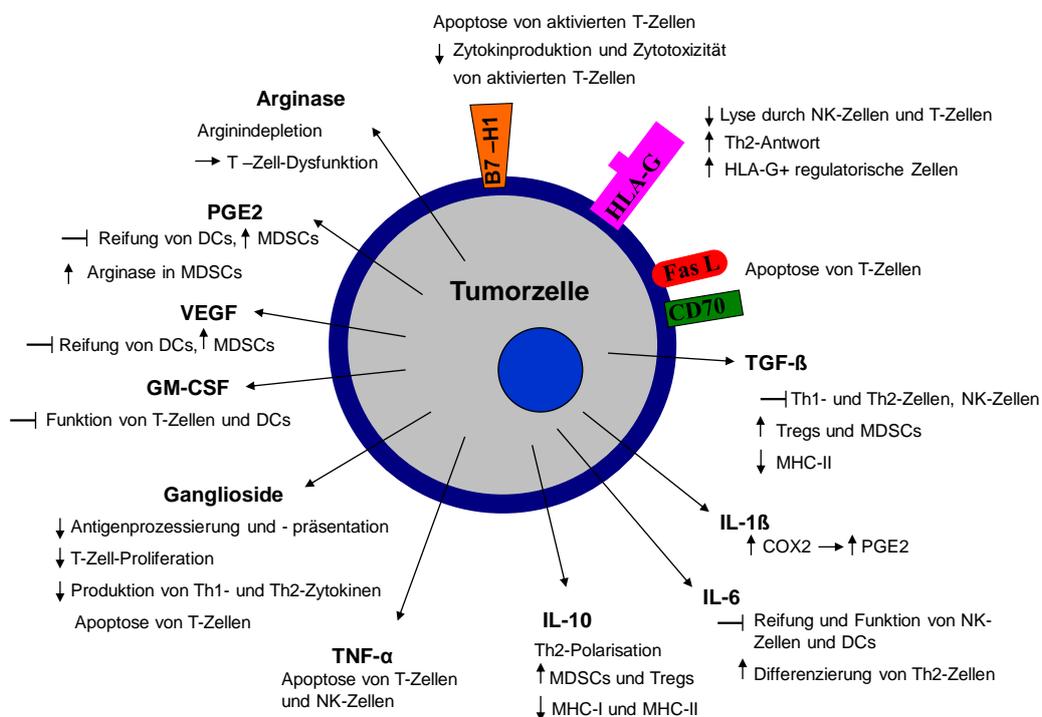


Abbildung 3: Auswahl von Mechanismen, die zum Verlust der Immunogenität führen. Modifiziert nach Busse und Keilholz 2010 (107).

Des Weiteren können Tumore ein immunsuppressives Mikroenvironment generieren durch Induktion und Rekrutierung von immunsuppressiven Zellen, insbesondere von regulatorischen T-Zellen (Tregs) und dysfunktionalen myelomonozytären Zellen.

CD4⁺ Tregs sind charakterisiert durch hohe Expression von CD25, Expression von Glucocorticoid-Induced Tumor Necrosis Factor Receptor (GITR), Cytotoxic Lymphocyte Antigen-4 (CTLA-4), und Forkhead-Box-Protein P3 (FOXP3) (108). Natürliche Tregs (nTreg) entstehen im Thymus und inhibieren die Immunantwort durch direkte Interaktion mit anderen Immunzellen mittels Granzyme B, Perforin oder Fas/FasL (109). Induzierte Tregs (iTregs)

entstehen in der Peripherie aus CD4⁺CD25⁻ T-Zellen nach Antigenerkennung unter Einfluss von Zytokinen wie IL2, TGFβ und IL10, die sowohl vom Tumor als auch von den Stroma-Immunzellen produziert werden. Sie vermitteln ihre immunsuppressiven Effekte kontaktunabhängig durch TGFβ, IL10 und andere immunsuppressive Faktoren (109). In vielen Tumoren wurden sowohl peritumoral als auch peripher erhöhte Frequenzen von Tregs detektiert (110-112) und sind häufig mit schlechter Prognose assoziiert (113, 114). Hierbei handelt es sich sowohl um nTregs als auch um iTregs (115).

Tumorassoziierte Makrophagen (TAMs) mit einem M2-Phänotyp repräsentieren die vorwiegende inflammatorische Komponente in vielen Tumoren. Sie begünstigen Tumorprogression nicht nur durch Förderung von Tumorzellproliferation, Angiogenese, Matrixremodelling und Tumormigration, sondern auch durch Suppression der adaptiven Immunantwort (116). Sie exprimieren TGFβ, IL10, Prostaglandin E2 (PGE2) und TNFα (117) und regulieren so die Expression von für die Antigenpräsentation wichtigen Moleküle herunter, verlieren ihre Fähigkeit zur Endozytose und fördern die Akkumulation von Tregs (98).

Durch chronische inflammatorische Stimuli wie Sekretion von VEGF, GM-CSF, TGFβ, IL10, IL6 oder PEG2 wird außerdem die Differenzierung von APCs aus ihren myeloischen Vorläufern gestoppt und die Akkumulation von myeloiden Suppressorzellen (myeloid derived suppressor cells, MDSCs) gefördert (118, 119). MDSCs repräsentieren eine heterogene Population von Monozyten/Makrophagen, Granulozyten und DCs unterschiedlichen Differenzierungsgrades. Sie sind negativ für CD14, CD80, CD86 und MHC-II und exprimieren VEGF-Rezeptor 1 (VEGFR1) und CD11b und weisen unterschiedliche Reifungsmarker in Abhängigkeit vom Zytokinmilieu des Mikroenvironments auf (118-121). Wie auch TAMs fördern sie Angiogenese und Akkumulation von Tregs und Typ 2-Immunzellen (116, 118). Außerdem inhibieren sie die T-Zellproliferation und -funktion durch Depletion von Arginin mittels Sekretion von Arginase I, ROS und NO.

1.8 Zielgerichtete Therapie zur Behandlung des metastasierten Nierenzellkarzinoms

Das Nierenzellkarzinom (renal cell carcinoma, RCC) ist der häufigste maligne Tumor der Niere und repräsentiert ca. 2-3% aller Krebserkrankungen (122-124). Ca. 30% der Patienten haben bei Erstdiagnose schon Metastasen entwickelt. Die mediane 5-Jahres-Überlebensrate beträgt im metastasierten Stadium (mRCC) < 15%. Aber auch 30-35% der Patienten mit lokalisierter Erkrankung entwickeln nach erfolgreicher chirurgischer Resektion im weiteren Verlauf Metastasen (125). Basierend auf der Beobachtung von Spontanremissionen assoziiert mit der Infiltration von Immunzellen sowie der Identifizierung von

immundysregulatorischen Mechanismen wurde das RCC als immunogener Tumor klassifiziert (126). Da das RCC nahezu refraktär auf Chemotherapie und Bestrahlung ist, war bis 2005 deshalb die Immuntherapie mit IFN α und/oder IL2 Therapiestandard; objektive Ansprechraten der Zytokintherapie waren jedoch niedrig (<20%) bei gleichzeitig deutlicher Toxizität (127-132). Allerdings entwickelten einige wenige Patienten langanhaltende komplette Remissionen (133).

Die Entwicklung von zielgerichteten Therapien hat die Prognose von mRCC-Patienten deutlich verbessert; die Behandlung bleibt aber palliativ. Verschiedene Substanzen sind inzwischen in Europa zugelassen für die Behandlung des mRCC wie die Tyrosinkinaseinhibitoren (TKIs) Sorafenib, Sunitinib, Pazopanib, Axitinib (134) und Cabozantinib (135) sowie Lenvatinib (in Kombination mit Everolimus) (136), Bevacizumab, ein monoklonaler Antikörper gegen VEGF (in Kombination mit IFN α) und mTOR (mechanistic Target of Rapamycin, früher mammalian Target of Rapamycin)-Inhibitoren wie Temsirolimus und Everolimus(137).

Die Wahl der Therapie basiert auf der Prognoseeinschätzung mittels *Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (MSKCC)*-Score, Komorbiditäten und Toxizitäten (138). Auch nach Zulassung der Immun-Checkpoint-Inhibitoren (139, 140) bleiben die zielgerichteten Therapien aktuell fester Bestandteil der Therapie des RCC. Der anti-PD-1 Antikörper Nivolumab, der kürzlich zur Behandlung von mRCC nach Vorbehandlung zugelassen wurde, ist aber sicherlich die neue Standardtherapie in der Zweitlinie. Im Gegensatz zu den zielgerichteten Therapien, die mit Ausnahme von Cabozantinib (135) nur einen Vorteil im progressionsfreien Überleben zeigten, konnte mittels Nivolumab in der Zweitlinie eine Verlängerung des Gesamtüberlebens erreicht werden (141).

1.8.1 Sorafenib

Sorafenib (BAY43-9006, Nexavar; Bayer HealthCare Pharmaceuticals Corporation, Montville, NJ; Onyx Pharmaceuticals, Emeryville, CA) ist ein oraler Multi-Tyrosinkinaseinhibitor, der Tumorwachstum und Angiogenese inhibiert (142, 143). Sorafenib wurde ursprünglich als rapidly accelerated fibrosarcoma (Raf)-Kinase-Inhibitor entwickelt. Neben c-Raf und b-Raf inhibiert Sorafenib aber auch diverse Tyrosinkinasen wie VEGFR-2, VEGFR-3, Platelet-derived growth-factor receptor (PDGFR), FMS-like tyrosine kinase 3 (Flt3, auch: CD135) und die Tyrosinkinase KIT (auch: CD117, *c-Kit* oder Stammzellfaktor-Rezeptor) (143, 144). Sorafenib wurde von der Food and Drug Administration (FDA) 2005 zur Behandlung des mRCC zugelassen (145). Sorafenib wird vorwiegend als Zweitlinientherapie des mRCC bei Patienten mit niedrigem oder intermediärem Risiko nach Therapieversagen von Zytokinen oder anti-VEGF basierter Vortherapie empfohlen, kann

aber auch in der Erstlinientherapie bei Patienten mit Kontraindikation gegen Zytokintherapie eingesetzt werden (142, 146). In der Erstlinientherapie zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied in der Remissionsrate und im progressionsfreien Überleben im Vergleich zu IFN α (147).

1.9 Adjuvante Therapie mit Interferon α zur Behandlung des lokal fortgeschrittenen Melanoms

Das kutane Melanom ist einer der gefährlichsten Hauttumore und verursacht ca. 90% der Hautkrebsmortalität. Für Patienten mit lokal fortgeschrittenem Melanom im TNM-Stadium II (T2-4 N0 M0) und Stadium III (T jedes N⁺ M0) liegen die Rückfallraten zwischen 20% und 60% und die 5-Jahres-Überlebensraten zwischen 40% und 79% (148). Die in Europa bisher einzig zugelassene Therapie für das lokal fortgeschrittene Melanom ist IFN α , eine nicht unumstrittene Therapie aufgrund von Kosten und Toxizität im Verhältnis zum Benefit. Mehrere Studien bei Patienten im Stadium IIB/III zeigten einen signifikanten, positiven Effekt auf das rückfallfreie Überleben, nicht jedoch auf das Gesamtüberleben (149-151). In einer Metaanalyse von 14 Studien mit insgesamt 8122 Patienten in den Stadien II und III konnte für die adjuvante Therapie mit IFN α neben der signifikanten Verbesserung des krankheitsfreien Überlebens (Hazard Ratio (HR) 0,82) auch eine signifikante Verlängerung des Gesamtüberlebens (HR 0,89) belegt werden (152). Aktuell wird eine adjuvante Therapie mit IFN α Patienten im Stadium IIB und III angeboten, wobei kein Standard in der Durchführung der Therapie besteht. In den Studien wurden nicht nur unterschiedliche IFN-Präparate getestet, sondern auch unterschiedliche Dosierungen und Therapiedauern. Die bisherigen Daten lassen vermuten, dass nur eine Subgruppe von Patienten von der adjuvanten Therapie mit IFN α profitiert. Eine Metaanalyse der European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) 18952-Studie und der EORTC 18991-Studie mit mehr als 2500 Patienten im Stadium IIB/III, die entweder mit IFN α oder mit pegyliertem (PEG)-IFN α behandelt wurden, zeigte, dass Tumorstadium und Ulzeration nicht nur prognostische, sondern auch prädiktive Faktoren für die Effektivität adjuvanter IFN/PEG-IFN Therapie sind. Vor allem Patienten mit Ulzeration und mikroskopischem Lymphknotenbefall profitierten von der Therapie (151, 153-155). Dies wurde auch in zwei weiteren Metaanalysen bestätigt (156, 157).

Die FDA hat 2015 auch Ipilimumab zur adjuvanten Therapie des Melanoms im Stadium III zugelassen. Im Vergleich zu Placebo führte es in der EORTC 1807 -Studie zu einer signifikanten Verbesserung des rückfallfreien Überlebens (158). Eine Überlegenheit zu IFN α ist bisher nicht gezeigt, sie wird aktuell in der Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) 1609-Studie geprüft.

1.9.1 Immunmodulatorische Aktivität von Interferon α

IFN α , ein Typ I-Interferon, ist ein multifunktionales regulatorisches Zytokin mit sowohl direkt zytotoxischen, proapoptotischen und antiangiogenen Effekten als auch immunmodulatorischen Eigenschaften. Es wird endogen hauptsächlich von Makrophagen produziert (159). Nach Bindung von IFN α an seinen Rezeptor wird über den Januskinase/Signal Transducers and Activators of Transcription (JAK-STAT)-Signalweg (STAT1/STAT2) die Transkription von antiviralen und immunregulatorischen Molekülen, sogenannten Interferon-stimulierten Genen (ISG), induziert (160, 161). Der IFN α -Signalweg wird negativ reguliert von einer Reihe von inhibitorischen Faktoren wie STAT3, Protein-Tyrosin-Phosphatasen, Protein-Inhibitoren von aktivierten STATs und den Suppressors of Cytokine Signalling (SOCS)-Proteinen, die ebenso durch IFN als Feedback-Inhibitoren induziert werden (160, 162). Mausmodelle haben gezeigt, dass die indirekte immunmodulatorische Aktivität von IFN α bei der Therapie des malignen Melanoms eine größere Rolle spielt als direkte Effekte auf Tumorzellen und Tumorgefäße (163-165). Dies lassen auch mehrere klinische Studien vermuten (166-168).

2 Fragestellung und Zielsetzung

Die Ausnutzung der vorhandenen Mechanismen des Immunsystems sind der Ansatzpunkt für eine Reihe von Strategien zur immunologischen Therapie von Krebserkrankungen. Die hier zusammengefassten Arbeiten sollten einen Beitrag zur Weiterentwicklung immuntherapeutischer Therapien leisten.

Der erste Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der Entwicklung T-Zell-therapeutischer Strategien mit speziellem Fokus auf Vakzinierung. Neben der Wahl des Antigens müssen eine Vielzahl von Immun-Escape-Mechanismen, die zu Verlust von Antigenität führen, bedacht werden. Hierbei gilt es auch die Immunbiologie von Mikrometastasen und Tumorstammzellen zu berücksichtigen.

Es sollten im speziellen folgende Fragestellungen beantwortet werden:

- 1 Eignet sich WT1, das als therapeutisches Target bei myeloischen Neoplasien gut etabliert ist, auch als therapeutisches Target für alle Subgruppen der ALL?
- 2 Spielen Immun-Escape-Mechanismen auf Tumor-Zellseite, insbesondere Defekte in der Antigenexpression, der Expression von APM-Molekülen oder HLA-Molekülen eine Rolle bei AML-Patienten mit Progress nach Tumorimpfung mit dem WT1₁₂₆₋₁₃₄ - Peptid?
- 3 Wie variabel ist die Expression von Proteasom-Untereinheiten in myeloischen und B-Zell-Neoplasien im Vergleich zu soliden Tumorzellen und welche Konsequenzen hat dies auf Epitop-basierte immuntherapeutische Strategien?
- 4 Weisen Mikrometastasen und Tumorstammzellen eine veränderte Expression von TAA, von APM-Molekülen oder HLA-Molekülen auf und werden deshalb nicht von T-Zell-therapeutischen Ansätzen erreicht?

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der Tumor-induzierten, peripheren Immundysregulation bei Patienten mit lokal fortgeschrittenem Melanom, die adjuvant mit PEG-IFN α behandelt wurden, sowie bei mit Sorafenib behandelten mRCC-Patienten. Folgende Fragestellungen sollten beantwortet werden:

1. Ist die periphere Immundysregulation auch schon im lokal fortgeschrittenen Stadium des Melanoms auf mRNA-Ebene nachweisbar und, wenn ja, hat sie Einfluss auf die Prognose?
2. Können immunregulatorische Eigenschaften von IFN α nachgewiesen werden, und gibt es einen prädiktiven Immunbiomarker für das Ansprechen auf IFN α -Therapie?
3. Spielt periphere Immundysregulation eine prognostische Rolle beim mRCC unter zielgerichteter Therapie mit Sorafenib?

4. Welche immunregulatorischen Eigenschaften hat Sorafenib, und welche Bedeutung haben diese im Hinblick auf sequentielle oder Kombinationsstrategien mit Immuntherapie?

3 EIGENE ARBEITEN

3.1 Der embryonale Transkriptionsfaktor WT1 als therapeutisches Target bei der akuten lymphatischen Leukämie (ALL)

Busse A, Goekbuget N, Siehl JM, Hoelzer D, Schwartz S, Rietz A, Thiel E and Keilholz U. Wilms' tumor gene 1(WT1) expression in subtypes of acute lymphoblastic leukemia (ALL) of adults and relation to treatment outcome. Ann Hematol. 2009 Dec;88(12):1199-205

Bei dem embryonale Transkriptionsfaktoren WT1 handelt es sich um ein TAA, von denen bekannt ist, dass sie in einer Vielzahl von soliden und hämatologischen Neoplasien überexprimiert und essentiell für das Überleben und Proliferation von Tumorzellen sind (20, 22, 34). Eine signifikante Expression im Tumor bei idealerweise fehlender Expression im Gesundheitsgewebe ist eine wesentliche Voraussetzung für die Verwendung Tumorantigenen als immuntherapeutische Targets.

Die Arbeitsgruppe hatte zuvor die Expression von WT1 bei den einzelnen Subtypen AML untersucht und keine relevanten Unterschiede in der Expression von WT1 und seiner Splicevarianten in den unterschiedlichen FAB-Subtypen gefunden (143).

Hinsichtlich der Expression von WT1 in der ALL bei Erwachsenen lagen nur begrenzt Daten von kleineren Fallserien vor, die eine Überexpression in 65 – 100% der Fälle zeigten (145-147). In dieser Arbeit wurde die mRNA-Expression von *WT1* und seine prognostische Bedeutung bei den unterschiedlichen Subgruppen der ALL bestimmt. 238 Blut- oder Knochenmarkproben von Erwachsenen mit ALL verschiedener Subtypen wurden mittels RT-PCR untersucht. *WT1* mRNA konnte in 219 von 238 Proben (92%) detektiert werden. Die mediane *WT1* mRNA-Expression war jedoch im Vergleich zu einer AML-Patientenkohorte (n = 43) (42) signifikant niedriger ($6,69 \times 10^{-3}$ vs. $1,19 \times 10^{-2}$, $p = 0,024$) und zeigte innerhalb der ALL-Subgruppen deutliche Unterschiede: Die *WT1* mRNA-Expression war am höchsten in der ALL-Subgruppe, die eine Koexpression myeloischer Marker aufwies ($p < 0,001$) und am niedrigsten in der reifen B-ALL. In dieser Subgruppe lag der mediane Expressionslevel deutlich unter dem Cut-off Level von gesundem Knochenmark ($3,37 \times 10^{-5}$ vs. 2×10^{-4}) (143) und war signifikant niedriger im Vergleich zur T-Linien-ALL und den unreiferen B-Linien-ALL Subgruppen ($p < 0,001$).

WT1 eignet sich damit als therapeutischen Target, aber auch als Marker für minimale Resterkrankung bei der ALL mit Ausnahme der reifen B-ALL. Die Cox-Regressionsanalyse zeigte unter Berücksichtigung aller phänotypischen sowie molekularzytogenetischen Untergruppen, dass die *WT1* mRNA-Expression kein unabhängiger prognostischer Faktor für das krankheitsfreie Überleben und das Gesamtüberleben bei der ALL des Erwachsenen darstellt.

Busse A, Goekbuget N, Siehl JM, Hoelzer D, Schwartz S, Rietz A, Thiel E and Keilholz U. Wilms' tumor gene 1(WT1) expression in subtypes of acute lymphoblastic leukemia (ALL) of adults and relation to treatment outcome. *Ann Hematol.* 2009 Dec;88(12):1199-205

<http://dx.doi.org/10.1007/s00277-009-0746-2>.

3.2 Immun-Escape durch Antigenverlust und durch Defekte in der Antigenprozessierung und -präsentation

Ein wesentlicher Immun-Escape Mechanismus ist der Verlust der Präsentation von Tumor-assoziierten oder spezifischen Epitopen. Dies kann durch mehrere Mechanismen bedingt sein, wie Verlust der Expression der Tumorantigene, oder Mutation im Bereich des Epitops oder seiner flankierenden Sequenzen. Mutationen können die Prozessierung durch das Proteasom verändern, die Bindung an das HLA-Molekül beeinträchtigen oder die Erkennung durch die Epitop-spezifischen T-Zellen verhindern. Ob diese Mechanismen eine Rolle für den Progress von Leukämiepatienten nach Impfung mit dem WT1₁₂₆₋₁₃₄-Peptid spielen, wurde in der ersten Arbeit untersucht.

Fehlende Prozessierung und Präsentation kann aber auch durch Verlust der Expression von Molekülen der APM bedingt sein. Daneben spielt für einige Epitope auch die Zusammensetzung der Proteasomen in Bezug auf ihre enzymatisch aktiven Untereinheiten eine Rolle. Proteasomen, die die sogenannten Immunoproteasom-Untereinheiten enthalten, unterscheiden sich zwar vor allem quantitativ, aber auch qualitativ in ihren proteolytischen Eigenschaften. Da es Epitope gibt, die nur von einem Proteasom-Typ prozessiert werden können, kann auch eine nicht passende Zusammensetzung der Proteasom-Untereinheiten zu fehlender Präsentation und damit zu Immun-Escape führen. Das primäre Ziel der zweiten Arbeit war zwar die die Sensitivität von Tumorzelllinien auf Proteasom-Inhibition zu untersuchen, sie zeigt aber gleichzeitig die Variabilität der Expression der enzymatisch aktiven Untereinheiten und der Zusammensetzung der Proteasomen in verschiedenen Zelllinien auf.

Die dritte Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob mittels T-Zell-therapeutischer Ansätze auch Tumorsphären, die Mikrometastasen repräsentieren und potentiell auch Tumor-initiiierende Zellen enthalten, erreicht werden können bzw. ob sie Defekte in der Antigenexpression oder der APM aufweisen.

3.2.1. Verlust der Expression oder Mutation von WT1 sind nicht Ursache für Rezidive nach Induktion einer WT1-spezifischen T-Zell-Antwort durch Impfung

Busse A, Letsch A, Scheibenbogen C, Nonnenmacher A, Ochsenreither S, Thiel E, Keilholz U. Mutation or loss of Wilms' tumor gene 1 (WT1) are not major reasons for immune escape in patients with AML receiving WT1 peptide vaccination. J Transl Med. 2010 Jan 21;8(1):5.

Vakzinierungsstudien bei soliden und hämatologischen Erkrankungen haben gezeigt, dass es möglich ist, sowohl in Patienten mit geringer Tumorlast, aber auch in Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung eine Anti-Tumor-Immunantwort zu induzieren. Trotzdem ist die Wirksamkeit der Tumorimpfstoffe in der therapeutischen Situation begrenzt.

Auch in unserer Arbeitsgruppe konnten wir beobachten, dass es bei AML-Patienten, die im Rahmen einer Phase II-Vakzinierungsstudie (NCT00153582) mit dem WT1₁₂₆₋₁₃₄-Peptid behandelt wurden, trotz Induktion einer WT1₁₂₆₋₁₃₄-spezifischen T-Zell-Antwort zu einem Rezidiv oder Progress der Erkrankung kam (149). Dies kann durch diverse Immun-Escape-Mechanismen bedingt sein, u. a. auch durch den Verlust der Expression von WT1 oder durch eine Mutation im Bereich des WT1₁₂₆₋₁₃₄-Epitopes. Eine Mutation kann sowohl eine fehlende Prozessierung und / oder Präsentation des WT1₁₂₆₋₁₃₄-Epitopes als auch eine fehlende Erkennung durch die Vakzine-spezifischen T-Zellen zur Folge haben.

In dieser Arbeit wurden 10 HLA-A2-positive Patienten mit AML und Progress unter WT1₁₂₆₋₁₃₄-spezifischer Vakzinierung im Rahmen der oben genannten Studie hinsichtlich des Verlustes der Expression von WT1 auf mRNA-Ebene und Proteinebene sowie hinsichtlich Mutationen des WT1-Epitopes und seiner flankierenden Sequenzen (10 Aminosäuren N- und C-terminal) untersucht. Blut- und Knochenmark-Proben wurden vor der Impfung und während des Progresses auf mRNA-Expression von WT1 analysiert. Mutationen wurden mit Schmelzpunktanalyse und Sequenzierung untersucht.

Nur bei einem Patienten wurde die Herunterregulierung der WT1-mRNA-Expression um eine Log-Stufe und der Verlust der WT1-Proteinexpression bei Progress der Erkrankung beobachtet. Eine Mutation, die zu einem Basenaustausch in der Sequenz des Epitopes oder in den Epitop-flankierenden Sequenzen führte, konnte bei keinem Patienten nachgewiesen werden. Weder Verlust oder Mutation des WT1-Proteins sind also Ursache für einen Krankheitsprogress unter Vakzinierung. Ferner wurde kein Verlust der HLA-I-Expression auf den Leukämieblasten beobachtet. Somit kann auch ein genereller Prozessierungsdefekt von HLA-I-assoziierten Epitopen ausgeschlossen werden; die Prozessierung des WT1₁₂₆₋₁₃₄-Epitopes im Speziellen wurde allerdings in dieser Arbeit nicht untersucht.

Busse A, Letsch A, Scheibenbogen C, Nonnenmacher A, Ochsenreither S, Thiel E, Keilholz U. Mutation or loss of Wilms' tumor gene 1 (WT1) are not major reasons for immune escape in patients with AML receiving WT1 peptide vaccination. *J Transl Med.* 2010 Jan 21;8(1):5.

<http://dx.doi.org/10.1186/1479-5876-8-5> .

3.2.2 Die Zusammensetzung der Proteasomen variiert in B-Zell-Neoplasien und soliden Tumoren

Busse A, Kraus M, Na IK, Rietz A, Scheibenbogen C, Driessen C, Blau IW, Thiel E, Keilholz U. Sensitivity of tumor cells to proteasome inhibitors is associated with expression levels and composition of proteasome subunits. Cancer. 2008 Feb 1

In dieser Arbeit wird gezeigt, dass die Sensitivität von Tumorzellen in Bezug auf Proteasominhibition mit PS-341 und Lactacystin sowohl mit dem Expressionslevel der enzymatisch aktiven Proteasom-Untereinheiten $\beta 1 / \beta 1i$ (LMP2), $\beta 2 / \beta 2i$ (MECL-1) und $\beta 5 / \beta 5i$ (LMP5) als auch mit deren qualitativen Zusammensetzung assoziiert ist. Zwölf neoplastische B-Zelllinien und 12 solide Tumorzelllinien wurden auf ihre Expression von Proteasom-Untereinheiten mittels RT-PCR untersucht und auf ihre Empfindlichkeit gegenüber den Proteasom-Inhibitoren PS-341 und Lactacystin getestet. Resistente Zelllinien zeigten niedrigere Expressionsniveaus der Standardproteasom-Untereinheit $\beta 2$ und der Immunoproteasom-Untereinheit $\beta 2i / LMP2$ im Vergleich zu empfindlichen B-Zelllinien. Solide Tumorzelllinien waren weniger empfindlich als neoplastische B-Zelllinien und wiesen eine deutlich geringe Expression der Immunoproteasom-Untereinheiten $\beta 1i / LMP2$, $\beta 5i / LMP7$ und $\beta 2i / MECL-1$ sowie der Standardproteasom-Untereinheit $\beta 2$ auf. Vorbehandlung mit IFN γ erhöhte die Sensitivität gegen PS-341 in 50% der Tumorzelllinien, was möglicherweise auf die Induktion von Immunoproteasomen zurückzuführen ist.

Neben der Variabilität der Expression der enzymatisch aktiven Proteasom-Untereinheiten auf mRNA-Ebene konnten wir außerdem auf Proteinebene zeigen, dass sich die Zusammensetzung der enzymatisch aktiven Untereinheiten der Proteasomen in intakten neoplastischen B-Zellen vor allem quantitativ unterscheidet. Hierfür wurde die zellpermeable Sonde Bodipy TMR-Ahx3L3VS (MV151) verwendet, die die Detektion aller aktiven und somit in das Proteasom eingebauten katalytischen Untereinheiten erlaubt (150). Dies ist auch relevant für die Prozessierung von Epitopen, die nur durch spezifische Proteasomtypen, z.B. nur durch das Standardproteasom oder nur durch das Immunoproteasom prozessiert werden können.

Busse A, Kraus M, Na IK, Rietz A, Scheibenbogen C, Driessen C, Blau IW, Thiel E, Keilholz U. Sensitivity of tumor cells to proteasome inhibitors is associated with expression levels and composition of proteasome subunits. Cancer. 2008 Feb 1

<http://dx.doi.org/10.1002/cncr.23224> .

3.2.3 Tumorsphären entgehen der T-Zell-vermittelten Immunantwort durch Herunterregulation von HLA-Molekülen

Busse A, Letsch A, Fusi A, Nonnenmacher A, Stather D, Ochsenreither S, Regenbrecht CRA, Keilholz U. Characterization of small spheres derived from various solid tumor cell lines: Are they suitable targets for T cells? Clinical & Experimental Metastasis, 2013 Aug;30(6):781-91.

Die folgende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob auch Mikrometastasen und sogenannte Tumorstammzellen (cancer stem cells, CSCs) von T-Zell-therapeutischen Ansätzen erreicht werden. Gerade die langsam proliferierenden CSCs entgehen den konventionellen Therapien wie Chemotherapie oder Bestrahlung. Möglicherweise unterscheidet sich jedoch die Antigenität der Mikrometastasen und CSCs von der Tumor-Bulk-Population. Um dieser Frage in vitro nachzugehen, wurden von 12 humanen soliden Tumorzelllinien Tumorsphären durch Kultur in serumfreien Medium generiert. Sie dienen als Modell für Mikrometastasen, die möglicherweise mit sogenannten CSCs angereichert sind.

In diesen Tumorsphären wurde die Expression von TAA und von APM-Molekülen mittels RT-PCR und / oder Durchflusszytometrie analysiert und mit den korrespondierenden adhären Zellen, die in serumhaltigem Medium kultiviert wurden, verglichen. Im Vergleich zu adhären Zellen zeigten Tumorsphären gleiche oder höhere mRNA-Expressionslevel von den Immunoproteasom-Untereinheiten LMP2 ($\beta 1i$), LMP7 ($\beta 5i$) und MECL-1 ($\beta 2i$), von den TAP1 und TAP2-Transportern und überraschenderweise auch von TAA einschließlich der Differenzierungsantigene. Jedoch wurde bei den Tumorsphären eine Herunterregulierung oder sogar Verlust von HLA-I- und HLA-II-Molekülen auf der Zelloberfläche bei 8 von 10 bzw. 1 von 2 Zelllinien beobachtet. Diese Herunterregulierung bzw. dieser Verlust konnte nicht durch Inkubation mit IFN γ behoben werden und kann somit zum Immun-Escape führen.

Busse A, Letsch A, Fusi A, Nonnenmacher A, Stather D, Ochsenreither S, Regenbrecht CRA, Keilholz U. Characterization of small spheres derived from various solid tumor cell lines: Are they suitable targets for T cells? Clinical & Experimental Metastasis, 2013 Aug;30(6):781-91.

<http://dx.doi.org/10.1007/s10585-013-9578-5> .

3.3 Immun-Escape durch Immunmodulation – prognostische Bedeutung beim Nierenzellkarzinom und Melanom

3.3.1 Prognostische Bedeutung des Immunphänotyps im peripheren Blut bei Patienten mit metastasiertem Nierenzellkarzinom

Das Nierenzellkarzinom (RCC) kann durch diverse Immun-Escape-Mechanismen der Anti-Tumor-Immunantwort entgehen, u. a. durch die Induktion immunsuppressiver Zellpopulationen wie Treg, M2-Makrophagen und MDSCs, und durch Funktionseinschränkung von Immuneffektorzellen. Die folgenden Arbeiten beschäftigten sich mit der Immundysregulation bei Patienten mit metastasiertem Nierenzellkarzinom, die Sorafenib im Rahmen eines „expanded access“ - Programms erhielten. Ziel war die Definition eines immunsuppressiven Immunphänotyps und die prognostische Bedeutung der Immunsuppression unter Sorafenib-Therapie.

Ferner sollte untersucht werden, ob der Immunphänotyp durch Sorafenib-Behandlung beeinflusst wird. In-vitro-Daten haben gezeigt, dass Tyrosinkinaseinhibitoren (TKIs) wie Sorafenib nicht nur die spezifischen Signalwege in den Tumorzellen beeinflussen, sondern auch die entsprechenden Signalwege in Immuneffektorzellen. Dies ist für die Entwicklung von Kombinationstherapien mit TKI und immuntherapeutischen Strategien von Bedeutung. TKIs haben zwar die Prognose von mRCC-Patienten deutlich verbessert, Langzeitremissionen wurden bisher jedoch nur mit der Immuntherapie beobachtet.

Es wurden sowohl die Expression von immunsuppressiven Zytokinen auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR untersucht als auch Frequenzen immunsuppressiver und inflammatorischer Zellpopulationen mittels Durchflusszytometrie im pB bestimmt. Ferner wurde die Expression von den T-box-Transkriptionsfaktoren T-bet, kodiert von dem Gen Tbx21 und Eomes auf mRNA-Ebene und Proteinebene analysiert. Sie sind die Masterregulatoren für die Entwicklung und Funktion von Gedächtnis- und Effektor-T-Zellen und NK-Zellen.

Busse A, Asemissen A, Nonnenmacher A, Ochsenreither S, Fusi A, Braun F, Stather D, Schmittel A, Miller K, Thiel E, Keilholz U. Systemic immune tuning in renal cell carcinoma: favorable prognostic impact of TGFβ1 mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells. J Immunother. 2011 Jan;34(1):113-9.

Es wurden die mRNA-Expression von *IL10* und *TGFβ1*, die Frequenzen von Tregs und von *IL10* und *TGFβ* produzierenden T-Zellen und Monozyten im pB von 46 Patienten mit mRCC unmittelbar vor Therapie mit Sorafenib untersucht. Im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen wiesen mRCC-Patienten sowohl eine signifikant höhere mRNA-Expression von *IL10* und *TGFβ1* als auch höhere Frequenzen von $CD4^+CD25^{high}/CD3^+$ und $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+/CD3^+$ Tregs auf. Es konnten nur geringe Frequenzen von *IL10* und

TGF β produzierenden T-Zellen detektiert werden. Im Gegensatz dazu waren monozytäre Zellen vorwiegend IL10 und TGF β positiv. Zusätzlich zu den bisher etablierten klinischen Faktoren wie Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) Performance Status Score, Hämoglobinkonzentration, Calciumkonzentration und Serumkonzentration der Alkalischen Phosphatase wurde die prognostische Bedeutung von *IL10* und *TGF β 1* mRNA-Expression und von der Treg-Frequenz im pB im univariaten und multivariaten Cox-Regressionsmodell untersucht (n=42). In der multivariaten Analyse wurden ein niedriger ECOG Performance Status Score und überraschenderweise eine hohe mRNA-Expression von *TGF β 1* als unabhängige günstige prognostische Faktoren für das progressionsfreie Überleben (PFS, p = 0,005 bzw. p = 0,003) als auch für das Gesamtüberleben (OS, p = 0,001 bzw. p = 0,039) identifiziert.

Busse A, Asemissen A, Nonnenmacher A, Ochsenreither S, Fusi A, Braun F, Stather D, Schmittel A, Miller K, Thiel E, Keilholz U. Systemic immune tuning in renal cell carcinoma: favorable prognostic impact of TGF β 1 mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells. *J Immunother*. 2011 Jan;34(1):113-9.

<http://dx.doi.org/10.1097/CJI.0b013e3181fb6580> .

Dielmann A, Letsch A, Nonnenmacher A, Asemissen AM, Miller K, Pezzutto, A, Keilholz, U and Busse, A. Favorable prognostic influence of T-box transcription factor Eomes in metastatic renal cell cancer patients. Cancer Immunol Immunother 2016 Jan 11 Cancer Immunol Immunother. 2016 Feb;65(2):181-92.

Anknüpfend an die vorherige Arbeit wurde in dieser Studie der prognostische Einfluss von den Transkriptionsfaktoren T-bet und Eomes, die sowohl Entwicklung als auch Funktion von Gedächtnis- und Effektor-T-Zellen und NK-Zellen regulieren, untersucht. Bei 41 mRCC-Patienten wurden sowohl die mRNA-Expressionslevel der Transkriptionsfaktoren als auch die Proteinexpression in T-Zell-Subpopulationen und NK-Zellen unmittelbar vor Therapie mit Sorafenib bestimmt. In der multivariaten Analyse, die ebenfalls wieder die oben genannten klinischen Faktoren beinhaltete, wurde die mRNA-Expression von Eomes als unabhängiger günstiger prognostischer Faktor für das PFS ($p = 0,042$) und das OS ($p = 0,001$) identifiziert, ebenso wie der ECOG Performance Status Score ($p = 0,01$ bzw. $p = 0,008$).

Passend zu den Ergebnissen der vorherigen Arbeit korrelierte die mRNA-Expression von *Eomes* positiv mit der mRNA-Expression von *TGF β 1*.

Die mRNA-Expression von Eomes korrelierte ferner sowohl positiv mit der mRNA-Expression von *Tbx21* und der mRNA-Expression des Aktivierungsmarkers *Inducible T-cell Costimulator (ICOS)* als auch mit der Frequenz von in vivo aktivierten HLA-DR⁺ T-Zellen; sie korrelierte jedoch negativ mit der Frequenz inflammatorischer TNF α ⁺ T-Zellen.

Interessanterweise wurde das Protein Eomes vorwiegend von CD56⁺CD3⁻ reifen NK-Zellen exprimiert.

Dielmann A, Letsch A, Nonnenmacher A, Asemissen AM, Miller K, Pezzutto, A, Keilholz, U and Busse, A. Favorable prognostic influence of T-box transcription factor Eomes in metastatic renal cell cancer patients. Cancer Immunol Immunother 2016 Jan 11 Cancer Immunol Immunother. 2016 Feb;65(2):181-92.

<http://dx.doi.org/10.1007/s00262-015-1786-1> .

Busse A, Asemissen AM, Nonnenmacher A, Braun F, Ochsenreither S, Stather D, Fusi A, Schmittel A, Miller K, Thiel E, Keilholz U. Immunomodulatory effects of sorafenib on peripheral immune effector cells in metastatic renal cell carcinoma. Eur J Cancer. 2011 Jan 5.

Der immunmodulatorische Effekt von Sorafenib auf Immuneffektorzellen im pB wurde an einer Kohorte von 35 mRCC-Patienten untersucht. mRNA-Expressionslevel von *IL10* und *TGFβ1*, Frequenzen von Tregs, definiert als CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺CD3⁺ T-Zellen, sowie von Zytokin-produzierenden (TNFα, IFNγ, IL10 und TGFβ) mononukleären Zellen wurde vor und nach 8 Wochen Behandlung mit Sorafenib bestimmt. Sorafenib hatte keinen Einfluss auf mRNA-Expressionslevel von *TGFβ1* oder *IL10* oder IL10⁺ oder TGFβ⁺ Monozyten. Ebenso hatte Sorafenib keinen Einfluss auf die Typ 1-Immunantwort (TNFα oder IFNγ produzierende T-Zellen oder Monozyten) im pB. Die Frequenz der Tregs bezogen auf die CD3⁺ T-Zellpopulation nahm jedoch unter der Therapie mit Sorafenib ab. Sorafenib scheint somit - auch wenn es nicht den immunsuppressiven Phänotyp im pB von mRCC-Patienten beheben kann - ein geeigneter Kandidat für immuntherapeutische Kombinationsstrategien zu sein.

Busse A, Asemissen AM, Nonnenmacher A, Braun F, Ochsenreither S, Stather D, Fusi A, Schmittel A, Miller K, Thiel E, Keilholz U. Immunomodulatory effects of sorafenib on peripheral immune effector cells in metastatic renal cell carcinoma. *Eur J Cancer*. 2011 Jan 5.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2010.11.021> .

3.3.2 Prognostische und prädiktive Bedeutung des Immunphänotyps im peripheren Blut bei Melanompatienten unter adjuvanter Therapie mit pegyliertem Interferon alpha
Busse A, Rapon J, Fusi A, Suci S, Nonnenmacher A, Santinami M, Kruit WHJ, Testori A, Punt CJA, Dalglish AG, Spatz A, Eggermont AM, M Keilholz U. Analysis of surrogate gene expression markers in peripheral blood of melanoma patients to predict treatment outcome of adjuvant pegylated interferon alpha 2b (EORTC 18991 side study. Cancer Immunol Immunother. 2013Jul;62(7):1223-33

Ziel dieser Studie war es, den Immunphänotyp im pB von Patienten mit lokal fortgeschrittenem Melanom im Stadium III zu analysieren und seine prognostische Bedeutung für das fernmetastasenfreie Überleben (DMFS) und das rezidivfreie Überleben (RFS) zu bestimmen. Ferner sollten prädiktive Biomarker für die Effektivität adjuvanter IFN α -Therapie identifiziert werden. Es wurden die mRNA-Expressionslevel von IFN-stimulierten Genen (ISGs) (ISG15, STAT1, CXCL10), Inhibitoren des JAK-STAT-Signalweges (STAT3, SOCS1, SOCS3) und von Zytokinen (TNF α , IL10, TGF β 1) im pB von 91 Patienten mit einem malignen Melanom im Stadium III (Tx, N1-2, M0, außer Intransit-Metastasen) untersucht. Alle Patienten wurden im Rahmen der prospektiven randomisierten Multicenter-Studie EORTC (European Organization for Research and Treatment of Cancer) 18991 (NCT00006249) behandelt und erhielten entweder für bis zu 5 Jahre pegyliertes Interferon alpha-2b (PEG-IFN α -2b) oder keine Therapie (Beobachtungsarm) (125). Die mRNA-Expressionslevel wurden unmittelbar vor Therapiebeginn und nach 6 Monaten Therapie bestimmt. Im Vergleich zu einer gesunden Kontrollkohorte konnte bei den Melanompatienten eine signifikant höhere TGF β 1 mRNA-Expression im pB nachgewiesen werden ($p = 0,0005$).

In der univariaten Cox-Regressions-Analyse hatte keiner der mRNA-Baseline-Expressionslevel einen Einfluss auf das RFS oder DMFS. Da einige mRNA-Expressionslevel jedoch mit klinischen Merkmalen korrelierten, wurde ein multivariates Cox-Modell aufgestellt, das neben den mRNA-Expressionsleveln auch Stadium, Geschlecht, Breslow-Level, Anzahl befallener Lymphknoten und Ulzeration beinhaltet. In diesem Modell waren höhere SOCS1 und SOCS3 mRNA-Expressionslevel mit schlechterem RFS ($p = 0,02$, HR [95 % CI] = 1,43 [1,07–1,91] und $p = 0,04$, HR [95 % CI] = 1,27 [1,01–1,61]) und schlechterem DMFS ($p = 0,05$, HR [95 % CI] = 1,35 [1–1,83] und $p = 0,05$, HR [95 % CI] = 1,27 [1–1,62] assoziiert aufgrund negativer Korrelation mit Ulzeration oder Breslow-Level.

Therapie mit PEG-IFN α -2b hatte keinen Einfluss auf die bestimmten mRNA-Expressionslevel mit Ausnahme von ISG15. ISG15 mRNA-Expressionslevel sanken im PEG-IFN α -2b Behandlungsarm ($p = 0,001$). Interessanterweise hatten die 5 Patienten, die eine Abnahme

von >60% der *ISG15* mRNA-Expression nach 6 Monaten Therapie aufwiesen, ein schlechteres RFS (Hazard Ratio (HR) = 3,72, $p = 0.039$) and DMFS (HR = 3,64, $p = 0,042$).

Busse A, Rapon J, Fusi A, Suci S, Nonnenmacher A, Santinami M, Kruit WHJ, Testori A, Punt CJA, Dalglish AG, Spatz A, Eggermont AM, M Keilholz U. Analysis of surrogate gene expression markers in peripheral blood of melanoma patients to predict treatment outcome of adjuvant pegylated interferon alpha 2b (EORTC 18991 side study. Cancer Immunol Immunother. 2013Jul;62(7):1223-33

<http://dx.doi.org/10.1007/s00262-013-1428-4> .

4 Diskussion

4.1 Immun-Escape bei Verwendung Tumor-assoziiertes Antigene als T-Zell-therapeutische Targets

4.1.1 Neoantigene versus TAA als Targets für T-Zell-vermittelte Immuntherapie

Für die Entwicklung spezifischer T-Zell-basierter Immuntherapien mit definierten Epitopen als Targets ist die Auswahl des Tumorantigens von entscheidender Bedeutung. Bei der Verwendung von TAA besteht zum einen die Gefahr des Antigenverlustes, sofern sie keine onkogene Funktion innehaben, zum anderen aufgrund der - wenn auch geringen - Expression im Normalgewebe die Gefahr der Autoimmunität bei Transfer von hochaviden T-Zellen im Rahmen der ATT. So wurden in Studien beim Transfer spezifischer T-Zellen gegen TAA wie CEA, Her2neu, gp100, MART-1 oder Mage-A3 teilweise schwerwiegende Toxizitäten beobachtet [Überblick (72)].

Tumorspezifische Antigene wie virale Antigene oder Neoantigene auf der Grundlage somatischer Mutationen sind ideale Targets, da sie nur von den Tumorzellen exprimiert werden und somit keine „On-Target-Toxizität“ auftreten sollte. Handelt es sich bei den Mutationen auch noch um sogenannte Treibermutationen, ist auch das Risiko des Verlustes der Antigenexpression gering. Die Identifizierung mutationsspezifischer Epitope (Neoepitope) ist Gegenstand aktueller Forschung (169, 170). Ein entscheidender Nachteil ist, dass es sich bei der Mehrheit der Mutationen in einem Tumor weder um rezurrenente Mutationen noch um Treibermutationen handelt, sondern um patientenindividuelle Passenger-Mutationen (171). Somit muss die T-Zell-basierte Therapie, sei es Vakzinierung oder adoptiver Transfer Epitop-spezifischer T-Zellen, individuell entwickelt werden, was zeit- und kostenaufwendig ist. Des Weiteren sollten mehrere Mutationen therapeutisch angegangen werden, wenn sich kein Epitop gegen eine übergeordnete Treibermutation findet, um eine Selektion von einzelnen Subklonen zu verhindern.

4.1.2 WT1 als Target für T-Zell-vermittelte Immuntherapie

Der embryonalen Transkriptionsfaktor WT1 ist nicht nur in einer Vielzahl von verschiedenen Tumorentitäten überexprimiert, sondern spielt auch eine entscheidende Rolle im onkogenen Prozess (172-177), so dass das Risiko von Immun-Escape durch Verlust der Antigenexpression auch unter spezifischer WT1-gerichteter Therapie gering ist. WT1 hat deshalb Interesse als Target für Immuntherapie erlangt, sowohl für Leukämien als auch für solide Tumore (178-180). Ein Schwerpunkt der Arbeitsgruppe war die Entwicklung einer Peptidvaccine auf der Basis des HLA-A0201 restringierten Epitopes WT1₁₂₆₋₁₃₄, zunächst für

die Behandlung der AML / MDS (181). Wir konnten zeigen, dass nur in einem von zehn AML-Patienten, die einen Progress unter Tumorimpfung mit dem WT1₁₂₆₋₁₃₄-Peptid erlitten, eine Herunterregulation von WT1 im Verlauf und somit vermutlich eine Expansion eines oder mehrerer WT1 negativer AML-Subklone erfolgte (182). Ob dies auf die Vakzinierung mit dem WT1₁₂₆₋₁₃₄-Peptid und damit verbundener Expansion spezifische T-Zellen gegen WT1 zurückzuführen ist, bleibt spekulativ. Auch wenn klinische Effektivität der Vakzine in der von uns durchgeführten Studie gezeigt wurde, ist der Beweis, dass diese auf Vakzine-induzierte T-Zellen, die AML-Blasten erkennen und lysieren, bisher nicht erfolgt.

Wie oben dargelegt, muss bei Verwendung von TAA, wie z.B. WT1, bedacht werden, dass diese auch in gesundem Gewebe nachgewiesen werden können. WT1 wird im adulten Organismus nur auf sehr niedrigem Expressionslevel in der Niere in Podozyten, im Ovar, im Hoden, in der Milz und in hämatopoetischen Progenitorzellen exprimiert (183, 184). Die T-Zellen, die mittels Tumorimpfung induziert werden, sind vom T-cell-Repertoire abhängig, das nach zentraler negativer Selektion Thymus übrig ist. Sie haben deshalb in der Regel keinen TCR mit ausreichender Affinität (185).

Ein weiterer, neben potentiell Immun-Escape wichtiger Aspekt ist die Gefahr der Induktion von „On-Target“-Toxizität, vor allem beim Transfer modifizierter hochavidere T-Zellen. Allerdings wurden weder bei Tumorimpfung mit dem WT1₁₂₆₋₁₃₄-Peptid (181) noch bei Transfer von allogenen WT1₁₂₆₋₁₃₄-spezifischen T-Zellen (186) bisher relevante Toxizitäten beobachtet. Dies mag allerdings auch an ineffizienter Prozessierung dieses Epitopes liegen (siehe unten); Daten zum AITC mit spezifischen T-Zellen gegen andere bisher identifizierter WT1-Epitope liegen zumindest im humanen System bisher nicht vor. In einem HLA-A24 transgenen Mausmodell konnte gezeigt werden, dass es trotz Zerstörung von Podozyten *in vitro* durch WT1₂₃₅₋₂₄₃-spezifische T-Zellen, *in vivo* zu keiner renalen Toxizität kommt – zumindest wenn keine renale Vorschädigung vorliegt (187). Des Weiteren wurde in einem Xenograft-Modell gezeigt, dass WT1₂₃₅₋₂₄₃-spezifische T-Zellen keine Hämatotoxizität verursachen (188).

Ein Problem bei der Verwendung von überexprimierten Antigenen ist sicherlich die Definition der Expressionsschwelle, die für effiziente Epitop-Präsentation und T-Zell-Erkennung relevant ist. Hohe Expression von WT1 in Blasten von Patienten mit AML, CML oder ALL sowie in Blasten von Patienten mit MDS wurde sowohl auf RNA-Ebene als auch auf Protein-Ebene nachgewiesen (189-192). mRNA-Expression von WT1 in den Leukämieblasten war deutlich höher im Vergleich zu gesunden hämatopoetischen Stammzellen (193). Während bei der AML keine signifikanten Unterschiede in der Höhe der Expression von WT1 innerhalb der einzelnen FAB-Typen detektiert wurden (194), konnten wir hingegen zeigen, dass die ALL nicht nur niedrigere mediane Expressionslevel von WT1 im Vergleich zur AML aufweist, sondern auch Unterschiede innerhalb der einzelnen Subgruppen (195). Die reife ALL zeigte

im Vergleich zu den anderen Subtypen einen nur sehr niedrigen Expressionslevel, der unterhalb des Expressionslevels von hämatopoetischen Stammzellen lag. Dies ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Omran et al (196). Im Gegensatz zu anderen Arbeiten konnten wir jedoch keine Unterschiede in der Expression von WT1 bei der B-ALL und T-ALL detektieren (192, 197-201). WT1 eignet sich also auch als Target zur Behandlung der ALL mit Ausnahme der reifen B-ALL. Interessanterweise zeigen Non-Hodgkin-Lymphome auch keine relevante WT1 Expression (202).

4.1.3 Expression von TAA in Tumorsphären

Eine wichtige Frage bei der Entwicklung T-Zell-therapeutischer Strategien - vor allem in der adjuvanten Situation - ist, ob auch Mikrometastasen und potentielle CSCs von T-Zell-therapeutischen Ansätzen erreicht werden. Gerade die langsam proliferierenden CSCs entgehen den konventionellen Therapien wie Chemotherapie oder Bestrahlung. Immuntherapie wie die T-Zell-basierte Immuntherapie mittels Vakzinierung oder ATT erreicht aber auch sich langsam teilende Zellen und eignet sich möglicherweise auch gut als Erhaltungstherapie zur Kontrolle von Mikrometastasen solider Tumore. Möglicherweise unterscheidet sich jedoch ihre Antigenexpression, vor allem die Expression von TAA wie Differenzierungsantigenen, von der Tumor-Bulk-Population. Um dieser Frage in vitro nachzugehen, wurden sogenannte Tumorsphären generiert durch Kultur von soliden Tumorzelllinien in serumfreien Medium. Diese Tumorsphären (10 - ~500 Zellen) dienen als in-vitro-Modell für mit potentiellen CSCs angereicherte Mikrometastasen. Im Gegensatz zur konventionellen 2D-Kultur spiegeln Tumorsphären eher die histomorphologischen, aber auch die metabolischen und proliferativen Eigenschaften des Originalgewebes wieder (203-205). Wir konnten bisherige Ergebnisse zu Melanomsphären (206, 207) bestätigen und zeigen, dass Tumorsphären zumindest auf mRNA-Ebene nicht nur TAA wie WT1, sondern auch Differenzierungsantigene exprimieren, die auch von den korrespondierenden 2D-kultivierten Tumorzellen exprimiert werden (208). Unterschiede im Antigenrepertoire mit der limitierten Anzahl der bisher untersuchten Antigene können allerdings nicht ausgeschlossen werden. Die Expression des embryonalen Transkriptionsfaktors WT1 ist aufgrund seiner onkogenen Funktion nicht überraschend. Die deutliche Expression von Differenzierungsantigenen in Tumorsphären war jedoch unerwartet, da eine Hochregulierung von Stammzell-assoziierten Genen nachgewiesen werden konnte. Dies weist auf eine Anreicherung mit potentiellen CSCs hin. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass potentielle Tumorstammzellen nur partiell reprogrammierte Stammzellen repräsentieren (209), von denen gezeigt werden konnte, dass sie eine inkomplette Repression oder sogar Hochregulation von Linien-spezifischen Transkriptionsfaktoren und proliferativen Genen aufweisen (210). Dies könnte ein Grund für die beobachtete Expression von Differenzierungsantigenen sein.

4.2 Fehlende Antigenprozessierung und –präsentation als Immun-Escape-Mechanismus

4.2.1 Immun-Escape in AML-Patienten nach Vakzinierung mit dem WT1₁₂₆₋₁₃₄-Peptid durch fehlende Prozessierung des WT1₁₂₆₋₁₃₄-Epitopes?

Obwohl es möglich ist, mit Vakzinierung Tumorantigen-spezifische T-Zellen zu induzieren, ist die klinische Effektivität in der Mehrheit der Vakzinierungsstudien bisher enttäuschend. Neben der Expansion von T-Zellen mit niedrigaffinen TCRs bei der Verwendung von TAAs als Vakzine werden eine verminderte Immunogenität der Tumorzellen und, vor allem in der metastasierten Situation, die durch den Tumor induzierte Immunsuppression als Ursache angesehen.

Eine weitere nicht in dieser Arbeit enthaltene Analyse der Arbeitsgruppe untersuchte, ob solche Mechanismen bei Patienten mit AML, die im Rahmen der von uns durchgeführten Vakzinierungsstudie mit dem WT1₁₂₆₋₁₃₄-Peptid geimpft worden sind (181), eine Rolle spielen. Es wurden in der Tat erhöhte Frequenzen von Tregs und MDSCs sowie die Expression Membran-gebundener oder löslicher immunsuppressiver Moleküle wie u. a. TGF β , PD-L1, IL10, IDO, HMOX, CXCR4, VEGF, PI-9 und IL8 bei einzelnen Patienten in unterschiedlichem Ausmaß nachgewiesen. Sie können grundsätzlich den klinischen Verlauf einzelner Patienten beeinflussen; mit Ausnahme der PD-L1 Expression auf leukämischen Blasten scheint jedoch kein direkter Zusammenhang mit dem klinischen Ansprechen auf Vakzinierung zu bestehen (211). Daneben wurden eine bereits bestehende oder unter Therapie auftretende eingeschränkte T-Zell-Funktionalität beobachtet (211, 212). Interessanterweise korrelierte die PD-1 Expression auf CD3+CD8+ T-Zellen mit dem PFS (211).

Allerdings zeigte auch der Transfer von aus gesunden Spendern isolierten WT1₁₂₆₋₁₃₄-spezifischen T-Zell-Klonen mit nachgewiesener Funktionalität bei AML-Patienten nach Stammzelltransplantation eine nur begrenzte klinische Effektivität (186). Dies lässt vermuten, dass, zusätzlich zu den oben beschriebenen Mechanismen eine verminderte Antigenität als Immun-Escape-Mechanismus eine Rolle spielt für den Progress nach Impfung mit dem WT1₁₂₆₋₁₃₄-Peptid.

Wie oben dargelegt, ist ein Verlust der Expression von WT1 aufgrund seiner onkogenen Eigenschaften unwahrscheinlich und konnte mit Ausnahme eines Patienten von zehn untersuchten Patienten ausgeschlossen werden (182). Weiterhin weist das WT1₁₂₆₋₁₃₄-Epitop

im Gegensatz zu vielen anderen Epitopen von Selbstantigenen eine ausreichende Affinität zum MHC-Komplex auf (213).

Weitere Ursachen für den Verlust der Epitopräsentation sind Defekte von APM-Molekülen oder HLA-Molekülen. Ein genereller Prozessierungs- und / oder Präsentationsdefekt scheint jedoch unwahrscheinlich, da keine Herunterregulierung von HLA-I-Molekülen im Allgemeinen und auch kein selektiver Verlust von HLA-A2-Molekülen auf der Zelloberfläche während des Progresses beobachtet wurde. Der Verlust der Präsentation eines einzelnen Epitopes kann jedoch auch durch Mutationen im Bereich des Epitopes bedingt sein. Mutationen können zu verminderter HLA-Bindung und Verlust der Erkennung durch Wildtyp-spezifische T-Zellen führen, aber auch die Prozessierung verhindern. Die Prozessierung kann auch durch Mutationen im Bereich der flankierenden Sequenzen des Epitopes beeinflusst werden (214-216). Mutationen von WT1 sind bei ca. 10% der Patienten mit AML berichtet worden (217, 218), auch im Exon 1 im Bereich der flankierenden Sequenzen des WT1₁₂₆₋₁₃₄-Epitopes (217). Wir konnten jedoch Mutationen innerhalb des Epitopes und seiner flankierenden Sequenzen (10 Aminosäuren N- und C-terminal) ausschließen (182).

Eine fehlende oder zumindest nicht ausreichende Prozessierung des WT1₁₂₆₋₁₃₄-Epitopes von einigen Tumorzellen kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Auch wenn in-vitro-Studien gezeigt haben, dass WT1₁₂₆₋₁₃₄-spezifische CTL-Linien / -Klone WT1-exprimierende Tumorzellen erkennen können (219), gibt es Hinweise, dass nicht alle Tumorzellen in der Lage sind, dieses Epitop zu prozessieren, wie z.B. Kolonkarzinomzelllinien (220), aber auch einige Leukämiezellen (eigene bisher nicht publizierte Ergebnisse), ohne dass ein genereller Defekt in der Antigenprozessierung vorliegt.

Eine wesentliche Voraussetzung für die Präsentation eines potentiellen MHC-I-Epitopes ist seine Prozessierung – in der Regel durch das Proteasom. Da unterschiedliche Proteasom-Typen existieren, die sich in ihrer proteolytischen Aktivität sowohl quantitativ als auch qualitativ unterscheiden, werden nicht alle Epitope gleich effizient von den verschiedenen Proteasom-Typen prozessiert; einige Epitope werden sogar nur von einem einzigen Proteasom-Typ prozessiert (57, 59, 221). Da also die Epitop-Präsentation auf der Zelloberfläche abhängig ist von der Proteasom-Komposition innerhalb Zelle, ist es essentiell für die Entwicklung Epitop-basierter immuntherapeutischer Strategien, nicht nur die Effizienz der Epitop-Prozessierung durch die verschiedenen Proteasom-Typen, sondern auch die Komposition der Proteasom-Typen in den entsprechenden Tumorzellen zu bestimmen. Guillaume et al konnte mittels eines ELISAs zeigen, dass solide Tumorzellen vorwiegend Standardproteasomen und nur zu einem geringen Anteil intermediäre Proteasomen exprimieren; konstitutive Expression von Immunoproteasomen ist nahezu nicht vorhanden. DCs hingegen exprimieren alle vier Proteasom-Typen (57). Über die Expression von Proteasomen in hämatologischen Neoplasien ist nicht viel bekannt. Mittels einer

zellpermeablen Sonde (Bodipy TMR-Ahx3L3VS, MV151), die die Detektion katalytisch aktiver Proteasom-Untereinheiten in intakten Zellen erlaubt, konnten sowohl wir als auch Kraus et al zeigen, dass sowohl gesunde und neoplastische lymphatische Zellen als auch myeloische neoplastische Zellen eine variable Expression von Standardproteasom- und Immunproteasom-Untereinheiten in zusammengelagerten Proteasomen exprimieren. Ein Entitäten-abhängiges Muster konnte nicht identifiziert werden (222-224). Eine genaue Quantifizierung der einzelnen Proteasom-Typen gelingt allerdings nur mit dem von Guillaume et al entwickelten quantitativen Sandwich-ELISA. Mit Hilfe dieses ELISAs wurden Myelom- und Leukämiezelllinien als auch periphere Blasten von AML-Patienten mit hoher Tumorlast untersucht. Auch hier zeigte sich ein unterschiedliches Proteasom-Expressionsmuster. Myelomzelllinien exprimierten alle vier Proteasom-Typen in unterschiedlichem Ausmaß; Leukämiezelllinien exprimierten vorwiegend (~90%) Standardproteasomen, periphere Blasten jedoch vorwiegend Immunproteasomen (> 90%) (eigene im Labor von Prof. van den Eynde, LICR, Brüssel generierte bisher unveröffentlichte Daten). Die hohe Expression von Immunproteasomen in den Blasten ist am ehesten durch das inflammatorische Mikroenvironment bei hoher Tumorlast bedingt. D. h. das Tumormikroenvironment kann dynamisch die Expression der Proteasom-Typen und damit auch die Antigenprozessierung regulieren. Für therapeutische Ansätze mit breiter klinischer Anwendung sind Epitope, die nur von einem Proteasom-Typ prozessiert werden, unter Umständen nicht geeignet. Über die Prozessierung des WT1₁₂₆₋₁₃₄-Epitopes liegen bisher keine publizierten Daten vor. Auch wenn die Mehrheit der Epitope Proteasom-abhängig prozessiert wird, so gibt es einige Epitope, die Proteasom-unabhängig prozessiert werden (61). Eigene bisher unpublizierte Ergebnisse weisen darauf hin, dass dieses Epitop nicht vom Proteasom prozessiert wird, sondern möglicherweise von einer im Zytoplasma nicht ubiquitär exprimierten Serinprotease.

4.2.2 Immun-Escape von Tumorsphären durch Verlust der HLA-Oberflächenexpression

Untersuchungen zu Immun-Escape durch fehlende Antigenprozessierung oder Verlust der Epitopräsentation wurden bisher vor allem mit dem Fokus auf den Primärtumor oder seiner Makrometastasen durchgeführt, entweder immunhistologisch an Paraffinschnitten oder an Einzelzellsuspensionen, unter Umständen nach 2D-Kultur in serumhaltigem Medium. Unklar ist jedoch, ob Mikrometastasen und Tumorstammzellen sich hinsichtlich der HLA-Expression und APM-Expression vom Primärtumor unterscheiden. Dies ist eine wichtige Frage hinsichtlich des Einsatzes von Tumorstammzellen in der in der adjuvanten Situation bzw. bei minimaler Tumorlast. Es wurden deshalb auch in den oben beschriebenen Tumorsphären

die Expression von HLA-Molekülen und APM-Molekülen bestimmt und mit der Expression in den entsprechenden adhärent wachsenden Tumorzelllinien verglichen. Daten zu APM-Molekülen in Sphären waren bisher limitiert (225). Wir fanden keinen Defekt in der Expression von Immunoproteasom-Untereinheiten oder TAP-Transportern. Da hier jedoch nicht die Zusammensetzung zusammengelagerter Proteasomen untersucht wurde, können Unterschiede in der Expression einzelner Proteasom-Typen nicht ausgeschlossen werden (57).

Bisherige Daten zur HLA-Expression in Tumorsphären zeigten teilweise eine höhere Oberflächenexpression von HLA-I- und II-Molekülen in Tumorsphären im Vergleich zu adhärent wachsenden Zellen, teilweise aber auch keinen Unterschied (226-229). In unserem Panel von Melanomzelllinien und epithelialen Tumorzelllinien konnten wir jedoch eine deutliche Herunterregulierung oder sogar Verlust der Oberflächenexpression von HLA-I- und HLA-II-Molekülen in den Tumorsphären beobachten. Dies war dementsprechend mit einer verminderten Erkennung peptidbeladener Sphären durch spezifische T-Zellen assoziiert. Im Gegensatz zu bisherigen Beobachtungen in Melanom- und Glioblastomsphären konnte die HLA-Expression trotz intaktem IFN γ -Signalweg nicht durch IFN γ hochreguliert werden (225, 230). Tumorsphären scheinen sich - zumindest in diesem Modell - der T-Zell-Erkennung durch verminderte HLA-Expression oder Verlust der HLA-Expression auf der Tumorzelloberfläche zu entziehen. Der zugrundeliegende Mechanismus wurde nicht im Detail untersucht. Am wahrscheinlichsten ist jedoch eine postranskriptionelle, epigenetische Regulation, da keine Herunterregulierung von HLA-I und β 2m auf mRNA-Ebene sowie kein intrazellulärer Verbleib von HLA-Molekülen beobachtet werden konnte (231, 232). Weitere Untersuchungen sind sicher sinnvoll, da Medikamente wie DNA-Methyltransferase-Hemmstoffe oder Histon-Deacetylase-Inhibitoren, die in die epigenetische Regulation eingreifen, verfügbar sind. In Glioblastomsphären konnte eine Hochregulation von HLA-Molekülen mittels 5-Azacytidin erreicht werden (225). Alternativ könnten HLA-unabhängige Strategien zum Einsatz kommen, wie der NK-Zell-Transfer oder -sofern ein tumorspezifisches Antigen verfügbar ist - Transfer von T-Zellen, die chimäre Antigen-Rezeptoren exprimieren, sogenannte CARs (75).

4.3 Immun-Escape durch Induktion immunsuppressiver Zellen und Expression immunsuppressiver Zytokine

4.3.1 Periphere Immundysregulation bei lokal fortgeschrittenem Melanom

Immundysregulation durch Induktion immunsuppressiver Zellen und Expression immunsuppressiver löslicher oder membrangebundener Moleküle entsteht schon sehr früh in der Entwicklung eines Tumors und nimmt in ihrer Ausprägung mit Progress des Tumors kontinuierlich zu. Sie ist schließlich nicht nur lokal in der unmittelbaren Tumorumgebung und regionalen Lymphknoten nachweisbar, sondern auch systemisch im pB. Diese systemische Immundysregulation ist nicht erst im metastasierten Stadium nachweisbar (233), sondern schon bei lokal fortgeschrittenen Tumoren: So wurden z. B. bei Melanompatienten im Stadium IIb/III- niedrige Serumlevel von IL2 und hohe Serumlevel diverser Zytokine wie u. a. IL1 α , IL1 β , IL5, IL6, IL8, IL12p40, IL13, IFN α und TNF α und Chemokine, wie MCP-1, MIP-1 α und MIP-1 β , beobachtet (234); des Weiteren scheinen Frequenzen von peripheren Tregs als auch von unreifen DCs in regionären Lymphknoten mit dem Tumorstadium bzw. der Tumordicke anzusteigen (110, 235, 236). Passend zu diesen Beobachtungen konnten wir bei Patienten mit lokal fortgeschrittenem Melanom im Stadium III signifikant höhere mRNA-Expressionslevel von *TGF β 1* im pB im Vergleich zu Gesundkontrollen nachweisen (237). Im Gegensatz zu Daten vom metastasierten Melanom konnte jedoch kein Unterschied in der mRNA-Expression von *IL10* oder von inflammatorischen Zytokinen und/ oder ISGs im pB im Vergleich zu Gesundkontrollen beobachtet werden. Interessanterweise fand sich auch keine signifikante Assoziation von *IL10*- und *TGF β 1*-mRNA-Expressionsleveln, als auch von mRNA-Expressionsleveln inflammatorischer Zytokine und ISGs mit klinischen und pathologischen Eigenschaften des Tumors, wie mit mikroskopischem oder makroskopischem Lymphknotenbefall, mit der Breslow-Dicke oder mit Ulzeration. Das Ausmaß der Immundysregulation scheint also nicht allein durch das Tumorstadium bzw. bestimmte klinische oder pathologische Eigenschaften bedingt zu sein, sondern möglicherweise auch durch individuelle immunsuppressive Eigenschaften des Tumors. Dies könnte auch die Inter-Patienten-Variabilität hinsichtlich der Aktivierung von STAT1 (238) und Induktion von ISGs (239) durch IFN α bei Melanompatienten erklären.

4.3.2 Peripherer Immunphänotyp als potentieller Biomarker mit prognostischer Bedeutung bei lokalisierter und metastasierter Tumorerkrankung

Die Erkenntnis, dass Immunzellen eine Schlüsselrolle beim Tumorprogress spielen, führte zu der Annahme, dass immunologische Endpunkte als zuverlässige Biomarker für das

Überleben oder Therapieansprechen und somit für Therapiestratifizierung dienen können – nicht nur im Kontext von Immuntherapien.

Eine Reihe von potentiellen prognostischen und prädiktiven Immunbiomarkern sind identifiziert worden, aber nur wenige sind bisher in unabhängigen klinischen Studien an größeren Kohorten bei unterschiedlichen Tumorentitäten validiert worden, wie z. B. die T-Zell-Signatur beim Kolonkarzinom (240, 241), die B-Zell-Immunsignatur beim Mammakarzinom, nichtkleinzelligen Lungenkarzinom und Kolonkarzinom (242) oder die Neutrophilen-Lymphozyten-Ratio (NLR) bei u. a. Lungen-, Mamma-, Nieren-, Ovarial- und Kopf-Hals-Karzinomen (243). Hierbei kann zwischen Markern für eine erfolgreiche Immunkontrolle, wie Markern einer Typ-I-Immunantwort und spezifische T-Zell-Antworten, und Markern für Immun-Escape inklusive tumorinduzierte Immunsuppression unterschieden werden. Des Weiteren kann zwischen gewebebasierten Markern, die den Tumor- bzw. das Tumormikroenvironment charakterisieren, und Körperflüssigkeiten-basierten Markern („Liquid Biopsies“), z.B. Markern aus dem peripheren Blut, unterschieden werden [Übersicht (244)].

Prognostische oder prädiktive Immunbiomarker werden nicht nur für Therapiestratifizierung metastasierter Tumore benötigt, sondern auch in der adjuvanten Situation. Ein Beispiel ist das lokal fortgeschrittene maligne Melanom (s. u.).

Blut-basierte Biomarker sind wenig invasiv und ermöglichen auch in der adjuvanten Situation, in der kein Tumor mehr zur Verfügung steht, repetitive Analysen zum Therapiemonitoring (245, 246). Allerdings stellt sich die Frage, wie repräsentativ Analysen aus dem peripheren Blut für das Geschehen im Tumor bzw. seiner unmittelbaren Umgebung sind. Das begleitende Immunmonitoring der Vakzinestudien hat z. B. gezeigt, dass Vakzine-spezifische T-Zell-Antworten nicht prädiktiv sind [Übersicht (244)]. Analysen mit PBMCs repräsentieren weder Komposition, Lokalisation noch Funktion der Immunzellen im Tumor.

Marker der tumorinduzierten peripheren Immundysregulation, die als direkte Folge der lokalen Immundysregulation entsteht, können durchaus sowohl prognostische als auch prädiktive Bedeutung haben, wie z. B. für die Neutrophilen-Lymphozyten-Ratio gezeigt wurde (243). Zytokinprofile, Phänotyp-Analysen von Immunzellpopulationen und lösliches oder von Zellen exprimiertes PD-L1 sind die bisher am häufigsten identifizierten (potentiellen) Biomarker auf der Basis von peripherem Blut (247). Voraussetzung ist, dass für die Detektion in ausreichender Konzentration vorhandene Marker bzw. geeignete Nachweismethoden zur Verfügung stehen. Molekularbiologische Marker sind in der Regel praktikabler hinsichtlich Probenlagerung und -verarbeitung als Serum- oder zellbiologische Analysen und waren auch Gegenstand der in dieser Arbeit enthaltenen Untersuchungen zum malignen Melanom und mRCC.

4.3.3 Prognostische und prädiktive Bedeutung des peripheren Immunphänotyps bei mit PEG-IFN α behandelten Hochrisiko-Melanompatienten

Adjuvante Therapie mit IFN α wird für Patienten mit lokal fortgeschrittenem Melanom empfohlen, jedoch scheint nur eine Minderheit der Patienten von dieser Therapie zu profitieren. Vor allem im Hinblick auf die Toxizität, aber auch auf Kosten adjuvanter IFN α -Therapie werden Biomarker für Therapiestratifizierung und Patientenselektion dringend benötigt. Verschiedene Faktoren wie Autoantikörper (167, 248, 249), SB100B (250) oder Ferritin und CRP im Serum (251) wurden in Studien mit adjuvanter IFN-Therapie untersucht, sie haben aber allenfalls prognostischen, jedoch keinen prädiktiven Wert. Die Auswertung der EORTC18991 Studie, in der Patienten mit Melanom im Stadium III für mindestens 5 Jahre mit PEG-IFN α -2b behandelt wurden, konnte nach 7,6 Jahren Follow-up jedoch zeigen, dass vorwiegend nur Patienten mit Ulzeration und mikroskopischem Tumorbefall hinsichtlich des RFS, DMFS und OS signifikant profitieren (252).

Yurkovetsky et al. zeigte, dass die Serumlevel inflammatorischer Zytokine bei Hochrisiko-Melanompatienten, die mit Hochdosis-IFN α behandelt wurden, positiv mit dem RFS korrelierten (234). Möglicherweise spielt das Immunsystem nicht nur als prognostischer, sondern auch prädiktiver Faktor für das Ansprechen auf IFN α eine Rolle. Tarhini et al. konnte zeigen, dass bei Melanompatienten mit intermediärem Risiko, die im Rahmen der E1697 Phase III Studie adjuvant IFN- α 2b für einen Monat erhielten, eine pro-inflammatorische Signatur bestehend aus IL-2R α , IL-12p40 and IFN α nach 4 Wochen ein günstiger prädiktiver Faktor für das RFS war (253).

Neben einer direkten Wirkung auf Tumorzellen und Gefäße hat IFN α auch immunmodulatorische Eigenschaften (168, 233, 234, 254, 255). Allerdings wurde eine Variabilität in der Aktivierung von STAT1 (238) und Induktion von ISGs (239, 256, 257) durch IFN α bei Melanompatienten und Patienten mit chronischer Hepatitis C beobachtet. Bei Hepatitis C Patienten war die Induktion von ISGs assoziiert mit der Reduzierung der Viruslast (257).

Wir haben deshalb den prognostischen und prädiktiven Wert von mRNA-Expressionsleveln von ISGs (ISG15, STAT1, CXCL10), Inhibitoren des JAK/STAT Signalweges (STAT3, SOCS1, SOCS3) (258) und von Zytokinen (TNF α , IL10, TGF β 1) im pB von Stadium III Melanompatienten, die adjuvant mit PEG-IFN α -2b im Rahmen der EORTC 18991 Studie behandelt wurden (151), vor Beginn der Therapie und nach 6 Monaten untersucht (237). Keiner der untersuchten Marker hatte prädiktiven Wert. Jedoch konnten höhere mRNA-Expressionslevel von SOCS1 und SOCS3 als prognostisch ungünstige Marker sowohl für das RFS als auch das DMFS identifiziert werden. Expression von SOCS-Proteinen in Immuneffektor-Zellen scheint nicht nur die Antwort auf exogenes IFN α zu beeinflussen,

sondern auch für die endogenen IFN-Aktivität und Immuntoleranz eine wichtige Rolle zu spielen (259). SOCS1 / SOCS3 werden nicht nur von IFN α , sondern auch von verschiedenen inflammatorischen Zytokinen im Rahmen einer negativen Feed-Back-Regulation induziert. Ihre Expressionslevel im pB spiegeln somit möglicherweise ein unterschiedliches Zytokinmilieu wieder. Interessanterweise wurde ein proinflammatorisches Tumormikroenvironment als potentieller prädiktiver Faktor für Vakzinierung mit rekombinantem MAGE-A3 oder Therapie mit Ipilimumab identifiziert (260-262).

Signifikante immunregulatorische Effekte konnten wir nicht feststellen, mit Ausnahme der Abnahme der mRNA-Expression von ISG15. Die Ursache hierfür ist unklar, da es sich eigentlich um ein ISG handelt, das die IFN-Antwort fördert (263, 264). Möglicherweise kommt es jedoch im Rahmen einer Gegenregulation zur Abnahme der Expression, um eine überschießende Reaktion auf dauerhafte IFN-Stimulierung zu verhindern. Interessanterweise zeigten Patienten mit einem Abfall über 60 % des Ausgangslevels ein schlechteres RFS und DMFS. Allerdings kann diese Beobachtung aufgrund der geringen Patientenzahl, die für die Analyse zur Verfügung stand, nur als hypothesengenerierend betrachtet werden.

4.3.4 Prognostische Bedeutung der peripheren Immundysbalance beim metastasierten Nierenzellkarzinom unter zielgerichteter Therapie

Die Behandlungsoptionen des mRCC haben sich durch die Entwicklung der zielgerichteten Therapie deutlich verbessert. Sie bleiben auch trotz der neuen Behandlungsoption mit Immun-Checkpoint-Inhibition beim RCC (141) fester Bestandteil der Therapie. Die Mehrheit der Patienten entwickelt im Verlauf eine Resistenz gegen die zielgerichteten Therapien – wenn auch nach unterschiedlich langer Behandlungsdauer (265). Deshalb werden sowohl prognostische als auch für Therapieansprechen prädiktive Biomarker für die Therapiestratifizierung dringend gebraucht. Basierend auf prognostischen Modellen sind verschiedene klinische und laborchemische Risikofaktoren zu prognostischen Scores zusammengefasst worden (266). Der am häufigsten eingesetzte Score ist der sogenannte Motzer-Score (MSKCC-Score), der für nicht vorbehandelte Patienten etabliert wurde (267) und für Zytokin-vorbehandelte Patienten modifiziert wurde (268). Die Cleveland Clinic Foundation (CCF) Gruppe validierte den Motzer-Score und erweiterte ihn um zwei negative unabhängige Prädiktoren, vorherige Radiotherapie und hepatische, pulmonale oder retroperitoneale Metastasen (269). Heng et al. erweiterte den Motzer-Score für mRCC-Patienten, die mit VEGF-gerichteter Therapie behandelt werden, um absolute Neutrophilen- und Thrombozytenzahlen (270). Keiner der Scores ist ein signifikanter Prädiktor für das PFS. Motzer et al. entwickelte deshalb ein Nomogramm für die Prädiktion des 12-Monate-PFS für mit Sunitinib behandelte Patienten basierend auf klinischen und laborchemischen Eigenschaften (271). Daneben wurde eine Vielzahl von potentiellen gewebebasierten und

zirkulierenden Biomarkern mit sowohl prognostischer als auch für das Therapieansprechen prädiktiver Bedeutung identifiziert (272-274). Der Baseline-VEGF-Serumlevel wurde als unabhängiger negativer prognostischer Marker für das Überleben von Patienten, die mit zielgerichteter Therapie oder IFN α behandelt wurden, identifiziert (275-277). In Bezug auf Therapie mit Sorafenib scheinen höhere Serumlevel von VEGF jedoch mit besserem klinischen Outcome assoziiert zu sein (278). Unter den Zytokinen ist IL6 der vielversprechendste Marker, auch wenn er bisher hauptsächlich nur bei Sunitinib- und Pazopanib-behandelten Patienten untersucht wurde (274). Patientin mit höheren IL6-Serumkonzentrationen profitierten eher von Pazopanib im Hinblick auf das PFS (279). Neben spezifischen angiogenen Faktoren (CAF), müssen multi-CAF-Signaturen ebenfalls berücksichtigt werden. Im Rahmen einer Phase II Studie, die Sorafenib mit Sorafenib + IFN α bei fortgeschrittenem RCC verglich, wurde eine 6 Marker Baseline CAF-Signatur [Osteopontin, VEGF, Carboanhydrase 9 (CAIX), Kollagen IV, VEGF Rezeptor-2, und Tumornekrosefaktor-verwandter Apoptose-induzierender Ligand (TRIAL)] identifiziert, die mit dem Benefit im PFS korrelierte (280).

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass nicht nur Marker einer systemischen Inflammation wie Neutrophile oder C-reaktives Protein (CRP) oder TNF α -Serumlevel (43, 270, 281-286), sondern auch immunsuppressive Zellen wie Tregs (113, 287-289) neben löslichen immunsuppressiven Molekülen wie IL6, IL8 und VEGF (274, 279, 290) einen negativen prognostischen Einfluss auf das Überleben von Patienten mit mRCC haben, die mit zielgerichteter Therapie behandelt wurden. Es gibt somit zahlreiche Hinweise darauf, dass auch in der Ära der zielgerichteten Therapie sowohl die lokale als auch die periphere Tumor-induzierte Immundysbalance prognostische Bedeutung hat [Übersicht (107)].

Wir konnten in einer Kohorte von 46 Patienten mit mRCC erhöhte mRNA-Expressionslevel von *TGF β 1* und *IL10* als auch erhöhte Frequenzen von FoxP3⁺CD25^{high} CD4⁺-T-Zellen / CD3⁺ T-Zellen im Vergleich zu einer gesunden Kontrollpopulation nachweisen (291). Für mit Sorafenib behandelte mRCC-Patienten (n=42) war jedoch nur die mRNA-Expression von *TGF β 1* und nicht die Frequenz von Tregs prognostisch bedeutsam, wobei interessanterweise hohe Expressionslevel mit einem verbesserten PFS und OS assoziiert waren. Dies mag initial verwundern; TGF β spielt jedoch eine duale Rolle in der Immunregulation mit immunsuppressiven und immunstimulierenden Effekten. Endogenes und exogenes TGF β regulieren Differenzierung, Homeostase und Funktion von T-Zellen. Abhängig von der Zytokinumgebung induziert TGF β Tregs, Th9-Zellen und Th17-Zellen und inhibiert die IL12 induzierte Th1-Antwort. TGF β kann jedoch auch die Anti-Tumor-Immunantwort stärken: Gemeinsam mit IL4 fördert TGF β CD103⁺ Th1-Zellen durch Induktion der Transkriptionsfaktoren Eomes und T-bet; (292, 293). Es kann außerdem die TNF α -Produktion von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen steigern und Apoptose von T-Zellen verhindern

(294, 295). Ferner blockiert TGF β 1 die Entwicklung von T_{CM}-Zellen zugunsten von T_{EM}-Zellen über die Expression von Eomes und T-bet (34) und unterstützt so ebenfalls eine effektive Anti-Tumor-Immunantwort.

Neben dem immunsuppressiven Phänotyp können auch Veränderungen in der Frequenz und Funktion von Immun-Effektorzellen der adaptiven und angeborenen Immunantwort eine Rolle in der Tumor-induzierten Immundysbalance spielen (107). Bisher ist wenig bekannt über den prognostischen Einfluss von Faktoren, die die Effektorfunktionen der Anti-Tumor-Immunantwort bei mRCC-Patienten unter zielgerichteter Therapie regulieren. In einer weiteren Untersuchung konnten wir mRNA-Expression von *Eomes* im pB als unabhängigen günstigen prognostischen Faktor für das PFS und OS von mit Sorafenib behandelten mRCC-Patienten identifizieren (296). Der mRNA-Expressionslevel von *Eomes* korrelierte positiv mit der mRNA-Expression von *Tbx21*, das für T-bet kodiert, aber auch mit der mRNA-Expression von TGF β 1. Verschiedene Studien zeigen, dass die Expression der T-box-Transkriptionsfaktoren Eomes und T-bet im Tumorgewebe prognostischen Einfluss hat (16, 297-299). Beide Faktoren regulieren die Effektorzellen der adaptiven und angeborenen Immunantwort. Sie sind nicht nur wichtig für die Balance zwischen Gedächtnis- und Effektor-T-Zellen, sondern auch für die Beibehaltung der Effektorfunktion in langlebigen CD8⁺ Gedächtnis-Zellen (38, 40). Daneben exprimieren CD103⁺ Th1-Zellen vorwiegend Eomes, und IFN γ -induziertes T-bet und TGF β werden für die Expression von Eomes benötigt (292). Dies könnte u.a. die positive Korrelation von mRNA-Expressionsleveln von TGF β 1 mit mRNA-Expressionsleveln von *Eomes* und *Tbx21* erklären. Wir fanden jedoch keinen prognostischen Einfluss von Tc1-Zellen oder Th1-Zellen noch von T_{CM}- oder T_{EM}-Zellen. In unserer Patienten-Kohorte wurden reife NK-Zellen als Zellpopulation, die vorwiegend Eomes exprimiert, identifiziert. Ob der positive prognostische Einfluss durch diese Zellpopulationen vermittelt wird, kann abschließend aufgrund der geringen Patientenzahl nicht beantwortet werden.

Es ist jedoch wahrscheinlicher, dass der günstige prognostische Einfluss von höheren *Eomes*-mRNA-Leveln nicht durch eine spezifische Zellpopulation vermittelt wird. mRNA-Expression von *Eomes* scheint ebenso wie TGF β 1 eher Teil einer günstigen Immunsignatur zu sein.

Ob ein höherer mRNA-Level von *Eomes* als Indikator für eine günstige Immunsignatur ein brauchbarer Marker ist, sei es allein oder in Kombination mit schon etablierten klinisch-pathologischen Eigenschaften oder zirkulierenden angiogenen Markern wie VEGF oder Zytokinen (273, 300), muss noch an einer größeren Patientenkohorte in einer prospektiven Studie evaluiert werden.

4.3.5 Immunmodulation durch Tyrosinkinaseinhibitoren – in-vivo-Effekte von Sorafenib beim mRCC

Mittels pharmakologischer Immunmodulation wird versucht, die Balance zugunsten der Tumor-Immunabwehr zu verschieben. Klassische sowohl endogene als auch therapeutische Immunmodulatoren sind Zytokine wie z. B. IFN α oder IL2 oder die zuletzt deutlich an Bedeutung gewonnene Immuncheckpoint-Inhibitoren. Daneben haben aber auch konventionelle Therapien wie Zytostatika oder Bestrahlung und zielgerichtete Therapien immunmodulatorische Effekte und können deshalb synergistisch mit immuntherapeutischen Ansätzen wirken. Hier spielen sowohl der immunogene Zelltod als auch direkte Effekte auf Tumorzellen, wie u. a. die Regulation der HLA-Expression oder der Expression von Cancer-Testis-Antigenen, eine Rolle als auch Effekte auf das Tumormikroenvironment, wie z.B. Regulation der Frequenzen immunsuppressiver Zellen [Übersicht (301, 302)]. Basierend auf diesen Erkenntnissen testen aktuelle klinische Studien die Kombination von Immuntherapie wie z.B. Vakzinierung oder Checkpoint-Blockade mit Zytostatika oder Bestrahlung bei diversen Tumorentitäten (302).

Auch beim RCC gibt es Bestrebungen, immuntherapeutische Kombinationstherapien zu entwickeln. Durch die Entwicklung neuer Medikamente gegen ras / raf Kinasen, mTor oder Angiogenese hat sich zwar die Prognose des mRCC deutlich verbessert (303), die Ansprechdauer unter TKIs und mTor-Inhibitoren ist jedoch begrenzt. Langanhaltende Remissionen sind bisher nur nach Immuntherapie bei einzelnen Patienten beobachtet worden (133). Die Ergebnisse mit Immuncheckpoint-Inhibitoren sind beim RCC vielversprechend, und Inhibition von PD-1 ist inzwischen als Zweitlinientherapie für das RCC zugelassen, jedoch spricht, wie auch bei anderen Tumorentitäten beobachtet, nur eine Minderheit der Patienten an (141).

Hieraus ergibt sich zwangsläufig die Frage nach immunmodulatorischen Eigenschaften der zielgerichteten Therapien wie der TKI. Dies ist nicht nur für die Entwicklung von Kombinationstherapien, sondern auch von sequentiellen Therapiestrategien interessant. Signalwege, wie z. B. der Ras/Raf-Signalweg oder mTor-Signalweg, die eine wichtige Rolle für die Tumorzellproliferation spielen und von den zielgerichteten Therapien inhibiert werden, spielen auch eine wichtige Rolle für Differenzierung, Proliferation und Funktion von Immunzellen (304, 305). Die immunologischen Effekte von TKIs sind bisher vor allem in vitro untersucht worden (306, 307). Daten liegen überwiegend für Sunitinib und Sorafenib vor. Sie können sowohl die Frequenz und Proliferation von Immunzellen wie Tregs, MDSCs, NK-Zellen und T-Zellen inklusive deren Subpopulationen beeinflussen als auch deren Aktivität und Funktion, wobei unterschiedliche immunmodulatorische Effekte beschrieben worden sind. Dies ist am wahrscheinlichsten auf unterschiedliche Affinitäten für Off-Target-Kinasen

zurückzuführen (304): Sorafenib oder Sunitinib sind nicht spezifische Inhibitoren einer einzelnen Tyrosinkinase, sondern inhibieren verschiedenen Kinasen wie VEGFR (Typ 1–3), PDGFR- β , Flt3 and c-kit mit unterschiedlichen, inhibitorischen Konzentrationen (308). Im Gegensatz zu Sunitinib inhibiert Sorafenib auch c-Raf und b-Raf, wohingegen Sunitinib PDGFR- α , Colony Stimulating Factor 1 Receptor (CSFR1) und Fibroblast Growth Factor Receptor 1 (FGFR1) inhibiert.

Für Sorafenib haben in vitro-Studien einen ungünstigen Effekt auf Immunzellen gezeigt: Sorafenib hatte nicht nur zytotoxische Effekte auf Tregs, sondern inhibierte auch die Proliferation und Funktion von T-Zellen und NK-Zellen. Hier dürften sowohl MAPK-abhängige als auch unabhängige Mechanismen eine Rolle spielen (309-315). Des Weiteren berichtete Hipp et al., dass Sorafenib im Gegensatz zu Sunitinib die Funktion von differenzierten DCs inhibierte (311). Alfaro et al hingegen fand, dass Sorafenib und nicht Sunitinib inhibitorischen Effekte von VEGF auf die Differenzierung von DCs aus myeloischen Vorläufern inhibierte (316).

In vitro-Studien spiegeln jedoch nicht zwangsläufig die in vivo Situation wieder. Immunstimulierende Effekte von Sorafenib durch direkte Effekte auf Tumorzellen werden in den in vitro-Studien nicht berücksichtigt. Hier spielen nicht nur der immunogene Zelltod oder die Reduzierung der Immundysbalance durch Reduzierung der Tumorlast eine Rolle (311, 317-319). Immunstimulierende Effekte können auch durch direkte Effekte auf Tumorzellen, wie z. B. verstärkte HLA-Expression auf der Zelloberfläche durch Inhibition des RAS-Signalweges (320) oder Suppression der Expression von immuninhibitorischer Zytokine - wie für MEK Inhibitoren gezeigt (321) - induziert werden.

Wir haben deshalb die immunmodulatorischen Effekte von Sorafenib in vivo untersucht. Wir konnten nach 8 Wochen Therapie nur einen geringen günstigen immunmodulatorischen Einfluss von Sorafenib im pB von mRCC-Patienten nachweisen (322). Innerhalb der CD3⁺ T-Zellpopulation konnten wir eine Abnahme der Frequenz von CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺ T-Zellen, die am ehesten Tregs entsprechen dürften, beobachten und somit bisherige in vitro-Daten für humane PBMCs (313) als auch Daten aus einem Mausmodell (322) bestätigen. Einen inhibitorischen Effekt auf Zytokinsekretion von Typ I-Immunzellen konnte entgegen der bisherigen in-vitro-Daten nicht detektiert werden; allerdings konnten wir auch keinen Einfluss auf im Vergleich zu Gesundkontrollen erhöhte mRNA-Expressionslevel von *TGF β 1* und *IL-10* oder erhöhte Frequenzen von IL-10 und TGF- β produzierende Monozyten nachweisen. In vitro-Daten weisen darauf hin, dass Sorafenib die CCR7-Expression herunterreguliert (313). Somit sollte sich Sorafenib günstig auf die Frequenz von T_E-Zellen und T_{EM}-Zellen auswirken. Aufgrund der Limitierung von Patientenmaterial konnte dies nur anhand von 12 Patienten

untersucht werden. In der Tat zeigte sich ein Anstieg von CD4⁺ T_{EM}-Zellen und CD8⁺ T_E-Zellen (unveröffentlichte Daten).

Sorafenib hatte also in vivo keinen negativen Effekt auf die Typ I-T-Zellantwort, war aber nicht in der Lage die periphere Immunsuppression zu beheben. Sorafenib ist also ein möglicher Kombinationspartner für immuntherapeutische Ansätze, Sunitinib und Axitinib weisen jedoch möglicherweise günstigere immunmodulatorische Eigenschaften auf (311, 313).

Für Sunitinib, das für die Erstlinienbehandlung des RCC zugelassen ist, wurde gezeigt, dass es in vitro im pB von RCC-Patienten die Typ I-T-Zell-Antwort fördert und die Frequenzen von Tregs und MDSCs senkt (317, 318). Außerdem förderte es die Antitumor-Immunantwort im Zusammenhang mit Vakzinierung oder ATT in Mausmodellen (323-326).

Basierend auf diesen Ergebnissen prüfen aktuelle Studien zur Behandlung des RCC die Kombination von anti-PD-1-Antikörpern mit TKIs wie Axitinib oder Sunitinib (siehe www.clinicaltrials.gov).

4.4 Ausblick: Perspektiven der Immuntherapie in der Ära der Präzisionsmedizin

Die Präzisionsmedizin oder personalisierte Medizin ist inzwischen auch in der Entwicklung der Immuntherapie angekommen. Das Ziel personalisierter Therapie ist, Patienten zu identifizieren, die sehr wahrscheinlich auf eine bestimmte Therapie ansprechen, um nicht unnötig eine potentiell toxische, ineffektive Therapie zu verabreichen, aber auch um Kosten zu sparen. Genaue Kenntnisse über die Antigenität und Immunogenität und somit auch über vorhandene Immun-Escape-Mechanismen eines Tumors sind entscheidende Voraussetzungen für die Präzisions-Immuntherapie. Da die Antigenität und Immunogenität auch innerhalb einer Tumorentität variieren kann, gewinnt patientenindividuelles molekulares und zelluläres „Immun-Profiling“ mit „High-Throughput“ – Methoden wie „Next Generation Sequencing“ oder massenspektrometrischen Methoden immer mehr an Bedeutung (247).

Sie ermöglichen nicht nur die Charakterisierung von Mutationsprofilen, Gensignaturen und epigenetischen Modifikationen von Tumorzellen, sondern auch von Immunzellen inklusive der funktionellen Analyse von T-Zellen und TCR-Repertoire-Analysen.

Mit Hilfe der neuen Methoden können prognostische und prädiktive Immun-Biomarkern wie Immungensignaturen oder Immunprofile, auf deren Basis eine Therapiestratifizierung erfolgen kann, definiert werden. Daneben können Targets für Immunmodulation und neue, patientenindividuelle Antigene für T-Zell-therapeutische Ansätze identifiziert und individuelle

immuntherapeutische Konzepte entworfen werden. In Kooperation mit dem vom Berliner Gesundheitsinstitut (BIH) geförderten Forschungskonsortium "Targeting somatic mutations in human cancer by T cell receptor gene therapy" verfolgt meine Arbeitsgruppe aktuell das Ziel adoptive T-Zelltherapie für solide Tumore mit TSAs als immunogene Zielstrukturen zu entwickeln.

Da Immun-Escape-Mechanismen nicht nur innerhalb einer Tumorentität sehr variabel sein können, sondern auch gleichzeitig mehrere Mechanismen zum Tragen kommen können, bieten sich Kombinationstherapien an. Sowohl eine Kombination von verschiedenen immuntherapeutischen Ansätzen, z. B. T-Zell-basierter Therapie wie ATT mit Checkpoint-Inhibition, als auch eine Kombination von Immuntherapie mit Chemotherapie, Radiotherapie oder zielgerichteter Therapie ist denkbar, wobei, wie oben dargelegt, Kombinationspartner mit günstigem immunmodulatorischen Profil bevorzugt werden sollten. So prüfen z.B. aktuelle Studien die Kombination von anti-PD-1-Antikörpern mit TKIs wie Axitinib oder Sunitinib oder mit Radiotherapie zur Behandlung des RCC. Des Weiteren ist die Kombinationen von PD-1-Blockade mit Histondeacetylase-Inhibitoren oder mit Decitabine Gegenstand klinischer Studien sowohl beim MDS / bei der AML als auch bei diversen soliden Tumoren. Die Kombinationen von PD-1-Blockade mit immunmodulatorischen Substanzen (IMiDs) wie z. B. mit Lenalidomid wird sowohl bei hämatologischen Neoplasien (Multiples Myelom, MDS, Lymphome) als auch bei soliden Tumoren geprüft (siehe www.clinicaltrials.gov, letzter Zugriff 11.03.2017).

Neben der intertumoralen Heterogenität stellt die intratumorale klonale Heterogenität jedoch weiterhin eine therapeutische Herausforderung und aufgrund des „Sampling Bias“ eine methodische Herausforderung dar, sowohl für die Identifizierung von T-Zell-Targets als auch für die Analyse von Immun-Escape-Mechanismen und die Identifizierung von Gewebe-Biomarkern.

Biomarker auf der Basis von Körperflüssigkeiten wie z. B. Blut, sogenannte „Liquid Biopsies“, haben deshalb großes Interesse erlangt, vor allem aufgrund ihrer geringen Invasivität und Möglichkeit der wiederholten Probenentnahme zum Therapie-Monitoring (245, 246). Es wird vermutet, dass sie im Gegensatz zur einzelnen Gewebebiospie eher die genetische Heterogenität des Tumors widerspiegeln. Die gesamte Heterogenität vom Primärtumor oder dessen Metastasen können allerdings auch sie nicht abbilden, da einzelne Tumorzellklone ein unterschiedliches Migrations-, Metastasierungs- und Homing-Potential aufweisen (327, 328).

Es ist durchaus denkbar, dass in Zukunft neben Zytokin-/ Chemokinprofilen und Immunzellprofilen auch periphere individuelle Immungensignaturen an Bedeutung gewinnen werden. Auch microRNAs, die eine wichtige Rolle bei der Regulation immunologischer

Prozesse spielen und vor allem peripher auch in gut messbaren Mengen vorliegen, haben Interesse als Immun-Biomarker erlangt (329).

Mit Hilfe von „Liquid Biopsies“ auf der Basis von zirkulierenden Tumorzellen oder zellfreier DNA / RNA könnten außerdem sowohl Information über Immunogenität und Antigenität von zirkulierenden Tumorzellen bzw. Mikrometastasen und potentiellen zirkulierenden CSCs gewonnen werden. Ob sie sich eignen zu Identifizierung immuntherapeutischer Targets oder zum Monitoring von Antigenverlust unter Therapie müssen weitere Studien zeigen.

5 Zusammenfassung

Ein wesentliches Kennzeichen von Tumoren ist, dass sie sich der Zerstörung durch das Immunsystem entziehen können. Immun-Escape-Mechanismen, die sowohl Antigenität, Immunogenität als auch Immunregulation betreffen, können nicht nur Einfluss auf die Prognose einer Tumorerkrankung haben, sondern müssen - neben der Wahl des Antigens - auch bei der Entwicklung immuntherapeutischer Strategien berücksichtigt werden.

Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Eignung des embryonalen Transkriptionsfaktors Wilms-Tumor-Protein 1 (WT1) im Allgemeinen und dem WT1₁₂₆₋₁₃₄-Epitop im Speziellen als therapeutisches T-Zell-Target sowie mit potentiellen Immun-Escape-Mechanismen, die zum Verlust von Antigenität und somit zum Versagen T-Zell-therapeutischer Strategien führen.

Wir konnten zeigen, dass sich WT1 nicht nur als Target für die AML eignet, sondern auch als Target für alle Subtypen der ALL, mit Ausnahme der reifen B-ALL. Die reife B-ALL zeigte einen nur sehr niedrigen Expressionslevel, der unterhalb des Expressionslevels von gesunden hämatopoetischen Stammzellen lag.

Neben der Wahl des Antigens müssen bei der Entwicklung T-Zell-therapeutischer Strategien eine Vielzahl von Mechanismen bedacht werden, die zu Verlust von Antigenität und somit zu fehlender T-Zell-Erkennung bzw. Ignoranz führen. Dies kann nicht nur durch Verlust der Antigenexpression bedingt sein, sondern auch durch Mutationen im Bereich von spezifischen T-Zell-Epitopen oder Epitop-flankierenden Sequenzen. Diese Mechanismen scheinen jedoch bei AML-Patienten, die unter Tumoringung mit dem WT1₁₂₆₋₁₃₄-Peptid im Rahmen einer von der Arbeitsgruppe initiierten klinischen Studie trotz nachgewiesener Induktion einer WT1₁₂₆₋₁₃₄-spezifischen T-Zell-Antwort einen Progress erlitten, keine Rolle zu spielen. Ferner konnte auch ein genereller Prozessierungsdefekt von HLA-I-assoziierten Epitopen ausgeschlossen werden; die Prozessierung des WT1₁₂₆₋₁₃₄-Epitopes im Speziellen wurde allerdings in dieser Arbeit nicht untersucht. Unklar ist zurzeit, ob dieses Epitop überhaupt effizient von allen Tumorzellen prozessiert werden kann und welche Proteasen hieran beteiligt sind.

Auch eine nicht passende Komposition der Proteasom-Typen in den entsprechenden Tumorzellen kann zu fehlender Präsentation und damit zu Immun-Escape führen. Wir konnten zeigen, dass neoplastische lymphatische Zellen Standardproteasom- und Immunoproteasom-Untereinheiten in zusammengelagerten Proteasomen exprimieren. Eigene bisher nicht veröffentlichte Analysen mittels quantitativem ELISA zeigten, dass Blasten von Patienten mit AML und hoher Tumormasse zu >90% Immunoproteasomen und keine Standardproteasomen exprimieren, am ehesten bedingt durch den Einfluss der inflammatorischen Tumorumgebung. Für therapeutische Ansätze mit breiter klinischer

Anwendung sind daher Epitope, die nur von einem Proteasom-Typ prozessiert werden, unter Umständen nicht geeignet.

Mikrometastasen und sogenannte Tumorstammzellen (cancer stem cells, CSCs) werden möglicherweise nicht von T-Zell-therapeutischen Ansätzen erreicht. Tumorsphären, die als in-vitro-Modell für mit CSCs angereicherte Mikrometastasen dienen, zeigten eine Herunterregulation oder sogar Verlust von HLA-Molekülen, am ehesten durch epigenetische Regulation auf postranskriptionellem Level. Weitere Untersuchungen hierzu sind sinnvoll, um zu klären, ob die HLA-Expression mittels Medikamente, die in die epigenetische Regulation eingreifen, wie DNA-Methyltransferase-Hemmstoffe oder Histon-Deacetylase-Inhibitoren, wiederhergestellt werden kann.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die durch den Tumor induzierte periphere Immundysregulation, ihre prognostische Bedeutung und mögliche Modulation durch tumorspezifische Therapie bei Patienten mit lokal fortgeschrittenem Melanom und bei Patienten mit metastasiertem Nierenzellkarzinom (mRCC) näher untersucht.

Immundysregulation ist mit zunehmendem Tumorwachstum nicht nur in der unmittelbaren Tumorumgebung und den regionalen Lymphknoten nachweisbar, sondern auch systemisch im peripheren Blut (pB) - auch schon bei lokal fortgeschrittenen Tumoren, wie in dieser Arbeit z. B. für das Maligne Melanom gezeigt. Melanompatienten im Stadium III, die adjuvant mit PEG-IFN α -2b im Rahmen der EORTC 18991 Studie behandelt wurden, wiesen signifikant höhere *TGF β 1*-mRNA Expressionslevel im pB im Vergleich zu Gesundkontrollen auf, interessanterweise jedoch ohne signifikante Assoziation mit klinischen oder pathologischen Eigenschaften und ohne prognostische Bedeutung. Jedoch konnten höhere mRNA-Expressionslevel von *SOCS1* und *SOCS3*, Inhibitoren des JAK/STAT Signalweges, als prognostisch ungünstige Marker sowohl für das rezidivfreie Überleben als auch das fernmetastasenfreie Überleben identifiziert werden.

Weitere Arbeiten untersuchten die periphere Immundysregulation und ihre prognostische Bedeutung bei mRCC Patienten, die den Tyrosinkinaseinhibitor Sorafenib im Rahmen eines „expanded access“ - Programms erhielten. Zunächst lag der Fokus auf immunsuppressiven Zytokinen und Zellpopulationen. Im Vergleich zu einer gesunden Kontrollpopulation wurden bei den mRCC-Patienten signifikant erhöhte mRNA-Expressionslevel von den immunsuppressiven Zytokinen *TGF β 1* und *IL10* als auch erhöhte Frequenzen von CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺-T-Zellen, die am ehesten immunsuppressiven regulatorischen T-Zellen entsprechen dürften, nachgewiesen. In einer multivariaten Analyse wurde neben einem niedrigen ECOG Performance Status Score überraschenderweise eine hohe mRNA-Expression von *TGF β 1* als unabhängiger günstiger prognostischer Faktor für das progressionsfreie Überleben (PFS) als auch für das Gesamtüberleben (OS) identifiziert.

Neben immunsuppressiven Faktoren können auch Veränderungen in der Frequenz und Funktion von Immun-Effektorzellen der adaptiven und angeborenen Immunantwort eine Rolle in der Tumor-induzierten Immundysbalance spielen. In einer weiteren Untersuchung wurde die mRNA-Expression des T-box-Transkriptionsfaktors *Eomes* im pB, die mit der Expression von *TGFβ1* im pB korrelierte, als unabhängiger günstiger prognostischer Faktor für das PFS und OS von mit Sorafenib behandelten mRCC-Patienten identifiziert. Ob eine höhere mRNA-Expression von *Eomes* oder *TGFβ1* als Indikator für eine günstige Immunsignatur bei mRCC-Patienten unter zielgerichteter Therapie ein brauchbarer Marker ist, sei es allein oder in Kombination mit schon etablierten klinisch-pathologischen Eigenschaften oder zirkulierenden angiogenen Markern wie VEGF oder Zytokinen, muss noch an einer größeren Patientenkohorte in einer prospektiven Studie evaluiert werden.

In-vitro-Daten haben gezeigt, dass TKIs wie Sorafenib nicht nur die spezifischen Signalwege in den Tumorzellen beeinflussen, sondern auch die entsprechenden Signalwege in Immuneffektorzellen. An einer Kohorte von 35 mRCC-Patienten wurde der Effekt von Sorafenib in vivo untersucht. Sorafenib hatte keinen negativen Effekt auf die Typ I-T-Zell-Antwort, war aber nicht in der Lage den oben beschriebenen immunsuppressiven Phänotyp im pB von mRCC-Patienten zu beheben. Sorafenib ist somit ein möglicher, jedoch kein optimaler Kandidat für immuntherapeutische Kombinationsstrategien.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Ehrlich P. Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung Beiträge zur experimentellen Pathologie und Chemotherapie. 1909:117-64.
2. Thomas LC. Cellular and Humoral Aspects of Hypersensitivity . 1959, . Edited by: Lawrence HS. 1959;New York: Hoeber-Harper.
3. Burnet F. Cancer – A biological approach. 1. The process of control Br Med J. 1957;1: 779-782.
4. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*. 2004;21(2):137-48.
5. Corthay A. Does the immune system naturally protect against cancer? *Frontiers in immunology*. 2014;5:197.
6. Pham SM, Kormos RL, Landreneau RJ, Kawai A, Gonzalez-Cancel I, Hardesty RL, et al. Solid tumors after heart transplantation: lethality of lung cancer. *Ann Thorac Surg*. 1995;60(6):1623-6.
7. Birkeland SA, Storm HH, Lamm LU, Barlow L, Blohme I, Forsberg B, et al. Cancer risk after renal transplantation in the Nordic countries, 1964-1986. *Int J Cancer*. 1995;60(2):183-9.
8. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*. 2001;357(9255):539-45.
9. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002;420(6917):860-7.
10. Philip M, Rowley DA, Schreiber H. Inflammation as a tumor promoter in cancer induction. *Semin Cancer Biol*. 2004;14(6):433-9.
11. Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *The New England journal of medicine*. 1986;315(26):1650-9.
12. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature immunology*. 2002;3(11):991-8.
13. Matkowski R, Gisterek I, Halon A, Lacko A, Szewczyk K, Staszek U, et al. The prognostic role of tumor-infiltrating CD4 and CD8 T lymphocytes in breast cancer. *Anticancer research*. 2009;29(7):2445-51.
14. Amedei A, Della Bella C, Silvestri E, Prisco D, D'Elios MM. T cells in gastric cancer: friends or foes. *Clinical & developmental immunology*. 2012;2012:690571.
15. Nakano O, Sato M, Naito Y, Suzuki K, Orikasa S, Aizawa M, et al. Proliferative activity of intratumoral CD8(+) T-lymphocytes as a prognostic factor in human renal cell carcinoma: clinicopathologic demonstration of antitumor immunity. *Cancer Res*. 2001;61(13):5132-6.
16. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Page C, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*. 2006;313(5795):1960-4.
17. Schietinger A, Philip M, Liu RB, Schreiber K, Schreiber H. Bystander killing of cancer requires the cooperation of CD4(+) and CD8(+) T cells during the effector phase. *J Exp Med*. 2010;207(11):2469-77.
18. Yewdell JW. Not such a dismal science: the economics of protein synthesis, folding, degradation and antigen processing. *Trends Cell Biol*. 2001;11(7):294-7.
19. Broere F, Apasov SG, Sitkovsky MV, van Eden W. T cell subsets and T cell-mediated immunity. *Principles of Immunopharmacology*. 3 ed 2011. p. 15-27.
20. Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B. CD4(+)T cells: differentiation and functions. *Clinical & developmental immunology*. 2012;2012:925135.
21. Germain RN. T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nature reviews Immunology*. 2002;2(5):309-22.

22. Zhou L, Chong MM, Littman DR. Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. *Immunity*. 2009;30(5):646-55.
23. Seder RA, Ahmed R. Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and memory T cell generation. *Nature immunology*. 2003;4(9):835-42.
24. Leffers N, Gooden MJ, de Jong RA, Hoogeboom BN, ten Hoor KA, Hollema H, et al. Prognostic significance of tumor-infiltrating T-lymphocytes in primary and metastatic lesions of advanced stage ovarian cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2009;58(3):449-59.
25. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*. 2011;331(6024):1565-70.
26. Mittrucker HW, Visekruna A, Huber M. Heterogeneity in the Differentiation and Function of CD8 T Cells. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*. 2014.
27. Shrikant PA, Rao R, Li Q, Kesterson J, Eppolito C, Mischo A, et al. Regulating functional cell fates in CD8 T cells. *Immunologic research*. 2010;46(1-3):12-22.
28. Mueller SN, Gebhardt T, Carbone FR, Heath WR. Memory T cell subsets, migration patterns, and tissue residence. *Annual review of immunology*. 2013;31:137-61.
29. Kaech SM, Cui W. Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation. *Nature reviews Immunology*. 2012;12(11):749-61.
30. Khanolkar A, Badovinac VP, Harty JT. CD8 T cell memory development: CD4 T cell help is appreciated. *Immunologic research*. 2007;39(1-3):94-104.
31. Pages F, Galon J, Dieu-Nosjean MC, Tartour E, Sautes-Fridman C, Fridman WH. Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene*. 2010;29(8):1093-102.
32. Belz GT, Kallies A. Effector and memory CD8+ T cell differentiation: toward a molecular understanding of fate determination. *Current opinion in immunology*. 2010;22(3):279-85.
33. Kallies A. Distinct regulation of effector and memory T-cell differentiation. *Immunology and cell biology*. 2008;86(4):325-32.
34. Takai S, Schlom J, Tucker J, Tsang KY, Greiner JW. Inhibition of TGF-beta1 signaling promotes central memory T cell differentiation. *J Immunol*. 2013;191(5):2299-307.
35. McLane LM, Banerjee PP, Cosma GL, Makedonas G, Wherry EJ, Orange JS, et al. Differential localization of T-bet and Eomes in CD8 T cell memory populations. *Journal of immunology*. 2013;190(7):3207-15.
36. Farag SS, Caligiuri MA. Human natural killer cell development and biology. *Blood reviews*. 2006;20(3):123-37.
37. Poli A, Michel T, Theresine M, Andres E, Hentges F, Zimmer J. CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. *Immunology*. 2009;126(4):458-65.
38. Knox JJ, Cosma GL, Betts MR, McLane LM. Characterization of T-bet and eomes in peripheral human immune cells. *Frontiers in immunology*. 2014;5:217.
39. Intlekofer AM, Takemoto N, Wherry EJ, Longworth SA, Northrup JT, Palanivel VR, et al. Effector and memory CD8+ T cell fate coupled by T-bet and eomesodermin. *Nature immunology*. 2005;6(12):1236-44.
40. Rao RR, Li Q, Odunsi K, Shrikant PA. The mTOR kinase determines effector versus memory CD8+ T cell fate by regulating the expression of transcription factors T-bet and Eomesodermin. *Immunity*. 2010;32(1):67-78.
41. Gordon SM, Chaix J, Rupp LJ, Wu J, Madera S, Sun JC, et al. The transcription factors T-bet and Eomes control key checkpoints of natural killer cell maturation. *Immunity*. 2012;36(1):55-67.
42. Townsend MJ, Weinmann AS, Matsuda JL, Salomon R, Farnham PJ, Biron CA, et al. T-bet regulates the terminal maturation and homeostasis of NK and Valpha14i NKT cells. *Immunity*. 2004;20(4):477-94.

43. Beuselinck B, Vano YA, Oudard S, Wolter P, De Smet R, Depoorter L, et al. Prognostic impact of baseline serum C-reactive protein in patients with metastatic renal cell carcinoma (RCC) treated with sunitinib. *BJU international*. 2014;114(1):81-9.
44. Zhu Y, Ju S, Chen E, Dai S, Li C, Morel P, et al. T-bet and eomesodermin are required for T cell-mediated antitumor immune responses. *J Immunol*. 2010;185(6):3174-83.
45. Pearce EL, Mullen AC, Martins GA, Krawczyk CM, Hutchins AS, Zediak VP, et al. Control of effector CD8+ T cell function by the transcription factor Eomesodermin. *Science*. 2003;302(5647):1041-3.
46. Aki M, Shimbara N, Takashina M, Akiyama K, Kagawa S, Tamura T, et al. Interferon-gamma induces different subunit organizations and functional diversity of proteasomes. *J Biochem (Tokyo)*. 1994;115(2):257-69.
47. Belich MP, Glynn RJ, Senger G, Sheer D, Trowsdale J. Proteasome components with reciprocal expression to that of the MHC-encoded LMP proteins. *Curr Biol*. 1994;4(9):769-76.
48. Kloetzel PM. The proteasome and MHC class I antigen processing. *Biochim Biophys Acta*. 2004;1695(1-3):225-33.
49. Kruger E, Kuckelkorn U, Sijts A, Kloetzel PM. The components of the proteasome system and their role in MHC class I antigen processing. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 2003;148:81-104.
50. Kuckelkorn U, Ferreira EA, Drung I, Liewer U, Kloetzel PM, Theobald M. The effect of the interferon-gamma-inducible processing machinery on the generation of a naturally tumor-associated human cytotoxic T lymphocyte epitope within a wild-type and mutant p53 sequence context. *Eur J Immunol*. 2002;32(5):1368-75.
51. Toes RE, Nussbaum AK, Degermann S, Schirle M, Emmerich NP, Kraft M, et al. Discrete cleavage motifs of constitutive and immunoproteasomes revealed by quantitative analysis of cleavage products. *J Exp Med*. 2001;194(1):1-12.
52. Steers NJ, Currier JR, Jobe O, Tovanabutra S, Ratto-Kim S, Marovich MA, et al. Designing the epitope flanking regions for optimal generation of CTL epitopes. *Vaccine*. 2014;32(28):3509-16.
53. Velders MP, Weijzen S, Eiben GL, Elmishad AG, Kloetzel PM, Higgins T, et al. Defined flanking spacers and enhanced proteolysis is essential for eradication of established tumors by an epitope string DNA vaccine. *J Immunol*. 2001;166(9):5366-73.
54. Nussbaum AK, Dick TP, Keilholz W, Schirle M, Stevanovic S, Dietz K, et al. Cleavage motifs of the yeast 20S proteasome beta subunits deduced from digests of enolase 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(21):12504-9.
55. Mo AX, van Lelyveld SF, Craiu A, Rock KL. Sequences that flank subdominant and cryptic epitopes influence the proteolytic generation of MHC class I-presented peptides. *J Immunol*. 2000;164(8):4003-10.
56. Yellen-Shaw AJ, Eisenlohr LC. Regulation of class I-restricted epitope processing by local or distal flanking sequence. *J Immunol*. 1997;158(4):1727-33.
57. Guillaume B, Chapiro J, Stroobant V, Colau D, Van Holle B, Parvizi G, et al. Two abundant proteasome subtypes that uniquely process some antigens presented by HLA class I molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(43):18599-604.
58. Van den Eynde BJ, Morel S. Differential processing of class-I-restricted epitopes by the standard proteasome and the immunoproteasome. *Curr Opin Immunol*. 2001;13(2):147-53.
59. Guillaume B, Stroobant V, Bousquet-Dubouch MP, Colau D, Chapiro J, Parmentier N, et al. Analysis of the processing of seven human tumor antigens by intermediate proteasomes. *J Immunol*. 2012;189(7):3538-47.
60. Weimershaus M, Evnouchidou I, Saveanu L, van Endert P. Peptidases trimming MHC class I ligands. *Curr Opin Immunol*. 2013;25(1):90-6.

61. van Endert P. Post-proteasomal and proteasome-independent generation of MHC class I ligands. *Cell Mol Life Sci.* 68(9):1553-67.
62. Kessler JH, Khan S, Seifert U, Le Gall S, Chow KM, Paschen A, et al. Antigen processing by nardilysin and thimet oligopeptidase generates cytotoxic T cell epitopes. *Nature immunology.* 2011;12(1):45-53.
63. Parmentier N, Stroobant V, Colau D, de Diesbach P, Morel S, Chapiro J, et al. Production of an antigenic peptide by insulin-degrading enzyme. *Nature immunology.* 2010;11(5):449-54.
64. Lopez D, Garcia-Calvo M, Smith GL, Del Val M. Caspases in virus-infected cells contribute to recognition by CD8+ T lymphocytes. *J Immunol.* 2010;184(9):5193-9.
65. Lopez D, Jimenez M, Garcia-Calvo M, Del Val M. Concerted antigen processing of a short viral antigen by human caspase-5 and -10. *The Journal of biological chemistry.* 2011;286(19):16910-3.
66. van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, et al. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science.* 1991;254(5038):1643-7.
67. Vigneron N. Human Tumor Antigens and Cancer Immunotherapy. *Biomed Res Int.* 2015;2015:948501.
68. van der Bruggen P, Van den Eynde BJ. Processing and presentation of tumor antigens and vaccination strategies. *Curr Opin Immunol.* 2006;18(1):98-104.
69. Kessler JH, Melief CJ. Identification of T-cell epitopes for cancer immunotherapy. *Leukemia.* 2007;21(9):1859-74.
70. Melief CJ, van Hall T, Arens R, Ossendorp F, van der Burg SH. Therapeutic cancer vaccines. *J Clin Invest.* 2015;125(9):3401-12.
71. Wong KK, Li WA, Mooney DJ, Dranoff G. Advances in Therapeutic Cancer Vaccines. *Adv Immunol.* 2016;130:191-249.
72. Kunert A, Straetmans T, Govers C, Lamers C, Mathijssen R, Sleijfer S, et al. TCR-Engineered T Cells Meet New Challenges to Treat Solid Tumors: Choice of Antigen, T Cell Fitness, and Sensitization of Tumor Milieu. *Frontiers in immunology.* 2013;4:363.
73. Ikeda H. T-cell adoptive immunotherapy using tumor-infiltrating T cells and genetically engineered TCR-T cells. *Int Immunol.* 2016;28(7):349-53.
74. Schmitt TM, Stromnes IM, Chapuis AG, Greenberg PD. New Strategies in Engineering T-cell Receptor Gene-Modified T cells to More Effectively Target Malignancies. *Clin Cancer Res.* 2015;21(23):5191-7.
75. Stone JD, Aggen DH, Schietinger A, Schreiber H, Kranz DM. A sensitivity scale for targeting T cells with chimeric antigen receptors (CARs) and bispecific T-cell Engagers (BiTEs). *Oncoimmunology.* 2012;1(6):863-73.
76. Obenaus M, Leitao C, Leisegang M, Chen X, Gavvovidis I, van der Bruggen P, et al. Identification of human T-cell receptors with optimal affinity to cancer antigens using antigen-negative humanized mice. *Nat Biotechnol.* 2015;33(4):402-7.
77. Li LP, Lampert JC, Chen X, Leitao C, Popovic J, Muller W, et al. Transgenic mice with a diverse human T cell antigen receptor repertoire. *Nat Med.* 2010;16(9):1029-34.
78. Couzin-Frankel J. Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy. *Science.* 2013;342(6165):1432-3.
79. Kochenderfer JN, Rosenberg SA. Treating B-cell cancer with T cells expressing anti-CD19 chimeric antigen receptors. *Nat Rev Clin Oncol.* 2013;10(5):267-76.
80. Turtle CJ, Riddell SR, Maloney DG. CD19-Targeted chimeric antigen receptor-modified T-cell immunotherapy for B-cell malignancies. *Clin Pharmacol Ther.* 2016;100(3):252-8.

81. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
82. Campoli M, Ferrone S. HLA antigen changes in malignant cells: epigenetic mechanisms and biologic significance. *Oncogene*. 2008;27(45):5869-85.
83. Leone P, Shin EC, Perosa F, Vacca A, Dammacco F, Racanelli V. MHC class I antigen processing and presenting machinery: organization, function, and defects in tumor cells. *J Natl Cancer Inst*. 2013;105(16):1172-87.
84. Bukur J, Seliger B. The role of HLA-G for protection of human renal cell-carcinoma cells from immune-mediated lysis: implications for immunotherapies. *Semin Cancer Biol*. 2003;13(5):353-9.
85. Diegmann J, Junker K, Gerstmayer B, Bosio A, Hindermann W, Rosenhahn J, et al. Identification of CD70 as a diagnostic biomarker for clear cell renal cell carcinoma by gene expression profiling, real-time RT-PCR and immunohistochemistry. *Eur J Cancer*. 2005;41(12):1794-801.
86. Uzzo RG, Rayman P, Kolenko V, Clark PE, Bloom T, Ward AM, et al. Mechanisms of apoptosis in T cells from patients with renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 1999;5(5):1219-29.
87. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(4):252-64.
88. Lahn M, Fisch P, Kohler G, Kunzmann R, Hentrich I, Jesuiter H, et al. Pro-inflammatory and T cell inhibitory cytokines are secreted at high levels in tumor cell cultures of human renal cell carcinoma. *Eur Urol*. 1999;35(1):70-80.
89. Knoefel B, Nuske K, Steiner T, Junker K, Kosmehl H, Rebstock K, et al. Renal cell carcinomas produce IL-6, IL-10, IL-11, and TGF-beta 1 in primary cultures and modulate T lymphocyte blast transformation. *J Interferon Cytokine Res*. 1997;17(2):95-102.
90. Wang Q, Redovan C, Tubbs R, Olencki T, Klein E, Kudoh S, et al. Selective cytokine gene expression in renal cell carcinoma tumor cells and tumor-infiltrating lymphocytes. *International journal of cancer*. 1995;61(6):780-5.
91. Sievers E, Dreimuller P, Haferkamp A, Schmidt-Wolf IG, Buchler MW, Schmidt J, et al. Characterization of primary renal carcinoma cultures. *Urologia internationalis*. 2007;79(3):235-43.
92. Gabrilovich D. Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. *Nature reviews*. 2004;4(12):941-52.
93. Wan YY, Flavell RA. 'Yin-Yang' functions of transforming growth factor-beta and T regulatory cells in immune regulation. *Immunological reviews*. 2007;220:199-213.
94. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual review of immunology*. 2001;19:683-765.
95. Romano M, Sironi M, Toniatti C, Polentarutti N, Fruscella P, Ghezzi P, et al. Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity*. 1997;6(3):315-25.
96. Thomas GR, Chen Z, Leukinova E, Van Waes C, Wen J. Cytokines IL-1 alpha, IL-6, and GM-CSF constitutively secreted by oral squamous carcinoma induce down-regulation of CD80 costimulatory molecule expression: restoration by interferon gamma. *Cancer Immunol Immunother*. 2004;53(1):33-40.
97. Fridman WH, Tartour E. Macrophage- and lymphocyte-produced Th1 and Th2 cytokines in the tumour microenvironment. *Research in immunology*. 1998;149(7-8):651-3.
98. Menetrier-Caux C, Bain C, Favrot MC, Duc A, Blay JY. Renal cell carcinoma induces interleukin 10 and prostaglandin E2 production by monocytes. *British journal of cancer*. 1999;79(1):119-30.

99. Bonizzi G, Karin M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* 2004;25(6):280-8.
100. Karin M, Greten FR. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol.* 2005;5(10):749-59.
101. Burdelya L, Kujawski M, Niu G, Zhong B, Wang T, Zhang S, et al. Stat3 activity in melanoma cells affects migration of immune effector cells and nitric oxide-mediated antitumor effects. *J Immunol.* 2005;174(7):3925-31.
102. Kortylewski M, Kujawski M, Wang T, Wei S, Zhang S, Pilon-Thomas S, et al. Inhibiting Stat3 signaling in the hematopoietic system elicits multicomponent antitumor immunity. *Nature medicine.* 2005;11(12):1314-21.
103. Wang T, Niu G, Kortylewski M, Burdelya L, Shain K, Zhang S, et al. Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells. *Nature medicine.* 2004;10(1):48-54.
104. Yu H, Kortylewski M, Pardoll D. Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nature reviews.* 2007;7(1):41-51.
105. Munn DH, Mellor AL. IDO in the Tumor Microenvironment: Inflammation, Counter-Regulation, and Tolerance. *Trends in immunology.* 2016;37(3):193-207.
106. ggGodin-Ethier J, Hanafi LA, Piccirillo CA, Lapointe R. Indoleamine 2,3-dioxygenase expression in human cancers: clinical and immunologic perspectives. *Clin Cancer Res.* 2011;17(22):6985-91.
107. Busse A, Keilholz U. Immune Self-tuning in Renal Cell Carcinoma. *European Oncology.* 2010;6(1):70-5.
108. Sakaguchi S. The origin of FOXP3-expressing CD4+ regulatory T cells: thymus or periphery. *The Journal of clinical investigation.* 2003;112(9):1310-2.
109. Whiteside TL. What are regulatory T cells (Treg) regulating in cancer and why? *Seminars in cancer biology.* 2012;22(4):327-34.
110. Cesana GC, DeRaffele G, Cohen S, Moroziewicz D, Mitcham J, Stoutenburg J, et al. Characterization of CD4+CD25+ regulatory T cells in patients treated with high-dose interleukin-2 for metastatic melanoma or renal cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 2006;24(7):1169-77.
111. Dannull J, Su Z, Rizzieri D, Yang BK, Coleman D, Yancey D, et al. Enhancement of vaccine-mediated antitumor immunity in cancer patients after depletion of regulatory T cells. *The Journal of clinical investigation.* 2005;115(12):3623-33.
112. Jensen HK, Donskov F, Nordmark M, Marcussen N, von der Maase H. Increased intratumoral FOXP3-positive regulatory immune cells during interleukin-2 treatment in metastatic renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2009;15(3):1052-8.
113. Griffiths RW, Elkord E, Gilham DE, Ramani V, Clarke N, Stern PL, et al. Frequency of regulatory T cells in renal cell carcinoma patients and investigation of correlation with survival. *Cancer Immunol Immunother.* 2007;56(11):1743-53.
114. Liu C, Workman CJ, Vignali DA. Targeting regulatory T cells in tumors. *FEBS J.* 2016;283(14):2731-48.
115. Elkord E, Al-Ramadi BK. Helios expression in FoxP3(+) T regulatory cells. *Expert opinion on biological therapy.* 2012;12(11):1423-5.
116. Mantovani A, Sica A, Allavena P, Garlanda C, Locati M. Tumor-associated macrophages and the related myeloid-derived suppressor cells as a paradigm of the diversity of macrophage activation. *Hum Immunol.* 2009;70(5):325-30.
117. Young MR, Newby M, Wepsic HT. Hematopoiesis and suppressor bone marrow cells in mice bearing large metastatic Lewis lung carcinoma tumors. *Cancer research.* 1987;47(1):100-5.

118. Marigo I, Dolcetti L, Serafini P, Zanovello P, Bronte V. Tumor-induced tolerance and immune suppression by myeloid derived suppressor cells. *Immunol Rev.* 2008;222:162-79.
119. Kusmartsev S, Su Z, Heiser A, Dannull J, Eruslanov E, Kubler H, et al. Reversal of myeloid cell-mediated immunosuppression in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2008;14(24):8270-8.
120. Solito S, Marigo I, Pinton L, Damuzzo V, Mandruzzato S, Bronte V. Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity in human cancers. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2014;1319(1):47-65.
121. Schmid MC, Varner JA. Myeloid cells in the tumor microenvironment: modulation of tumor angiogenesis and tumor inflammation. *Journal of oncology.* 2010;2010:201026.
122. Rini BI, Campbell SC, Escudier B. Renal cell carcinoma. *Lancet.* 2009;373(9669):1119-32.
123. Chow WH, Devesa SS. Contemporary epidemiology of renal cell cancer. *Cancer journal.* 2008;14(5):288-301.
124. Choueiri TK, Rini B, Garcia JA, Baz RC, Abou-Jawde RM, Thakkar SG, et al. Prognostic factors associated with long-term survival in previously untreated metastatic renal cell carcinoma. *Ann Oncol.* 2007;18(2):249-55.
125. Flanigan RC, Campbell SC, Clark JI, Picken MM. Metastatic renal cell carcinoma. *Curr Treat Options Oncol.* 2003;4(5):385-90.
126. Itsumi M, Tatsugami K. Immunotherapy for renal cell carcinoma. *Clinical & developmental immunology.* 2010;2010:284581.
127. Motzer RJ, Bander NH, Nanus DM. Renal-cell carcinoma. *The New England journal of medicine.* 1996;335(12):865-75.
128. Negrier S, Escudier B, Lasset C, Douillard JY, Savary J, Chevreau C, et al. Recombinant human interleukin-2, recombinant human interferon alfa-2a, or both in metastatic renal-cell carcinoma. *Groupe Francais d'Immunotherapie. The New England journal of medicine.* 1998;338(18):1272-8.
129. Atzpodien J, Kirchner H, Jonas U, Bergmann L, Schott H, Heynemann H, et al. Interleukin-2- and interferon alfa-2a-based immunochemotherapy in advanced renal cell carcinoma: a Prospectively Randomized Trial of the German Cooperative Renal Carcinoma Chemoimmunotherapy Group (DGCIN). *J Clin Oncol.* 2004;22(7):1188-94.
130. Coppin C, Porzsolt F, Awa A, Kumpf J, Coldman A, Wilt T. Immunotherapy for advanced renal cell cancer. *Cochrane database of systematic reviews (Online).* 2005(1):CD001425.
131. Fyfe G, Fisher RI, Rosenberg SA, Sznol M, Parkinson DR, Louie AC. Results of treatment of 255 patients with metastatic renal cell carcinoma who received high-dose recombinant interleukin-2 therapy. *J Clin Oncol.* 1995;13(3):688-96.
132. Glaspy JA. Therapeutic options in the management of renal cell carcinoma. *Seminars in oncology.* 2002;29(3 Suppl 7):41-6.
133. Verra N, de Jong D, Bex A, Batchelor D, DelleMijn T, Sein J, et al. Infiltration of activated dendritic cells and T cells in renal cell carcinoma following combined cytokine immunotherapy. *European urology.* 2005;48(3):527-33.
134. Iacovelli R, Carteni G, Sternberg CN, Milella M, Santoni M, Di Lorenzo G, et al. Clinical outcomes in patients receiving three lines of targeted therapy for metastatic renal cell carcinoma: results from a large patient cohort. *European journal of cancer.* 2013;49(9):2134-42.
135. Choueiri TK, Escudier B, Powles T, Tannir NM, Mainwaring PN, Rini BI, et al. Cabozantinib versus everolimus in advanced renal cell carcinoma (METEOR): final results from a randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet Oncology.* 2016;17(7):917-27.

136. Motzer RJ, Hutson TE, Glen H, Michaelson MD, Molina A, Eisen T, et al. Lenvatinib, everolimus, and the combination in patients with metastatic renal cell carcinoma: a randomised, phase 2, open-label, multicentre trial. *The Lancet Oncology*. 2015;16(15):1473-82.
137. Hutson TE. Targeted therapies for the treatment of metastatic renal cell carcinoma: clinical evidence. *The oncologist*. 2011;16 Suppl 2:14-22.
138. Escudier B, Albiges L, Sonpavde G. Optimal management of metastatic renal cell carcinoma: current status. *Drugs*. 2013;73(5):427-38.
139. McDermott DF, Drake CG, Sznol M, Choueiri TK, Powderly J, Smith DC, et al. Clinical activity and safety of anti-PD-1 (BMS-936558, MDX-1106) in patients with previously treated metastatic renal cell carcinoma (mRCC). *Journal of Clinical Oncology*. 2012;30(15).
140. McDermott DF, Drake CG, Sznol M, Choueiri TK, Powderly JD, Smith DC, et al. Clinical activity and safety of antiprogrammed death-1 (PD-1) (BMS-936558/MDX-1106/ONO-4538) in patients (pts) with previously treated, metastatic renal cell carcinoma (mRCC): An updated analysis. *Journal of Clinical Oncology*. 2013;31(6).
141. Motzer RJ, Rini BI, McDermott DF, Redman BG, Kuzel TM, Harrison MR, et al. Nivolumab for Metastatic Renal Cell Carcinoma: Results of a Randomized Phase II Trial. *J Clin Oncol*. 2015;33(13):1430-7.
142. Escudier B, Eisen T, Stadler WM, Szczylik C, Oudard S, Siebels M, et al. Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *The New England journal of medicine*. 2007;356(2):125-34.
143. Procopio G, Verzoni E, Testa I, Nicolai N, Salvioni R, Debraud F. Experience with sorafenib in the treatment of advanced renal cell carcinoma. *Therapeutic advances in urology*. 2012;4(6):303-13.
144. Adnane L, Trail PA, Taylor I, Wilhelm SM. Sorafenib (BAY 43-9006, Nexavar), a dual-action inhibitor that targets RAF/MEK/ERK pathway in tumor cells and tyrosine kinases VEGFR/PDGFR in tumor vasculature. *Methods in enzymology*. 2006;407:597-612.
145. Wilhelm S, Carter C, Lynch M, Lowinger T, Dumas J, Smith RA, et al. Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 2006;5(10):835-44.
146. Escudier B, Porta C, Schmidinger M, Algaba F, Patard JJ, Khoo V, et al. Renal cell carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2014;25 Suppl 3:iii49-56.
147. Stadler WM, Figlin RA, McDermott DF, Dutcher JP, Knox JJ, Miller WH, Jr., et al. Safety and efficacy results of the advanced renal cell carcinoma sorafenib expanded access program in North America. *Cancer*. 2010;116(5):1272-80.
148. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol*. 2009;27(36):6199-206.
149. Wheatley K, Ives N, Hancock B, Gore M, Eggermont A, Suci S. Does adjuvant interferon-alpha for high-risk melanoma provide a worthwhile benefit? A meta-analysis of the randomised trials. *Cancer treatment reviews*. 2003;29(4):241-52.
150. Kirkwood JM, Manola J, Ibrahim J, Sondak V, Ernstoff MS, Rao U. A pooled analysis of eastern cooperative oncology group and intergroup trials of adjuvant high-dose interferon for melanoma. *Clin Cancer Res*. 2004;10(5):1670-7.
151. Eggermont AM, Suci S, Santinami M, Testori A, Kruit WH, Marsden J, et al. Adjuvant therapy with pegylated interferon alfa-2b versus observation alone in resected stage III melanoma: final results of EORTC 18991, a randomised phase III trial. *Lancet*. 2008;372(9633):117-26.

152. Mocellin S, Pasquali S, Rossi CR, Nitti D. Interferon alpha adjuvant therapy in patients with high-risk melanoma: a systematic review and meta-analysis. *Journal of the National Cancer Institute*. 2010;102(7):493-501.
153. Anaya DA, Xing Y, Feng L, Huang X, Camacho LH, Ross MI, et al. Adjuvant high-dose interferon for cutaneous melanoma is most beneficial for patients with early stage III disease. *Cancer*. 2008;112(9):2030-7.
154. Eggermont AM, Suci S, MacKie R, Ruka W, Testori A, Kruit W, et al. Post-surgery adjuvant therapy with intermediate doses of interferon alfa 2b versus observation in patients with stage IIb/III melanoma (EORTC 18952): randomised controlled trial. *Lancet*. 2005;366(9492):1189-96.
155. Eggermont AM, Suci S, Testori A, Kruit WH, Marsden J, Punt CJ, et al. Ulceration and stage are predictive of interferon efficacy in melanoma: results of the phase III adjuvant trials EORTC 18952 and EORTC 18991. *Eur J Cancer*. 2012;48(2):218-25.
156. McMasters KM, Edwards MJ, Ross MI, Reintgen DS, Martin RC, 2nd, Urist MM, et al. Ulceration as a predictive marker for response to adjuvant interferon therapy in melanoma. *Annals of surgery*. 2010;252(3):460-5; discussion 5-6.
157. Wheatley K IN, Eggermont A. Interferon- α as adjuvant therapy for melanoma: an individual patient data meta-analysis of randomised trials. *J Clin Oncol*. 2007(25:abstract 8526).
158. Eggermont AM, Chiarion-Sileni V, Grob JJ, Dummer R, Wolchok JD, Schmidt H, et al. Adjuvant ipilimumab versus placebo after complete resection of high-risk stage III melanoma (EORTC 18071): a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2015;16(5):522-30.
159. Ferrantini M, Capone I, Belardelli F. Interferon-alpha and cancer: mechanisms of action and new perspectives of clinical use. *Biochimie*. 2007;89(6-7):884-93.
160. Schindler C, Plumlee C. Interferons pen the JAK-STAT pathway. *Seminars in cell & developmental biology*. 2008;19(4):311-8.
161. Theofilopoulos AN, Baccala R, Beutler B, Kono DH. Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity. *Annual review of immunology*. 2005;23:307-36.
162. Dalpke A, Heeg K, Bartz H, Baetz A. Regulation of innate immunity by suppressor of cytokine signaling (SOCS) proteins. *Immunobiology*. 2008;213(3-4):225-35.
163. Lesinski GB, Anghelina M, Zimmerer J, Bakalakos T, Badgwell B, Parihar R, et al. The antitumor effects of IFN-alpha are abrogated in a STAT1-deficient mouse. *The Journal of clinical investigation*. 2003;112(2):170-80.
164. Badgwell B, Lesinski GB, Magro C, Abood G, Skaf A, Carson W, 3rd. The antitumor effects of interferon-alpha are maintained in mice challenged with a STAT1-deficient murine melanoma cell line. *The Journal of surgical research*. 2004;116(1):129-36.
165. Astsaturov I, Petrella T, Bagriacik EU, de Benedette M, Uger R, Lumber G, et al. Amplification of virus-induced antimelanoma T-cell reactivity by high-dose interferon-alpha2b: implications for cancer vaccines. *Clin Cancer Res*. 2003;9(12):4347-55.
166. Ascierto PA, Kirkwood JM. Adjuvant therapy of melanoma with interferon: lessons of the past decade. *Journal of translational medicine*. 2008;6:62.
167. Gogas H, Ioannovich J, Dafni U, Stavropoulou-Giokas C, Frangia K, Tsoutsos D, et al. Prognostic significance of autoimmunity during treatment of melanoma with interferon. *The New England journal of medicine*. 2006;354(7):709-18.
168. Moschos SJ, Edington HD, Land SR, Rao UN, Jukic D, Shipe-Spotloe J, et al. Neoadjuvant treatment of regional stage IIIB melanoma with high-dose interferon alfa-2b induces objective tumor regression in association with modulation of tumor infiltrating host cellular immune responses. *J Clin Oncol*. 2006;24(19):3164-71.
169. Blankenstein T, Leisegang M, Uckert W, Schreiber H. Targeting cancer-specific mutations by T cell receptor gene therapy. *Curr Opin Immunol*. 2015;33:112-9.

170. Lu YC, Robbins PF. Targeting neoantigens for cancer immunotherapy. *Int Immunol*. 2016;28(7):365-70.
171. Stratton MR. Exploring the genomes of cancer cells: progress and promise. *Science*. 2011;331(6024):1553-8.
172. Algar EM, Khromykh T, Smith SI, Blackburn DM, Bryson GJ, Smith PJ. A WT1 antisense oligonucleotide inhibits proliferation and induces apoptosis in myeloid leukaemia cell lines. *Oncogene*. 1996;12(5):1005-14.
173. Inoue K, Tamaki H, Ogawa H, Oka Y, Soma T, Tatekawa T, et al. Wilms' tumor gene (WT1) competes with differentiation-inducing signal in hematopoietic progenitor cells. *Blood*. 1998;91(8):2969-76.
174. Yamagami T, Sugiyama H, Inoue K, Ogawa H, Tatekawa T, Hirata M, et al. Growth inhibition of human leukemic cells by WT1 (Wilms tumor gene) antisense oligodeoxynucleotides: implications for the involvement of WT1 in leukemogenesis. *Blood*. 1996;87(7):2878-84.
175. Buttiglieri S, Deregiibus MC, Bravo S, Cassoni P, Chiarle R, Bussolati B, et al. Role of Pax2 in apoptosis resistance and proinvasive phenotype of Kaposi's sarcoma cells. *J Biol Chem*. 2004;279(6):4136-43.
176. Muratovska A, Zhou C, He S, Goodyer P, Eccles MR. Paired-Box genes are frequently expressed in cancer and often required for cancer cell survival. *Oncogene*. 2003;22(39):7989-97.
177. Gnarra JR, Dressler GR. Expression of Pax-2 in human renal cell carcinoma and growth inhibition by antisense oligonucleotides. *Cancer Res*. 1995;55(18):4092-8.
178. Xue S, Gao L, Gillmore R, Bendle G, Holler A, Downs AM, et al. WT1-targeted immunotherapy of leukaemia. *Blood Cells Mol Dis*. 2004;33(3):288-90.
179. Keilholz U, Menssen HD, Gaiger A, Menke A, Oji Y, Oka Y, et al. Wilms' tumour gene 1 (WT1) in human neoplasia. *Leukemia*. 2005;19(8):1318-23.
180. Oka Y, Tsuboi A, Oji Y, Kawase I, Sugiyama H. WT1 peptide vaccine for the treatment of cancer. *Curr Opin Immunol*. 2008;20(2):211-20.
181. Keilholz U, Letsch A, Busse A, Asemissen AM, Bauer S, Blau IW, et al. A clinical and immunologic phase 2 trial of Wilms tumor gene product 1 (WT1) peptide vaccination in patients with AML and MDS. *Blood*. 2009;113(26):6541-8.
182. Busse A, Letsch A, Scheibenbogen C, Nonnenmacher A, Ochsenreither S, Thiel E, et al. Mutation or loss of Wilms' tumor gene 1 (WT1) are not major reasons for immune escape in patients with AML receiving WT1 peptide vaccination. *J Transl Med*. 2010;8:5.
183. Haber DA, Housman DE. Role of the WT1 gene in Wilms' tumour. *Cancer Surv*. 1992;12:105-17.
184. Maurer U, Brieger J, Weidmann E, Mitrou PS, Hoelzer D, Bergmann L. The Wilms' tumor gene is expressed in a subset of CD34+ progenitors and downregulated early in the course of differentiation in vitro. *Exp Hematol*. 1997;25(9):945-50.
185. Klein L, Kyewski B, Allen PM, Hogquist KA. Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nature reviews*. 2014;14(6):377-91.
186. Chapuis AG, Ragnarsson GB, Nguyen HN, Chaney CN, Pufnock JS, Schmitt TM, et al. Transferred WT1-reactive CD8+ T cells can mediate antileukemic activity and persist in post-transplant patients. *Sci Transl Med*. 2013;5(174):174ra27.
187. Asai H, Fujiwara H, Kitazawa S, Kobayashi N, Ochi T, Miyazaki Y, et al. Adoptive transfer of genetically engineered WT1-specific cytotoxic T lymphocytes does not induce renal injury. *J Hematol Oncol*. 2014;7:3.
188. Ochi T, Fujiwara H, Okamoto S, An J, Nagai K, Shirakata T, et al. Novel adoptive T-cell immunotherapy using a WT1-specific TCR vector encoding silencers for endogenous TCRs shows marked antileukemia reactivity and safety. *Blood*. 2011;118(6):1495-503.

189. Cilloni D, Messa F, Carturan S, Arruga F, Defilippi I, Messa E, et al. Myelodysplastic syndromes. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1028:400-8.
190. Menssen HD, Renkl HJ, Rodeck U, Maurer J, Notter M, Schwartz S, et al. Presence of Wilms' tumor gene (wt1) transcripts and the WT1 nuclear protein in the majority of human acute leukemias. *Leukemia.* 1995;9(6):1060-7.
191. Miwa H, Beran M, Saunders GF. Expression of the Wilms' tumor gene (WT1) in human leukemias. *Leukemia.* 1992;6(5):405-9.
192. Inoue K, Ogawa H, Sonoda Y, Kimura T, Sakabe H, Oka Y, et al. Aberrant overexpression of the Wilms tumor gene (WT1) in human leukemia. *Blood.* 1997;89(4):1405-12.
193. Baird PN, Simmons PJ. Expression of the Wilms' tumor gene (WT1) in normal hemopoiesis. *Exp Hematol.* 1997;25(4):312-20.
194. Siehl JM, Reinwald M, Heufelder K, Menssen HD, Keilholz U, Thiel E. Expression of Wilms' tumor gene 1 at different stages of acute myeloid leukemia and analysis of its major splice variants. *Ann Hematol.* 2004;83(12):745-50.
195. Busse A, Gokbuget N, Siehl JM, Hoelzer D, Schwartz S, Rietz A, et al. Wilms' tumor gene 1 (WT1) expression in subtypes of acute lymphoblastic leukemia (ALL) of adults and impact on clinical outcome. *Ann Hematol.* 2009;88(12):1199-205.
196. Omran HA, Shabani M, Vossough P, Sharifian R, Tabrizi M, Khoshnoodi J, et al. Cross-sectional monitoring of Wilms' tumor gene 1 (WT1) expression in Iranian patients with acute lymphoblastic leukemia at diagnosis, relapse and remission. *Leuk Lymphoma.* 2008;49(2):281-90.
197. Chiusa L, Francia di Celle P, Campisi P, Ceretto C, Marmont F, Pich A. Prognostic value of quantitative analysis of WT1 gene transcripts in adult acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica.* 2006;91(2):270-1.
198. Boublikova L, Kalinova M, Ryan J, Quinn F, O'Marcaigh A, Smith O, et al. Wilms' tumor gene 1 (WT1) expression in childhood acute lymphoblastic leukemia: a wide range of WT1 expression levels, its impact on prognosis and minimal residual disease monitoring. *Leukemia.* 2006;20(2):254-63.
199. Cilloni D, Gottardi E, De Micheli D, Serra A, Volpe G, Messa F, et al. Quantitative assessment of WT1 expression by real time quantitative PCR may be a useful tool for monitoring minimal residual disease in acute leukemia patients. *Leukemia.* 2002;16(10):2115-21.
200. Garg M, Moore H, Tobal K, Liu Yin JA. Prognostic significance of quantitative analysis of WT1 gene transcripts by competitive reverse transcription polymerase chain reaction in acute leukaemia. *Br J Haematol.* 2003;123(1):49-59.
201. Im HJ, Kong G, Lee H. Expression of Wilms tumor gene (WT1) in children with acute leukemia. *Pediatr Hematol Oncol.* 1999;16(2):109-18.
202. Drakos E, Rassidakis GZ, Tsioli P, Lai R, Jones D, Medeiros LJ. Differential expression of WT1 gene product in non-Hodgkin lymphomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2005;13(2):132-7.
203. Gorlach A, Acker H. pO₂- and pH-gradients in multicellular spheroids and their relationship to cellular metabolism and radiation sensitivity of malignant human tumor cells. *Biochimica et biophysica acta.* 1994;1227(3):105-12.
204. Chignola R, Schenetti A, Andrichetto G, Chiesa E, Foroni R, Sartoris S, et al. Forecasting the growth of multicell tumour spheroids: implications for the dynamic growth of solid tumours. *Cell proliferation.* 2000;33(4):219-29.
205. Hirschhaeuser F, Menne H, Dittfeld C, West J, Mueller-Klieser W, Kunz-Schughart LA. Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again. *Journal of biotechnology.* 148(1):3-15.

206. Gedye C, Quirk J, Browning J, Svobodova S, John T, Sluka P, et al. Cancer/testis antigens can be immunological targets in clonogenic CD133+ melanoma cells. *Cancer Immunol Immunother.* 2009;58(10):1635-46.
207. Sigalotti L, Covre A, Zabierowski S, Himes B, Colizzi F, Natali PG, et al. Cancer testis antigens in human melanoma stem cells: expression, distribution, and methylation status. *J Cell Physiol.* 2008;215(2):287-91.
208. Busse A, Letsch A, Fusi A, Nonnenmacher A, Stather D, Ochsenreither S, et al. Characterization of small spheres derived from various solid tumor cell lines: are they suitable targets for T cells? *Clin Exp Metastasis.* 2013;30(6):781-91.
209. Welte Y, Adjaye J, Lehrach HR, Regenbrecht CR. Cancer stem cells in solid tumors: elusive or illusive? *Cell Commun Signal.* 2010;8(1):6.
210. Mikkelsen TS, Hanna J, Zhang X, Ku M, Wernig M, Schorderet P, et al. Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature.* 2008;454(7200):49-55.
211. Stather D. Prevalence of possible immune resistance mechanisms of acute leukemias within the context of vaccination strategies using the Wilms tumor gene-1 (WT1); Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I, publiziert am 02.08.2012, urn:nbn:de:kobv:11-100203939.
212. Ochsenreither S, Fusi A, Busse A, Bauer S, Scheibenbogen C, Stather D, et al. "Wilms Tumor Protein 1" (WT1) peptide vaccination-induced complete remission in a patient with acute myeloid leukemia is accompanied by the emergence of a predominant T-cell clone both in blood and bone marrow. *J Immunother.* 2011;34(1):85-91.
213. Engels B, Engelhard VH, Sidney J, Sette A, Binder DC, Liu RB, et al. Relapse or eradication of cancer is predicted by peptide-major histocompatibility complex affinity. *Cancer cell.* 2013;23(4):516-26.
214. Milicic A, Price DA, Zimbwa P, Booth BL, Brown HL, Easterbrook PJ, et al. CD8+ T cell epitope-flanking mutations disrupt proteasomal processing of HIV-1 Nef. *J Immunol.* 2005;175(7):4618-26.
215. Del Val M, Schlicht HJ, Ruppert T, Reddehase MJ, Koszinowski UH. Efficient processing of an antigenic sequence for presentation by MHC class I molecules depends on its neighboring residues in the protein. *Cell.* 1991;66(6):1145-53.
216. Theobald M, Ruppert T, Kuckelkorn U, Hernandez J, Haussler A, Ferreira EA, et al. The sequence alteration associated with a mutational hotspot in p53 protects cells from lysis by cytotoxic T lymphocytes specific for a flanking peptide epitope. *J Exp Med.* 1998;188(6):1017-28.
217. King-Underwood L, Pritchard-Jones K. Wilms' tumor (WT1) gene mutations occur mainly in acute myeloid leukemia and may confer drug resistance. *Blood.* 1998;91(8):2961-8.
218. Summers K, Stevens J, Kakkas I, Smith M, Smith LL, Macdougall F, et al. Wilms' tumour 1 mutations are associated with FLT3-ITD and failure of standard induction chemotherapy in patients with normal karyotype AML. *Leukemia.* 2007;21(3):550-1; author reply 2.
219. Gao L, Bellantuono I, Elsasser A, Marley SB, Gordon MY, Goldman JM, et al. Selective elimination of leukemic CD34(+) progenitor cells by cytotoxic T lymphocytes specific for WT1. *Blood.* 2000;95(7):2198-203.
220. Koesters R, Linnebacher M, Coy JF, Germann A, Schwitalle Y, Findeisen P, et al. WT1 is a tumor-associated antigen in colon cancer that can be recognized by in vitro stimulated cytotoxic T cells. *Int J Cancer.* 2004;109(3):385-92.
221. Chapiro J, Claverol S, Piette F, Ma W, Stroobant V, Guillaume B, et al. Destructive cleavage of antigenic peptides either by the immunoproteasome or by the standard proteasome results in differential antigen presentation. *J Immunol.* 2006;176(2):1053-61.

222. Busse A, Kraus M, Na IK, Rietz A, Scheibenbogen C, Driessen C, et al. Sensitivity of tumor cells to proteasome inhibitors is associated with expression levels and composition of proteasome subunits. *Cancer*. 2008;112(3):659-70.
223. Frisan T, Levitsky V, Masucci MG. Variations in proteasome subunit composition and enzymatic activity in B-lymphoma lines and normal B cells. *Int J Cancer*. 2000;88(6):881-8.
224. Kraus M, Ruckrich T, Reich M, Gogel J, Beck A, Kammer W, et al. Activity patterns of proteasome subunits reflect bortezomib sensitivity of hematologic malignancies and are variable in primary human leukemia cells. *Leukemia*. 2007;21(1):84-92.
225. Di Tomaso T, Mazzoleni S, Wang E, Sovena G, Clavenna D, Franzin A, et al. Immunobiological Characterization of Cancer Stem Cells Isolated from Glioblastoma Patients. *Clin Cancer Res*. 2010.
226. Brown CE, Starr R, Martinez C, Aguilar B, D'Apuzzo M, Todorov I, et al. Recognition and killing of brain tumor stem-like initiating cells by CD8+ cytolytic T cells. *Cancer Res*. 2009;69(23):8886-93.
227. Pellegatta S, Poliani PL, Corno D, Menghi F, Ghielmetti F, Suarez-Merino B, et al. Neurospheres enriched in cancer stem-like cells are highly effective in eliciting a dendritic cell-mediated immune response against malignant gliomas. *Cancer Res*. 2006;66(21):10247-52.
228. Xu Q, Liu G, Yuan X, Xu M, Wang H, Ji J, et al. Antigen-specific T-cell response from dendritic cell vaccination using cancer stem-like cell-associated antigens. *Stem Cells*. 2009;27(8):1734-40.
229. Castriconi R, Daga A, Dondero A, Zona G, Poliani PL, Melotti A, et al. NK cells recognize and kill human glioblastoma cells with stem cell-like properties. *J Immunol*. 2009;182(6):3530-9.
230. Feder-Mengus C, Ghosh S, Weber WP, Wyler S, Zajac P, Terracciano L, et al. Multiple mechanisms underlie defective recognition of melanoma cells cultured in three-dimensional architectures by antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *British journal of cancer*. 2007;96(7):1072-82.
231. Liu Y, Zhao JJ, Wang CM, Li MY, Han P, Wang L, et al. Altered expression profiles of microRNAs in a stable hepatitis B virus-expressing cell line. *Chinese medical journal*. 2009;122(1):10-4.
232. Castelli EC, Moreau P, Oya e Chiromatzo A, Mendes-Junior CT, Veiga-Castelli LC, Yaghi L, et al. In silico analysis of microRNAs targeting the HLA-G 3' untranslated region alleles and haplotypes. *Human immunology*. 2009;70(12):1020-5.
233. Critchley-Thorne RJ, Yan N, Nacu S, Weber J, Holmes SP, Lee PP. Down-regulation of the interferon signaling pathway in T lymphocytes from patients with metastatic melanoma. *PLoS medicine*. 2007;4(5):e176.
234. Yurkovetsky ZR, Kirkwood JM, Edington HD, Marrangoni AM, Velikokhatnaya L, Winans MT, et al. Multiplex analysis of serum cytokines in melanoma patients treated with interferon-alpha2b. *Clin Cancer Res*. 2007;13(8):2422-8.
235. Ascierto PA, Napolitano M, Celentano E, Simeone E, Gentilcore G, Daponte A, et al. Regulatory T cell frequency in patients with melanoma with different disease stage and course, and modulating effects of high-dose interferon-alpha 2b treatment. *Journal of translational medicine*. 2010;8:76.
236. Elliott B, Scolyer RA, Suci S, Lebecque S, Rimoldi D, Gugerli O, et al. Long-term protective effect of mature DC-LAMP+ dendritic cell accumulation in sentinel lymph nodes containing micrometastatic melanoma. *Clin Cancer Res*. 2007;13(13):3825-30.
237. Busse A, Raponi J, Fusi A, Suci S, Nonnenmacher A, Santinami M, et al. Analysis of surrogate gene expression markers in peripheral blood of melanoma patients to predict treatment outcome of adjuvant pegylated interferon alpha 2b (EORTC 18991 side study). *Cancer Immunol Immunother*. 2013;62(7):1223-33.

238. Lesinski GB, Kondadasula SV, Crespin T, Shen L, Kendra K, Walker M, et al. Multiparametric flow cytometric analysis of inter-patient variation in STAT1 phosphorylation following interferon Alfa immunotherapy. *Journal of the National Cancer Institute*. 2004;96(17):1331-42.
239. Zimmerer JM, Lehman AM, Ruppert AS, Noble CW, Olencki T, Walker MJ, et al. IFN-alpha-2b-induced signal transduction and gene regulation in patient peripheral blood mononuclear cells is not enhanced by a dose increase from 5 to 10 megaunits/m². *Clin Cancer Res*. 2008;14(5):1438-45.
240. Galon J, Pages F, Marincola FM, Thurin M, Trinchieri G, Fox BA, et al. The immune score as a new possible approach for the classification of cancer. *J Transl Med*. 2012;10:1.
241. Fridman WH, Galon J, Pages F, Tartour E, Sautes-Fridman C, Kroemer G. Prognostic and predictive impact of intra- and peritumoral immune infiltrates. *Cancer Res*. 2011;71(17):5601-5.
242. Schmidt M, Hellwig B, Hammad S, Othman A, Lohr M, Chen Z, et al. A comprehensive analysis of human gene expression profiles identifies stromal immunoglobulin kappa C as a compatible prognostic marker in human solid tumors. *Clin Cancer Res*. 2012;18(9):2695-703.
243. Perisanidis C, Kornek G, Poschl PW, Holzinger D, Pirklbauer K, Schopper C, et al. High neutrophil-to-lymphocyte ratio is an independent marker of poor disease-specific survival in patients with oral cancer. *Med Oncol*. 2013;30(1):334.
244. Whiteside TL. Immune responses to cancer: are they potential biomarkers of prognosis? *Front Oncol*. 2013;3:107.
245. Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakis F, Bardelli A. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nat Rev Clin Oncol*. 2013;10(8):472-84.
246. Diaz LA, Jr., Bardelli A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *J Clin Oncol*. 2014;32(6):579-86.
247. Yuan J, Hegde PS, Clynes R, Foukas PG, Harari A, Kleen TO, et al. Novel technologies and emerging biomarkers for personalized cancer immunotherapy. *J Immunother Cancer*. 2016;4:3.
248. Bouwhuis MG, Suci S, Collette S, Aamdal S, Kruit WH, Bastholt L, et al. Autoimmune antibodies and recurrence-free interval in melanoma patients treated with adjuvant interferon. *Journal of the National Cancer Institute*. 2009;101(12):869-77.
249. Bouwhuis MG, Suci S, Testori A, Kruit WH, Sales F, Patel P, et al. Phase III trial comparing adjuvant treatment with pegylated interferon Alfa-2b versus observation: prognostic significance of autoantibodies--EORTC 18991. *J Clin Oncol*. 2010;28(14):2460-6.
250. Bouwhuis MG, Suci S, Kruit W, Sales F, Stoitchkov K, Patel P, et al. Prognostic value of serial blood S100B determinations in stage IIB-III melanoma patients: a corollary study to EORTC trial 18952. *Eur J Cancer*. 2011;47(3):361-8.
251. Bouwhuis MG, Collette S, Suci S, de Groot ER, Kruit WH, Ten Hagen TL, et al. Changes of ferritin and CRP levels in melanoma patients treated with adjuvant interferon-alpha (EORTC 18952) and prognostic value on treatment outcome. *Melanoma research*. 2011;21(4):344-51.
252. Eggermont AM, Suci S, Testori A, Santinami M, Kruit WH, Marsden J, et al. Long-term results of the randomized phase III trial EORTC 18991 of adjuvant therapy with pegylated interferon alfa-2b versus observation in resected stage III melanoma. *J Clin Oncol*. 2012;30(31):3810-8.
253. Tarhini AA, Lin Y, Zahoor H, Shuai Y, Butterfield LH, Ringquist S, et al. Pro-Inflammatory Cytokines Predict Relapse-Free Survival after One Month of Interferon-alpha but Not Observation in Intermediate Risk Melanoma Patients. *PLoS One*. 2015;10(7):e0132745.

254. Gogas H, Paterakis G, Frangia K, Bafaloukos D, Pectasides D, Kalofonos HP, et al. Lymphocyte subpopulations and interleukin levels in high-risk melanoma patients treated with high-dose interferon A-2B. *American journal of clinical oncology*. 2002;25(6):591-6.
255. Guenterberg KD, Lesinski GB, Mundy-Bosse BL, Karpa VI, Jaime-Ramirez AC, Wei L, et al. Enhanced anti-tumor activity of interferon-alpha in SOCS1-deficient mice is mediated by CD4(+) and CD8(+) T cells. *Cancer Immunol Immunother*. 2011;60(9):1281-8.
256. Brassard DL, Delorenzo MM, Cox S, Leaman DW, Sun Y, Ding W, et al. Regulation of gene expression by pegylated IFN-alpha2b and IFN-alpha2b in human peripheral blood mononuclear cells. *J Interferon Cytokine Res*. 2004;24(8):455-69.
257. Taylor MW, Tsukahara T, Brodsky L, Schaley J, Sanda C, Stephens MJ, et al. Changes in gene expression during pegylated interferon and ribavirin therapy of chronic hepatitis C virus distinguish responders from nonresponders to antiviral therapy. *Journal of virology*. 2007;81(7):3391-401.
258. Zimmerer JM, Lesinski GB, Kondadasula SV, Karpa VI, Lehman A, Raychaudhury A, et al. IFN-alpha-induced signal transduction, gene expression, and antitumor activity of immune effector cells are negatively regulated by suppressor of cytokine signaling proteins. *J Immunol*. 2007;178(8):4832-45.
259. Worschech A, Kmiecik M, Knutson KL, Bear HD, Szalay AA, Wang E, et al. Signatures associated with rejection or recurrence in HER-2/neu-positive mammary tumors. *Cancer research*. 2008;68(7):2436-46.
260. Ulloa-Montoya F, Louahed J, Dizier B, Gruselle O, Spiessens B, Lehmann FF, et al. Predictive gene signature in MAGE-A3 antigen-specific cancer immunotherapy. *J Clin Oncol*. 2013;31(19):2388-95.
261. Ji RR, Chasalow SD, Wang L, Hamid O, Schmidt H, Cogswell J, et al. An immune-active tumor microenvironment favors clinical response to ipilimumab. *Cancer Immunol Immunother*. 2012;61(7):1019-31.
262. Hamid O, Schmidt H, Nissan A, Ridolfi L, Aamdal S, Hansson J, et al. A prospective phase II trial exploring the association between tumor microenvironment biomarkers and clinical activity of ipilimumab in advanced melanoma. *Journal of translational medicine*. 2011;9:204.
263. Malakhov MP, Kim KI, Malakhova OA, Jacobs BS, Borden EC, Zhang DE. High-throughput immunoblotting. Ubiquitin-like protein ISG15 modifies key regulators of signal transduction. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(19):16608-13.
264. Shi HX, Yang K, Liu X, Liu XY, Wei B, Shan YF, et al. Positive regulation of interferon regulatory factor 3 activation by Herc5 via ISG15 modification. *Molecular and cellular biology*. 2010;30(10):2424-36.
265. Coppin C, Le L, Porzsolt F, Wilt T. Targeted therapy for advanced renal cell carcinoma. *Cochrane database of systematic reviews (Online)*. 2008(2):CD006017.
266. Finley DS, Pantuck AJ, Belldegrun AS. Tumor biology and prognostic factors in renal cell carcinoma. *The oncologist*. 2011;16 Suppl 2:4-13.
267. Motzer RJ, Mazumdar M, Bacik J, Berg W, Amsterdam A, Ferrara J. Survival and prognostic stratification of 670 patients with advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 1999;17(8):2530-40.
268. Motzer RJ, Bacik J, Schwartz LH, Reuter V, Russo P, Marion S, et al. Prognostic factors for survival in previously treated patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 2004;22(3):454-63.
269. Mekhail TM, Abou-Jawde RM, Boumerhi G, Malhi S, Wood L, Elson P, et al. Validation and extension of the Memorial Sloan-Kettering prognostic factors model for survival in patients with previously untreated metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 2005;23(4):832-41.

270. Heng DY, Xie W, Regan MM, Warren MA, Golshayan AR, Sahi C, et al. Prognostic factors for overall survival in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with vascular endothelial growth factor-targeted agents: results from a large, multicenter study. *J Clin Oncol*. 2009;27(34):5794-9.
271. Motzer RJ, Bukowski RM, Figlin RA, Hutson TE, Michaelson MD, Kim ST, et al. Prognostic nomogram for sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Cancer*. 2008;113(7):1552-8.
272. Brannon AR, Haake SM, Hacker KE, Pruthi RS, Wallen EM, Nielsen ME, et al. Meta-analysis of clear cell renal cell carcinoma gene expression defines a variant subgroup and identifies gender influences on tumor biology. *Eur Urol*. 2012;61(2):258-68.
273. Maroto P, Rini B. Molecular biomarkers in advanced renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2014;20(8):2060-71.
274. Funakoshi T, Lee CH, Hsieh JJ. A systematic review of predictive and prognostic biomarkers for VEGF-targeted therapy in renal cell carcinoma. *Cancer treatment reviews*. 2014;40(4):533-47.
275. Porta C, Paglino C, De Amici M, Quaglini S, Sacchi L, Imarisio I, et al. Predictive value of baseline serum vascular endothelial growth factor and neutrophil gelatinase-associated lipocalin in advanced kidney cancer patients receiving sunitinib. *Kidney international*. 2010;77(9):809-15.
276. Escudier B, Eisen T, Stadler WM, Szczylik C, Oudard S, Staehler M, et al. Sorafenib for treatment of renal cell carcinoma: Final efficacy and safety results of the phase III treatment approaches in renal cancer global evaluation trial. *J Clin Oncol*. 2009;27(20):3312-8.
277. Harmon CS, DePrimo SE, Figlin RA, Hudes GR, Hutson TE, Michaelson MD, et al. Circulating proteins as potential biomarkers of sunitinib and interferon-alpha efficacy in treatment-naive patients with metastatic renal cell carcinoma. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2014;73(1):151-61.
278. Pena C, Lathia C, Shan M, Escudier B, Bukowski RM. Biomarkers predicting outcome in patients with advanced renal cell carcinoma: Results from sorafenib phase III Treatment Approaches in Renal Cancer Global Evaluation Trial. *Clin Cancer Res*. 2010;16(19):4853-63.
279. Tran HT, Liu Y, Zurita AJ, Lin Y, Baker-Neblett KL, Martin AM, et al. Prognostic or predictive plasma cytokines and angiogenic factors for patients treated with pazopanib for metastatic renal-cell cancer: a retrospective analysis of phase 2 and phase 3 trials. *The Lancet Oncology*. 2012;13(8):827-37.
280. Zurita AJ, Jonasch E, Wang X, Khajavi M, Yan S, Du DZ, et al. A cytokine and angiogenic factor (CAF) analysis in plasma for selection of sorafenib therapy in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Ann Oncol*. 2012;23(1):46-52.
281. Hu Q, Gou Y, Sun C, Ding W, Xu K, Gu B, et al. The prognostic value of C-reactive protein in renal cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Urologic oncology*. 2014;32(1):50 e1-8.
282. Negrier S, Perol D, Menetrier-Caux C, Escudier B, Pallardy M, Ravaud A, et al. Interleukin-6, interleukin-10, and vascular endothelial growth factor in metastatic renal cell carcinoma: prognostic value of interleukin-6--from the Groupe Francais d'Immunotherapie. *J Clin Oncol*. 2004;22(12):2371-8.
283. Yasuda Y, Saito K, Yuasa T, Kitsukawa S, Urakami S, Yamamoto S, et al. Prognostic impact of pretreatment C-reactive protein for patients with metastatic renal cell carcinoma treated with tyrosine kinase inhibitors. *International journal of clinical oncology*. 2013;18(5):884-9.
284. Perez-Gracia JL, Prior C, Guillen-Grima F, Segura V, Gonzalez A, Panizo A, et al. Identification of TNF-alpha and MMP-9 as potential baseline predictive serum markers of sunitinib activity in patients with renal cell carcinoma using a human cytokine array. *British journal of cancer*. 2009;101(11):1876-83.

285. Vermaat JS, van der Tweel I, Mehra N, Sleijfer S, Haanen JB, Roodhart JM, et al. Two-protein signature of novel serological markers apolipoprotein-A2 and serum amyloid alpha predicts prognosis in patients with metastatic renal cell cancer and improves the currently used prognostic survival models. *Ann Oncol.* 2010;21(7):1472-81.
286. Sengupta S, Lohse CM, Chevillat JC, Leibovich BC, Thompson RH, Webster WS, et al. The preoperative erythrocyte sedimentation rate is an independent prognostic factor in renal cell carcinoma. *Cancer.* 2006;106(2):304-12.
287. Li JF, Chu YW, Wang GM, Zhu TY, Rong RM, Hou J, et al. The prognostic value of peritumoral regulatory T cells and its correlation with intratumoral cyclooxygenase-2 expression in clear cell renal cell carcinoma. *BJU international.* 2009;103(3):399-405.
288. Liu L, Wu G, Yao JX, Ding Q, Huang SA. CD4+CD25high regulatory cells in peripheral blood of cancer patients. *Neuro endocrinology letters.* 2008;29(2):240-5.
289. Liotta F, Gacci M, Frosali F, Querci V, Vittori G, Lapini A, et al. Frequency of regulatory T cells in peripheral blood and in tumour-infiltrating lymphocytes correlates with poor prognosis in renal cell carcinoma. *BJU international.* 2011;107(9):1500-6.
290. Polimeno M, Napolitano M, Costantini S, Portella L, Esposito A, Capone F, et al. Regulatory T cells, interleukin (IL)-6, IL-8, vascular endothelial growth factor (VEGF), CXCL10, CXCL11, epidermal growth factor (EGF) and hepatocyte growth factor (HGF) as surrogate markers of host immunity in patients with renal cell carcinoma. *BJU international.* 2013;112(5):686-96.
291. Busse A, Asemussen A, Nonnenmacher A, Ochsenreither S, Fusi A, Braun F, et al. Systemic immune tuning in renal cell carcinoma: favorable prognostic impact of TGF-beta1 mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells. *J Immunother.* 2011;34(1):113-9.
292. Tofukuji S, Kuwahara M, Suzuki J, Ohara O, Nakayama T, Yamashita M. Identification of a new pathway for Th1 cell development induced by cooperative stimulation with IL-4 and TGF-beta. *J Immunol.* 2012;188(10):4846-57.
293. Lingnau K, Hoehn P, Kerdine S, Koelsch S, Neudoerfl C, Palm N, et al. IL-4 in combination with TGF-beta favors an alternative pathway of Th1 development independent of IL-12. *J Immunol.* 1998;161(9):4709-18.
294. Chen W, Jin W, Tian H, Sicurello P, Frank M, Orenstein JM, et al. Requirement for transforming growth factor beta1 in controlling T cell apoptosis. *The Journal of experimental medicine.* 2001;194(4):439-53.
295. Genestier L, Kasibhatla S, Brunner T, Green DR. Transforming growth factor beta1 inhibits Fas ligand expression and subsequent activation-induced cell death in T cells via downregulation of c-Myc. *The Journal of experimental medicine.* 1999;189(2):231-9.
296. Dielmann A, Letsch A, Nonnenmacher A, Miller K, Keilholz U, Busse A. Favorable prognostic influence of T-box transcription factor Eomesodermin in metastatic renal cell cancer patients. *Cancer Immunol Immunother.* 2016;65(2):181-92.
297. Pages F, Berger A, Camus M, Sanchez-Cabo F, Costes A, Molitor R, et al. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *The New England journal of medicine.* 2005;353(25):2654-66.
298. Atreya I, Schimanski CC, Becker C, Wirtz S, Dornhoff H, Schnurer E, et al. The T-box transcription factor eomesodermin controls CD8 T cell activity and lymph node metastasis in human colorectal cancer. *Gut.* 2007;56(11):1572-8.
299. Chen LJ, Zheng X, Shen YP, Zhu YB, Li Q, Chen J, et al. Higher numbers of T-bet(+) intratumoral lymphoid cells correlate with better survival in gastric cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2013;62(3):553-61.
300. Garcia-Roig M, Ortiz N, Lokeshwar V. Molecular marker for predicting treatment response in advanced renal cell carcinoma: does the promise fulfill clinical need? *Current urology reports.* 2014;15(1):375.

301. Zitvogel L, Galluzzi L, Smyth MJ, Kroemer G. Mechanism of action of conventional and targeted anticancer therapies: reinstating immunosurveillance. *Immunity*. 2013;39(1):74-88.
302. Apetoh L, Ladoire S, Coukos G, Ghiringhelli F. Combining immunotherapy and anticancer agents: the right path to achieve cancer cure? *Ann Oncol*. 2015;26(9):1813-23.
303. Motzer RJ, Molina AM. Targeting renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 2009;27(20):3274-6.
304. Karaman MW, Herrgard S, Treiber DK, Gallant P, Atteridge CE, Campbell BT, et al. A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nature biotechnology*. 2008;26(1):127-32.
305. Chi H. Regulation and function of mTOR signalling in T cell fate decisions. *Nature reviews Immunology*. 2012;12(5):325-38.
306. Seliger B, Massa C, Rini B, Ko J, Finke J. Antitumour and immune-adjuvant activities of protein-tyrosine kinase inhibitors. *Trends Mol Med*. 2010;16(4):184-92.
307. Porta C, Paglino C, Imarisio I, Ganini C, Pedrazzoli P. Immunological effects of multikinase inhibitors for kidney cancer: a clue for integration with cellular therapies? *Journal of Cancer*. 2011;2:333-8.
308. Fabian MA, Biggs WH, 3rd, Treiber DK, Atteridge CE, Azimioara MD, Benedetti MG, et al. A small molecule-kinase interaction map for clinical kinase inhibitors. *Nature biotechnology*. 2005;23(3):329-36.
309. Krusch M, Salih J, Schlicke M, Baessler T, Kampa KM, Mayer F, et al. The kinase inhibitors sunitinib and sorafenib differentially affect NK cell antitumor reactivity in vitro. *J Immunol*. 2009;183(12):8286-94.
310. Molhoek KR, McSkimming CC, Olson WC, Brautigan DL, Slingluff CL, Jr. Apoptosis of CD4(+)CD25(high) T cells in response to Sirolimus requires activation of T cell receptor and is modulated by IL-2. *Cancer Immunol Immunother*. 2009;58(6):867-76.
311. Hipp MM, Hilf N, Walter S, Werth D, Brauer KM, Radsak MP, et al. Sorafenib, but not sunitinib, affects function of dendritic cells and induction of primary immune responses. *Blood*. 2008;111(12):5610-20.
312. Heine A, Held SA, Bringmann A, Holderried TA, Brossart P. Immunomodulatory effects of anti-angiogenic drugs. *Leukemia*. 2011;25(6):899-905.
313. Stehle F, Schulz K, Fahldieck C, Kalich J, Lichtenfels R, Riemann D, et al. Reduced immunosuppressive properties of axitinib in comparison with other tyrosine kinase inhibitors. *The Journal of biological chemistry*. 2013;288(23):16334-47.
314. Houben R, Voigt H, Noelke C, Hofmeister V, Becker JC, Schrama D. MAPK-independent impairment of T-cell responses by the multikinase inhibitor sorafenib. *Molecular cancer therapeutics*. 2009;8(2):433-40.
315. Zhang QB, Sun HC, Zhang KZ, Jia QA, Bu Y, Wang M, et al. Suppression of natural killer cells by sorafenib contributes to prometastatic effects in hepatocellular carcinoma. *PloS one*. 2013;8(2):e55945.
316. Alfaro C, Suarez N, Gonzalez A, Solano S, Erro L, Dubrot J, et al. Influence of bevacizumab, sunitinib and sorafenib as single agents or in combination on the inhibitory effects of VEGF on human dendritic cell differentiation from monocytes. *British journal of cancer*. 2009;100(7):1111-9.
317. Finke JH, Rini B, Ireland J, Rayman P, Richmond A, Golshayan A, et al. Sunitinib reverses type-1 immune suppression and decreases T-regulatory cells in renal cell carcinoma patients. *Clin Cancer Res*. 2008;14(20):6674-82.
318. Ko JS, Zea AH, Rini BI, Ireland JL, Elson P, Cohen P, et al. Sunitinib mediates reversal of myeloid-derived suppressor cell accumulation in renal cell carcinoma patients. *Clin Cancer Res*. 2009;15(6):2148-57.

319. Xin H, Zhang C, Herrmann A, Du Y, Figlin R, Yu H. Sunitinib inhibition of Stat3 induces renal cell carcinoma tumor cell apoptosis and reduces immunosuppressive cells. *Cancer research*. 2009;69(6):2506-13.
320. Sers C, Kuner R, Falk CS, Lund P, Sueltmann H, Braun M, et al. Down-regulation of HLA Class I and NKG2D ligands through a concerted action of MAPK and DNA methyltransferases in colorectal cancer cells. *International journal of cancer*. 2009;125(7):1626-39.
321. Sumimoto H, Imabayashi F, Iwata T, Kawakami Y. The BRAF-MAPK signaling pathway is essential for cancer-immune evasion in human melanoma cells. *The Journal of experimental medicine*. 2006;203(7):1651-6.
322. Busse A, Asemisen AM, Nonnenmacher A, Braun F, Ochsenreither S, Stather D, et al. Immunomodulatory effects of sorafenib on peripheral immune effector cells in metastatic renal cell carcinoma. *Eur J Cancer*. 2011;47(5):690-6.
323. Ozao-Choy J, Ma G, Kao J, Wang GX, Meseck M, Sung M, et al. The novel role of tyrosine kinase inhibitor in the reversal of immune suppression and modulation of tumor microenvironment for immune-based cancer therapies. *Cancer research*. 2009;69(6):2514-22.
324. Bose A, Taylor JL, Alber S, Watkins SC, Garcia JA, Rini BI, et al. Sunitinib facilitates the activation and recruitment of therapeutic anti-tumor immunity in concert with specific vaccination. *International journal of cancer*. 2011;129(9):2158-70.
325. Farsaci B, Higgins JP, Hodge JW. Consequence of dose scheduling of sunitinib on host immune response elements and vaccine combination therapy. *International journal of cancer*. 2012;130(8):1948-59.
326. Kujawski M, Zhang C, Herrmann A, Reckamp K, Scuto A, Jensen M, et al. Targeting STAT3 in adoptively transferred T cells promotes their in vivo expansion and antitumor effects. *Cancer research*. 2010;70(23):9599-610.
327. Burrell RA, McGranahan N, Bartek J, Swanton C. The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. *Nature*. 2013;501(7467):338-45.
328. Greaves M, Maley CC. Clonal evolution in cancer. *Nature*. 2012;481(7381):306-13.
329. Willis JC, Lord GM. Immune biomarkers: the promises and pitfalls of personalized medicine. *Nature reviews*. 2015;15(5):323-9.

DANKSAGUNG

Zunächst möchte ich mich besonders bei Prof. Dr. Ulrich Keilholz bedanken, der mir nicht nur als Doktorvater den Einstieg in die Forschung ermöglicht und mein Interesse für die Tumorimmunologie geweckt hat, sondern mich stets wohlwollend gefördert und mir Rückhalt gegeben hat. Diese Habilitationsschrift wären ohne seine tatkräftige Unterstützung nicht zustande gekommen.

Bei Herrn Prof. Dr. Eckhard Thiel möchte ich mich für seine Unterstützung bedanken. Sie ermöglichte nicht nur meine klinische Entwicklung, sondern auch meine wissenschaftliche Arbeit.

Außerordentlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Antonio Pezzutto. Er hat nicht nur die letzten Abschnitte dieser Habilitationsarbeit großzügig unterstützt, sondern mir auch wertvolle wissenschaftliche Impulse und Unterstützung über diese Habilitationsschrift hinausgehend gegeben.

Außerdem möchte ich den Kollegen und Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe danken, die mich auf meinem wissenschaftlichen Weg begleitet haben. Ohne ihre engagierte Mitwirkung wären die vorliegenden Forschungsarbeiten nicht möglich gewesen: u.a. (in alphabetischer Reihenfolge) Dr. AnneMarie Asemissen, Dr. Igor Wolfgang Blau, Frau Anastasia Dielmann, Dr. Alberto Fusi, Dr. Anne Letsch, Dr. Il-Kang Na, Dr. Sebastian Ochsenreither, Prof. Dr. Carmen Scheibenbogen und Dr. Jan Siehl. Ganz besonders danken möchte Anika Nonnenmacher, die mich immer tatkräftig im Labor unterstützt hat.

Frau Prof. Dr. Diana Lüftner danke ich nicht nur für das Korrekturlesen, sondern auch für ihre kontinuierliche Ermunterung beim Verfassen dieser Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, Cornelia und Wolfgang Busse, für ihren moralischen Beistand und menschlichen Halt, sowie meinem Ehemann, Pierre Nicola Kroll, der nicht müde wurde, mich verständnisvoll zu unterstützen, ein offenes Ohr für meine Gedanken zu haben und immer wieder zu motivieren.

ERKLÄRUNG

§4 Abs.3 (k) der HabOMed der Charité, CBF

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. wurde,
- die vorliegende Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern / Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Berlin, 19.02.17

Dr. Antonia Busse