

Kinderklinik und Poliklinik der Technischen Universität München
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. St. Burdach)

**Identifizierung und Charakterisierung von Tumorantigenen eines
metastasierten, kleinzelligen Medulloblastoms mit SEREX**

Inken Schneider

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. St. Burdach
2. Univ.-Prof. Dr. Dr. B. Pontz

Die Dissertation wurde am 16.01.2006 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 19.07.2006 angenommen.

für meine Eltern

Teile dieser Dissertation

Identifizierung und Charakterisierung von Tumorantigenen eines metastasierten, kleinzelligen Medulloblastoms mit SEREX

wurden vorab wie folgend veröffentlicht:

Behrends U., Schneider I., Rössler S., Frauenknecht H., Golbeck A., Lechner B., Eigenstetter G., Zobywalski C., Müller-Wehrich S., Graubner U., Schmid I., Sackerer D., Späth M., Goetz C., Prantl F., Asmuss H.P., Bise K. und Mautner J., *Novel tumor antigens identified by autologous antibody screening of childhood medulloblastoma cDNA libraries*, Int. J. Cancer: 106, 244-251 (2003).

INHALTSVERZEICHNIS

I	EINLEITUNG	2
I.1	THERAPIE DES MEDULLOBLASTOMS	3
I.2	IDENTIFIZIERUNG VON TUMORANTIGENEN	5
I.3	KLASSIFIZIERUNG VON TUMORANTIGENEN	6
I.4	IDENTIFIZIERUNG VON TUMORANTIGENEN MIT HILFE VON CD8 + CTL.....	7
I.6	DIE BEDEUTUNG VON CD4+ T-HELPERZELLEN BEI DER TUMORIMMUNANTWORT.....	9
I.7	IDENTIFIZIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON TUMORANTIGENEN MIT SEREX ...	10
I.8	PASSIVE TUMORVAKZINE	13
I.9	ANSÄTZE DER AKTIVEN TUMORTHERAPIE	15
II	ZIELSETZUNG	17
III	MATERIAL	18
III.1	ANTIBIOTIKA	18
III.2	ANTIKÖRPER.....	18
III.3	BAKTERIEN	18
III.4	CHEMIKALIEN	18
III.5	ENZYME.....	20
III.6	GERÄTE	20
III.7	DNA MOLECULAR WEIGHT MARKER.....	20
III.8	MEDIUM	20
III.9	MEMBRANEN UND FILTER	21
III.10	PATIENTENSERUM.....	21
III.11	PHAGEN	21
III.12	PUFFER	21
III.13	SONSTIGES	22
III.14	TUMOR-CDNA-EXPRESSIONSBIBLIOTHEK.....	23
IV	METHODEN	24
IV.1	GRUNDLAGEN.....	24
IV.2	SEROLOGICAL DEFINITION OF RECOMBINANTLY EXPRESSED ANTIGENS (SEREX).....	24
IV.2.1	<i>Allgemeine Beschreibung</i>	24
IV.2.2	<i>Bestimmung eines Phagen-Titers</i>	25
IV.2.2.1	Aufzucht der Wirtsbakterien.....	25
IV.2.2.2	Infektion.....	25
IV.2.2.3	Berechnung des Phagentiters	26
IV.2.3	<i>Blue-White Test</i>	26
IV.2.4	<i>Amplifikation von Phagenklonen</i>	27
IV.2.5	<i>Präabsorption von Patientenseren</i>	27
IV.2.5.1	Isolation eines nicht rekombinanten „blauen“ Phagenklons.....	27
IV.2.5.2	Herstellung `mechanischer´ und `lytischer´ Säulen.....	28
IV.2.5.2.1	`mechanische´ Säule	28
IV.2.5.2.2	`lytische´ Säule.....	28
IV.2.5.3	Herstellung lytischer Membran.....	28
IV.2.5.4	Aufreinigung von Patientenseren.....	29
IV.2.5.5	Regeneration der `mechanischen´ und `lytischen´ Säulen.....	29

IV.2.6	<i>Immunscreening</i>	29
IV.2.6.1	Infektion und Induktion der rekombinanten Proteinsynthese	29
IV.2.6.2	Inkubation von Tumorproteinen mit Patientenserum	29
IV.2.6.3	Immunfärbung.....	30
IV.2.7	<i>Isolierung, Monoklonalisierung und Vermehrung positiver Klone</i>	30
IV.2.7.1	Ausschluß falsch positiver Klone	31
IV.2.7.1.1	IgG Ausschluß-Verfahren	31
IV.2.7.2	Charakterisierung positiver Klone	31
IV.2.7.2.1	In vivo Exzision	31
IV.2.7.2.2	DNA-Präparation	32
IV.2.7.2.2.1	Plasmid-Mini-Präparation.....	32
IV.2.7.2.2.2	Restriktionsanalysen	33
IV.2.7.2.2.3	Plasmid Midi-Präparation nach Qiagen	34
IV.2.7.2.3	Sequenzierung	35
IV.2.7.2.4	Homologierecherche	36
IV.2.7.3	autologe Serumanalyse	36
IV.2.7.4	heterologe Serumanalyse	36
V	ERGEBNISSE	37
V.1	AMPLIFIKATION DER PHAGENBANK.....	37
V.2	SEREX-SCREENING	37
V.3	MOLEKULARE CHARAKTERISIERUNG DER TUMORANTIGENE	39
V.3.1	<i>Restriktionsanalyse</i>	39
V.3.2	<i>Sequenzanalyse</i>	41
V.3.3	<i>Homologierecherche</i>	45
V.4	AUTOLOGE SERUMANALYSE	49
V.5	HETEROLOGE SERUM-ANALYSE	50
VI	DISKUSSION	52
VII	ZUSAMMENFASSUNG	67
VIII	ANHANG	69
VIII.1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	69
VIII.2	LITERATURVERZEICHNIS.....	70
VIII.3	ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	85
VIII.4	CURRICULUM VITAE.....	86
VIII.5	DANKSAGUNG.....	87

Identifizierung und Charakterisierung von Tumorantigenen eines metastasierten, kleinzelligen Medulloblastoms mit SEREX

I Einleitung

In Deutschland erkranken im Jahr durchschnittlich ca. 1800 Kinder neu an neoplastischen Erkrankungen. Davon sind etwa 20 % Tumore des Zentralnervensystems. Das Medulloblastom (Mb) ist einer der häufigsten und besonders problematischen Hirntumoren im Kindes- und Jugendalter. Abgesehen von frühzeitigen Metastasierungen und häufigen Rezidiven wird die Behandlung durch die toxischen Nebenwirkungen erschwert. So führt zum Beispiel die notwendige Bestrahlungstherapie bei jungen Patienten mit Mb oft zu schweren neurokognitiven und endokrinologischen Störungen. Trotz erheblicher Verbesserungen der konventionellen operativen, Strahlen- und Chemotherapie können nur etwa zwei von drei der an einem Mb erkrankten Kinder dauerhaft geheilt werden. Es wird deshalb in vielen experimentellen Studien nach neuen Behandlungsansätzen gesucht.

Die gezielte Aktivierung des Immunsystems gegen entartete Zellstrukturen ist ein viel versprechender Therapieansatz. Allerdings ist die Identifikation von geeigneten Antigenen eine essentielle Voraussetzung für die Entwicklung sicherer und wirksamer Tumorstoffe. Besonders interessant sind dabei Antigene, die von Helfer-T-Lymphozyten (HTL) erkannt werden, da diese eine zentrale Rolle bei der Koordination komplexer und lang anhaltender Immunantworten innehaben. Mit der autologen serologischen Analyse rekombinanter Tumor-cDNS-Bibliotheken (SEREX) können HTL-Antigene indirekt und sehr effizient nachgewiesen werden. Mit diesem Verfahren wurden in diversen Karzinomen erwachsener Patienten zahlreiche neue und klinisch interessante Antigene identifiziert und für neue Behandlungsstrategien vorgeschlagen.

Über das Antigenrepertoire typischer pädiatrischer Tumoren ist dagegen bis heute wenig bekannt. Zu Beginn der vorliegenden Arbeit gab es keine Informationen über die antigenspezifische Immunerkennung des Mb. Es war daher nahe liegend, die Eignung des SEREX-Verfahrens für die Identifizierung pädiatrischer Tumorantigene exemplarisch an einem Mb zu testen.

I.1 Therapie des Medulloblastoms

Mb sind primitive, embryonale, mesoneuroektodermale Mischtumore aus der Meninx primitiva. Aufgrund ihres Gewebersprungs werden sie von der WHO als PNET (Primitive Neuroektodermale Tumoren) der hinteren Schädelgrube klassifiziert [42][66]. Es handelt sich um Tumore höchster Malignität, was einem WHO-Grad IV entspricht. Vorwiegend im Wurbereich des Kleinhirns sowie im Dach des IV. Ventrikels lokalisiert, wachsen diese infratentoriellen Tumore lokal infiltrierend und metastasieren in den gesamten Liquorraum. Mb zählen zu den häufigsten Hirntumoren im Kindes- und Jugendalter mit einem Häufigkeitsgipfel zwischen dem 4. und 8. Lebensjahr und einer männlichen Prädisposition von 1,5:1. Die Leitsymptome bestehen aus Hirndruckzeichen wie Nüchternerebrechen, Nackensteifigkeit, Zwangshaltung des Kopfes und Sehstörungen. Desweiteren zählen dazu Kleinhirnsymptome mit Ataxie, Nystagmus, Intentionstremor und bei lokaler Ausbreitung Hirnnervenparesen, Ausfälle langer Bahnen und Regulationsstörung vitaler Zentren. Die lokale Raumforderung und Liquorzirkulationsstörung führt zu einer baldigen vitalen Bedrohung [66]. Das therapeutische Vorgehen erfolgt aktuell nach den von der Gesellschaft für pädiatrische Onkologie und Hämatologie ausgearbeiteten Richtlinien des HIT 2000-Protokolls [67]. Mit der bis zum Jahre 2000 in Deutschland angewandten HIT-Therapiestudien konnten rückfallsfreie 5-Jahres-Überlebensraten von 69% (HIT'91) bzw. Heilungsraten von 61-77% (HIT-SKK'92 bei Säuglingen und Kindern unter drei Jahren) bei Patienten mit Mb erzielt werden [<http://www.kinderkrebsstiftung.de/pdf/hit-network/behandlungsnetzwerk05.pdf>].

Zunächst wird eine möglichst totale Tumorresektion angestrebt, bei der sich abhängig vom Grad der Gewebe-Infiltration nicht immer bleibende neurologische Schäden vermeiden lassen. Problematische Tumorrreste können später in einer „second look“ Operation nach postoperativer Strahlen- und/oder Chemotherapie erneut angegangen werden [66]. Die postoperative Therapie teilt sich in eine konventionelle Bestrahlung von Gehirn und Rückenmark (24-36 Gy) mit Boost im Bereich der hinteren Schädelgrube (55-72 Gy) und wöchentliche Gaben von Vincristin auf. Anschließend erfolgt eine Erhaltungstherapie mit acht Blöcken Cisplatin, Lomustin und Vincristin. Die Strahlentherapie im Bereich des Hirnschädels und des Spinalkanals ist prinzipiell dringend notwendig, da Mb wegen ihres infiltrativen Wachstums selten vollständig reseziert werden können. Außerdem muß bei jedem Patienten zumindest mit einer okkulten Metastasierung über die Liquorwege gerechnet werden. Eine Heilung ohne nachfolgender Strahlentherapie ist somit nicht zu erwarten. Besonders bei

Patienten unter drei Jahren birgt sie jedoch die Gefahr von schweren, bleibenden vor allem neurokognitiven und endokrinologischen Störungen. Aufgrund der Strahlentoxizität besteht ein stark erhöhtes Risiko für eine nachfolgende mentale Retardierung und Myelosuppression [32]. An erster Stelle der endokrinen Spätfolgen stehen Längenwachstumsstörungen infolge Wachstumshormon (GH-)Mangel [22]. Prinzipiell können jedoch alle hypothalamisch-hypophysär kontrollierten Regelkreise betroffen sein [73][110]. Somit sollte die Strahlentherapie bei Patienten mit Mb unter drei Jahren möglichst auf einen späteren, weniger risikoträchtigen Zeitpunkt verschoben und das Intervall mit einer längerfristigen Chemotherapie überbrückt werden.

Das Wirksamkeitsoptimum der Chemotherapie bei jungen Patienten mit Mb wird zur Zeit in verschiedenen Ansätzen in weiteren Studien überprüft. Grundsätzlich ist das Mb ein chemotherapiesensibler Tumor und wird mit einer Kombination mehrerer Substanzen angegangen. Zu den etablierten Zytostatika bei der adjuvanten Therapie zählen Nitroseharstoffderivate, Platinderivate und Vincristin. Beim neoadjuvanten Einsatz werden alkylierende Substanzen (Ifosfamid, Cyclophosphamid), Platinderivate (Cisplatin, Carboplatin) sowie Alkaloide (Vincristin, Etoposid) und eventuell auch Antimetabolite (hochdosiertes Methotrexat, Cytosinarabinosid) verwendet. Bei der Hochdosischemotherapie kommen außerdem Busulfan und Melphalan zum Einsatz [66]. Auch bei der Chemotherapie können außer den bekannten Nebenwirkungen, wie erhöhte Infektanfälligkeit, Leukopenie, Übelkeit und Kopfschmerzen, insbesondere bei sehr jungen Patienten Störungen des Längenwachstums auftreten [79][111].

Allgemein hat sich die Prognose von Krebserkrankungen im Kindesalter in den letzten Jahrzehnten durch Fortschritte in den Behandlungsmethoden zum Teil dramatisch gebessert. Dies gilt in Folge einer Reduktion der perioperativen Mortalität, einer Standardisierung der Radiotherapie und intensivierter Chemotherapie auch für junge Patienten mit Mb [131]. Dennoch beeinträchtigen nach wie vor ein niedriges Alter bei Diagnose, Vorhandensein primärer ZNS-Metastasen, postoperativer Resttumor und eventuell ungenügendes Ansprechen auf die Chemotherapie die Prognose [68][134]. Mit steigender Zahl überlebender Patienten mit Mb gewinnt auch die Behandlung der therapeutischen Spätfolgen zunehmend an Bedeutung. Die erheblichen Auswirkungen der Strahlen- und Chemotherapie auf die Lebensqualität der überlebenden Patienten sollte neben der hohen Mortalitätsrate weiter ausschlaggebend sein, nach alternativen Ansätzen zur Therapie des Mb zu suchen.

I.2 Identifizierung von Tumorantigenen

Die Idee, sich die ausgezeichnete Spezifität und Sensitivität des körpereigenen Immunsystems zu nutze zu machen, und dieses gezielt gegen maligne Tumoren einzusetzen, ist nicht neu. Bereits im Jahr 1900 hatte Paul Ehrlich die Vision von „Zauberkegeln“, die Tumorzellen auffinden und zerstören können, und sprach ohne genauere Kenntnis von Ak-Technologie, die sich im darauffolgenden Jahrhundert entwickeln würde. Später formulierte MacFarlane Burnet die als „immune surveillance“ definierte Theorie, daß die Entstehung eines bösartigen Tumors mit genetischen Veränderungen verbunden sei, die zur Expression veränderter Proteine führe. Wobei diese modifizierten Proteine vom Immunsystem als fremd erkannt, und eine solche transformierte Zelle wie eine virusinfizierte Zelle zerstört würden. Demnach ließe sich die Existenz eines progressiv wachsenden Tumors auf einen Defekt in der Immunabwehr zurückführen [87]. Das wissenschaftliche Bemühen konzentrierte sich daraufhin jahrzehntelang auf den Nachweis dieser spezifischen Immunreaktion in Tumorpatienten sowie auf das Verständnis von deren Ineffektivität und darauf, ob und wie die körpereigene Immunabwehr demnach therapeutisch effektiver gestaltet werden könnte.

Der Beweis der Existenz von tumorspezifischen Ak bei Krebspatienten gelang Lloyd Old bereits in den 60er Jahren [85]. Der Durchbruch im Bereich der Tumorimmunologie wurde allerdings erst durch die Entwicklung neuer Technologien erzielt. Besonders hervorzuheben ist dabei die in den 70er Jahren von Köhler und Milstein entwickelte Hybridomtechnik, mit der immortalisierte Zellen erzeugt werden konnten, die einen bestimmten monoklonalen Ak (mAk) produzieren [60]. Auf dem Gebiet der T-Zell-Forschung gelang es verlässliche In-vitro-Kulturbedingungen zu etablieren, die eine effiziente Klonierung einzelner Lymphozyten ermöglichte [87]. Die Fortschritte im Bereich der Tumorimmunologie führten dazu, daß die polyklonale Anti-Tumor-Immunantwort in ihre einzelnen Komponenten zerlegt werden konnte und Erkenntnisse über die genauere Morphologie der Tumorantigene gewonnen werden konnten. So wurde deutlich, daß gesunde und maligne Zellen zweifellos qualitative und quantitative Unterschiede in der Antigenexpression aufweisen und dabei nicht nur Zellmembranmoleküle, sondern als Tumorantigene fungieren. Auch zytoplasmatische und nukleäre Proteine die in Form von Peptiden von MHC-Molekülen zur Zelloberfläche transportiert und präsentiert werden, können dort von T-Zellen als fremd erkannt werden [8].

I.3 Klassifizierung von Tumorantigenen

Die Analyse der tumorassoziierten Antigene ließ eine Klassifizierung nach Sequenz, Expression und Immunogenität zu [102][121].

Cancer/Testis Antigene sind durch ein charakteristisches Expressionsmuster definierte Genprodukte, deren Vorkommen sich auf maligne Zellpopulationen beschränkt und Normalgewebe (außer Spermatogonien) ausschließt, wobei sie sich nicht tumortypspezifisch und frequenzvariabel verhalten (z.B. MAGE-Antigene, BAGE, GAGE und NY-ESO-1).

Differenzierungsantigene sind zelltypspezifische Antigene, deren Expression in Normalgewebe auf eine bestimmte Entwicklungsstufe beschränkt ist und sich in Malignomen findet, die sich von Zellen dieser Differenzierungsstufe ableiten (z.B. Melan A, Tyrosinase, gp100, CEA und NY-BR-1).

Überexprimierte Antigene sind Genprodukte, die in Tumorzellen stärker exprimiert werden als in entsprechenden nicht entarteten Normalgeweben (z.B. p53, HER2/neu).

Mutierte Antigene entsprechen mutierten Genprodukten, die zur Neoexpression und/oder veränderter Prozessierung eines Epitopes führen und somit vor allem individuell auftreten aber auch als gemeinsame (shared) Antigene von Tumoren verschiedener Patienten vorkommen (z.B. MUM-1, R24C, β -Catenin, p57).

Virus-kodierte Antigene werden von Tumorzell-infizierenden Viren exprimiert, für die zum Teil ein ursächlicher Zusammenhang zwischen Virusinfektion und Tumorentstehung belegt ist (hepatozelluläres Karzinom, Zervixkarzinom) (z.B. HBV, HPV, HCV).

Tumorspezifische Spleißvarianten entsprechen durch alternatives Spleißen generierten Proteinvarianten, deren Expression auf Tumorgewebe beschränkt ist (z.B. Restin)

Tumorassoziierte Autoantigene sind Antigene, die in gleicher Form auch in Normalgewebe vorkommen, aber aufgrund bislang ungeklärter Mechanismen nur in Tumorpatienten eine meßbare Immunantwort auslösen (z.B. HOM-MEL-2.4).

Nicht tumorassoziierte Autoantigene entsprechen klassischen Autoantigenen mit Expression in verschiedenen Normal- und ggf. Tumorgeweben (z.B. HOM-RCC-10, HOM-tes-11).

I.4 Identifizierung von Tumorantigenen mit Hilfe von CD8 + CTL

Nachfolgend soll eine kurzer Überblick über bekannte Tumorantigene und klassische Methoden der Tumorantigen-Identifizierung gegeben werden.

Aufgrund der protektiven Effekte CD8+ zytotoxischer T-Lymphozyten (CTL) in murinen Tumormodellen [132] konzentrierte sich die Identifizierung von Tumorantigenen besonders auf solche Antigene, die von CD8 + CTL erkannt werden. Die sich dabei entwickelte sogenannte „genetische“ und „biochemische“ Methode zur Antigen-Identifizierung wird im Folgenden näher beschrieben. Der Grundgedanke der beiden Methoden besteht darin, CD8 + CTL-Klone mit nachgewiesener Tumorspezifität als Sonden zur Identifizierung von Tumorantigenen zu nutzen.

Das „genetische“ Verfahren, das von Boon und Kollegen 1988 etabliert wurde [29], basiert auf der Transfektion von HLA-Genen und Tumor-cDNA-Banken in COS-Zellen und Identifizierung positiver Klone durch T-Zell-Assays mit den tumorspezifischen CD8 + CTL. Dabei erlaubte die anschließende Transfektion mit Fragmenten der identifizierten Tumorantigenensequenzen die Identifizierung des verantwortlichen T-Zellepitops.

Beim sogenannten „biochemischen“ Verfahren werden aus den MHC-Molekülen auf der Oberfläche der Tumorzellen Peptide eluiert und diese fraktioniert auf die Erkennung durch tumorspezifische CD8 + CTL-Klone getestet. Diejenige Fraktion des Eluats, die eine Sensibilisierung der zytotoxische Aktivierung des CD8+ CTL-Klons hervorruft, weiter fraktioniert, und schließlich das T-Zell-Epitop tragende Peptid sequenziert.

Anhand des „genetischen“ Verfahrens gelang die erste direkte molekulare Identifizierung eines von CD8+ CTL erkannten tumorspezifischen humanen Antigens. Es handelte sich dabei um das von einer Melanomzelllinie exprimierte Antigen MAGE-1, das zu einer großen Familie von verwandten Tumorantigenen gehört. Im weiteren Verlauf konnten anhand von CD8+ CTL-Klonen weitere Gen-Familien wie die der Antigene BAGE-, GAGE- und LAGE definiert werden. Mit Hilfe des „genetischen“ Verfahrens konnten auch erste Vertreter der großen Antigen-Gruppe der Differenzierungsantigene erfasst werden. Ein Beispiel stellt das Antigenprodukt des Tyrosinase Gens dar, welches die Synthese der Melaninvorstufe DOPA in Melanozyten katalysiert [14]. Inzwischen wurden mehrere der Antigene, die mit CTL-basierten Verfahren erstmals identifiziert worden sind, auch mit Hilfe Ak-basierter Verfahren identifiziert.

I.5. Identifizierung von Tumorantigenen mit Hilfe von Antikörpern

Auch die Nutzung der von B-Zellen sezernierten Serum-Ak war ein Ansatz zur Identifizierung von Tumorantigenen. Die Untersuchungen von Lloyd Old und seiner Arbeitsgruppe zeigten, daß Krebspatienten Ak produzierten, die mit autologen und teilweise auch heterologen Tumorzellen reagierten, ohne an nicht-maligne transformierte Zellpopulationen zu binden [85], allerdings verfügte man erst viele Jahre später geeigneten Methoden für die molekulare Identifikation der von Serum-Ak gebundenen Antigene [Vgl. Kapitel I.6.]. Nach Etablierung der Hybridomtechnik [60] dominierte deshalb in den darauffolgenden Jahren zunächst die Identifizierung von Tumorantigenen mit Hilfe muriner mAk das wissenschaftliche Feld [13].

Mit Hilfe von mAk konnte z.B. der zur Klasse der in Krebszellen überexprimierten Tumorantigene gehörende, Plasmamembran-ständige Her2/neu (erbB-2)-Rezeptor identifiziert werden. Das Her2/neu-Gen wird von zahlreichen menschlichen Zellen exprimiert, vermittelt die Wirkung bestimmter Wachstumsfaktoren und kann bei Fehlregulierung den Charakter eines Onkogens annehmen [58][99]. In der Literatur wird die Überexpression von *Her2/neu* in verschiedenen Tumorarten wie z. B. epithelialen Tumoren [105], Nierenzellkarzinom [105], Gehirntumoren [36] und Melanomen [95] beschrieben. Besonders hervorzuheben ist dabei der manigfaltig beschriebene Zusammenhang mit Brustkrebs [18]. Mit der mutierten Form des Melanotransferrins p97 konnte auch ein Produkt einer sporadischen Genmutation mit mAK identifiziert werden [15]. Die nachgewiesene Mutation im Tumor des Patienten ist jedoch extrem selten oder vielleicht sogar einmalig [87].

Viele der identifizierten Tumorantigene konnten unabhängig voneinander sowohl mit der T-Zell-Methode als auch mittels monoklonaler AK und später mit dem unten näher beschriebenen SEREX-Verfahren erfasst werden, welches auf der serologischen Analyse von rekombinant exprimierten Tumor-cDNA-Bibliotheken beruht (*serological analysis of recombinant tumor cDNA expression libraries*) und auf den Vorarbeiten von Lloyd Old basierte [100].

In den letzten Jahren hat die Identifikation neuer Tumorantigene in malignen Tumoren des Erwachsenen rasant zugenommen und führte nicht nur zu verschiedenen antigenspezifischen passiven und aktiven Immuntherapieansätzen, sondern darüberhinaus zur Etablierung neuer Marker für die Diagnose, Prognose und Beurteilung des Krankheitsverlaufes von malignen Erkrankungen. Ob dabei Unterschiede zwischen den Tumorantigenen in Malignomen von erwachsenen und pädiatrischen Patienten bestehen, ist bisher wenig untersucht.

Anhand eines mAk der Maus konnte ein Tumorantigen pädiatrischer Rhabdomyosarkome und Nephroblastome identifiziert werden, welches von dem sogenannten *WT1*-Gen kodiert wird und neben einer möglichen diagnostischen Bedeutung auch immuntherapeutisch genutzt werden kann [17]. Einige der bereits in Tumoren von Erwachsenen identifizierten Cancer-Testis-Antigene wie z.B. Antigene der MAGE und GAGE-Familie sowie NY-Eso-1 konnten inzwischen auch in verschiedenen pädiatrischen Tumoren nachgewiesen werden [47]. Zu Beginn dieser Arbeit waren für das Mb nur wenige Tumorantigene bekannt. Insgesamt besteht in der pädiatrischen Onkologie ein Nachholbedarf an der Identifizierung von tumorimmunologischer Zielstrukturen, um an die wissenschaftlichen und klinischen Erfolge in der erwachsenen Onkologie anzuschließen.

I.6 Die Bedeutung von CD4+ T-Helferzellen bei der Tumorimmunantwort

Hinreichend bekannt ist, daß THL mit ihrem T-Zell-Rezeptor an einen Peptid-MHC-Klasse II-Komplex auf professionellen antigenpräsentierenden Zellen interagieren, während zytotoxische CD8+ CTL Komplexe von Peptiden mit den ubiquitär vorkommenden MHC-I-Klasse binden. Die Tatsache, daß Tumorantigene sowohl mit CD8+ CTL-basierten als auch mit IgG-Ak-vermittelten Verfahren identifiziert werden konnten, bestätigte die komplexe Tumorimmunerkennung und wies indirekt auf einen Beitrag von CD4+ THL, da B-Zellen nur nach THL-Hilfe IgG-Ak produzieren können. Durch *in vitro* Untersuchungen und *in vivo* Tiermodelle wurde später deutlich, daß CD4+-THL bei der antitumoralen Immunität eine zentrale Rolle zukommt [23][30][130][127]. Entsprechend zielen wissenschaftliche Bemühungen zunehmend auf die Identifizierung von Tumorantigenen ab, die von CD4+ THL erkannt werden. T-Zell-basierte Ansätze zur Identifikation von Tumorantigenen sind jedoch noch sehr kompliziert und aufwendig, und verlangen wie die CTL-basierten Verfahren die Etablierung von Tumorzelllinien und tumorspezifischen T-Zell-Klonen [89][127]. Der überwiegende Teil der bislang mit T-Zell-Methoden definierten Tumorantigene wird deshalb im Kontext von MHC-Klasse I Molekülen auf der Oberfläche des Tumors von CD8+-T-Zellen erkannt. Mit dem Ak-basierten SEREX-Verfahren steht dagegen eine relativ einfache, sehr effiziente, indirekte Methode zur Verfügung, mit der CD4+ THL-Antigene kloniert werden können. Die Tatsache, daß es von der Kultivierbarkeit der Tumoren *in vitro* unabhängig ist, macht es zu einem besonders attraktiven Verfahren für die Identifikation von Antigenen pädiatrischer Tumoren.

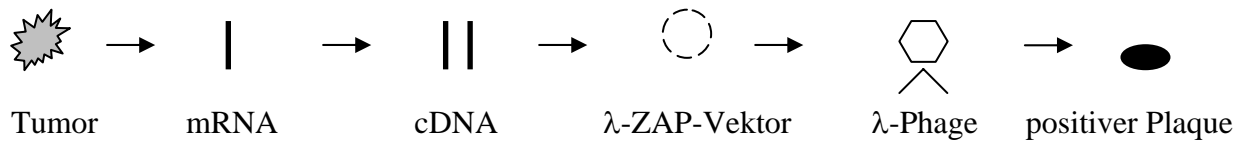
I.7 Identifizierung und Charakterisierung von Tumorantigenen mit SEREX

Das SEREX-Verfahren wurde von der onkologischen Arbeitsgruppe um Michael Pfreundschuh in Homburg/Saar etabliert und 1995 erstmals publiziert [100][102]. Seine Entwicklung basierte auf dem tumorimmunologischen Ansatz der „autologen Typisierung“ von Lloyd Old [85], dessen New Yorker Arbeitsgruppe inzwischen einen grossen Beitrag zur Antigen-Identifikation mit SEREX geleistet hat [19].

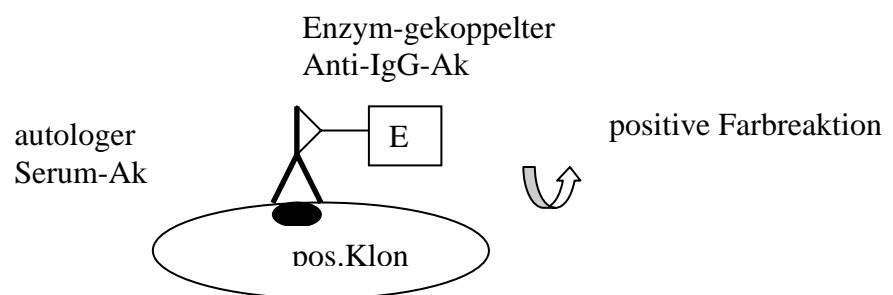
Bei diesem Verfahren wird klassischerweise eine Tumor-cDNA-Bibliothek mit autologem Serum auf das Vorkommen von Antigenen gescreent, die von hochtitrigen IgG-Serum-Ak gebunden werden kann (Kap. IV.2.6) (**Abb. 1**). Zu diesem Zweck muss zunächst aus einer Tumorbiopsie mRNA isoliert, und diese in cDNA umgeschrieben, in einen Bakteriophagen-DNA-Vektor kloniert und mit diesem zu einer Bakteriophagen-cDNA-Expressions-Bibliothek verpackt werden. Diese wird in *E.coli*-Bakterien exprimiert, und die rekombinanten Tumorproteine nach Übertragung auf Nitrozellulosemembranen mit dem Serum auf Antigene gescreent. Um unspezifische Bindungen an Bestandteile des Vektorsystems auszuschließen, muß das Patientenserum vorab gegen Bestandteile des Vektorsystems vorabsorbiert werden (Kap. IV.2.5). Die Einsatz eines markierten Zweit-Ak gegen humanes IgG erlaubt schließlich die Identifikation von Phagenklonen, die Antigen exprimieren. Diese können aus den lytischen Plaques im Bakterienagar isoliert, und die Antigen-cDNA nach einfachen Klonierschritten unmittelbar sequenziert werden (Kap. IV.2.7.2). Mithilfe der Antigen-cDNA-Sequenz können dann Homologierecherchen und ggf. mRNA-Expressionsanalysen durchgeführt werden (Kap. IV.2.7.2.4). Durch Analyse der Antigene auf Reaktivität mit Seren anderer krebskranker und gesunder Personen, kann schliesslich die Tumor-Spezifität und Frequenz der Ak-Antwort ermittelt werden (Kap. IV.2.7.3).

Das SEREX-Verfahren ist weniger aufwendig als die oben geschilderten T-Zell-basierten Verfahren, liefert indirekte Hinweise auf die Erkennung der Antigene durch THL und ist unabhängig von der Kultivierbarkeit sowohl des untersuchten Tumors als auch autologer T-Zellen *in vitro* (Abb. 2). Es kann mit primärem Tumormaterial gearbeitet werden, so dass der ermittelte Antigenstatus des Tumors weitgehend repräsentativ für die *in vivo* Situation ist. Die Durchführung der SEREX-Methode ist darüberhinaus wenig störanfällig und sehr effizient. Für die Untersuchung des Antigenstatus von Medulloblastomen, die schwer *in vitro* zu propagieren und daher den T-Zell-Verfahren weitgehend unzugänglich sind, erschien das SEREX hervorragend geeignet.

1) cDNA Expressionsbibliothek



2) Immunscreening



3) Sequenzanalyse

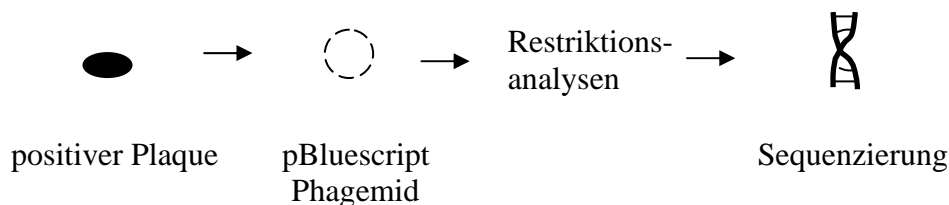


Abbildung 1 : Das SEREX-Verfahren

1) Ausgehend von m-RNA aus Tumorgewebe wird eine cDNA-Expressionsbibliothek konstruiert und diese durch Phagentechologie zur hocheffizienten prokaryontischen Expression mittels *E. coli* von rekombinanten Proteinen verwendet. Jeder Plaque auf dem *E.coli*-Rasen einer Agarplatte entsprach einem rekombinanten Antigen. 2) Wenn der rekombinante Klon von Serum-Ak erkannt wird, binden an dessen konstanten Teil der Enzym-gekoppelte, sekundäre Anti-IgG-Ak, der wiederum nach einer enzymatischen Farbreaktion den positiven λ-Phagenplaque anzeigt. 3) Zur genaueren Charakterisierung des Tumor-cDNA-Inserts muß der rekombinante λ-Phage aus dem Plaque isoliert, und die Fremd-cDNA aus dem grossen λ-Vektor Uni-Zap-XR in den kleinen Phagemid-Vektor pBluescript umklontiert werden. Durch Restriktionsanalysen des rekombinanten pBluescript-Vektors konnte ein erster Überblick über die Größe und Identität des cDNA-Inserts gewonnen werden, während die vollständige Aufschlüsselung der Identität des Inserts in den Sequenzanalysen erfolgte.

Weltweit konnten mittlerweile weit über 1000 Antigene mit SEREX in verschiedenen Tumoren identifiziert werden [101][<http://www.licr.org/SEREX.html>], von denen eine Vielzahl vorher unbekannt war. Für einige dieser Antigene konnte inzwischen durch zusätzliche Experimente eine Erkennung durch CD8+ CTL und/oder CD4+ THL bestätigt werden [12][113].

Die SEREX-Antigen-spezifischen tumorassoziierten Veränderungen molekularer (Gen, Transkripte, Protein) oder immunologischer Art (Serum-Ak, CD8+ CTL, CD4+ THL), können auf ihre Wertigkeit als diagnostische und prognostische Marker oder als Ansatzpunkt für eine Immuntherapie überprüft werden. Für die klinische Relevanz ist dabei die Gewebespezifität und Immunogenität der Antigen-Kandidaten von Bedeutung.

Analysen der Sequenzhomologien und der Expression eines Antigens können Aufschluss über den tumorassoziierten Pathomechanismus geben. So konnte für das mit SEREX detektierte Antigen Carboanhydrase XII in Nierenzellkarzinom eine Überexpression des Gens nachgewiesen werden, die durch eine mutationsbedingte Aufhebung der Transkriptions-Repression durch das Von Hippel Lindau-Genprodukt zustande kam [102] .

Die Identifizierung von Ak gegen tumorassoziierte Antigene, die bei mehreren Tumorpatienten vorkamen, machten Hoffnung auf neue serologische Tests für die onkologische Frühdiagnose, Beurteilung des Krankheitsverlaufes und Früherkennung eines Rezidivs [83].

Unter therapeutischen Gesichtspunkten betrachtet können Antigene, die auf der Zelloberfläche exprimiert werden (wie z.B. CEA, Her2/neu, MUC-1 und einige der mit SEREX identifizierten Antigene) als Zielstrukturen für die monoklonale Ak-Therapie genutzt werden (Kap. I.5). Von besonders großem Interesse ist der Einsatz von SEREX-definierten Tumorantigenen in die aktive, antigenspezifische Vakzinierung oder in den adoptiven Transfer von antigenspezifischen T-Zellen. Mithilfe SEREX-definierter Tumorantigene werden bereits erste klinische Studien durchgeführt [50][33][104](Kap.I.6).

Die folgenden Kapitel geben eine allgemeine Einführung in passive und aktive, antigenunspezifische und antigenspezifische Ansätze für die Tumorimmuntherapie. Letztere würden von der Identifikation neuer Antigene z.B. mit SEREX profitieren.

I.8 Passive Tumorstoffe

Zu den passiven Impfansätzen gegen maligne Erkrankungen zählen der adoptive Transfer malignomreaktiver T-Zellen [98] und der Einsatz von tumorantigenspezifischen Ak [24][124]. Die Idee des adoptiven T-Zell-Transfers wurde zunächst bei der virologischen Therapie näher untersucht. Greenberg et al. übertrugen erstmals und erfolgreich durch wiederholte *in vitro* - Stimulation mit dem Virus generierte Cytomegalievirus (CMV)-spezifische CD8+ CTL eines immunkompetenten Knochenmarkspender auf einen immuninkompetenten Patienten mit manifester CMV-Infektion [93]. Nebenwirkungen traten bei guter protektiver Wirkung aufgrund der hohen Spezifität der gegen CMV gerichteten CD8+ T-Zellen nicht auf. Die Strategie des adoptiven T-Zell-Transfers wurde inzwischen auch erfolgreich auf die Immuntherapie von Epstein-Barr-Virus (EBV)-assoziierten Erkrankungen bei Immunsupprimierten angewandt [96].

Die Erfolge bei der Prävention und Therapie von Virus-assoziierten Erkrankungen bei immunsupprimierten Patienten ermutigen zur Übertragung dieses Konzeptes auf Antigene, die von malignen Tumoren exprimiert und von autologen T-Zellen erkannt werden. Rosenberg und seine Kollegen entwickelten Mitte der 80er Jahre die ersten malignomreaktiven Lymphozyten für den adoptiven Transfer [98]. Die *in vitro* zur Zerstörung von Tumorzellen fähigen Lymphokinaktivierten Killerzellen (LAK-Zellen) zeigten *in vivo* allerdings toxische Nebenwirkungen und keine Tumorspezifität. Auch die folgenden wissenschaftlichen Ansätze auf der Basis tumorinfiltrierender T-Lymphozyten sowie *in vitro* generierter tumorspezifischer CD8+ und CD4+ T-Zelllinien brachten noch nicht die erhoffte effektive immunologische Tumorabwehr. Ein zentrales Problem stellt die beobachtete schwächere Immunogenität tumorassoziierter Antigene gegenüber viralen Antigenen dar und der ungenügende Funktionalität autologer T-Zellen, die zwar die tumorassozierten Antigenepitope erkennen können, aber überwiegend nicht in der Lage sind, die Tumorzelle zu lysieren. Die *in vitro* Herstellung antigenspezifischer T-Zellen, die einen T-Zellrezeptor mit ausreichender Affinität zum Antigen besitzen, ist aufwendig. An der Optimierung dieses Prozesses z.B. durch Verwendung von Peptidbeladenen dendritischen Zellen arbeiten derzeit verschiedene Arbeitsgruppen [119]. Problematisch bleibt die limitierte Anzahl bislang identifizierter tumorspezifischer Antigene.

Für die Ak-basierte Immuntherapie konnten native wie auch an Zellgifte gekoppelte monoklonale (m) Ak entwickelt werden. Letztere transportieren pflanzliche oder bakterielle Giftstoffe (Immuntoxine), Radionuklide (Radioimmunkonjugate), Enzyme, Zytokine oder Nukleinsäuren zu den malignen Zielzellen. Allerdings blieb das variable und häufig niedrige zytotoxisches Potential ein bedeutendes Handicap der immunologischen Therapie mit Ak. Inzwischen konnten sogenannte bispezifische Ak entwickelt werden, die Bindungsstellen für zwei unterschiedliche Antigene vorweisen. Dies eröffnete die Möglichkeit, immunologische Effektorzellen direkt mit Tumorzellen zu vernetzen und so deren Lyse zu bewirken [11]. Die zweite Bindungsstelle wurde auch für die Konjugation an Prodrug-konvertierende Enzyme genutzt, die Zytostatika-Vorläufer in unmittelbarer Nähe der Tumorzellen in aktive Metabolite umwandeln und somit eine lokal erhöhte Zytostatikakonzentration bewirken [64][11]. Seit einigen Jahren wird bereits an trispezifischen Ak gearbeitet [129].

Die Ak-basierte Behandlung ist jedoch mit den folgenden Limitationen behaftet. Nach wiederholter intravenöser Injektion muriner Ak bildet das menschliche Immunsystem häufig anti-Maus-Ak (HAMA), die die Wirkung der murinen Ak neutralisierten. Dies führt nicht nur zu einer verkürzten Halbwertszeit der murinen Ak, sondern begünstigte darüberhinaus auch das Entstehen allergischer Reaktionen bis hin zum allergischen Schock oder zu Immun-Komplex-Erkrankungen mit Nierenversagen [27][78]. Gelöst werden konnte dieses Problem durch die sogenannte Chimärisierung und Humanisierung, die weniger häufig allergische Nebenwirkungen zeigen. Im klinischen Einsatz stellt die Produktion solcher modifizierten Ak in ausreichender Quantität und Reinheit jedoch ein aufwendiges und kostspieliges Verfahren dar.

Ein weiteres Problem stellt die ungenügende Zugänglichkeit vieler solider Tumore für Ak dar. Durch zentrale Nekrosen, reichlich interstitielles Bindegewebe und den erhöhten Interstitialdruck im Tumorgewebe, können solide Tumoren mit zunehmender Größe schlechter von Immunglobulinen penetriert werden. Insgesamt werden die Grenzen der Ak-basierten Therapie durch die relativ geringen Ansprechraten auf verschiedene Ak reflektiert, so z.B. auf anti-Her-2-Ak beim Mammakarzinom (12%) [92] oder auf anti-CD20-Ak bei B-Zell-Lymphomen (6%) [51]. Wie bei der Therapie mit T-Zellen ist auch bei der Ak-basierten Immuntherapie ein Mangel an geeigneten Antigenen bislang ein limitierender Faktor.

I.9 Ansätze der aktiven Tumorthherapie

Von aktiven Ansätzen der Tumormimmuntherapie werden länger anhaltende Immunreaktionen erwartet, die sich u.a. in der Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses manifestieren. Allerdings kann eine höhergradige Immunsuppression für aktive immuntherapeutische Ansätze limitierend sein.

Erste Schritte in Richtung aktiver Vakzine erbrachten klinisch-experimentelle Immunisierungen mit bestrahlten autologen Tumorzellen bei Melanompatienten, bei denen sich nach der Vakzinierung tumorreaktive T-Zellvorläufer im peripheren Blut nachweisen ließen [59][80]. Aktuell zeigte sich in einer multizentrischen Phase-III-Studie an Patienten mit regionalem Nierenzellkarzinom nach radikaler Nephrektomie, daß der adjuvant angewandte autologe renale Tumorzellimpfstoff das Risiko einer Tumorprogression im Vergleich zur alleinigen operativen Therapie signifikant reduzierte [90].

Nach der Identifikation der ersten Tumorantigene wurden auf der Basis tumorassoziierter Antigene (z.B. Melan A/MART-1, Tyrosinase, gp100, MAGE-3, NY-ESO-1) Peptid-Vakzine entwickelt [75][51][97][48] und zum Teil mit Adjuvantien kombiniert eingesetzt. Als Kriterium für eine signifikante Immunantwort galt bei Untersuchungen dieser Art die Induktion einer Hautreaktion vom verzögerten Typ („delayed-type-hypersensitivity“, DTH-Reaktion) nach intradermaler Peptidinjektion und die messbare Induktion peptidspezifischer CD8⁺ CTL in peripherem Blut, Tumorgewebe und drainierenden Lymphknoten. In einigen Fällen waren diese Immunreaktionen nach Peptidvakzinierung mit der Regression einzelner Tumormanifestationen oder Stabilisierung einer vorher progredienten Tumorerkrankung assoziiert [48]. Als besonders vielversprechendes Adjuvans gelten derzeit Dendritische Zellen, die im gesunden Organismus als professionelle antigenpräsentierende Zellen für die Induktion der primären Immunantwort verantwortlich und bei Tumorpatienten oft nachweislich in ihrer Funktion gestört sind [34]. Autologe Dendritische Zellen werden dabei entweder mit definierten antigenen Peptiden beladen oder mit Lysaten aus autologen oder allogenen Tumoren inkubiert, so daß die Tumorproteine unselektioniert phagozytiert und die entsprechenden Antigene im optimierten Kontext präsentiert werden können. In mehreren Studien konnte eine verstärkte Immunantwort nach Immunisierung mit Dendritischen Zellen gegenüber reinen Peptidvakzinen beobachtet werden, was für eine effizientere Präsentation des Impfantigens sprach [4].

Es besteht bezüglich optimaler Vakzine Einigkeit darüber, daß von antigen-spezifischen Vakzinen eine höhere Spezifität und damit Sicherheit, aber auch eine höhere Effizienz zu erwarten ist. Für diese antigenspezifische Strategien würden sich ausgewählte Tumorantigen-Kandidaten eignen, die sich in entsprechenden Homologierecherchen und Expressionsanalysen als nicht identisch mit in Normalgewebe exprimierten Strukturen erwiesen haben. Andernfalls wäre nach Antigen-spezifischer Vakzinierung mit Nebenwirkungen an Normalgeweben zu rechnen. Wie oben geschildert, sind die Arbeiten zur Identifizierung von Tumorantigenen in häufigen Tumorentitäten erwachsener Patienten weit fortgeschritten, während *bis dato* nur wenige Tumorantigene pädiatrischer Tumoren für immuntherapeutische Ansätze vorgeschlagen werden konnten. Die Teilerfolge der Tumorstimmung bei erwachsenen Patienten spornen daher die Suche nach pädiatrischen Tumorantigenen an. Auf ihrer Basis wären dann aktive und passive Therapieansätze denkbar.

II Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, mit Hilfe des SEREX-Verfahrens erstmalig Antigene eines Mb und damit eines typisch pädiatrischen Malignoms zu identifizieren, und die gefundenen Antigene im Hinblick auf ihre mögliche klinische Bedeutung näher zu charakterisieren.

Zu diesem Zweck sollten

- 1) eine bereitgestellte Mb-cDNA-Bibliothek bakteriell exprimiert und mit SEREX auf das Vorkommen von Antigenen gescreent werden, die hochtitrige IgG-Ak in autologem Serum banden,
- 2) die gefundenen Antigene nach einer einfachen Umklonierung in Phagemide sequenziert, einer computergestützten Homologie-Recherche zugeführt, und alle verfügbaren Informationen zu den Homologen recherchiert werden,
- 3) eine heterologe, serologische Analyse mit Proben von anderen pädiatrischen Tumorpatienten und gesunden Kontrollen durchgeführt werden, um zu beurteilen, ob es sich bei den gefundenen Antigenen um Tumor- oder Autoantigene handelte,
- 4) für alle Antigene darüber hinaus der Ak-Titer im Verlauf der individuellen Krankheit gemessen und dadurch getestet werden, ob sich einzelne Antigen-spezifische Ak als Tumormarker eignen, und
- 5) die Ergebnisse der Arbeit vor allem unter den Gesichtspunkten einer möglichen klinischen Bedeutung der einzelnen Antigene und des Nutzens der SEREX-Strategie für die Entwicklung pädiatrischer Tumormimmuntherapien diskutiert werden.

III Material

III.1 Antibiotika

Tetracyclin (SIGMA, # T 7660)

Stammlösung : 10 mg / ml Tetracyclin in 70 % EtOH (lichtgeschützt bei -20 °C)

Gebrauchslösung : 15 µg / ml

Ampicillin (MERCK, # 1.00278)

Stammlösung : 10 mg / ml 70 % EtOH

Gebrauchslösung : 50 µg / ml

Kanamycin (SIGMA, # K-4000)

Stammlösung : 10 mg / ml H₂O

Gebrauchslösung : 50 µg / ml

III.2 Antikörper

Alkaline Phosphatase-conjugated Affini Pure Goat Anti Human IgG

(DIANOVA Hamburg, # 109-055-098)

Stammlösung : 0,3 mg / ml in dd H₂O : Glycerol (1 : 1)

Gebrauchslösung : 1 : 2500 [0,12 µg / ml TBS]

III.3 Bakterien

E. coli XL-1 Blue MRF' (Fa. Stratagene, # 200450)

*SOLR*TM (Fa. Stratagene, # 200298)

III.4 Chemikalien

BIOMOL Feinchemikalien Hamburg

5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat toluidine salt (BCIP), (# 02291)

Stammlösung : 50 mg / ml (in 100 % DMF)

Gebrauchslösung : 1 : 2000 (in 1 x CDS)

Nitroblue Tetrazoliumchloride (NBT), (# 06428)

Stammlösung : 100 mg / ml (in 70 % DMF)

Gebrauchslösung : 1 : 2000 (in 1 x CDS)

Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranoside (IPTG), (# 05684)

Stammlösung : 1 M (in dd H₂O, aliquotiert bei -20 °C)

Gebrauchslösung : 4,5 M (30 µl in 6,6 ml Topagar)

GIBCO BRL

Agarose, (# 15510-027)

SIGMA Steinheim

N,N-Dimethylformamide 99% (DMF), (# D-4551)

Polyoxyethylene-Sorbitan Monolaurate (Tween 20), (# P 1379)

Gebrauchslösung : 1 : 200 (in TBS)

Maltose, (# M-5885)

Stammlösung: 20 %

Gebrauchslösung : 0,2 %

MgSO₄⁺-7H₂O, (# M-5921)

Stammlösung : 1 M (steril)

Gebrauchslösung : 0,01 mM

Thimerosal, (# T 2299)

Stammlösung : 10 %

Gebrauchslösung : 0,0125 %

Stratagene

Ethylenediaminetetraacetic acid-disodium salt (EDTA), (# 300071)

5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid (X-Gal), (# 300201 (1g))

Stammlösung : 250 mg / ml DMF 99 %

USB Amersham Life Science

TRIS, (# US 75825)

MERCK Darmstadt

Chloroform (zur Analyse, # 1.02445)

Glycerin 87 % (zur Analyse, # 1.04094)

Hydrochlorid acid 32% (zur Analyse, # 1.00319)

Kaliumchlorid (# 1.04936)

Natriumazid (reinst, # 106688)

Stammlösung : 10 %

Gebrauchslösung : 0,0125 %

NaCl (# 1.06404.5000)

Natriumhydrogenphosphat (# 1.06586)

III.5 Enzyme

Restriktionsenzyme :

EcoR I (Stratagene, # 500480)

Xho I (Stratagene, # 501140)

BamH I (Stratagene, # 500220)

III.6 Geräte

Analysen-Waage (Mettler)

Autoklav (KSG-Sterilisatoren)

Bakterienschüttler (New Brunswick Scientific)

Brutschrank (Heraeus Instruments)

Mikrowelle

Wasserbad (Haake)

Überkopffrotator (Heidolph)

Ultraschallhomogenisator (Branson)

Schwenktisch (IKA Labortechnik)

Standzentrifuge (Sorvall Instruments)

Spectrometer (Beckmann)

Tischwaage (Mettler)

Tischzentrifuge (Eppendorf)

III.7 DNA molecular weight marker

Gene Ruler™ 1kb DNA Ladder (MBI Fermentas, # SM 0311)

III.8 Medium

LB-Medium

10 g Peptone (,#), 5 g Select Yeast-Extract (Life Technologies, # 30393-029), 10 g NaCl; ad 1 Liter dd H₂O

LB-Tet-Platten

7g Select Agar (Life Technologies, # 30391-023) ad 400ml LB-Medium autoklavieren

Gebrauchslösung : 52 °C + 600µl Tetracyclin-Stammlösung

Lagerung : lichtgeschützt bei +4 °C

Verwendung : 2-14 Tage nach Herstellung

Top-Agar

2,8g Agarose ad 400 ml LB-Medium, autoklavieren

Gebrauchslösung : 52 C °

III.9 Membranen und Filter

Nitrocellulose Blotting Membran (0,45µm) (Sartorius Göttingen, # 11306-41BL)

Faltenfilter (Durchmesser 240 mm) (S&S GmbH Daßel, #)

III.10 Patientenserum

Das Patientenserum stammte von klinisch gesunden Probanden im Alter von 0-40 Jahren sowie von Patienten mit Medulloblastom oder anderen Tumoren. Nach Einwilligung der Eltern wurde es von Patienten sowie von freiwilligen gesunden Spendern der Kinderklinik der TU München entnommen.

III.11 Phagen

Arbeitsgruppe Dr. Uta Behrends

amplifizierte Tumor cDNA-Expressionsbibliothek PH002 (vgl. III.14)

Stratagene

EX Assist™ (# 200450)

III.12 Puffer

DNA-Ladepuffer

Stammlösung: (10 x) 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 mM EDTA, 0,25 % (w / v)

Bromphenolblau, 40 % (v / v) Glycerin

Gebrauchslösung: (1 x)

Restriktionspuffer

NE-Buffer 2 (10x) + BSA (BIO Labs, #007-2)

Plasmid-Midi-Puffer :

Lösung I : 50 mM Glukose, 25 mM Tris (pH 8), 10 mM EDTA

Lösung II : 1 % SDS, 0,2 M NaOH

Lösung III: 600 ml 5 M KOAL (pH 5,3), 115 ml Eisessig, H₂O ad 1 Liter

TE-Puffer : 10 mM Tris-HCL; 1 mM EDTA,(pH 8)

QIAGEN-Midi-Puffer (Qiagen, # 1005255)

Puffer I (Resuspension): 50 mM Tris-Cl, ph 8; 10 mM EDTA; 100 µg / ml Rnase A

Puffer II (Lyse) : 200 mM NaOH, 1 % SDS

Puffer III (Neutralisation) : 3 M Kaliumacetat, pH 5,5

Puffer QBT (Equilibration) : 750 mM NaCl; 50 mM MOPS, pH 7; 15 % Isopropanol;
0,15 % Triton X-100

Puffer QC (Reinigung) : 1 M NaCl ; 50 mM MOPS, pH 7; 15 % Isopropanol

Puffer QF (Elution) : 1,25 M NaCl; 50 mM Tris, Tris-Cl, pH 8,5; 15 % Isopropanol

TE-Puffer : 10 mM Tris-Cl, pH 8; 1 mM EDTA

SM-Puffer

5,8 g NaCl, 2 g MgSO₄ x 7 H₂O, 50 ml Tris-HCL (pH 7.5) 5 ml 2 % (w/v) Gelatine, ad
1 Liter H₂O und steril filtrieren

TAE (pH 7,5)

Stammlösung : (50x)

242g Trisbase, 57,1g Eisessig, 37,2g Na₂EDTA x 2H₂O
(H₂O auf 1l)

Gebrauchslösung: (1x)

TBS (pH 7,5)

120 g Tris-Base +175 g NaCl ad 2 Liter dd H₂O auffüllen und mit 32 % HCL auf pH
7,5 einstellen

TBST (pH 7,5)

2 Liter TBS + 10 ml Tween 20

TRIS (pH 9,5, 1 M)

120 g Tris-Base, ad 1 Liter dd H₂O (pH mit HCL)

PBS (pH 7,4)

8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,15 g Na₂HPO₄ x 7 H₂O , 0,2 g KH₂PO₄ ad 1 Liter (pH mit HCL)

5 x CDS

100 ml Tris (1 M), 50 ml MgCl (1 M), 100 ml NaCl (5 M), ad 1 Liter dd H₂O

III.13 Sonstiges

Polypropylene Conical Tubes (Falkon, # 6037050)

100 Sterican (Einmal-Injektions-Kanülen 20 G, Ø 0,9 x 40 mm) (B/Braun)

Glücksklee Magermilchpulver (Nestlé Deutschland AG, Reformhaus)

Greiner-Petrischalen Ø 145 x 20 mm (M +B Stricker, # G-639102)

III.14 Tumor-cDNA-Expressionsbibliothek

Das Tumormaterial entstammte einem multilokulär metastasiertem Medulloblastom einer siebenjährigen Patientin (WHO-Grad IV). Es wurde während der klinisch notwendigen primären Resektion entnommen und sofort in flüssigem N₂ asserviert. Aus den kryokonservierten Tumorgewebeproben wurde protokollgemäß mRNA (Stratagene, mRNA Isolation Kit # 200347) isoliert. Mithilfe des ZAP cDNA Synthese Kits (Stratagene # 200450) wurde protokollgemäß die mRNA in cDNA umgeschrieben und die cDNA in den λ-Vektor Uni-ZAP XR (Stratagene) kloniert. Die rekombinante Phagen-DNA wurde mit dem Gigapack III Gold packaging extract verpackt und die entstandene Phagenprimärbank amplifiziert. Die amplifizierte cDNA-Expressionsbibliothek wurde freundlicherweise von Frau Dr. Uta Behrends zur Verfügung gestellt. Dabei enthielt die Primärbank 1 x 10⁶ Klone, wovon weniger als 10 % nicht rekombinant waren.

IV Methoden

IV.1 Grundlagen

Die in dieser Arbeit beschriebene Identifizierung von Antigenen eines Mb wurde nach der von Ugur Sahin und Özlem Türeci in der Arbeitsgruppe von Michael Pfreundschuh (Homburg) für Tumoren von Erwachsenen etablierten SEREX-Methode durchgeführt (Sahin et. al. PNAS 1995). Die humorale Immunantwort gegen Antigene im autologen Tumorgewebe bildet die Grundlage dieser Methode (Old, 1986). Die Tumor-Antigene können dann nachgewiesen werden, wenn hochtitrige spezifische IgG-AK im Serum vorkommen. Hochtitrige IgG-AK werden von B-Zellen dann produziert, wenn durch T-Zell-Hilfe ein IgG-Switch ausgelöst wurde. Deshalb wurden mit der SEREX-Methode indirekt Proteine identifiziert, die im Patienten eine Aktivierung von T-Helferzellen ausgelöst haben. In der vorliegenden Arbeit wurde die SEREX-Methode zum erstenmal an pädiatrischem Tumormaterial angewandt.

IV.2 Serological Definition of Recombinantly Expressed Antigens (SEREX)

IV.2.1 Allgemeine Beschreibung

Zunächst mußte das Patientenserum gegen Proteinbestandteile der später verwendeten Bakterien und Phagen vorabsorbiert werden (vgl. IV.2.5). Mit dem präabsorbierten Serum wurde dann die Tumor-cDNA-Expressionsbibliothek gescreent. Zu diesem Zweck wurden *E. coli* Bakterien mit der Phagenbank infiziert. Nach Induktion der Proteinsynthese wurden die infizierten Bakterien ausplattiert. In den nach der Inkubation auf einer Bakterienplatte entstandenen lytischen Plaques lagen die exprimierten Proteine hochangereichert und frei vor. Jeder Plaque repräsentierte einen cDNA-Klon mit klonaler Expression eines rekombinanten Proteins. Die Proteine wurden auf eine Nitrozellulose-Membran gebロットet und mit dem präabsorbierten autologen Patientenserum inkubiert (vgl. IV.2.6). Ak im Patientenserum, die gegen im Tumor exprimierte Antigene gerichtet waren, banden an das prokaryontisch exprimierte Antigen auf der Nitrozellulose-Membran. Diese Serum-Ak wurden durch Verwendung eines sekundären, mit alkalischer Phosphatase gekoppelten Ak markiert, der gegen die konstante Region von humanen IgG gerichtet war. Positive Klone auf der Membran ließen sich zurückverfolgen bis zu dem entsprechenden Plaque auf der gekühlt aufgehobenen Bakterienplatte. Nach Isolierung der positiven Phagen aus dem Agar und Monoklonalisierung

wurden die Klone in eine Phagemidform überführt, deren DNA leicht aufgereinigt und sequenziert werden konnte (vgl. IV.2.7). Falsch positive Plaques, die IgG-Sequenzen enthielten, mußten in einem zusätzlichen Test ausgeschlossen werden (vgl. IV.2.7.1). Um zu testen, ob die Ak gegen Tumorantigene auch in Seren klinisch gesunder Probanden oder in Seren von Patienten mit anderen Tumoren vorkommen, wurden heterologe Serumanalysen durchgeführt (vgl. IV.2.7.4). Um eine mögliche Korrelation der autologen Serum-Ak zum Krankheitsverlauf zu erfassen, wurde eine autologe Serumanalyse durchgeführt (vgl. IV.2.7.3).

IV.2.2 Bestimmung eines Phagen-Titers

Vor Beginn der Screening Experimente mußte der Titer der amplifizierten Mb-Bank bestimmt werden.

IV.2.2.1 Aufzucht der Wirtsbakterien

E.coli XL-1-Blue MRF' wurde durch fraktionierten Ausstrich aus dem gekauften Glycerolstock vereinzelt. Wöchentlich wurde eine Bakterien-Kolonie auf `LB-Tet'-Agar ausgestrichen. Zum Zwecke der Infektion wurde eine Einzelkolonie der Stammpalte in 5 ml LB-Tet-Medium über Nacht bei 30 °C kultiviert. Darauf wurden 500 µl dieser Bakterienkultur in 50 ml LB-Tet-Medium, 500 µl $MgSO_4^+$ (1 M) und 500 µl Maltose (20%) angeimpft. Die Bakterienkultur wurde bis zu einer optischen Dichte OD_{600} von 0,4 - 0,9 bei 37 °C geschüttelt. Diese Dichte sollte nicht überschritten werden, da sich nur Bakterien in der exponentiellen Wachstumsphase für die spätere Transfektion eignen. Anschließend wurden die Zellen durch 10-minütige Zentrifugation bei 500 g abzentrifugiert und mit $MgSO_4^+$ (0,01 M) auf eine OD von 0,5 eingestellt.

IV.2.2.2 Infektion

Ein Aliquot der Phagenlösung mit unbekanntem Titer wurde zunächst in 10er Schritten mit 0,01 M $MgSO_4$ verdünnt. Dann wurden 10 µl jeder Verdünnungsstufe mit jeweils 0,6 ml der vorbereiteten Bakterien (OD 0,5) vermischt und 15 min. bei 37 °C inkubiert. In dieser Zeit hefteten sich die Phagen an die Bakterien an, ohne sie zu lysieren. Nach 15 min. wurde jeder Infektionsansatz mit 6 ml Topagar (52 °C) auf eine LB-Tet-Platte ausplattiert und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Wenn die Titerbestimmung durch einen Blue-White Test (vgl. IV.2.3) spezifiziert werden sollte, wurde dem Ansatz neben Topagar 30 µl IPTG (1M) und 120 µl X-Gal (250 mg / ml) zugesetzt.

IV.2.2.3 Berechnung des Phagentiters

Für die Berechnung des Phagentiters wurden von den unterschiedlichen Verdünnungen die geeigneten Ansätze ausgewählt und die Anzahl der weißen Plaques, d.h. rekombinante Phagenklone (vgl. IV.2.3) pro ausplattiertem Phagenvolumen bestimmt. Der Phagentiter wurde unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors in *plaque forming units* pro ml (pfu / ml) angegeben. Mit der angegebenen Formel wurde der Phagentiter anschließend bestimmt.

Formel :

$$\frac{\text{Zahl der Plaque (pfu)} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{ausplattiertes Volumen } (\mu\text{l})} \times 1000 \mu\text{l} / \text{ml}$$

IV.2.3 Blue-White Test

Der Test diente der Unterscheidung von rekombinanten und nicht rekombinanten Phagenklonen. Bei der Herstellung einer cDNA-Bank war die Ligation von vorgeschrittenem Vektor und Insert nie 100%, d.h. vereinzelt rezirkularisierte der Vektor z.B. mithilfe kleiner Spaltprodukte, so daß das lac-Z-Gen (s.u.) nicht zerstört wurde. Es konnten auch unvollständig gespaltene Vektoren religieren. Diese Tatsache wurde genutzt, um nicht bzw. nicht signifikant rekombinante λ -Phagen für die Serumpräabsorption zu gewinnen. Die Vektoren mit intaktem lac-Z-Gen (s.u.) wurden von den Rekombinanten mit Insert durch den Blue-White-Test unterschieden.

Das lac-Z-Gen auf dem Uni-ZAP XR Vektor kodierte für eine Untereinheit des Enzyms β -Galactosidase. Nach Induktion durch das Galaktose-Analog katalysierte die β -Galaktosidase den Abbau des Galactose-Derivats X-Gal zu einem dunkelblauen Reaktionsprodukt. In rekombinanten Klonen, lag das cDNA Insert inmitten des β -Galaktosidase-Gens. Folglich konnte kein intaktes β -Galaktosidase-Enzym mehr synthetisiert und das Galaktose-Derivat nicht abgebaut werden. Rekombinante Klone bildeten deshalb weiße und nicht rekombinante blaue lytische Plaques.

In der Arbeit wurde der Blue-White-Test angewandt, um die Qualität der Primärbank zu überprüfen und einen nicht rekombinanten Phagen für die Herstellung von 'lytischen' Säulen und Folien zu gewinnen (vgl. IV.2.5.2 und IV.2.5.3). Im Einzelnen wurde die Phagensuspension in der gewünschten Dichte ausplattiert und das Verhältnis blauer zu weißer

Phage berechnet. Um ein effizientes Screening zu gewährleisten sollte der Anteil `blauer´ Phage 1/10 der `weißen´ Phagen nicht überschreiten.

IV.2.4 Amplifikation von Phagenklonen

Um eine ausreichende Stabilität der überlassenen Phagenbank über die Zeit zu gewährleisten, mußte die Primärbank vor dem Screening amplifiziert werden. Nach demselben Protokoll wurden auch einzelne Phagenklone vermehrt.

Im Einzelnen wurden *E. coli* Bakterien mit 5×10^4 pfu / Platte infiziert und ausplattiert. Am nächsten Tag wurde die Platte mit 10 ml SM-Puffer überschichtet und unter leichten Schwenken über nacht bei 4 °C inkubiert. In diesem Zeitraum diffundierten die amplifizierten Phagen in den SM-Puffer und konnten mit diesem am darauffolgendem Morgen geerntet werden. Zu diesem Zweck wurde der SM-Puffer von der Platte abgenommen und die Platte nocheinmal mit 2 ml SM-Puffer gespült. Die 12 ml Phagenlösung wurde mit 5 Vol. % Chloroform versetzt und Zellreste bei Raumtemperatur 10 min. bei 500 g abzentrifugiert, bis die Lösung klar war. Der klare Überstand wurde mit 0,3 Vol. % Chloroform versetzt und bei 4 °C aufgehoben. Kleine Fraktionen konnten mit Zusatz von 7 Vol. % DMSO eingefroren werden. Nach Amplifikation einer Primärbank mit ca. 1×10^6 Phagenklonen war eine Amplifikation auf 10^{9-11} Phagenklone zu erwarten.

IV.2.5 Präabsorption von Patientenserum

Um unspezifische Bindungen von Serum-Ak an bakterielle und nicht rekombinante Phagenproteine zu vermeiden, wurde das Serum vor dem Screening Experiment an diese Proteine präabsorbiert. Zu diesem Zweck wurden zwei Reinigungsschritte über Säulen (1 x sogenannte `mechanische´ und 1 x sogenannte `lytische´ Säule) und fünf Reinigungsschritte über sogenannte `lytische´ Membranen eingesetzt. Für die Herstellung der Säulen und Membranen mußte zunächst der nicht rekombinante verpackte Uni-ZAP XR Phage isoliert werden.

IV.2.5.1 Isolation eines nicht rekombinanten „blauen“ Phagenklons

Im einzelnen wurde eine Kolonie *XL-1 Blue Bakterien* wie in IV.2.2 angezüchtet. Nicht rekombinante Phagen wurden für die Herstellung von `lytischen´ Säulen und Folien benötigt. Zu diesem Zweck wurde bei geeigneter Verdünnung ein Blue-White-Test (vgl. IV.2.3)

durchgeführt und ein 'blauer' Plaque wie in IV.2.7 für positive Klone ausgeführt gestochen und in SM-Puffer aufgenommen.

IV.2.5.2 Herstellung 'mechanischer' und 'lytischer' Säulen

Die Kapazität der Säulen à 2g Kieselgel war für insgesamt 6 ml Serum ausreichend. Es wurden maximal 2 ml Serum pro Säulenlauf geladen. Für eine nachfolgende Nutzung mit Serum derselben Person mußten die Säulen regeneriert werden (vgl. IV.2.5.5).

IV.2.5.2.1 'mechanische' Säule

Mit dieser Säule wurde das Patientenserum an mechanisch zerkleinerte Bakterien absorbiert: Pro Säule wurden 50 ml einer überwachsenen Übernachtskultur von *XL-1 Blue Bakterien* bei 37°C, 15 min., bei +4 °C und 500 g zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 5 ml PBS aufgenommen und mit einem Ultraschallhomogenisator aufgeschlossen. Das Homogenisat wurde mit 2 ml Kieselgel versetzt und 4 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei +4 °C im Überkopffrotor geschwenkt. Um die nicht an das Gel gebundenen Bakterienbestandteile abzusondern, wurde die Suspension 3 x mit je 35 ml TBS (0,1 % Natriumacid) gewaschen.

IV.2.5.2.2 'lytische' Säule

Mit dieser Säule wurde das Patientenserum an lysierte Bakterien und Phagenproteine absorbiert. Pro Säule wurde ein Bakterienpellet aus 50 ml XL-1 Blue Kultur (hergestellt wie in IV.2.5.1.) in 2 ml MgSO₄ (0.01 M) aufgenommen. 200 µl davon wurden mit 5 ml LB-Tet und 500 µl 'blauen' Phagen (1 : 10) 4 h bei 37 °C inkubiert. Der Rest der Bakteriensuspension wurde bei + 4 °C bereitgehalten und nach der vierstündigen Infektion und Lysephase mit zusätzlich 5 ml LB-Tet auf den Infektionsansatz gegeben. Nach erneuter Inkubation bei 37 °C für 2 h wurde die Suspension lysierter Bakterien mit einem Ultraschallhomogenisator zusätzlich aufgeschlossen und das Homogenisat mit 2 ml Kieselgel vermengt. Mit dem Überkopffrotor wurde es 4 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei +4 °C geschwenkt. Das Kieselgel wurde dann mit TBS (0,1 % Natriumacid) gewaschen.

IV.2.5.3 Herstellung lytischer Membran

Ausplattiert wurde wie in IV.2.6 beschrieben, nur wurde erstens der nicht rekombinante Phagenklon aus IV.2.5.1 verwendet und zweitens soviel Phagenlösung eingesetzt, daß der Bakterienrasen durchlysiert war.

Da hier die Induktion rekombinanter Gene nicht nötig war, wurde kein IPTG verwendet. Nach der einstündigen Inkubation mit Milchpulver wurden die Membranen noch 1 x 15 min. mit TBS gewaschen und dann getrocknet. Die trockenen Membranen wurden bei RT bis zur Serumpräabsorbition gelagert.

IV.2.5.4 Aufreinigung von Patientenserum

Eine Fraktion à 2 ml Serum wurden 1:10 mit TBS verdünnt und mit je 0,0125 % Natriumacid und Thimerosal versetzt. Um unspezifische Bindungen zu blocken wurde zusätzlich noch 0,2 % Magermilch dazugegeben. Über Nacht wurde die Serumlösung bei +4 °C zuerst über die `mechanische` Säule, in der nächsten Nacht über die `lytische` Säule und abschließend noch je 3 h lang über fünf `lytische` Membranen gegeben. Das aufgereinigte Patientenserum wurde abschließend mit TBS auf eine Endkonzentration von 1 : 100 verdünnt und das Endvolumen mit je 0,0125 % NaAcid und Thimerosal sowie 0,2 % Magermilch versetzt. Das aufgereinigte Patientenserum wurde bei +4 °C gelagert.

IV.2.5.5 Regeneration der `mechanischen` und `lytischen` Säulen

Zu diesem Zweck wurden die Säulen 3 x 0,1 M NaAc, 3 x TBS gewaschen.

IV.2.6 Immunscreening

IV.2.6.1 Infektion und Induktion der rekombinanten Proteinsynthese

Um ein repräsentatives Screening der cDNA-Expressions-Bank zu erreichen, wurden insgesamt ca. eine Million Klone gescreent.

Die Infektion von *XL-1 Blue* Bakterien mit Phagen der amplifizierten cDNA Expressions-Bank erfolgte. Pro Platte wurden 3000 pfu eingesetzt. Zum Zwecke des Screenings wurden dem Infektionsansatz zur Proteininduktion 30 µl IPTG (1 M) aber kein X-Gal zugegeben.

IV.2.6.2 Inkubation von Tumorproteinen mit Patientenserum

Die lysierten Bakterienklone waren auf der Agarplatte als Plaques im Bakterienrasen sichtbar, wobei die Größe der Plaques nach 14-16 h Inkubation bei 37 °C 1-2 mm im Durchmesser betrug. Die Platte wurde mit Nitrocellulose-Membran bedeckt und mit der Membran 2 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert (Herstellung eines Abklatsches). Um das Entfernen der Membran von den Platte zu erleichtern, wurden die Platten mitsamt anhaftender Membran für mind. 0,5 h

bei +4 °C abgekühlt. Nach vorsichtiger Ablösung der Membranen wurden diese 2 x 15 min. in TBST-Puffer gewaschen, wobei anheftende Agarreste vorsichtig per Hand von der Membran gestreift wurden. (Die Agarplatten wurden bei +4 °C gelagert, um sie im Fall eines gefundenen Klons zum Ausstechen parat zu haben.) Für 1 h wurden daraufhin alle Membranen in 20 ml TBS (5 % Magermilchpulver) auf dem Horizontalschüttler geschwenkt, um unspezifische Bindungen zu blocken. Darauf folgte ein zweiter Waschgang von 2 x 15 min. in TBS. Abschließend wurde jede Membran einzeln in eine Petrischale gelegt und mit 20 ml präabsorbierten, 1 : 100 verdünnten autologem Patientenserum (vgl. IV.2.5) mindestens 12 h inkubiert. Die Verdünnung gewährleistete, daß nur hochtitrige Ak erfaßt wurden.

IV.2.6.3 Immunfärbung

Die Bindung von Serum-Ak an Tumorproteine wurde mithilfe eines sekundären Ak nachgewiesen, der gegen den konstanten Teil des Serum-IgG gerichtet und mit alkalischer Phosphatase (ALP) gekoppelt war. In alkalischen Milieu setzte dieses Enzym zugesetztes BCIP zu einem Niederschlag mit Indigo um. Als Farbverstärker wurde NBT zugegeben, das bei dieser Reaktion zum purpurfarbenen Diformazan reduziert wurde.

Im einzelnen wurde das Patientenserum nach der Membraninkubation sorgfältig abgenommen und durch einen Faltenfilter zurück in den Ursprungsbehälter filtriert. Wieder wurde die Membran 15 min. in TBS-Puffer auf dem Schüttler gereinigt. Darauf folgte eine einstündige Inkubation mit 8 µl der Stammlösung des ALP-markierten sekundären Ak in 20 ml TBS-Magermilch (0,2 %). Für die Färbung wurden währenddessen pro Membran 20 ml 1 x CDS filtriert und mit je 200 µl BCIP- und NBT-Stammlösung versetzt. Die Membran wurde in einer Petrischale mit 20 ml der Färbelösung in Dunkelheit bei 37 °C bebrütet. Ein positiver Klon war nach 2 h auf der Membran als ein runder dunkelviolettscharf abgegrenzter Kreis zu erkennen, der sich von der helleren unspezifisch blau gefärbten Umgebung abhob.

IV.2.7 Isolierung, Monoklonalisierung und Vermehrung positiver Klone

Der entsprechende positive Plaque wurde mit dem umgebenden Agarstück aus der dazugehörigen Bakterienplatte ausgestochen und mit 1 ml SM-Puffer überschichtet. Nach einstündigem Schütteln waren die Phagen von dem Agarstück in den Puffer diffundiert. Der Ansatz wurde kurz abzentrifugiert, so daß Agarreste am Boden zu liegen kamen. Der Überstand mit den Phagen wurde abgenommen, in ein frisches Gefäß überführt und mit 25 µl

Chloroform versetzt. Falls der positive Plaque mit umgebenden negativen Plaque ausgestochen werden mußte, war ein nachfolgender Arbeitsschritt zur Monoklonalisierung notwendig. Die Phagensuspension wurde in mehreren Verdünnungen ausplattiert und bei einer geeigneten Verdünnung wurde ein einzeln liegender positiver Klon ausgestochen.

Für das Bank-Screening und die spätere heterologe Serumanalyse mußte ständig eine ausreichende Menge der einzelnen Phagensuspensionen zur Verfügung stehen. Zur Vermehrung wurde der entsprechende Klon mit *E. coli* Bakterien auf einer frischen Agarplatte relativ dicht ausplattiert, über Nacht bei 37 °C bebrütet und wie in IV.2.4 beschrieben amplifiziert.

IV.2.7.1 Ausschluß falsch positiver Klone

IV.2.7.1.1 IgG Ausschluß-Verfahren

‘Falsch positive’ Klone konnten sich anfärben, wenn im Plaque rekombinante Immunglobuline von B-Zellen aus dem Tumor exprimiert wurden, die den sekundären Ak direkt banden. Um ‘falsch positive’ Klone von positiven Klonen mit Tumor-cDNA zu differenzieren, wurde der positive Klon in einem Doppelansatz ausplattiert und parallel zu autologem Patientenserum mit nur 20 ml TBS über Nacht inkubiert. War auch mit TBS nach der Immunfärbung ein positiver Plaque auszumachen, handelte es sich um einen ‘falsch positiven’ Klon. War der Ansatz mit TBS negativ handelte es sich um einen ‘echt positiven’ Klon und damit um ein mögliches Tumorantigen. Waren die Ansätze mit TBS und Serum negativ, handelte es sich bei dem vermeintlich positiven Klon um einen Färbeartefakt, z.B. durch Faltenwurf der Membran, Luftblasen oder Randeffekte.

IV.2.7.2 Charakterisierung positiver Klone

IV.2.7.2.1 In vivo Exzision

Zur genaueren Charakterisierung der Tumor-cDNA-Inserts, mußte der Tumor-Antigen-Klon vom großen Uni-ZAP XR Vektor in den kleineren Phagemid-Vektor pBluescript „umkloniert“ werden, da nur so eine unproblematische Aufreinigung der DNA möglich war. Das Vektorsystem Uni-ZAP XR / pBlueskript erlaubte die *in vivo* Exzision des Phagemids mithilfe des f1-Helferphagen ‘EX-Assist’. Zu diesem Zweck infizierte man *XL-1 Blue* Bakterien gleichzeitig mit den λ -Phagen, die das Tumor-Antigen-Insert tragen, und mit Helferphagen. Da die Replikationsproteine des Helferphagen auf der Uni-ZAP-XR-DNA, Initiator- und

Terminatorsignale für die DNA-Synthese erkennen, und da diese das lineare Phagemid flankierten, können sie den dazwischen liegenden DNA-Abschnitt kopieren und sozusagen das Phagemid aus den λ -Vektor herausschneiden. Das Phagemid wurde mit Verpackungsproteinen des Helferphagen verpackt und freigesetzt. Im Überstand des Ansatzes fanden sich nun Tumor-Antigen tragende f-1 Bakteriophagen neben Helferphagen und neben einigen der ursprünglichen Tumorantigen tragende λ -Phagen.

Mit diesem Überstand wurden *SOLR* Bakterien infiziert, die für λ -Phagen resistent waren und daher nur die f-1 Bakteriophagen aufnahmen. Der Helferphage kann aufgrund einer sogenannten *amber* Mutation nicht in *low nonsuppressing E. coli* Stämmen wie *SOLR* replizieren. Da das Phagemid pBlueskript zwar über den bakteriellen Replikationsursprung ColE1 in *SOLR* replizieren kann, aber keine Gene für Verpackungsproteine enthält, führt die *SOLR*-Infektion nicht zur Produktion infektiöser Partikel. Infizierte *SOLR* Bakterien lassen sich aufgrund der Ampicillinresistenz erkennen, die mit dem Phagemid übertragen wurde.

Im einzelnen wurde je eine Übernachtskultur von *XL-1 Blue* Bakterien und *SOLR* Bakterien in LB-Medium mit 0,2 % Maltose und 0.01 M $MgSO_4$ angesetzt. Das zentrifugierte Pellet wurde in 0,01 M $MgSO_4$ resuspendiert und auf ein OD_{600} von 1,0 eingestellt. 200 μ l dieser Bakteriensuspension wurden mit 250 μ l Phagenlösung ($>1 \times 10^5$ pfu) und 1 μ l ExAssist Helper Phage für 15 min. bei 37 °C inkubiert. Nach Anheftung der Phagen an die Bakterien erfolgte eine erneute Inkubation für 3 h bei 37 °C in 3 ml LB-Medium, die zur Bakterienlyse führte. Die Suspension lysierter Bakterien wurde bei 70 °C für 15 min. erhitzt und dann bei 1000 g für 15 min. zentrifugiert. Der Überstand enthielt u.a. die 'verpackten' pBluescript Phageme (s.u.). In einem Doppelansatz wurden einmal 10 μ l und einmal 100 μ l des Überstandes mit je 200 μ l *SOLR* in $MgSO_4$ ($OD_{600} = 1$) versetzt und für 15 min. bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden 20 μ l jedes Ansatzes auf einer LB-Amp-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die heranwachsenden ampicillinresistenten Kolonien enthielten den pBlueskript-Vektor mit dem klonierten Tumor-cDNA-Insert und konnten am nächsten Morgen gepickt werden.

IV.2.7.2.2 DNA-Präparation

IV.2.7.2.2.1 Plasmid-Mini-Präparation

Die Plasmidaufarbeitung erfolgte nach der alkalischen Lysis-Methode (Birnboim und Doly, 1979), mit der schnell eine relativ reine Plasmid-cDNA für die spätere Restriktionsenzymanalyse erhalten wurde.

Im einzelnen wurde in LB-Amp-Flüssigmedium eine Übernachtskultur der gepickten Kolonie hergestellt, von dieser wurden 1,5 ml entnommen, kurz abzentrifugiert (5 min, 5000 Upm, RT) und das Bakterienpellet in 100 µl Lösung I und Rnase A resuspendiert. Nach Zugabe von 100 µl Lösung II wurde die Suspension 5 min. bei RT inkubiert, und die Bakterien so lysiert. Durch Zugabe von 100 µl Lösung III wurden die zellulären Proteine gefällt und für 20 min. bei 15000 Upm abzentrifugiert. Die Plasmid-DNA im Überstand wurde mit 2,5 Vol. Ethanol (100%) gefällt. Das DNA-Pellet wurde kurz getrocknet und in 50 µl TE-Puffer resuspendiert.

IV.2.7.2.2.2. Restriktionsanalysen

Um die Größe der Tumor-cDNA-Inserts und mögliche Repetitionen unter verschiedenen Klonen zu erfassen, wurden Restriktionsanalysen durchgeführt. Gewählt wurde ein Verdau mit den Restriktionsenzymen a) *XbaI* oder b) *EcoRI* und *XhoI*. Diese Schnittstellen kamen im Vektor nur das cDNA-Insert flankierend in der multiplen Klonierungsstelle vor und eigneten sich daher dazu, das Insert „herauszuschneiden“. Bei Vorkommen der passenden DNA-Restriktionselemente im Insert wurde dieses zusätzlich verdaut. Das Ergebnis der Restriktionsanalyse wurde durch Größenauftrennung der DNA-Fragmente auf einem Agarosegel sichtbar gemacht.

Im einzelnen wurde für einen enzymatischen Verdau folgender Ansatz gewählt und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert :

❶) 10 µl DNA (ca. 2 µg)

2 µl 10 x Restriktionspuffer MEB-2

7 µl H₂O

1 µl *Xba I*

❷) 10 µl DNA (ca. 2 µg)

2 µl 10 x Restriktionspuffer MEB-2

6 µl H₂O

1 µl *EcoRI*

1 µl *XhoI*

Für die Plasmidauftrennung wurde ein 0,9 % Agarose TAE-Gel angefertigt : 400 ml 1 x TAE wurden mit 3,6 g Agarose vermischt und in der Mikrowelle aufgekocht. Nach Abkühlung auf Temperaturen unter 60 °C wurden 20 µl Ethidiumbromid (1%), welches in die DNA interkaliert und diese nach Anregung mit UV-Licht leuchten läßt, dazugegeben und das Gel gegossen. Das fest gewordene Gel wurde mit 1 x TAE vollständig bedeckt. Der 20 µl Reaktionsansatz wurde mit 2 µl 10 x Ladepuffer versetzt und in die Taschen des Gels geladen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 100 V über 45 min. oder bei 20 V über Nacht. Das Gel wurde auf einem UV-Transilluminator fotografiert. Die Größe der Inserts konnte durch Vergleich mit der Bande eines mitgelaufenen Größenmarkers abgeschätzt werden.

IV.2.7.2.2.3 Plasmid Midi-Präparation nach Qiagen

Da die DNA für die spätere Sequenzierung einen höheren Reinheitsgrad besitzen mußte, erfolgte die präperative Plasmidauftrennung mithilfe von DNA-Adsorptionssäulen entsprechend den Angaben des Herstellers (Qiagen). Die präperative Plasmidauftrennung basierte auf der optimierten alkalischen Lysis Methode nach Birnboim und Doly.

Zu diesem Zweck wurden 50 µl des interessierenden Minipräp-Ansatzes 1 : 1000 in LB-Medium verdünnt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Dieses Kulturvolumen reichte aus, da es sich bei dem pBlueskript um einen „high copy“ Vektor handelte, der mit 300-500 Kopien pro Bakterienzelle vorlag. Die Phagemid-Suspension wurde 15 min. bei +4 °C und 6000 g zentrifugiert, und das Pellet in 4 ml Puffer I (Resuspensions-Puffer und Rnase A) resuspendiert. Nach Zugabe von 4 ml Puffer II (Lyse Puffer) folgte eine Inkubation von 5 min. bei RT. Darauf wurde der Ansatz mit 4 ml Puffer III (Neutralisations-Puffer) versetzt und 20 min auf Eis inkubiert. Nach anschließender 30 minütiger Zentrifugation bei +4 °C und 20000 g mußte der Überstand sofort auf eine mit 4 ml QBT (Equilibrations-Puffer) vorbehandelte Qiagen-Tip-100 Säule gegeben werden. Um die an der Säulenmatrix haftende Plasmid-DNA von Zelldebris und Proteinen zu reinigen, wurde die Säule zweimal mit 10 ml QC-Puffer gewaschen. Die DNA selber wurde mit 5 ml QF-Puffer (Elutions-Puffer) von der Matrix gelöst. Die Fällung der DNA erfolgte durch Zugabe von 0,7 Vol Isopropanol und Zentrifugation für 30 min. bei +4 °C und 15000 g. Das Pellet wurde zweimal mit 2 ml 70 % Ethanol gewaschen, anschließend luftgetrocknet und schließlich in TE-Puffer (pH 8) aufgenommen.

IV.2.7.2.3 Sequenzierung

Die Sequenzierung des klonierten Inserts wurde bei der Firma Sequiserve von Herrn Dr. Willi Metzger in Vaterstetten in Auftrag gegeben. Zunächst wurde mithilfe von Primern für den T₃- und T₇-Promotor 5' bzw. 3' des Inserts auf dem p-Bluescript Phagemid sequenziert (**Abb. 2** und Stratagene Instruktion Manual). Auf diese Weise konnten von dem Insert die ersten ca. 500 bp 5' und die letzten ca. 500 bp 3' identifiziert werden. Während kleine Inserts unter 1000 bp auf diese Art vollständig aufgeschlüsselt wurden, mußten für größere Inserts zusätzlicher Primer eingesetzt werden, die an dem bereits sequenzierten Abschnitt banden. So konnten die dazwischen liegenden Sequenzen aufgeklärt werden. Mit Hilfe des Computer-Programms *Gen Tool* wurden die partiellen Sequenzen eines großen Inserts zusammengesetzt. Die Gesamtsequenz wurde in die GenBank-Datei eingereicht und unter einem entsprechenden Zugangskode aus zwei Buchstaben und sechs Zahlen nach Publikation der Daten veröffentlicht.

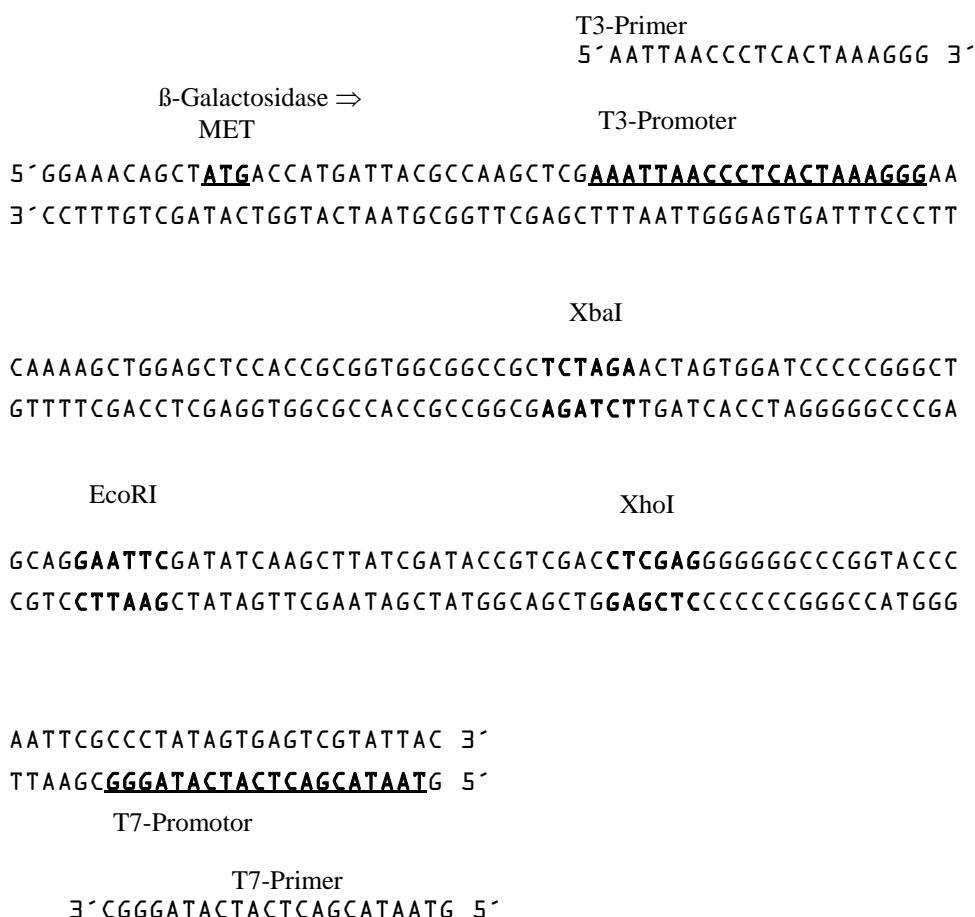


Abbildung 2: Polylinker und Enzymschnittstellen auf dem p-Bluescript SK (+/-) Phagemid

IV.2.7.2.4 Homologierecherche

Es wurde mithilfe des BLAST-Programmes im Internet die Homologie der cDNA-Inserts zu DNA und mRNA-Sequenzen in den Datenbanken *htgs* (High-Throughput Genom Sequences), *gss* (Genomic Service Sequences), *hu-ests* (Non-redundant Database of GenBank Human EST entries) und *nr* (Non-redundant GenBank + EMBL + DDGJ + PDB sequences) gesucht. Außerdem wurde in der SEREX-Datenbank [<http://www.licr.org/SEREX.html>] nach Homologie zu anderen mit Hilfe von SEREX klonierten mRNAs gesucht. Die Homologierecherchen geben den Stand von 1999 wieder.

IV.2.7.3 autologe Serumanalyse

Mit der autologen Serumanalyse wurde getestet, in welcher Höhe der antigenspezifische Ak-Titer im Serum der Patientin lag, aus der das Antigen kloniert worden war, und wie sich der antigenspezifische Ak-Titer im Verlauf des Krankheitsgeschehen änderte. Die Abnahmezeitpunkte von Serumproben für diese serologischen Verlaufs-Analysen erstreckten sich über einen Beobachtungszeitraum von vier Jahren, beginnend mit dem Zeitpunkt der initialen Diagnose. Im einzelnen wurden die positiven Klone (aus IV.2.7.2) 1:10 mit der untersuchten Phagenbank verdünnt und dann nach der selben Methode wie beim Bank Screening ausplattiert und mit autologen Serum inkubiert (Plaque Assay). Die Serum-Verlaufproben der Patientin wurden wie in Kapitel IV.2.5 beschrieben präabsorbiert und zur Testung 1 : 100 bis 1 : 100 000 verdünnt.

IV.2.7.4 heterologe Serumanalyse

Mit der heterologen Serumanalyse wurde getestet, ob im Serum klinisch gesunder Probanden und im Serum anderer Tumorpatienten Ak gegen das Tumorantigen nachgewiesen werden konnten. Im einzelnen wurden die positiven Klone (aus IV.2.7.2) 1:10 mit der untersuchten Phagenbank verdünnt und dann nach der selben Methode wie beim Bank Screening ausplattiert und mit Serum inkubiert (Plaque Assay). Das Serum klinisch gesunder Probanden oder anderer Tumorpatienten wurde wie in Kapitel IV.2.5 beschrieben präabsorbiert und 1:100 verdünnt verwendet.

V Ergebnisse

V.1 Amplifikation der Phagenbank

Die übernommene primäre Phagenbank enthielt insgesamt 4×10^6 pfu, die durch Amplifikation auf insgesamt 4×10^{12} pfu vermehrt werden konnten. Der Anteil nicht rekombinanter Phagen ergab sich aus dem Blue-White-Test und lag bei $< 10\%$. Die amplifizierte Phagenbank PH002 hatte einen Titer von $2,7 \times 10^7$ pfu/ μ l.

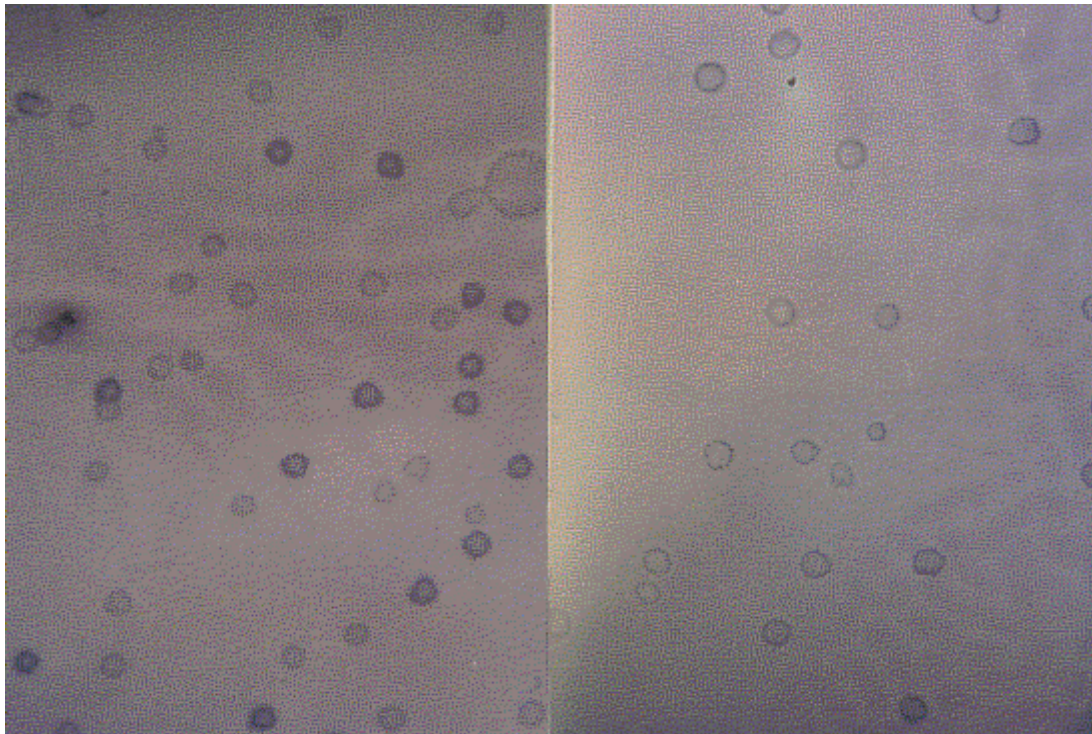
V.2 SEREX-Screening

Es wurden insgesamt $0,9 \times 10^6$ Klone der Medulloblastom-cDNA-Expressionsbibliothek PH002 gescreent. 13 Klone banden den sekundären Ak und zeigten somit eine Farbreaktion. Von diesen wurden sechs durch die IgG-Ausschluß-Methode (vgl. IV.2.7.1.1, **Abb. 3**) als IgG identifiziert. Die restlichen sieben positiven Klone (vgl. Abb. 4a) wurden monoklonalisiert (**Abb. 4**) und *MU-MB-2.32*, *.42*, *.50*, *.52.1*, *.52.2*, *.76* und *.235* genannt. In Anlehnung an die publizierten Klone aus Homburg (HOM) und New York (NY) steht „*MU*“ für München, „*MB*“ für Medulloblastom, 2 für die laborinterne Tumornummer, die nachfolgende Zahl für die Agarplatte, auf der der Klon gefunden wurde und ggf. eine weitere Zahl für die einzelnen Klone auf einer Platte.

Die Effizienz des Bank-Screening war ähnlich der Effizienz von publizierten Analysen der Erstbeschreiber Ugur Sahin und Özlem Türeci in Homburg / Saar [100] (**Tab. 1**).

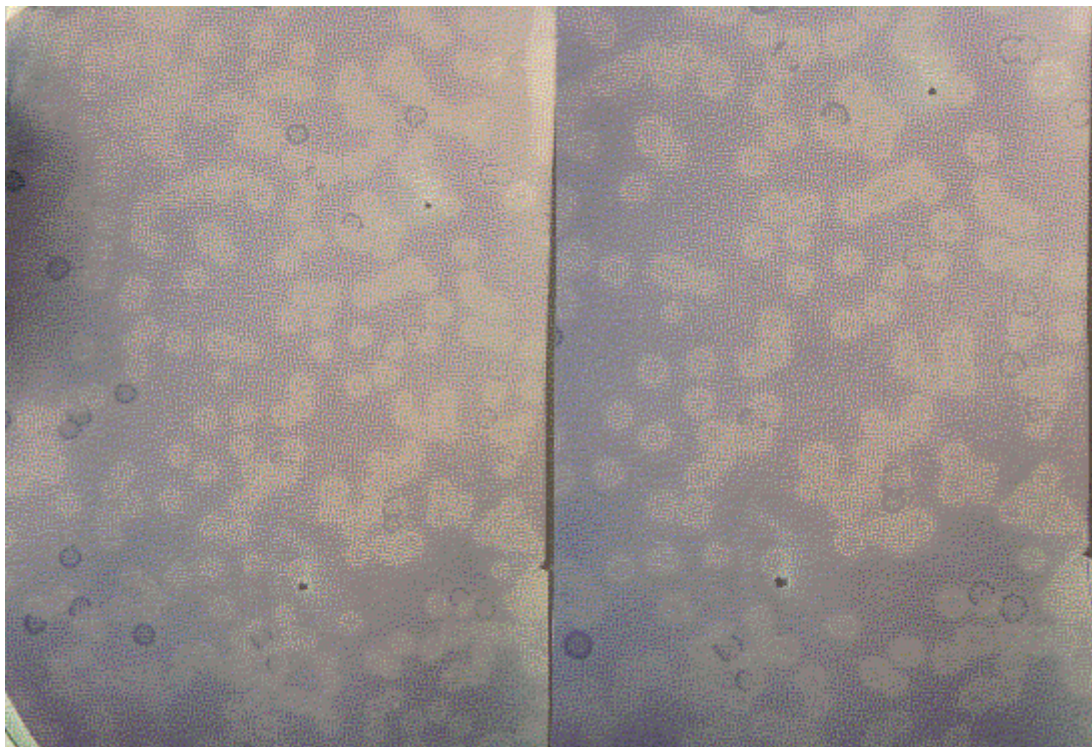
Tumor	Getestete Klone	IgG	pos. Klone	versch. Inserts
Medulloblastom	$0,9 \times 10^6$	6	7	4

Tabelle 1: Ergebnis des Screening der Medulloblastom-cDNA-Expressionsbibliothek



a) Antigen + Serum

b) Antigen + TBS

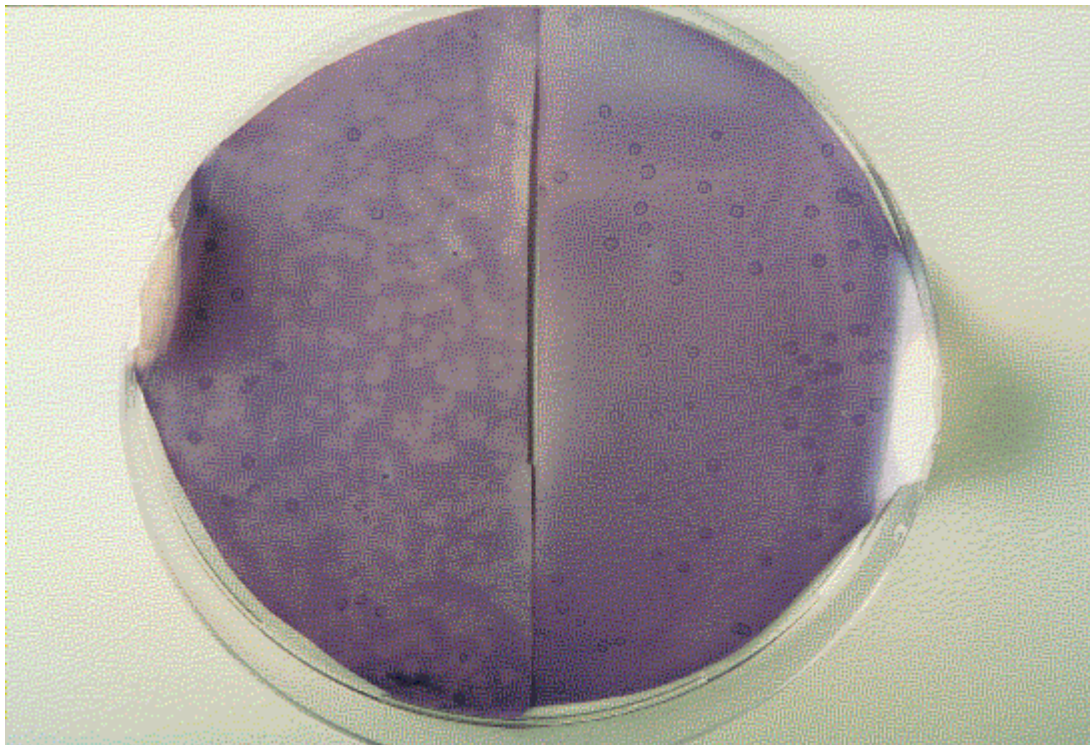


c) IgG + Serum

d) IgG + TBS

Abbildung 3 : Identifikation eines Antigen-(a,b) bzw. IgG-(c,d) kodierenden Klons durch das IgG-Ausschlußverfahren

Der Antigen-kodierende Klon (4a,b) und der IgG-kodierende Klon (4c,d) wurden jeweils in Plaque-Assays mit autologem Serum (+Serum) oder ausschließlich TBS (+TBS) inkubiert. Das rekombinante Antigen zeigte nur mit Serum eine Farbreaktion (4a,b), während IgG sowohl mit Serum als auch mit TBS eine Farbreaktion (4c,d) ergab.



a) polyklonal

b) monoklonal

Abbildung 4 : Monoklonalisierung eines positiven Klons

Der positive Klon war im polyklonalen Ausstich noch mit negativen Klonen vermischt (a). Nach erfolgreicher Monoklonalisierung zeigte sich eine gleichförmige Anfärbung aller Plaques (b). Die Aufhellungen in b) sind unspezifische Hintergrundveränderungen.

V.3 Molekulare Charakterisierung der Tumorantigene

Nach *in vivo excision* des p-Bluescript Vektors mit dem Tumor-cDNA-Insert wurde die Plasmid-DNA präpariert und mithilfe enzymatischer Restriktionen analysiert.

V.3.1 Restriktionsanalyse

Die DNA der sieben Klone *MU-MB-2.32*, *.42*, *.50*, *.52.1*, *.52.2*, *.76* und *.235* wurden entweder mit *Xba*I oder mit *Eco*RI und *Xho*I geschnitten. Nach der Restriktion wurde die DNA der Größe nach in einem 0,9 % Agarose-Gel aufgetrennt (**Abb. 5**).

EcoRI und XbaI schnitten 5' des Inserts und XhoI 3' des Inserts im Polylinker des 2,9 kb großen p-Bluescript Phagemids (**Abb. 2, 5**).

Wenn keine weiteren Schnittstellen für diese Enzyme im Insert lagen, wurden die rekombinanten Plasmide mit XbaI linearisiert und mit EcoRI und XhoI aus dem Insert herausgeschnitten. Bei zusätzlichen Schnittstellen im Insert mußte mit mehreren Fragmenten gerechnet werden.

So ergaben sich für die Klone *MU-MB-2.32*, *.52.2*, *.235* Insert-Größen von ca. 0,3 kb, für die Klone *MU-MB-2.42* und *.52.1* von ca. 2 kb, für *MU-MB-2.50* von ca. 1,5 kb und für *MU-MB-2.76* von ca. 0,5 kb (**Abb. 5**).

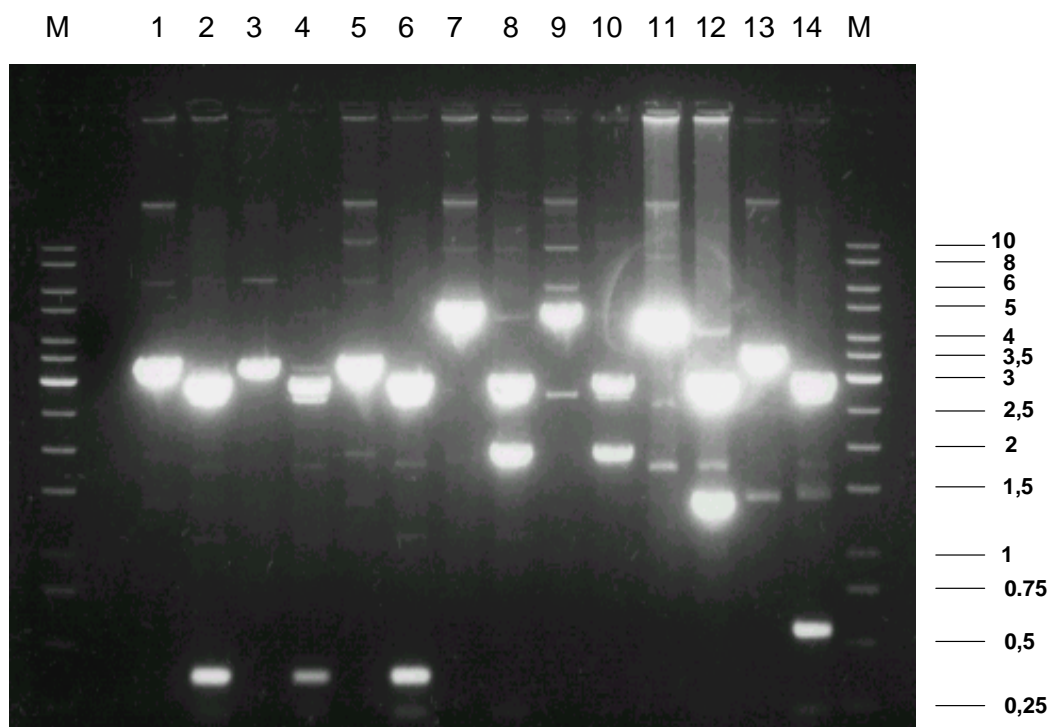


Abbildung 5: Restriktionsanalyse der rekombinanten pBlueskript-Vektoren

Die Restriktion des Klons *MU-MB-2.32* mit XbaI ergab eine Bande von ca. 3,5 kb entsprechend der Größe von p-Bluescript mit Insert (1). Mit EcoRI und XhoI ergaben sich eine Bande von ca. 2,9 kb (p-Bluescript Vektor) und ca. 0,3 kb (Insert) (2). Die Klone *MU-MB-2.52.2* (3,4) und *.235* (5,6) zeigten dasselbe Restriktionsmuster. Der Klon *MU-MB-2.42* zeigte mit XbaI eine Bande von ca. 6 kb (7) und mit EcoRI und XhoI eine Bande von ca. 2,9 kb und ca. 2 kb Länge (8). Ein identisches Restriktionsmuster zeigte *MU-MB-2.52.1* (9,10). *MU-MB-2.50* ergab mit XbaI geschnitten eine prominente Bande von ca. 4,5 kb (11) und mit EcoRI und XhoI geschnitten zwei prominente Banden von ca. 2,9 kb und ca. 1,5 kb (12). Der Verdau des Klons *MU-MB-2.76* mit XbaI ergab eine Bande von ca. 3,5 kb (13) und mit EcoRI und XhoI Banden von ca. 2,9 und ca. 0,5 kb (14). Ob zusätzlich noch Fragmente mit weniger als 150 bp Größe entstanden waren, konnte bei der Auflösung im unteren Bereich des 0,9 % Agarose-Gels nicht sicher beurteilt werden. M = Größenmarker (Angabe in kb).

V.3.2 Sequenzanalyse

Um die Sequenz der cDNA Inserts der einzelnen positiven Klone aufzuklären, wurde wie in IV.2.7.2.3 verfahren. Die kurzen Inserts von *MU-MB-2.32*, *.52.2*, *.76* und *.235* konnten dabei mithilfe des T3-Primers vom 5'-Ende sowie mit dem T7-Primer vom 3'-Ende her vollständig sequenziert werden. Bei den längeren Inserts von *MU-MB-2.42* und *.50* wurden die dazwischen liegenden Sequenzen mit zusätzlichen Primern im bereits sequenzierten Abschnitt aufgeklärt. Die vollständigen Sequenzen sind im Folgenden abgebildet (**Abb. 6-9**).

Im Einzelnen war das Insert von Klon *MU-MB-2.32* [AF527735] identisch mit dem Insert von *MU-MB-2.52.2* und *.235* und hatte nach Abtrennen des Poly(A)-Schwanzes eine Länge von 331 bp (**Abb. 6**). Es fand sich kein putatives Translationsstartsignal. *In frame* mit dem Vektor-atg war nur ein putatives Translationsstoppsignal zu finden (taa ab bp 312 im Polyadenylierungssignal), so daß sich ein chimärer *open reading frame* (ORF) von insgesamt 218 bp mit 124 bp Vektor-Anteil ergab. Möglicherweise war dieses cDNA-Insert durch *false priming* des poly(T)-Primers an eine adenosinreiche Region innerhalb einer mRNA von internen Sequenzen und nicht vom Poly(A)-Schwanz der mRNA aus abgelesen worden. In diesem Falle wäre die entsprechende mRNA 3'inkomplett kloniert.

1	gacgggcccag	ctctaggcca	ggccaaccta	cccaagcccc	40
41	acctcctaga	ccgtcccacc	catccccgcc	tccaggccct	80
81	gggagttgga	ctgaggacca	ggccctaaga	aggtgcctcc	120
121	cgcacaacca	caggcccagg	cgggccacgg	aagacgctgc	160
161	ccgggccctg	cggagggctg	gggctggggc	tggggctggg	200
201	gctggggctg	gggccggggc	cggggccggg	gccgggggtg	240
241	gggttggggg	tggggccggg	gccggggccg	gggccggggc	280
281	cggggccaca	gacttcactg	ctggacatga	ataa gtcca	320
321	cggtcgtggt	c			331

Abbildung 6: Sequenz des Inserts *MU-MB-2.32*

Hervorgehoben ist das einzige Translationsstoppsignal (**taa**) (bp 312), das *in frame* mit dem Vektor-atg gelegen ist, sowie ein mögliches Polyadenylierungssignal (**aataaa**) (bp 310). Weitere atg-definierte ORF mit einer Größe von mehr als 20 bp waren nicht vorhanden. Ab bp 331 folgte der Poly(A)-Schwanz.

Das Insert von Klon *MU-MB-2.42* [AF527734] war identisch mit dem Insert von *MU-MB-2.52.1* und hatte nach Abtrennen des Poly(A)-Schwanzes eine Länge von 1835 bp (**Abb. 7**). Auf Grund dieser Länge konnte das Insert nicht vollständig mithilfe des T3- und T7-Primers aufgeschlüsselt werden, so daß für die Sequenzierung des Zwischenstückes die zusätzlichen Primer '42-se2' (bp 556-578) und '42-an2' (bp 1281-1260) benötigt wurden. Ein weiterer Primer '42-an3' (bp 1353 -1335) wurde für die Aufklärung eines primär nicht eindeutig lesbaren Nukleotids (n = c, bp 1282) verwendet.

Bei der Suche nach dem längsten ORF fand sich *in frame* mit dem unmittelbar stromaufwärts gelegenen Vektor-atg ein Stoppsignal (*tga*) ab bp 1320, d.h. dieser chimäre ORF hatte insgesamt eine Länge von 1443 bp, wovon 124 bp Vektor-Anteil darstellten. Daneben fanden sich sieben kleinere ORF (bp1319-1537, 571-777, 1537-1689, 1629-1724, 1126-1245, 1732-1833 und 421-480).

Das Insert von Klon *MU-MB-2.50* [AF527736] hatte nach Abtrennen des Poly(A)-Schwanzes eine Länge von 1408 bp (**Abb. 8**). Auf Grund dieser Länge konnte auch dieses Insert nicht vollständig mithilfe der T3- und T7-Primer aufgeschlüsselt werden, so daß für die Sequenzierung des Zwischenstückes der zusätzliche Primer '50-se2' (bp 565 - 586) benötigt wurde.

Bei der Suche nach dem längsten ORF fand sich ein nicht *in frame* mit dem stromaufwärts gelegenen gelegenes Translationsstartsignal (atg) ab bp 259 und ein Translationsstoppsignal, welches dem Startcodon von Kinesin entsprach (dieser ORF war 3' inkomplett). Daneben fanden sich vier kleine, alternative ORF (bp 1094-1156, 728-916, 548-709 und 1178-1282)

Das Insert von Klon *MU-MB-2.76* [AY130006] hatte nach Abtrennen des Poly(A)-Schwanzes eine Länge von 526 bp (**Abb. 9**). Innerhalb des Inserts fand sich kein putatives Translationsstartsignal. *In frame* mit dem stromaufwärts gelegenen Vektor-atg fand sich das erste Translationsstoppsignal (*tga*) ab bp 272. Somit hatte der chimäre ORF eine Länge von 295 bp einschließlich des 124 bp langen Vektor-Anteils.

1	atgggaggct	gagcggggctc	caggcgggagc	tggcgctgca	40
41	ggaggagagt	gtgcggcgca	gtgagcggga	gcgccgggccc	80
81	acgctggacc	aggtggccac	actggagagg	agcctgcagg	120
121	ccaccgagag	cgagctccgg	gccagccagg	agaagatcag	160
161	caagatgaag	gccaatgaga	caaagctgga	gggcgacaag	200
201	cggcgcctga	aggaggttct	ggacgcctcc	gagagccgca	240
241	ctgtcaagct	ggagctgcag	cggcgctcgc	ttgaggggga	280
281	gctgcagcgc	agccgcctgg	gcctcagtga	ccgcgaggcc	320
321	caagcccagg	ccctccagga	tcgggtggat	tccctgcaga	360
361	gacaggtggc	cgacagcgag	gtgaaggcag	ggaccctgca	400
401	gctgaccgtg	gagcggctga	atggggccct	ggccaagggtg	440
441	gaggaaagcg	agggggccct	gcgggacaag	gtgcggggcc	480
481	tgacagaggc	cctggcccag	agcagtgcca	gcctcaacag	520
521	caccggggac	aagaacctgc	atctgcagaa	ggctc tgacc	560
561	gcctgtgaac	atgaccgcca	agtactccag	gaacggctgg	600
601	atgccgcccg	gcaggcatta	tctgaggcac	ggaagcagag	640
641	cagctccctg	ggcgagcagg	tgcagacggt	gcgaggcgag	680
681	gtggctgacc	tggaaactgca	gcgggtggag	gccgagggcc	720
721	agctacaaca	gctacgggag	gtgctgcggc	agcggcagga	760
761	gggtgaggct	gcagccctga	acaccgtcca	gaagctgcaa	800
801	gacgagcggc	ggctgctgca	ggagcgcctg	ggaagcctgc	840
841	agcgcgccct	ggctcagctg	gaagctgaga	agcgagaggt	880
881	ggagcgcctca	gccctgcggc	tggagaagga	ccgtgtagcc	920
921	ctcaggagga	cgctggacaa	ggtggagcgg	gagaagcttc	960
961	gtagccatga	ggacacagtg	cggctgagcg	cagagaaggg	1000
1001	ccgcctggac	cgcaccctca	cgggggctga	gctggagctg	1040
1041	gcagaggcgc	agaggcagat	ccagcagctg	gaggcgcagg	1080
1081	tgggtggctg	ggagcagagc	cacagcccgg	cccagctgga	1120
1121	ggtggatgcg	cagcagcagc	agctggagct	gcagcaggag	1160
1161	gtggagcggc	tgcgcagcgc	ccaggcgcag	actgagcgca	1200
1201	ccctggaggc	tcgggagcgg	gcccaccgcc	agaggggtgtc	1240
1241	cacactgaag	ggccagctgc	agcaggagct	tcgaaggagc	1280
1281	tcagcaccct	tctccccacc	ctcgggcccc	ccagagaaat	1320
1321	<u>gagctcctgc</u>	tggcatctgg	agaacacccc	tgtgcctggg	1360
1361	acaggggagg	acccttcttt	tggacagccc	cccccccag	1400
1401	agcccggctc	cttggggggc	tcaagctggg	gtgggatgag	1440
1441	gaggcgctct	gctggcagtg	ctgaggacgg	gtactccagc	1480
1481	tccaggcctg	gagaggcttc	ccagcaacac	ctgcagtcca	1520
1521	gccccctct	tctaggatga	gccactgtag	atcattaaag	1560
1561	ttcctccttg	agaggctgag	ccgtagccag	gattggggag	1600
1601	agcccttgtc	tctggtcagc	cctggagcat	gggatcgtgg	1640
1641	gaaagaggag	ggggaccagg	cccagggcag	gggtcagagg	1680
1681	cccaggccct	gacttcggct	tcccagagat	ctctccgct	1720
1721	tagttaagag	catgtgtcgg	gaaattcctc	agagtgctca	1760
1761	gagtcctgt	atTTTTatac	ctTTTTacaa	tgTTAAactgt	1800
1801	tcagaactgt	TTTTTgtaac	aaaaccttgt	TTTT	1835

Abbildung 7: Sequenz des Inserts MU-MB-2.42

Hervorgehoben sind die Primer `42-se2` (bp 556 – 578), `42-an2` (bp 1281 – 1260) und `42-an3` (bp 1353 – 1335). Ebenso gekennzeichnet ist das für den längsten ORF relevante Translationsstoppsignal (bp 1320-1322) (unterstrichen). Dieser ORF wurde am Vektor-atg initiiert. Es fanden sich sieben kleine, alternative ORF. Ab bp 1835 folgte der Poly(A)-Schwanz.

1	ggccgagcgg	gactggctgg	gtcggctggg	ctgctggtgc	40
41	gaggagccgc	ggggctgtgc	tcggcgcca	aggggacagc	80
81	gcgtgggtgg	ccgaggatgc	tgcgggcgg	tagctccggc	120
121	gccccctcgt	ggtgactgct	gcgccgtgcc	tcacacagcc	160
161	gaggcgggct	cggcgcacag	tcgctgctcc	gcgctcgcgc	200
201	ccggcggcgc	tccaggtgct	gacagcgcga	gagagcgcgg	240
241	ccctcaggag	caaggcgaat	<u>gtatgacaac</u>	atgtccacaa	280
281	tggtgtacat	aaaggaagac	aagttggaga	agcttacaca	320
321	ggatgaaatt	atctctaaga	caaagcaagt	aattcagggg	360
361	ctggaagctt	tgaagaatga	gcacaattcc	atcttacaaa	400
401	gtttgctgga	gacactgaag	tgtttgaaga	aagatgatga	440
441	aagtaatttg	gtggaggaga	aatcaaacat	gatccggaag	480
481	tactggaga	tgttgagct	cggcctgagt	gaggcacagg	520
521	ttatgatggc	tttgtcaaat	cacctgaatg	ctgtggagtc	560
561	cgagaagcag	aaactgcgtg	cgcaggttcg	tcgtctgtgc	600
601	caggagaatc	agtggctacg	ggatgaactg	gccaacacgc	640
641	agcagaaact	gcagaagagt	gagcagtctg	tggtcaact	680
681	ggaggaggag	aagaagcatc	tggagtatt	gaatcagcta	720
721	aaaaaatatg	atgacgacat	ttccccatcc	gaggacaaag	760
761	acactgattc	taccaagag	cctctggatg	accttttccc	800
801	caatgatgaa	gacgaccag	ggcaaggaat	ccagcagcag	840
841	cacagcagtg	cagccgcggc	tgcccagcag	ggcggctacg	880
881	agatccccgc	gcggtgcgg	acgctccaca	acctggtgat	920
921	ccagtacgcc	tcgcaggggc	gctacgaggt	agctgtgcc	960
961	ctctgcaagc	aggccctgga	ggacctggag	aagacttcag	1000
1001	gacacgacca	cccggacgtg	gccaccatgc	tcaacatcct	1040
1041	ggccttggtg	tacagggatc	agaataaata	caaagatgca	1080
1081	gctaacctac	tgaatgatgc	cttggtatt	cgtgagaaaa	1120
1121	ctttgggcaa	agatcatcct	gcggtggcgg	cgactttgaa	1160
1161	taaccttgca	gtcctttatg	gtaaaagagg	gaagtacaaa	1200
1201	gaagcagagc	cgttgtgtaa	aagagctctg	gaaatccgag	1240
1241	aaaaggtttt	ggggaaggat	caccccgatg	tgccaagca	1280
1281	gttaaataac	tggccttac	tgtgccagaa	ccagggcaag	1320
1321	tatgaagaag	tagaatatta	ttatcaaaga	<u>gccctcgaga</u> ^{XhoI}	1360
1361	tctaccagac	aaaactggga	cctgatgacc	ccaacgtggc	1400
1401	taagacg				1408

Abbildung 8: Sequenz des Inserts MU-MB-2.50

Hervorgehoben ist der Primer `50-se2` (bp 565–586). Markiert sind außerdem das Translationsstartsignal (**atg**) ab bp 271 und das zugehörige Translationsstoppsignal ab bp 1401, die den längsten ORF markierten. Das Polyadenylierungssignal (**aataaa**) ist ab bp 1064 ersichtlich. Ab bp 1408 folgte der Poly(A)-Schwanz. Außerdem ist die zusätzliche XhoI-Schnittstelle (**ctcgag**) innerhalb des Inserts ab bp 1354 gekennzeichnet.

1	gcccagcccc	tcctcatccg	gcagcctcag	cagcacctcc	40
41	tcctggtaca	gcagcagcag	tagccgctcg	gccagccgca	80
81	gctactcccc	gagccggagt	cggagccgga	gccggagacg	120
121	gagccggacc	cgcacgagca	gcagctctag	ctcccgcagc	160
161	cctagtccgg	gctcccgcag	ccggagccgg	agcaggagcc	200
201	ggagccggag	ccggagcagg	agccagagcc	ggagctacag	240
241	ctcagcagac	agctactcca	gcacgaggcg	ctaagtgcc	280
281	<u>ctgag</u> gccagc	tgcccgtggg	ggccccttcg	cgctgccagc	320
321	ctcccccaac	cacctgccct	ccccgcctcc	ttggtgacaa	360
361	atagtgagg	ctcctatacc	ttgtccttcc	tgcttgctta	400
401	ggggaagaag	agaagagggt	aagggggctt	cact <u>tctag</u> ^{XbaI}	440
441	<u>a</u> tcagcctgc	taggagcctc	taccagcatc	atcctggggc	480
481	ccagctcagg	cctgggcatt	tggaaagaac	catcatcttg	520
521	tggcac				526

Abbildung 9: Sequenz des Inserts MU-MB-2.76

Hervorgehoben ist das Translationsstoppsignal (tga) bp 282, welches in frame mit dem Vektor-atg lag. Ab bp 527 folgte der Poly(A)-Schwanz. Außerdem ist eine zusätzliche XbaI-Schnittstelle (tctaga) innerhalb des Inserts ab bp 436 hervorgehoben.

V.3.3 Homologierecherche

Um die Insertsequenzen der positiven Klone auf Homologien mit bereits bekannten Gensequenzen zu untersuchen, wurden verschiedene Gendatenbanken (vgl. III.2.7.2.4) mit der jeweiligen Insertsequenz verglichen. Dabei wurden nur Homologien von über 20 bp Länge als signifikant betrachtet.

Mithilfe der Gendatenbank *htgs* wurde ersichtlich, daß das 331 bp lange Insert des KLons *MU-MB-2.32* revers homolog zu genomischen Sequenzen von Chromosomen 16 war.

Im Einzelnen war bp 1-331 des *MU-MB-2.32* (AF527735) homolog zu bp 5906-5585 des Klon 335H7 (NT_010552.9, AE006464) (**Abb. 10**). Ausnahmen bildeten Basenaustausche an den Positionen 86, 215 und 257 des *MU-MB-2.32* (Abb.7, Abb.11), die jedoch im relevanten ORF (bp <1-312) zu keinem Aminosäureaustausch führten. Weiter waren im Insert *MU-MB-2.32* Insertionen von Cytosinen an den Positionen 215, 221 und 227 sowie eine Insertion einer sechs bp langen Nucleotidsequenz vorhanden (ccgggg) (bp 232-237), die zur Insertion eines zusätzlichen Alanins und Glycins führte. Homologien von *MU-MB-2.32* zu Einträgen in den Gendatenbanken *gss*, *hu-ests* und *nr* wurden nicht gefunden.

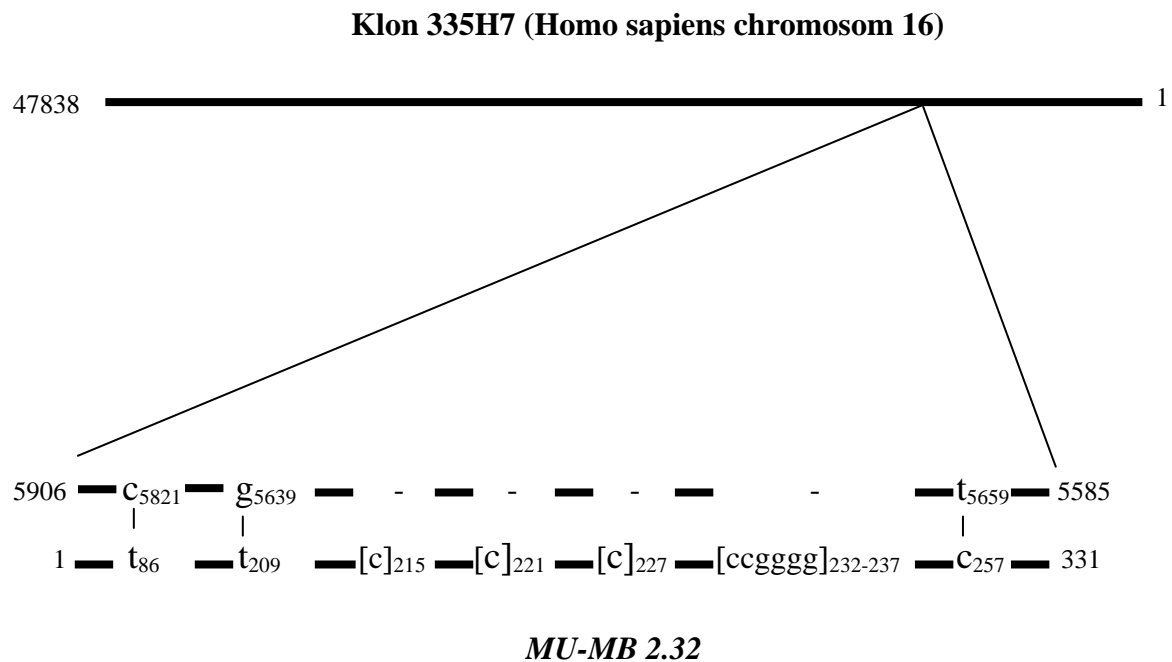


Abbildung 10: Homologie des Inserts *MU-MB-2.32* mit genomischer DNA

Gezeigt ist die Homologie des Inserts von Klon *MU-MB-2.32* zu Klon335H7, der genomische Sequenzen des Chromosoms 16 enthielt und in der Datenbank *htgs* gespeichert war.

Für das 1835 bp lange Insert des Klons *MU-MB-2.42* wurde mithilfe der Datenbank *nr* eine Homologie zur mRNA des putativen Proteins KIAA0445 aus Hirngewebe gefunden und zum genomischen Klon 37C10, der Sequenzen des Chromosoms 1p35 trug (**Abb. 11**).

Im Einzelnen war bp 1-1835 des Inserts von Klon *MU-MB-2.42* (AF527734) homolog zu bp 4638-6471 der KIAA0445 mRNA (NM_014675.1) und unterschied sich von diesem lediglich an zwei Positionen. Zum Einen fand sich an Position 875 des *MU-MB-2.42*-Inserts ein Adenosin anstatt des beschriebenen Guanidins. Dieser Basenaustausch war jedoch bezüglich des längsten ORF stumm, da das Triplet *cga* genauso wie das Triplet *cgg* für Arginin kodierte. Zum Anderen zeigte sich an Position 1343 des *MU-MB-2.42*-Inserts eine Insertion von Adenosin, die jedoch außerhalb des bei Position 1319 terminierten, längsten ORF lag.

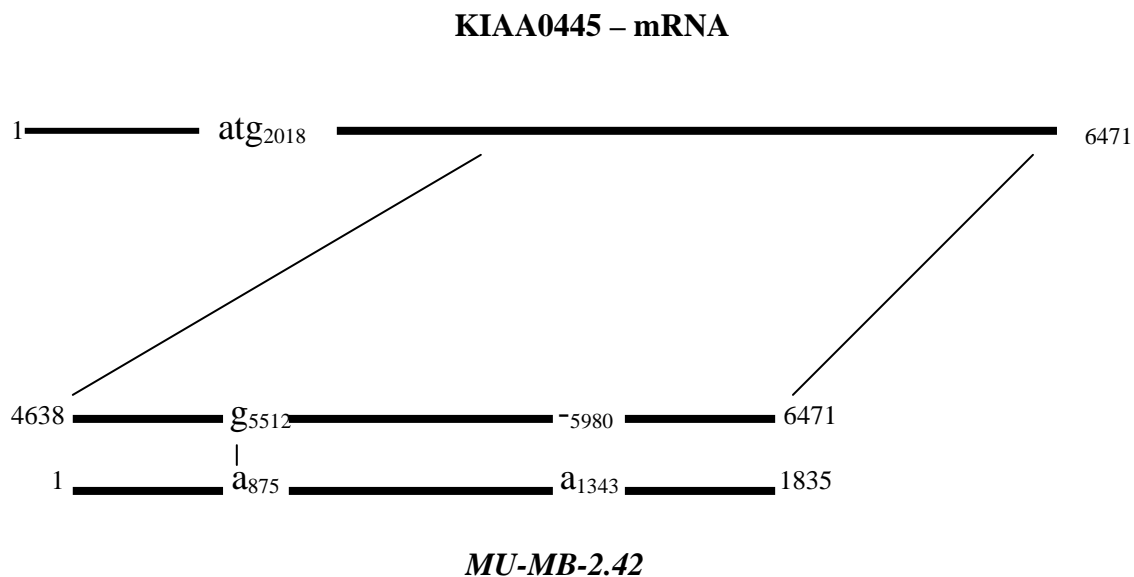


Abbildung 11: Homologie des Inserts *MU-MB-2.42* mit KIAA0445 mRNA

Durch dünne Linien markiert ist der Bereich der Sequenzhomologie. Die Sequenzunterschiede bestanden in zwei Basenaustauschen

Für das 1408 bp lange Insert des Klons *MU-MB-2.50* wurde mithilfe der Gendatenbank *nr* eine Homologie zu der 2308 bp langen Kinesin-2-mRNA gefunden (**Abb. 12**). Im Einzelnen war das *MU-MB-2.50*-Insert (AF527736) von bp 1-1407 homolog zu bp 21-1427 der Kinesin-2 mRNA (BC008881.1).

Die 526 bp lange Sequenz des *MU-MB-2.76*-Inserts (AY130006) war identisch mit einem Abschnitt der in der Gendatenbank *nr* gespeicherten KIAA1853 mRNA (XM_045184.2) entsprechend bp 1855-2380 (**Abb. 13**). Weitere wesentliche Homologien mit den Gendatenbanken *hgts*, *gss* und *hu-ests* wurden nicht gefunden.

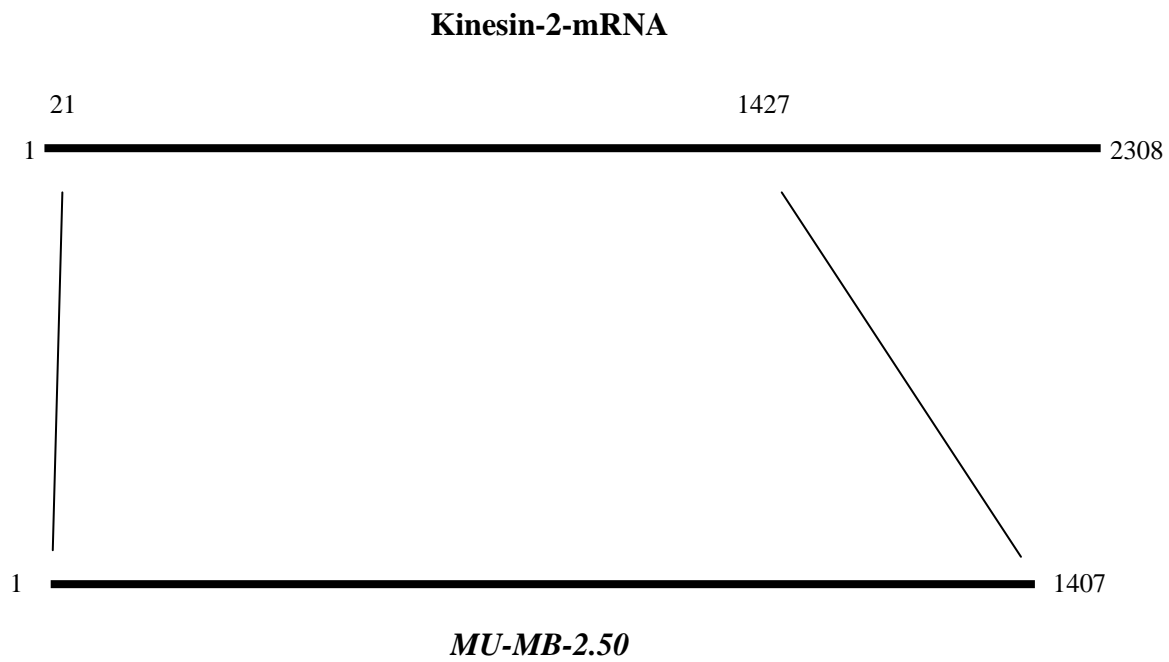


Abbildung 12: Homologie des Inserts *MU-MB-2.50* mit Kinesin-2-mRNA

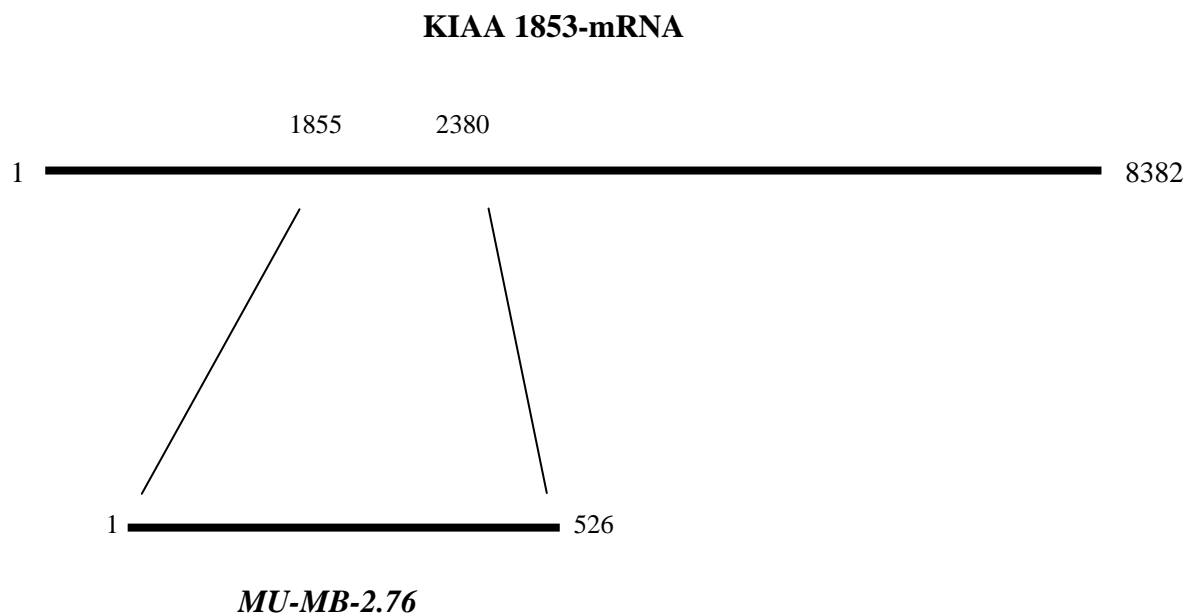


Abbildung 13: Homologie des Inserts von Klon *MU-MB-2.76* mit KIAA1853 mRNA

V.4 Autologe Serumanalyse

Um eine mögliche Korrelation der Serum-Ak-Titer zum Krankheitsverlauf zu erfassen, wurde eine Analyse von Serumproben vorgenommen, die der mit SEREX untersuchten Mb-Patientin über einen Zeitraum von vier Jahren beginnend nach Erstdiagnose jährlich bzw. halbjährlich entnommen worden waren (**Tab. 2**). Dabei wurde das Serum der Patientin in Verdünnungsstufen von 1:100 bis 1:100.000 untersucht. Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose des Mb mit Nachweis Metastasen in Gehirn und Spinalkanal lagen für die Antigene MU-MB-2.32 und .42 sehr hohe und für MU-MB-2.50 hohe Ak-Titer vor (1:10.000 bzw. 1:1.000). Die Ak gegen MU-MB-2.76 waren nur mit der geringsten eingesetzten Serumverdünnung nachzuweisen (1:100). Nach kompletter chirurgischer Tumorexzision und erfolgreichem Ansprechen der Metastasen auf die Radio- und Hochdosischemotherapie zeigte sich 1,5 Jahre nach Erstdiagnose ein deutlicher Abfall der Ak-Titer aller vier Antigene. Im weiteren Verlauf der folgenden 2,5 Jahre waren gegen keines der vier Antigene mehr Ak nachweisbar. Da sich das untersuchte Mb der jungen Patientin *bis dato* in anhaltender kompletter Remission befindet, ist hier Korrelation des Ak-Titers mit der Tumormasse vorzuschlagen.

Zeitintervall ¹ (in Jahren)	MU-MB-2.32	MU-MB-2.42	MU-MB-2.50	MU-MB-2.76
0	10 000 ²	10 000	1 000	100
1,5	1 000	1 000	100	0
2	- ³	-	-	-
2,5	0 ⁴	0	0	0
3	0	0	0	0
3,5	0	0	0	0
4	0	0	0	0 ⁴

Tabelle 2: Ak-Titer in sequentiell entnommenen autologen Serumproben

¹ Angegeben wurde das Zeitintervall vom Zeitpunkt der Erstdiagnose des Mb bis zur Abnahme der untersuchten Serumprobe. ² Die Zahl zeigt die Verdünnung der untersuchten Serumprobe. ³ Zu diesem Zeitpunkt war kein Serum zu asservieren bzw. kein Ak-Nachweis im 1:100 verdünnten Serum möglich. ⁴ Zu diesem Zeitpunkt befand sich das Mb der untersuchten Patientin in kompletter Remission.

V.5 Heterologe Serum-Analyse

Um die klinische Signifikanz der Serum-Ak weiter zu testen, wurden sogenannte heterologe Serumanalysen an zwei verschiedenen Personengruppen durchgeführt. Eine Gruppe bildeten 40 klinisch gesunde Probanden im Alter zwischen 15 und 30 Jahren. Die zweite Gruppe bestand aus 42 pädiatrischen Tumorpatienten, von denen 21 an einem neuroektodermalen und 21 an einem nicht neuroektodermalen Malignom erkrankt waren. Jedes der vier Antigene wurde mit Serum dieser 80 Personen auf reaktive Ak untersucht (**Tab. 3**).

Der Klon *MU-MB-2.32* wurde neben dem autologen Serum der Mb-Patientin lediglich vom Serum eines Probanden der klinisch gesunden Kontrollgruppe erkannt. Seren von anderen Patienten mit malignen Erkrankungen waren nicht reaktiv. Damit handelte es sich wahrscheinlich bei dem kodierten Antigen um ein nicht häufig mit meßbarer spezifischer humoraler Immunantwort assoziiertes Autoantigen.

Der Klon *MU-MB-2.42* zeigte nur mit Serum von Tumorpatienten eine Ak-Bindung. Unter diesen waren neben der mit SEREX untersuchten Mb-Patientin je ein Patient mit Mb, Ewing-Tumor und Gliosarkom, sowie drei Patienten mit Tumoren nicht neuroektodermalen Ursprungs (Osteosarkom, Rhabdomyosarkom und Non Hodgkin Lymphom). Damit handelte es sich bei dem kodierten Antigen wahrscheinlich um ein klassisches Tumorantigen und außerdem um ein Antigen mit bemerkenswert häufig nachweisbarer spezifischer Ak-Antwort.

Der Klon *MU-MB-2.50* zeigte von allen Klonen die größte Streuung von Ak-Reaktivität innerhalb der getesteten Seren. Sowohl bei einem Probanden aus der gesunden Kontrollgruppe und auch bei drei Patienten mit Hirntumoren (Neuroblastom, Astrozytom und Glioblastom) und zwei Patienten mit nicht neuroektodermalen Tumoren (RMS und Non Hodgkin Lymphom) zeigten sich eine eindeutige Ak-Reaktivität. Definitionsgemäß handelt es sich damit auch bei diesem Antigen um ein Autoantigen, allerdings mit häufiger nachweisbarer, spezifischer, humoraler Immunantwort.

Der Klon *MU-MB-2.76* wurde neben dem autologen Serum der Mb-Patientin von Seren eines weiteren Patienten mit Mb und zwei gesunden Probanden der Kontrollgruppe erkannt. Auch mit diesem Antigen wurde definitionsgemäß ein neues Autoantigen identifiziert.

Insgesamt waren die Seren der Patienten mit neuroektodermalen Tumoren häufiger mit allen Klonen reaktiv als die Patienten mit nicht neuroektodermalen Tumoren. Zehn von 21 Seren der Patienten mit neuroektodermalen Tumoren enthielten nachweislich Ak gegen alle vier Antigene, während nur fünf von 21 Seren der Patienten mit nicht neuroektodermalen Tumoren mit nur zwei der vier Antigene reagierten. Dabei waren bei Patienten mit Mb insgesamt am häufigsten Ak gegen die SEREX-definierten Mb-Antigene nachweisbar.

<i>Seren</i>	n	MU-MB-2.32	MU-MB-2.42	MU-MB-2.50	MU-MB-.76
<i>Gesunde Probanden</i>	40	1 ¹	0	1	2
<i>Patienten mit Malignom</i>	42	1	7	4	2
<i>Neuroektodermale Tumoren</i>	21				
Medulloblastom	5	1	2	1	2
Neuroblastom	4	0	0	1	0
Ewingtumor	4	0	1	0	0
Astrozytom	2	0	0	1	0
Ependymom	2	0	0	0	0
Ganglioneuroblastom	1	0	0	0	0
Phaeochromozytom	1	0	0	0	0
PNET ³	1	0	0	0	0
Gliosarkom	1	0	1	1	0
<i>Nicht neuroektodermale Tumoren</i>	21				
Wilms Tumor	2	0	0	0	0
Osteosarkom	2	0	1	0	0
Rhabdomyosarkom	5	0	1	1	0
KZT ²	1	0	0	0	0
Hepatoblastom	1	0	0	0	0
Morbus Hodgkin	3	0	0	0	0
ALL ⁴	4	0	0	0	0
Non Hodgkin Lymphom	3	0	1	1	0

Tabelle 3: Ergebnis der heterologen Serumanalyse

Die vier verschiedenen Klone *Mu-MB-2.32*, *.42*, *.50* und *.76* wurden mit 1:100 verdünntem Serum von 40 jungen, klinisch gesunden Probanden und 42 pädiatrischen Krebspatienten auf Ak-Reaktivität getestet. ¹Anzahl reaktiver Seren. ²KZT: Keimzelltumor (Maligner Dottersacktumor), ³ PNET: Primitiver neuroektodermaler Tumor. ⁴ ALL: Akute lymphatische Leukämie.

VI Diskussion

Ziel der Untersuchung war es zu überprüfen, ob mit dem SEREX-Verfahren, welches bisher erfolgreich bei Tumoren im Erwachsenenalter angewandt worden war, erstmals auch Antigene von Malignomen des kindlichen Organismus detektierbar waren. Die auf diese Weise im Jahre 1998 identifizierten und charakterisierten Antigene stehen hier zur aktuellen Diskussion.

Mu-MB-2.42 ist das erste mit SEREX aus pädiatrischem Tumorgewebe klonierte Tumorantigen

In der vorliegenden Arbeit wurden etwa eine Million rekombinante Klone der Mb-cDNA-Expressionsbibliothek auf ihre Reaktivität mit autologem Serum getestet und auf diese Weise sieben positive Klone gefunden, die vier verschiedene Tumor-cDNA-Inserts trugen. Davon kodierte ein Klon für ein neues Genprodukt, ein weiterer Klon für Kinesin-2 und zwei weitere Klone für sogenannte KIAA-Proteine, welche bisher noch nicht auf Proteinebene nachgewiesen und noch nicht als Zielstruktur einer Immunantwort beschrieben worden waren. Von den vier neuen Antigenen wurden drei von IgG-Ak im Serum klinisch gesunder Probanden und krebskranker Patienten gebunden und damit definitionsgemäß als Autoantigene identifiziert. Eines der vier Antigene war ausschließlich mit Serum von Tumorpatienten reaktiv und damit definitionsgemäß ein Tumorantigen. So konnte mit dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, daß sich das SEREX-Verfahren dazu eignet, Tumorantigene pädiatrischer Malignome zu identifizieren und unmittelbar molekular zu charakterisieren. Das Antigen MU-MB-2.42 war das erste Beispiel für ein Tumorantigen, das mit Hilfe von SEREX und pädiatrischem Probenmaterial aus einem hochmalignen Tumor kloniert wurde.

MU-MB-2.42 gehört zur Gruppe der KIAA-Proteine, die aus adultem Gehirn kloniert wurden

Die cDNA des Tumorantigens MU-MB-2.42 war, wie auch die cDNA des Autoantigens MU-MB-2.76, homolog zur cDNA jeweils eines KIAA-Proteins. Die sogenannten KIAA-cDNA-Sequenzen sind im Durchschnitt 5 kB groß und waren aus einer größenfraktionierten cDNA-Bibliothek von humanem, adulten Gehirngewebe kloniert worden [108]. Bis heute sind über 2000 verschiedene KIAA-Proteine identifiziert worden. Sie wurden primär zu den HUGE (*human unidentified gene encoded*) Proteinen gezählt, deren Funktion im Detail nicht genau bekannt ist. Alle verfügbaren Informationen über die jeweilige Proteinfamilie, ihre Funktion

sowie ggf. Homologien und Expression werden für KIAA-Proteine auf der HUGE *protein data base homepage* gesammelt und können dort eingesehen werden [<http://www.kazusa.or.jp>].

Das MU-MB-2.42-Homolog KIAA0445 ist das humane Ortholog des murinen Rootletin

Das KIAA0445-Protein wird laut aktueller Angaben der GenBank und HUGE *protein data base homepage* von einem Gen auf Chromosom 1p36.11 kodiert und höchstwahrscheinlich von einem über 5,7 kb großen Leserahmen in der mehr als 6,2 kb großen mRNA exprimiert. Der bislang über zwei Teilstücke identifizierte Leserahmen ist 5' inkomplett, und das aminoternale Ende des putativen KIAA0445-Proteins somit noch unbekannt.

Vor etwa zwei Jahren konnte das vom größten Leserahmen kodierte KIAA0445-Protein als das humane Ortholog des murinen Rootletin identifiziert werden. Rootletin ist ein neues 220 kD großes, Homopolymere bildendes, sogenanntes *coiled-coil* Protein, welches mithilfe eines mAk als strukturelle Komponente aller Zilien-tragenden Vertebratenzellen identifiziert werden konnte [133]. Es bildet ein Filament-Netzwerk in Zellen, die bewegliche oder unbewegliche Zilien tragen, einschließlich sensorischer Zilien wie in den Photorezeptoren der Retina. Über sein aminoternales Ende interagiert es wahrscheinlich mit dem Motorprotein Kinesin-3 [133]. Es hat darüber hinaus große Homologie zu dem Protein C-Nap1, für das eine Rolle bei der Zell-Zyklus-regulierten Zentrosomen-Kohäsion postuliert wurde [76][133]. Dazu passen die nachfolgenden Befunde von Andersen et al. [1], die das KIAA0455-Protein bei der Charakterisierung des humanen Zentrosoms durch *protein correlation profiling* detektierten.

Das Wildtyp-Rootletin wird gewebespezifisch vor allem in der Retina exprimiert

Mithilfe von mAk gegen das murine Rootletin, wurde gezeigt, daß große Mengen dieses Strukturproteins in der Retina gefunden werden, und daß Spuren davon in der Trachea, dem Bronchus und, passend zu den eigenen Befunden, im Gehirn vorkommen [133]. Zur mRNA-Expression des KIAA0445 sind laut HUGE Protein Database bisher keine Untersuchungen bekannt [<http://www.kazusa.or.jp/huge/gfpage/KIAA0445/>]. Gut vereinbar mit dem Vorkommen des murinen Protein-Orthologs in verschiedenen Normalgeweben konnte in der eigenen Arbeitsgruppe im Rahmen von mRNA-Analysen mit Hilfe der RT-PCR (*reverse transkription und polymerase chain reaction*) gezeigt werden, daß die mit KIAA0445/Rootletin-cDNA weitgehend identischen Sequenzen der MU-MB-2.42 mRNA in vielen Normalgeweben exprimiert werden [7]. Da allerdings die MU-MB-2.42 mRNA an ihrem 5'Ende inkomplett kloniert worden war, konnte nicht ausgeschlossen werden, daß die

Tumorantigen-cDNA im 5'terminalen Bereich durch Sequenzen charakterisiert ist, die nur in Tumorgewebe vorkommen. Um zu untersuchen, ob es sich bei dem *in vivo* relevanten, kompletten Antigen um eine tumorspezifische Variante des KIAA0445/Rootletin-Proteins handelte, müssten die stromaufwärts gelegenen Sequenzen aus Tumorproben der Kinder kloniert werden, die eine spezifische Ak-Antwort aufwiesen, und diese Sequenzen auf ihr Vorkommen in gesundem Gewebe geprüft werden.

Tumorspezifische Epitope können aufgrund tumorspezifischer Expression, aberranter Expression oder molekularer Alterationen generiert werden

Angesichts der tumor-assoziierten humoralen Immunreaktion gegen MU-MB-2.42 stellt sich die Frage, ob dieses Antigen ein tumorspezifisches Neoepitop trägt. Neben der oben diskutierten möglichen tumorspezifischen Expression wären prinzipiell auch tumorspezifische Alterationen des Genprodukts z.B. aufgrund alternativen Spleißens, Mutation, Gebrauch eines alternativen Promotors oder durch Verwendung eines alternativen ORF denkbar. Daß diese Mechanismen bei der Generation von tumorspezifischen Neoepitopen eine wichtige Rolle spielen, ist in der Literatur mehrfach belegt [128][82]. Die in Tumoren verwendeten alternativen ORF können mit einer Größe von weniger als 25 Aminosäuren sehr klein sein und sowohl innerhalb des Wildtyp-ORF wie auch stromaufwärts und stromabwärts [7] des Wildtyp-ORF liegen. In den nachfolgenden SEREX-Analysen der eigenen Arbeitsgruppe an Mb-, Neuroblastom- und Rhabdomyosarkom-Gewebe konnten Beispiele für die Generation von Tumorantigenen durch alternative Translation gegeben werden [6] [7] [Behrends et al., Manuskripte in Vorbereitung].

Das Antigen MU-MB-2.42 wird nicht von einem alternativen Leserahmen abgelesen

Als putatives Antigen wurde das Translationsprodukt des längsten ORF in der MU-MB-2.42 cDNA angenommen, welcher einem Abschnitt des humanen Orthologs von Rootletin entsprach. Um zu prüfen, ob die Serum-Ak der mit SEREX untersuchten Mb-Patientin tatsächlich an dieses und nicht an ein mögliches Produkt der in dieser Arbeit beschriebenen kleineren ORF band, wurde der längste ORF des MU-MB-2.42-Klons in Anschlussuntersuchungen der Arbeitsgruppe rekombinant exprimiert und in eine Western-Blot-Analyse mit Serum der Patientin eingesetzt. Der serologische Nachweis des rekombinant exprimierten ORF belegte die Identität des SEREX-definierten Mb-Antigens als Rootletin-Homolog und schloß den Gebrauch eines alternativen ORF als Mechanismus der tumor-

assoziierten Immunogenität aus [7]. Damit konnte auch die vermutete fehlende Relevanz der beschriebenen cDNA-Sequenzunterschiede belegt werden: Der innerhalb des ORF-gelegene Basenaustausch war stumm, der außerhalb gelegene hatte keinen Einfluß auf die Aminosäuresequenz des Antigens.

Eine Überexpression des MU-MB-2.42-Antigens in Mb könnte seiner tumor-assoziierten Immunogenität zu Grunde liegen

Wie in der Einleitung ausgeführt, ist eine Überexpression von Wild-Typ-Proteinen in Tumorgewebe verglichen mit Normalgewebe ein wichtiger Mechanismus für die Generation tumor-assoziiierter Immunreaktionen. Die in erwähnten semiquantitativen Untersuchungen der MU-MB-2.42-mRNA-Expression mithilfe der RT-PCR [7] ließen keine Aussage darüber zu, ob die klonierten MU-MB-2.42-Sequenzen in Tumorgewebe verglichen mit Normalgewebe überexprimiert werden. Allerdings gibt das mit Hilfe von mAk gegen Rootletin beschriebene Expressionsmuster [133] Anlaß dazu, über diesen Mechanismus als Auslöser der tumor-assoziierten Immunogenität des MU-MB-2.42-Antigens nachzudenken. Das murine Rootletin war mit Hilfe eines mAk und Immunoblot in hoher Menge ausschließlich in der Retina gefunden worden, welche ebenso wie das Gehirn und Hoden zu den sogenannten *immunoprivileged sites* gehört. Diese immunologisch privilegierten Gewebe sind dem Immunsystem aufgrund verschiedener Mechanismen nicht oder nur in Sonderfällen, wie etwa das Gehirn bei Verletzung der Bluthirnschranke, zugänglich. Da das Rootletin nun laut der immunhistologischen Untersuchungen in der Maus nur in Spuren in anderen Geweben als Retina und Gehirn vorkommt (Trachea, Niere) [133], könnte die tumor-assoziierte Immunogenität des MU-MB-2.42-Antigens in diesem spinal metastasierten Mb durchaus darauf beruhen, daß dem peripheren Immunsystem ungewöhnlich viel des Wild-Typ-Proteins präsentiert und dadurch die immunologische Toleranz durchbrochen wurde. Im Falle eines malignen Hirntumors mit nachweislicher spinaler Aussaat wie bei der hier untersuchten Patientin ist die Bluthirnschranke grundsätzlich als nicht mehr intakt anzusehen. Überexprimierte Tumorantigene können interessanterweise, wie am Beispiel des in vielen gesunden Epithelien exprimierten Tumorantigens Her2/neu gezeigt, trotz Vorkommen in Normalgewebe, durchaus hilfreiche Ansätze für die Immuntherapie bieten, ohne Autoimmun-Phänomene auszulösen [31].

Die tumor-assoziierten Ak gegen MU-MB-2.42 kommen bei pädiatrischen Krebspatienten häufig vor

Unabhängig davon, welcher Mechanismus für die tumor-assoziierte Immunantwort gegen das Tumorantigen MU-MB-2.42 verantwortlich war, war die Häufigkeit nachweisbarer humoraler Immunreaktionen bemerkenswert. Die heterologe Serum-Analyse sollte darüber Klarheit schaffen, inwieweit die hier identifizierten Antigene auch vom Immunsystem anderer Tumorpatienten erkannt werden bzw. inwieweit es sich um tumorspezifische, Entitätsspezifische oder individuelle Tumorantigene handelte. Ak gegen MU-MB-2.42 waren in dieser Arbeit bei 40 % aller Patienten mit Mb, bei 20 % aller Patienten mit neuroektodermalen Tumoren und bei insgesamt 17,5 % aller untersuchten pädiatrischen Tumorpatienten nachzuweisen. Diese Frequenz rangierte in demselben Bereich wie die, die für anti-Hu-Ak beschrieben ist, welche als serologische Tumormarker etabliert wurden [6][38]. Anti-Hu-Ak kommen bei 16 % aller erwachsenen Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom vor [38] und werden dazu genutzt, bei Patienten mit unklarer neurologischer Symptomatik und fehlenden Tumorsymptomen nach einer zugrunde liegenden onkologischen Erkrankung zu suchen. In diesen Fällen wird die paraneoplastische neurologische Symptomatik als anti-Hu-Syndrom bezeichnet [1][28]. Anti-Hu-Ak wurden auch im Rahmen einer pädiatrischen SEREX-Analyse identifiziert und kommen mit ähnlicher Häufigkeit wie anti-MU-MB-2.42-Ak bei Kindern vor, so z.B. bei 20% aller untersuchten Patienten mit neuroektodermalen Tumoren [7][6]. Für alle streng tumor-assoziierten und häufigen Ak, so auch für anti-MU-MB-2.42-Ak, kommt eine mögliche Rolle als hilfreicher klinischer Tumormarker in Betracht.

Die Ak gegen SEREX-definierte Mb-Antigene könnten klinische Verlaufsmarker darstellen

Die engmaschige Verlaufskontrolle der Ak-Titer gegen MU-MB-2.42 und alle drei Autoantigene im Serum der mit SEREX untersuchten Mb-Patientin hatte eine Korrelation zwischen der Immunantwort und der klinischen Tumorentwicklung ergeben. Zum Zeitpunkt der Diagnose des multifokal metastasierten Mb lag der Ak-Titer um das 10- bis 100-fache höher als nach kompletter chirurgischer Tumorexzision und erfolgreichem Ansprechen auf die Therapie. In Korrelation mit einer kompletten Tumorremission waren die Ak im weiteren Heilungsverlauf nicht mehr nachweisbar. Diese Befunde legen nahe, daß vor allem diejenigen der hier nachgewiesenen Ak, die bei Tumorpatienten relativ häufig vorkamen wie anti-MU-MB-2.42-Ak und anti-MU-MB-2.50-Ak, möglicherweise als Indikatoren für den Therapieerfolg nützlich sein könnten. Dazu passend wurde in nachfolgenden

Titerverlaufsanalysen gegen-SEREX-definierte Antigene bei einer weiteren Mb-Patientin ebenfalls eine Korrelation von Ak-Titerabfall und Tumorregression beobachtet [7]. Diese Ergebnisse untermauerten einen älteren Bericht über eine Korrelation des Ak-Titers gegen das SEREX-definierte *Cancer/Testis* Antigen NY-ESO-1 mit der Regression eines Nasopharynxkarzinoms bei einem erwachsenen Patienten [54].

Möglicherweise sind nur Wiederanstiege von Ak-Titern gegen SEREX-definierte Antigene prädiktiv

Interessanterweise ergaben sich bei der Untersuchungen einer dritten Patientin mit Mb [7] und einer Patientin mit Neuroblastom [6] Evidenzen dafür, daß ein erneuter Ak-Anstieg gegen SEREX-definierte Antigene nach intermittierendem Titerabfall eine Tumorprogression bzw. ein Tumorrezidiv anzeigen kann. Daß ein solcher wiederansteigender Titer möglicherweise höhere klinische Aussagekraft hat als abfallende Titer, zeigte die Beobachtung, daß die Ak-Titer bei einer vierten Mb-Patientin trotz fulminantem, fatalen Tumorrezidiv unter der Nachweisgrenze verblieben [7]. In diesem Falle war offensichtlich ein *immune escape* Phänomen zu beobachten, wie es für besonders aggressive Tumoren typisch ist. Eine solche immunologische Maskierung kann z.B. durch eine verminderte Expression oder eine ungenügende Präsentation von Tumorantigenen im progredienten Tumor bedingt sein [109].

Ak gegen Tumor- und Autoantigene können prognostische Marker darstellen

Alle neu definierten Ak, die bei Tumorpatienten häufig vorkommen und innerhalb einer Tumorentität ein heterogenes Verteilungsmuster zeigen, sollte man darauf prüfen, ob sie von prognostischer Bedeutung sind. Es gibt in der Literatur mehrere Beispiele dafür, daß sowohl Tumor- wie Autoantigene hilfreiche Indikatoren der Prognose sein können. So zeigt z.B. der Nachweis von Ak gegen das Autoantigen Heat-shock-protein 70 (Hsp70) bei Diagnose eines Mammakarzinoms eine schlechte Prognose an [25][118]. Ak gegen die oben bereits erwähnten Hu-Antigene sind bei Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom (SCLC) häufiger mit lokal begrenzter als mit disseminierter Erkrankung assoziiert und werden daher als prognostisch günstiges Zeichen angesehen [38]. Bei pädiatrischen Patienten mit disseminiertem Neuroblastom zeichnet sich ebenfalls eine günstige prognostische Bedeutung ab [6]. Im Falle der Hu-Ak wird spekuliert, daß die anti-Hu-Immunantwort nicht nur ein Epiphänomen darstellt, sondern über die zellulären Immunreaktionen gegen Hu-Antigene des Tumors direkt protektive Wirkung [88]. Für die eigenen Befunde bedeutet dies, daß vor allem die bei Mb-

Patienten häufigen Ak (anti-MU-MB-2.42 und .76) anhand weiterer heterologer Serumanalysen und Korrelation mit dem Therapieergebnis bei den betroffenen Patienten auf ihre mögliche prognostische Bedeutung geprüft werden sollten.

Ak bei klinisch gesunden Personen können auf eine latente Tumorerkrankung hinweisen

Die Tatsache, daß die Klone MU-MB-2.32, .50 und .76 nur vom Serum einiger weniger oder einzelner klinisch gesunder Kontrollpersonen erkannt wurden, gibt Anlaß zu der Überlegung, ob diese jungen Erwachsenen möglicherweise eine bis dahin unentdeckte maligne Erkrankung aufwiesen, und es sich doch anstatt eines Autoantigens um ein Tumorantigen handelt. Daß Ak gegen Tumorantigene durchaus im Stadium klinisch okkulten Malignome als Tumormarker dienen können, war oben am Beispiel der Hu-Antigene diskutiert worden [88]. Allein die Identifikation des verantwortlichen T-Zellepitops und richtungsweisend die Analyse zahlreicher weiterer gesunder Probanden können hier endgültig Aufschluß über die Identität der Antigene geben. Das ähnlich häufige Vorkommen von Ak gegen MU-MB-2.32, .50 und .76 bei klinisch gesunden Probanden und Tumorpatienten legt jedoch nahe, daß es sich bei diesen Antigenen tatsächlich um Autoantigene handelte.

Viele Auto-Ak kommen bei Tumorpatienten häufiger vor

Daß Ak gegen Autoantigene bei Tumorpatienten meist häufiger und mit höherem Titer als bei Gesunden vorkommen, ist ein inzwischen gut bekanntes Phänomen [7][6]. So fanden sich für die Autoantigene MU-MB-2.32 und MU-MB-2.76 ähnliche, für das Antigen MU-MB-2.50 aber höhere Werte bzgl. Ak-Titer und -Häufigkeit wie nach Abschluß der Arbeit gezeigt werden konnte [7]. Es ist gut vorstellbar, daß Autoantigene im Kontext eines schnell wachsenden und teilweise nekrotisierten Tumors vermehrt präsentiert werden und das alarmierte Immunsystem unter anderem mit einer gesteigerter Produktion spezifischer Ak reagiert.

Das neue Autoantigen MU-MB-2.32 wurde von einem bislang unbekanntem Gen kodiert

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit MU-MB-2.32 ein Autoantigen beschrieben, das von einem bis dato unbekanntem Gen kodiert wird. Es hatten sich lediglich Homologien zu genomischen Sequenzen auf Chromosom 16p13.3 gefunden. Während über den betroffenen Abschnitt des Chromosoms 16 nichts weiter bekannt ist, gibt es Hinweise darauf, daß Aberrationen auf Chromosom 16 mit onkologischen Erkrankungen wie z.B. Brustkrebs assoziiert sein können

[120]. Die drei Basenaustausche des MU-MB-2.32-Insert gegenüber den genomischen Sequenzen führten bezüglich des putativen ORF nicht zu Aminosäureaustauschen und waren somit wahrscheinlich nicht von funktioneller Bedeutung. Allerdings resultierte die Insertion von zusätzlichen Basen bezüglich des putativen ORF in einer geänderten Aminosäuresequenz. Um zu klären, ob es sich bei den Veränderungen um tumorspezifische Mutationen oder Genpolymorphismen handelte, müßte man die entsprechende genomische DNA-Sequenz des Tumors mit genomischer DNA z.B. peripherer Leukozyten der Patientin vergleichen. Es wäre darüber hinaus interessant, mithilfe der klonierten Sequenzen eine Northern-Blot-Analyse von Normalgewebe durchzuführen, und auf diese Weise die gesamte mRNA dieses Gens darzustellen. Weiterhin könnte man mit Hilfe der klonierten Sequenzen eine cDNA-Bibliothek aus gesundem und/oder Tumorgewebe zu hybridisieren und auf diese Weise versuchen, größere cDNAs oder cDNA-Fragmente zu isolieren.

Das neue Autoantigen MU-MB-2.76 war vollständig homolog zu KIAA1853

Für das kleine cDNA-Insert MU-MB-2.76 war außer der 100% Homologie zu der mehr als zehnmals längeren KIAA1853 mRNA keine signifikante Homologie zu weiteren humanen cDNAs zu eruieren. Als nicht humane Homologe der KIAA1853 cDNA werden auf der aktuellen HUGO *protein data base homepage* drei nicht weiter charakterisierte cDNAs aus Gehirn von Makaken bzw. Mäusen angegeben [<http://www.kazusa.or.jp/huge/gfpage/KIAA1853/>]. Darüberhinaus findet sich auf dieser Homepage ein mit Hilfe der RT-PCR ermitteltes Expressionsmuster der KIAA1853 mRNA. Es zeigt eine überwiegende Expression in Strukturen des Gehirns und Spuren in Hoden und Niere. Im KIAA1853-Protein kommen laut HUGO-Protein Database Homepage zwei für *high mobility group* (HMG)-Proteine charakteristische DNA-Bindemotive (HMG-I und -Y) sowie ein potentiell nukleäres Lokalisationssignal vor, so daß es sich bei Mu-Med-2.76 möglicherweise um ein nukleäres, DNA-bindendes Antigen handelt. In dieser Arbeit wurde erstmalig ein Beweis dafür erbracht, daß das KIAA1853-Protein tatsächlich exprimiert wird, in Gehirngewebe vorkommt, und darüber hinaus eine Zielstruktur des Immunsystems darstellt. Durch rekombinante Expression des putativen ORF könnte wiederum untersucht werden, ob dies der *in vivo* relevante, von Serum-Ak gebundene ORF ist. Man könnte die cDNA-Sequenzen des KIAA1853-Proteins zum Beispiel mit Farbindikatoren wie z.B. dem green-fluorescing protein (GFP) koppeln und nach Transfektion die intrazelluläre Lokalisation untersuchen. Aufwendige Experimente dieser Art sind allerdings erst dann lohnenswert, wenn auch das 5'Ende der bislang inkompletten

KIAA1853-cDNA vollständig kloniert und damit des aminoterminalen Ende des Proteins bekannt ist.

MU-MB-2.50 lieferte die erste Evidenz dafür, daß es sich bei Kinesin-2 um ein immunogenes Protein handelt

Kinesin ist ein mechano-chemisches Enzym, das die Hydrolyse von Adenosin-5'-triphosphat katalysiert und die dabei frei werdende Energie benutzt, um Zellorganellen entlang intrazellulärer Mikrotubuli zu transportieren [9]. Auf diese Art ist Kinesin innerhalb der Zelle an der Verteilung der Chromosomen bei der Meiose/Mitose sowie beim Transport von Organellen, Vesikeln, RNA und Proteinkomplexen beteiligt [35]. Das sogenannte Motorprotein Kinesin ist strukturell ein Heterotetramer bestehend aus zwei schweren (KHC = *kinesin heavy chain*, 110 kDa) und zwei leichten Polypeptidketten (KLC = *kinesin light chain*, 65-70 kDa). Die sogenannte Motordomäne befindet sich im aminoterminalen Bereich der schweren Kette und enthält die ATP-Bindungsstelle sowie eine Mikrotubulusbindungsstelle. Während mit dem Carboxylterminus der schweren Kette die leichten Ketten interagieren können, welche der Bindung des zu transportierenden Objektes an das Motorprotein dienen und einen regulatorischen Einfluß auf die Aktivität der Motordomäne haben [107][115][126]. Erstmals gelang es Cabeza-Arvelaiz et al. 1993 Teile der leichten Kette des humanen Kinesins (KLC) zu isolieren und zu sequenzieren [16]. Chernajovsky et. al. 1996 [21] entschlüsselten das vollständige Kinesin-2 Protein von 90 kb und Goedert et al. im selben Jahr [37] konnten den zugehörigen kodierenden Genlokus auf Chromosom 14q32.3 ausmachen. Vor ca. drei Jahren wurde die Immunogenität des Kinesin-2 in einer SEREX-Analyse von Mammakarzinom-Gewebe bestätigt [103]. Interessanterweise hatten die Autoren Ak gegen das Kinesin-2-Homolog NY-BR-45 nur bei zwei von 25 Patienten mit Mammakarzinom, nicht aber bei 25 klinisch gesunden Kontrollen und nicht bei insgesamt 64 Patienten mit Kolon-, Ovarial- oder Ösophaguskarzinom sowie Lungentumoren gefunden. Sie hatten das Antigen demnach als Tumorantigen vorgeschlagen. Bei ihren Expressionsanalysen mittels RT-PCR fanden sie die NY-BR-45 mRNA in Mammakarzinomgewebe verglichen mit gesundem Gewebe eher unterrepräsentiert, so daß der Mechanismus der beobachteten tumor-assoziierten Immunogenität dieses Wild-Typ-Antigens offen blieb. Mit der eigenen Arbeit wird erstmals belegt, daß es sich bei den mit SEREX identifizierten Kinesin-2-Homologen wahrscheinlich doch um Autoantigene handelte.

Bedeutung des hier definierten Mb-Antigene für die Tumormimmuntherapie

Für antigenspezifische Tumorstoffe kommen in erster Linie solche Antigene in Frage, die ein tumorspezifisches Epitop aufweisen. Damit sind in erster Linie diejenigen Antigene für immuntherapeutische Ansätze nützlich, die wie MU-MB-2.42 nur bei Tumorkranken mit einer nachweislichen Immunreaktion assoziiert sind. Unter diesen haben solche Antigene höchste Priorität, die nur in Tumorgewebe vorkommen bzw. eine tumorspezifische Variante des Wildtyps darstellen, da sonst Nebenwirkungen der Stoffe an gesunden Geweben befürchtet werden müssten. Daraus lässt sich folgern, daß die Bedeutung des Tumorstoffes MU-MB-2.42 für die Tumorstoffung erst dann abschließend beurteilt werden kann, wenn das verantwortliche T-Zell-Epitop identifiziert wurde. Aus dem Gesagten möchte man schließen, daß Tumorstoffe mit Wildtyp-Struktur wie möglicherweise MU-MB-2.42 und Autoantigene wie MU-MB-2.32, .50 und .76 keinerlei Bedeutung für Tumorstoffe haben sollten. Daß dem vermutlich nicht so ist, zeigen Arbeiten zum immunregulatorischen Potential von Wildtyp-Antigenen (s.u.).

Immunregulatorisches Potential von Wild-Typ-Molekülen und Autoantigenen

Die Mehrzahl der SEREX-definierten Antigene zeigen keine Mutation oder andere strukturelle Veränderungen gegenüber den homologen Wild-Typ-Sequenzen und sind zum großen Teil Autoantigene [82]. Da die Immunantwort gegen solche Wild-Typ-Antigene bei Tumorkranken nicht selten sehr markant ist, stellt sich die Frage, ob sie für den Betroffenen hilfreich, schädlich oder unbedeutend ist.

Um die Rolle von immunogenen Wild-Typ-Molekülen in der Tumorkennung näher zu untersuchen, wurden in einer Studie von Nishikawa et al. [82] tumortragende Mäuse mit einem Gemisch aus SEREX-definierten Wild-Typ-Antigenen und einem bekannten, tumorspezifischen Antigen dieser chemisch induzierten Tumore immunisiert. Dies führte gegenüber einer Stoffung mit dem tumorspezifischen Antigen allein zu einer verbesserten Tumorkennung. Die verbesserte Tumorkennung war abhängig von der Kopräsentation des tumorspezifischen Antigens mit Wild-Typ-Antigen und konnte durch Ausschaltung der CD4+ THL-Antwort unterdrückt werden. Die Autoren schlossen entsprechend auf einen möglichen therapeutischen Nutzen von SEREX-definierten Wild-Typ-Antigenen.

In einer weiterführenden Studie der gleichen Arbeitsgruppe wurden tumortragende Mäuse nur mit SEREX-definierten Autoantigenen immunisiert [81]. Interessanterweise kam es in diesem Modell nicht zur Tumorkennung, sondern sogar zu einem gegenüber nicht geimpften Mäusen

vermehrten Tumorwachstum Die Autoren identifizierten CD4+ CD25+ regulatorische T-Zellen als verantwortlich für das verstärkte Tumorwachstum. Die zentrale Rolle von CD4+ CD25+ regulatorischen T-Zellen in der Unterdrückung von Autoimmunreaktionen ist allgemein akzeptiert [112].

Zusammenfassend könnte dies bedeuten, daß die Expression von Autoantigenen in Tumorgewebe einen nicht unerheblichen Einfluß auf die induzierte Immunantwort hat, wobei die gleichzeitige Expression von Autoantigenen mit tumorspezifischen Antigenen offensichtlich protektiv wirken kann, während die alleinige Expression von Autoantigenen die immunologische Kontrolle des Tumorwachstums erschwert.

Modifikation der SEREX-Methode für die Anwendung auf maligne Erkrankungen des hämatopoetischen Systems

Aufgrund der unkomplizierten und gegenüber T-Zellverfahren weniger kostenspielligen Anwendung der SEREX-Methode bei gleichzeitig hoher Effizienz, wurde die SEREX-Methode international von zahlreichen Arbeitsgruppen übernommen. Dies ist nicht nur der Fülle der Publikationen zum Thema, sondern auch der stetig wachsenden Zahl von Einträgen in die SEREX-Datenbank zu entnehmen [<http://www.licr.org/SEREX.html>]. Es wurden vor allem Antigene verschiedener solider Tumoren einschließlich diverser neuroektodermaler Malignome identifiziert, so z.B. mehrere Medulloblastomantigene [7], das O18INX und neue Humanantigenvarianten in einem Neuroblastom [6], das PHF3 im Glioblastoma multiforme [117] und das antiapoptotische Protein BAX-Inhibitor 1 im Astrozytom [106]. Während Proben von solchen wenig durchbluteten Tumoren ein sehr gutes Ausgangsmaterial für die Antigensuche mit SEREX darstellen, war es bei Malignomen des hämatopoetischen Systems notwendig, eine Modifizierung des Verfahrens zu entwickeln.

Bei der Anwendung von SEREX auf Leukämien bestand die grundlegende Problematik, daß die malignen Zellen mit vielen B-Zellen vermischt vorliegen, und diese über ihre IgG-mRNA das Detektionsverfahren irritierten [63]. Diese Schwierigkeiten konnten durch die Ergänzung der SEREX-Methode mittels eines Zwischenschrittes überwunden werden. Nach Übertragung der rekombinanten Proteine von der Agarplatte auf Nitrozellulose erfolgte zunächst eine Inkubation der Nitrozellulosemembran mit Ak gegen humanes IgG. Die hierbei direkt angefärbten, falsch positiven IgG-Plaques wurden so markiert und falsch positive Bindungen nach der anschließenden Inkubation mit autologem Serum demaskiert [123]. Auf diese Weise konnten z.B. auch bei Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie (CLL) interessante,

teils tumorspezifische (KW-1, KW-3), teils tumorspezifisch überexprimierte Antigene (KW-4, KW-13) identifiziert werden [63]. Das modifizierte SEREX-Verfahren könnte demnach genutzt werden, um auch bei Leukämien von Kindern nach Tumorantigenen zu suchen.

Modifikationen des SEREX-Verfahrens durch Analyse von Zelllinien- oder Hoden-cDNA bzw. Anwendung von gepooltem Serum

Bei Tumorarten, von denen oft nur wenig Gewebe für die SEREX-Analyse zur Verfügung steht, kann es sinnvoll sein, etablierte Zell-Linien anstatt Tumorgewebe mit allogenen Serum von betroffenen Patienten zu untersuchen [20]. Vorteil dieses Verfahrens ist die unlimitierte Verfügbarkeit des Ausgangsgewebes für nachfolgende Untersuchungen zur Expression, molekularen Identität und/oder Funktion des Antigens. Nachteil des Verfahrens ist das möglicherweise artifizielle Antigeneset, da die *in vitro* Kultur durchaus mit einer Veränderung des Antigenmusters einhergehen kann.

In vielen jüngeren SEREX-Arbeiten anderer Autoren [72][41] sowie der eigenen Arbeitsgruppe wurde nicht mehr allein autologes Serum für die Antigensuche eingesetzt, sondern ein Serum-Pool aus Proben von mehreren Patienten mit derselben Tumorerkrankung. So konnten kürzlich an Osteosarkom-, Rhabdomyosarkom- und Wilmstumorgewebe jeweils mehr als 30 verschiedene Antigene in den einzelnen Analysen identifiziert werden (Behrends et al., Manuskripte in Vorbereitung). Damit sind SEREX-Analysen unter Verwendung von gepooltem Serum weitaus effizienter als die klassische autologe Analyse wie sie noch in der vorliegenden Arbeit angewandt wurde.

Eine interessante Variation der SEREX-Methode war die Untersuchung von cDNA-Expressionsbibliotheken aus Hodengewebe mit Serum von Krebspatienten. Auf diese Weise wurde gezielt und erfolgreich nach neuen *Cancer/Testis*-Antigenen gesucht [40]. Die Methode wurde noch weiter spezifiziert, indem die Hoden-cDNA-Expressionsbibliothek für Hodenspezifische lange Transkripte angereichert wurde [122]. Bislang ist noch keine Analyse einer Hoden-cDNA-Expressionsbibliothek mit Serum von pädiatrischen Patienten publiziert worden. Angesichts der vielen embryonalen Tumorentitäten des Kindesalters einschließlich des Mb erscheint dies jedoch durchaus sinnvoll.

SEREX-Analysen im Tiermodell

Das SEREX-Verfahren wurde darüber hinaus bereits wiederholt in Mausmodelle eingesetzt, und auf diese Weise murine SEREX-Antigene identifiziert. Diese Modelle bieten den Vorteil, daß

im selben System diverse zusätzliche immunologische Untersuchungen und ggf. Vakzinierungsstudien durchgeführt werden können, die im klinischen Alltag nicht praktikabel oder nicht ethisch vertretbar sind [44][82][86]. Eine Anwendung des SEREX-Verfahrens auf etablierte Mausmodelle von Mb-Erkrankungen wäre äußerst interessant [43][71].

Okada et al. [84] entwickelten darüber hinaus im Ratten-Modell das sogenannte CAS-Verfahren (*cytokine tumor vaccine-assisted SEREX*) Verfahren, bei dem die Effizienz der Antigen suche durch vorangehende subkutane Vakzinierung mit Interleukin-4-transduzierten Tumorzellen gesteigert werden sollte. Auf diese Weise konnte tatsächlich unter mehreren Tumor-assoziierten Antigenen eines murinen Glioms ein *tumor rejection antigen* identifiziert werden, das nach intradermaler Plasmidvakzinierung in diesem Tumormodell protektiv war.

Limitationen des SEREX-Verfahrens

Obwohl die hohe Effizienz des SEREX-Verfahrens allgemein anerkannt ist, dürfen seine Limitationen nicht unerwähnt bleiben. Sie sind dem bakteriellen Expressionssystem anzulasten. Zum Einen sind im bakteriellen System nicht alle posttranslationalen Modifikationen vertreten, die das humane Protein *in vivo* erfährt, so daß wichtige Epitope maskiert bleiben und mit Hilfe von SEREX-Methode wahrscheinlich nur ein limitiertes Antigen-Repertoire identifiziert werden kann [91]. Das kürzlich entwickelte RAYS-Verfahren (*Recombinant antigen expression on yeast surface*) versucht diese Limitationen dadurch zu umgehen, daß die Antigene auf der Oberfläche von Hefezellen exprimiert werden, wodurch ihre natürliche Konformation in Eukaryonten weitgehend erhalten bleibt [77]. Problematisch ist dabei die Tatsache, daß tumorspezifische posttranslationale Modifikationen auch bei Expression in Hefezellen nicht erfasst werden, da die Hefen das Protein bestenfalls so glykosylieren wie Normalgewebe, nicht aber wie Tumoren. RAYS erscheint vielmehr dazu nützlich, Antigene zu erfassen, die in *E.coli*-Bakterien toxisch wirken und daher bei der SEREX-Analyse übersehen werden, so z.B. Membranantigene, die aufgrund hydrophober Regionen in *E.coli*-Bakterien klumpen. Zellmembran-ständige Antigene sind für die Entwicklung von immuntherapeutischen Ansätzen auf der Basis von Ak essentiell. Hier könnte RAYS, bei dem die Expression von Membranantigenen unproblematisch sein sollte, einen interessanten Beitrag leisten. Über die Anwendung von RAYS auf Malignome von Kindern wurde noch nicht berichtet.

Optimierung der autologen Verlaufs- und der heterologen Serumanalyse

Der Plaque Assay, wie er in dieser Arbeit eingesetzt wurde, ist als Ak-Suchverfahren für bekannte Antigene sehr aufwendig und daher nicht gut für groß angelegte *screening-Verfahren* geeignet. Außerdem wird sehr viel Serummaterial verbraucht, was gerade bei Kindern oft ein limitierender Faktor ist. Anzustreben ist die Entwicklung von ELISA-Verfahren (*enzyme linked immuno assay*) oder Chip-Analysen, die die Untersuchung von kleinen Patientenproben in großem Maßstabe erlauben. Für einige SEREX-Antigene aus Tumoren von Erwachsenen sind bereits ELISA-Untersuchungen mit rekombinanten SEREX-Antigenen publiziert [116]. Auch serologische Chip- bzw. Microarray-basierte Ansätze wurde bereits für die Suche nach Auto-Ak vorgeschlagen [94]. Problematisch ist dabei, daß ELISAs und Chip-Assays auf der Basis bakteriell exprimierter Antigene denselben Aufwand für die Serumabsorption verlangen wie der Plaque assay, daß aber andererseits in eukaryonten Systemen rekombinant exprimierte Proteine nur mit hohem Arbeitsaufwand in ausreichender Menge für sensitive ELISA/Chip-Analysen herzustellen sind. Dieser Aufwand wird sich nur für ausgewählte pädiatrische SEREX-Antigene lohnen.

T-Zellantworten gegen SEREX-Antigene und erste SEREX-Antigen-Vakzine

Wie auch immer die Antigen-Suchverfahren in Zukunft noch weiter modifiziert werden, lässt sich doch heute schon sagen, daß die Fülle der bislang identifizierten Antigene vielversprechende Beiträge nicht nur zu einem verbesserten biologischen Verständnis der untersuchten Tumoren geführt haben, sondern darüber hinaus entweder selbst oder über spezifische Immunreaktionen wichtige therapeutische Beiträge leisten [65][104][121]. Neben ihrer Nutzung als klinische Marker für die initiale Diagnostik und therapeutische Erfolgskontrolle sind vor allem die tumorspezifischen Antigene interessant für die Immuntherapie. Während zu Beginn der SEREX-Anwendung noch unklar war, ob die SEREX-definierten Antigene auch suffizient von T-Lymphozyten erkannt werden, ist letzteres inzwischen gut belegt. Für die SEREX-Antigene NY-ESO-1 und SSX-2 sind diverse *in vitro* Analysen publiziert, die ihre Erkennung durch CD8⁺ CTL und CD4⁺ THL untermauern [3][49][125]. Erste Peptidvakzine auf der Basis dieser Antigene werden klinisch evaluiert [75].

Schlussfolgerung und Ausblick

In dieser Arbeit konnten erstmals mehrere SEREX-Antigene eines pädiatrischen Tumors identifiziert und so die Anwendbarkeit dieses effizienten Verfahrens auch in der Kinderonkologie belegt werden. Mit den identifizierten antigenspezifischen Ak konnten mögliche neue prognostische Marker und mit dem Tumorantigen MU-MB-2.42 ein möglicher Ansatzpunkt für Tumorstoffe vorgeschlagen werden. Die Arbeit schaffte die Basis für zahlreiche nachfolgende SEREX-Analysen mit Tumormaterial und Serum von Kindern, in denen weitere Kandidaten für neue diagnostische, prognostische und therapeutische Strategien in der pädiatrischen Onkologie beschrieben werden konnten [6][7][Behrends et al., Manuskripte in Vorbereitung].

Für die interessantesten der so identifizierten Tumorantigene werden in laufenden Analysen die verantwortlichen T-Zell-Epitope charakterisiert, die Proliferationskinetik autologer antigenspezifischer T-Zellen studiert und so ihre Eignung für Tumorstoffe näher evaluiert. Alle Antigene und antigenspezifischen Ak, die mögliche diagnostische oder prognostische Bedeutung haben, werden in Studien an größeren Patientenkohorten auf ihre klinische Eignung getestet. Durch Anwendung aktueller Modifikationen des SEREX-Verfahrens könnte die Ausbeute an neuen Tumorantigenen in kindlichen Tumoren einschließlich des Mb möglicherweise noch gesteigert werden.

VII Zusammenfassung

Für viele aggressive Krebserkrankungen besteht aufgrund der ungenügenden Wirksamkeit und hohen Toxizität konventioneller Therapieverfahren die dringende Notwendigkeit, nach neuen Therapiekonzepten zu suchen. Verschiedene immuntherapeutische Ansätze erscheinen auf Grund ihrer tumorspezifischen Wirkung und guten Verträglichkeit vielversprechend. Spezifische Immuntherapien setzen die Identifizierung geeigneter Antigene voraus, die als Zielstrukturen für passive oder aktive Vakzinierungsansätze dienen können. Bei der Suche nach geeigneten Tumorantigenen hatte sich in der internistischen Onkologie das sogenannte SEREX-Verfahren als sehr effizient erwiesen. Das Antigenrepertoire typischer Krebserkrankungen des Kindesalters war zu Beginn dieser Arbeit noch kaum untersucht. Die ersten Erfolge der Tumorzellvakzinierung bei erwachsenen Patienten und die Tatsache, daß neue Tumorantigene auch von diagnostischer oder tumorbiologischer Bedeutung sein können, spornten die Suche nach geeigneten pädiatrischen Tumorantigenen an.

In der vorliegenden Arbeit sollte mit einem Medulloblastom erstmals ein typisch pädiatrischer Tumor mit SEREX gescreent werden. Das SEREX-Verfahren hatte den Vorteil, daß keine Tumorzelllinien etabliert werden mussten, sondern mit kryokonserviertem Gewebe der Antigenstatus quasi *in vivo* analysiert werden konnte. Ausserdem wurden mit SEREX methodenimmanent Antigene nachgewiesen, die im Patienten eine hochtitrige IgG-Anwort ausgelöst hatten und somit von den zentralen Modulatoren des Immunsystems, den T-Helferzellen, erkannt worden waren. Die Antigensuche erfolgte durch die autologe serologische Analyse einer mit Hilfe von λ -Bakteriophagen in *E.coli*-Bakterien exprimierten cDNA-Bibliothek aus Medulloblastomgewebe einer sechs Jahre alten Patientin. Die cDNA-Bibliothek wurde in Agarplattenkulturen exprimiert, und Folienabzüge der Proteine mit Serum des Patienten inkubiert, welches zuvor gegen Bestandteile des Vektorsystems präabsorbiert und ausreichend verdünnt worden war. Seroreaktive Antigene wurden dann durch Anfärbung mit einem markierten Zweit-Ak auf der Folie sichtbar gemacht, der verantwortliche Phagenklon aus dem Agar isoliert, und die Antigen-cDNA nach einfacher Umklonierung sequenziert. Die so identifizierten Antigene wurden durch eine Datenbank-gestützte Homologie-Recherche und Testung auf Reaktivität mit Seren anderer Tumorpatienten oder gesunder Kontrollen näher charakterisiert.

Auf diese Weise konnten sieben seroreaktive Klone mit vier verschiedenen cDNA-Inserts identifiziert werden. Eines der vier Antigene wurde von einem neuen Gen kodiert. Zwei Antigene waren auf vorbeschriebene sogenannte KIAA-Gene zurückzuführen, über deren Genprodukte bislang noch nichts bekannt war, und die bisher noch nicht als Ausgangspunkte für Immunreaktionen beschrieben worden waren. Das vierte Antigen war mit dem als Tumorantigen vorbeschriebenen Kinesin-2 identisch, was hier jedoch als Autoantigen klassifiziert werden musste. Unter den anderen Antigenen wurden weitere zwei von IgG-Ak im Serum gesunder Kontrollen gebunden und damit als Autoantigene eingestuft. Eines der beiden KIAA-Genprodukte war dagegen nur mit Seren von Tumorpatienten reaktiv und damit ein Tumorantigen. Interessanterweise kamen Ak gegen dieses Tumorantigen insgesamt häufig und bei Patienten mit Tumoren verschiedener Entitäten vor. Die Serum-Ak-Titer wurden über vier Jahre im Verlauf dokumentiert und korrelierten mit dem Therapieansprechen. Zusammenfassend konnten in der hier präsentierten Arbeit erstmals mit einem serologischen Ansatz T-Helferzellantigene eines pädiatrischen Tumors identifiziert, und neben drei Autoantigenen ein neues Tumorantigen für die Entwicklung neuer diagnostischer und therapeutischer Ansätze zur Verfügung gestellt werden.

VIII Anhang

VIII.1 Abkürzungsverzeichnis

ALL	Akute lymphatische Leukämie
ALP	Alkalische Phosphatase
Ak	Antikörper
bp	Basenpaar
CMV	Cytomegalievirus
CTL	CD8+ zytotoxische T-Lymphozyten
DNA	Desoxyribonucleinsäure
cDNA	komplementäre DNA
DC	dendritische Zellen
ELISA	<i>enzyme linked immuno assay</i>
HAMA	humane anti-Maus-Ak
HIT	multizentrische Therapieoptimierungsstudie zur Behandlung von Kindern und jungen Erwachsenen mit einem intrakranial lokalisierten, primitivem, neuroektodermalem Tumor und Ependyom
HLA	Human-Leukozyten-Antigen
HUGE	<i>human unidentified gene encoded</i>
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalacto-Pyranosid
kb	Kilobasen
KIAA	cDNA Klone der HUGE <i>protein data base</i>
KZT	Keimzelltumor
mAk	monoklonaler Antikörper
Mb	Medulloblastom
MHC	major Histokompatibilitätskomplex
ORF	<i>open reading frame</i>
Pfu	<i>plaque forming units</i>
PNET	Primitive Neuroektodermale Tumoren
RAYS	<i>recombinant antigen expression on yeast surface</i>
SEREX	<i>serological definition of recombinantly expressed antigens</i>
THL	CD4+ T-Helfer-Lymphozyten
WHO	<i>World Health Organization</i>

VIII.2 Literaturverzeichnis

- [1] Andersen J.S., Wilkinson C.J., Mayor T., Mortensen P., Nigg E.A. and Mann M., Proteomic characterization of the human centrosome by protein correlation profiling, *Nature* 426 (2003):570-574
- [2] Antunes N.L., Khakoo Y., Matthay K.K., Seeger R.C., Stram D.O., Gerstner E., Abrey L.E. and Dalmau J., Antineuronal antibodies in patients with neuroblastoma and paraneoplastic opsomyoclonus. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 22 (2000):315-320
- [3] Ayyoub M., Rimoldi D., Guillaume P., Romero P., Cerottini J.C., Valmori D., and Speiser D., Tumor-reactive, SSX-2-specific CD8+ T cells are selectively expanded during immune responses to antigen-expressing tumors in melanoma patients. *Cancer Res.* 63 (2003):5601-6.
- [4] Bancherau J., Schuler-Thurner B., Palucka A.K. and Schuler G., Dendritic cells as vectors for therapie, *Cell* 106 (2001):271-274
- [5] Baselga J., Tripathy D., Mendelsohn J., Baughman S., Benz C.C., Dantis L., Sklarin N.T., Seidman A.D., Hudis C.A., Moore J., Rosen P.P., Twaddell T., Henderson I.C. and Norton L., Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpression metastatic breast cancer, *J. Clin. Oncol.* 14 (1996):697-699
- [6] Behrends U., Jandl T., Goldbeck A., Lechner B., Muller-Weihrich S., Schmid I., Till H., Berthold F., Voltz R. and Mautner J.M., Novel products of the HUD, HUC, NNP-1 and α -INTERNEXIN genes identified by autologous antibody screening of a pediatric neuroblastoma library, *Int. J. Cancer* 100 (2002):669-677
- [7] Behrends U., Schneider I., Rössler S., Frauenknecht H., Golbeck A., Lechner B., Eigenstetter G., Zobywalski C., Muller-Weihrich S., Graubner U., Schmid I., Sackerer D., Spath M., Goetz C., Prantl F., Asmuss H.P., Bise K. and Mautner J., Novel tumor antigens identified by autologous antibody screening of childhood medulloblastoma cDNA libraries, *Int. J. Cancer* 106 (2003):244-251
- [8] Berg J.M., Tymoczko J.L. und Stryer L., *Biochemie*, (2003), 5. Auflage:1028-1037

-
- [9] Berg J.M., Tymoczko J.L. und Stryer L., Biochemie, (2003), 5. Auflage:1060-1064
- [10] Bernhard H., Schmidt B., Meyer zum Büschenfelde C. und Peschel C., Adoptiver Transfer von malignomreaktiven T-Zellen, *Onkologie* 5 (1999):688-694
- [11] Bohlen H., Hopff T., Manzke O., Engert A., Kube D., Wickramanayake P.D., Diehl V. and Tesch H., Lysis of malignant B cells from patients with B-chronic lymphocytic leukemia by autologous T cell activated with CD3xCD19 bispecific antibodies in combination with bivalent CD28 antibodies, *Blood* 82 (1993):1803-1812
- [12] Boon T., Cerottini J.C., Van den Eynde B., Van der Bruggen P. and Van Pel A., Tumor antigens recognized by T lymphocytes, *Annu. Rev. Immunol.* 12 (1994):337-365
- [13] Boon T., Van Pel A., De Plaen E., Chomez P., Lurquin C., Szikora J.P., Sibille C., Marianne B., Van de Eynde B. and Lethe B., Genes coding for T-cell-defined tumor transplantation antigens : point mutations, antigenic peptides and subgenic expression. *Cold Spring Harb Symp. Quant. Biol.* 54 Pt 1 (1989):587-96
- [14] Brichard V., Van Pel A., Wolfel T., Wolfel C., De Plaen E., Lethe B., Coulie P. and Boon T., The Tyrosinase Gene Codes for an Antigen Recognized by Autologous Cytolytic T Lymphocytes on HLA-A2 Melanomas, *J. Exp. Med.* 178 (1993):489-495
- [15] Brown J.P., Woodbury R.G., Hart C.E., Hellstrom I. and Hellstrom K.C., Quantitative analysis of melanoma-associated antigen p97 in normal and neoplastic tissues, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981):539-543
- [16] Cabeza-Arvelaiz Y., Shin L.C., Hardman N., Asselbergs F., Bilbe G., Schmitz A., White B., Siciliano M.J. and Lachman L.B., Cloning and genetic characterization of the human kinesin light-chain (KLC) gene, *DNA Cell Biol.* 12 (1993):881-892
- [17] Carpentieri, D.F., Nichols K., Chou P.M., Matthews M., Pawel B. and Huff D., The expression of WT1 in the differentiation of rhabdomyosarcoma from other pediatric small round blue cell tumors, *Mod. Pathol.* 15 (2002):1080-1086
- [18] Chearskul S., Onreabroi S., Churintrapun M., Semprasert N. and Bhothisuwan K., Immunohistochemical study of c-erbB-2 expression in primary breast cancer, *Asian Pac. J. Allergy Immunol.* 19 (2001):197-205

- [19] Chen J.L., Dunbar R., Gileadi U., Jäger E., Gnjatich S., Nagata Y., Stockert E., Panicali D., Chen Y.-T., Knuth A., Old L. and Cerundolo V., Identification of NY-ESO-1 peptide analogues capable of improved stimulation of tumor-reactive CTL, *J. Immunol.* 165 (2000):948-955
- [20] Chen Y.T., Gure A.O., Tsang S., Stockert S., Jager E., Knuth A. and Old L.J., Identification of multiple cancer/testis antigens by allogenic antibody screening of a melanoma cell line library, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998):6919-6923
- [21] Chernajovsky Y., Brown A. and Clark J., Human kinesin light (beta) chain gene:DNA sequence and functional characterization of its promotor and first exon, *DNA Cell Biol.* 15 (1996):968-970
- [22] Clayton P.E. and Shalet S.M., Dose dependency of time of onset of radiation-induced growth hormone deficiency, *Journal of Pediatrics* 118 (1991):922-926
- [23] Cohen P.A., Peng L., Plautz G.E., Kim J.A., Weng D.E. and Shu S., CD4+ T cells in adoptive immunotherapy and the indirect mechanism of tumor rejection, *Crit. Rev. Immunol.* 20 (2000):17-56
- [24] Cohen Y., Polliack A. and Nagler A., Treatment of refractory autoimmune diseases with ablative immunotherapy using monoclonal antibodies and/or high dose chemotherapy with hematopoietic stem cell support, *Curr. Pharm. Des.* 9 (2003):279-288
- [25] Conroy S.E., Sasieni P.D., Fentima I. and Latchman D.S., Autoantibodies to the 90kDa heat shock protein and poor survival in breast cancer patients, *Eur. J. Cancer* 34 (1998):942-943
- [26] Constine L.S., Woolf P.D., Cann D., Mick G., McCormick K., Raubertas R.F. and Rubin P., Hypothalamic-pituitary dysfunction after radiation of brain tumors, *N. Engl. J. Med.* 328 (1993):87-94
- [27] Courtney-Luck N.S., Epenetos A.A., Moore R., Larche M., Pectasides D., Dhokia B. and M.A., Development of primary and secondary immune responses to mouse monoclonal antibodies used in diagnosis and therapy of malignant neoplasms, *Cancer Res.* 46 (1986):6489-6493
- [28] Dalmau J., Graus F., Cheung N.K., Rosenblum M.K., Ho A., Canete A., Delattre J.Y., Thompson S.J. and Posner J.B., Major histocompatibility proteins, anti-Hu

- antibodies and paraneoplastic encephalomyelitis in neuroblastoma and small cell lung cancer, *Cancer* 75 (1995):99-109
- [29] De Plaen E. and Boon T., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988):2274-2278
- [30] Den Boer A.T., van Mierlo G.J., Franssen M.F., Melief C.J., Offringa R. and Toes R.E., CD4+ T cells are able to promote tumor growth through inhibition of tumor-specific CD8+ T-cell responses in tumor-bearing hosts, *Cancer Res.* 65 (2005):6984-6989
- [31] Disis M.L. and Cheever M.A., HER-2/neu protein: a target for antigen-specific immunotherapy of human cancer, *Adv. Cancer Res.* 71 (1997):343-371
- [32] Duffner P., Horowitz M., Krischer J., Fiedman H., Burger P., Cohen M., Sanford R., Mulhern R., James H., Freeman C., Seidel F. und Kun L., Postoperative Chemotherapie and Delayed Radiation in children less than three years of age with malignant brain tumors, *N. Engl. J. Med.* 328 (1993):1725-1731
- [33] Ehlken H., Schadendorf D. and Eichmuller S., Humoral immun response against melanoma antigens induced by vaccination with cytokine gene-modified autologous tumor cells, *Int. J. Cancer* 108 (2004):307-313
- [34] Enk A.H., Jonuleit H., Saloga J. and Knop J., Dendritic cells as mediators of tumor-induced tolerance in metastatic melanoma, *Int. J. Cancer* 73 (1997):309-331
- [35] Fischer R. und Mertens D., Kinesine-Motoren in der Zelle, *Biologie in unserer Zeit* Nr.5 (2002):32
- [36] Forseen S.E., Potti A., Koka V., Koch M., Fraiman G. and Levitt R., Identification and relationship of HER-2/neu overexpression to short-term mortality in primary malignant brain tumors, *Anticancer. Res.* 22 (2002):1599-1602
- [37] Goedert M., Marsh S. and Carter N., Localization of the human kinesin light chain gene (KNS2) to chromosome 14q 32.3 by fluorescence in situ hybridisation, *Genomics* 32 (1996):173-175
- [38] Graus F., Dalmau J., Rene R., Tora M., Malats N., Verschuuren J., Cardenal F., Vinolas N., Garcia del Muro J., Vadell C., Mason W.P. and Rosell R., Anti-Hu antibodies in patients with small-cell lung cancer: association with complete response to therapy and improved survival, *J. Clin. Oncol.* 15 (1997):2866-2872

- [39] Grillo-Lopez A.J., White C.A., Varns C., Shen D., Wei A., McClure A. and Dallaire B.K., Overview of the clinical development of rituximab: first monoclonal antibody approved for the treatment of lymphoma, *Semin. Oncol.* 26 (1999):66-73
- [40] Gure A.O., Tureci O., Sahin U., Tsang S., Scanlan M.J., Jager E., Knuth A., Pfreundschuh M., Old L.J. and Chen Y.T., SSX: a multigene family with several members transcribed in normal testis and human cancer, *Int. J. Cancer* 73 (1997):965-971
- [41] Gure A.O., Stockert E., Scanlan M.J., Keresztes R.S., Jager D., Altorki N.K., Old L.J. and Chen Y.T., Serological identification of embryonic neural proteins as highly immunogenic tumor antigens in small cell lung cancer, *Proc. Natl. Sci. USA* 97 (2000):4198-4203
- [42] Gutjahr P., *Krebs bei Kindern und Jugendlichen*, Deutscher Ärzteverlag, 1993, 3. Auflage,
- [43] Hallahan A.R., Pritchard J.I., Hansen S., Benson M., Stoeck J., Hatton B.A., Russel T.L., Ellenbogen R.G., Bernstein I.D., Beachy P.A. and Olson J.M., The SmoA1 mouse model reveals that notch signaling is critical for the growth and survival of sonic hedgehog-induced medulloblastomas, *Cancer Res.* 64 (2004):7794-800
- [44] Hampton T.A., Conry R.M., Khazaeli M.B., Shaw D.R., Curiel D.T., LoBuglio A.F. and Strong T.V., SEREX analysis for tumor antigen identification in a mouse model of adenocarcinoma, *Cancer Gene Ther.* 7 (2000):446-455
- [45] Herr W., Wölfel T., Heike M., Meyer zum Büschenfelde K.H. and Knuth A., Frequency analysis of tumor-reactive cytotoxic T lymphocytes in peripheral blood of a melanoma patient vaccinated with autologous tumor cells, *Cancer Immunol Immunother.* 39 (1994):93-99
- [46] Houghton A.N., *Cancer antigens : Immune recognition of self and altered self*, *J. exp. Med.* 180 (1994):1-4
- [47] Ishida H., Matsumura T., Salgaller M.L., Ohmizono Y., Kadono Y. and Sawada T., MAGE-1 and MAGE-3 or -6 expression in neuroblastoma-related pediatric solid tumors, *Int. J. Cancer* 69 (1996):375-380

- [48] Jager E., Jager D. and Knuth A., Clinical cancer vaccine trials, *Curr. Opin. Immunol.* 14 (2002):178-182
- [49] Jäger E., Jäger D., Karbach J., Chen Y.T., Ritter G., Nagata Y., Gnjatic S., Stockert E., Arand M., Old L.J. and Knuth A., Identification of NY-ESO-1 epitopes presented by human histocompatibility antigen (HLA)-DRB4*0101-0103 and recognized by CD4(+) T lymphocytes of patients with NY-ESO-1-expressing melanoma, *J. Exp. Med.* 191 (2000): 625-630
- [50] Jager D., Jager E. and Knuth A., Vaccination for malignant melanoma: recent developments, *Oncology* 60 (2001):1-7
- [51] Jager E., Bernhard H., Romero P., Ringhoffer M., Arand M., Karbach J., Ilsemann C., Hegerdorn M. and Knuth A., Generation of cytotoxic T cell responses with synthetic melanoma associated peptides in vivo: implications for tumor vaccines with melanoma associated antigens, *Int. J. Cancer* 66 (1996):162-169
- [52] Jager E. und Knuth A., Stand und Perspektiven der therapeutischen Vakzinierung mit bekannten Tumorantigenen, *Onkologie* 5 (1999):695-700
- [53] Jager E., Chen Y.T., Drijfhout J.W., Karbach J., Ringhoffer M., Jager D., Arand M., Wada H., Noguchi Y., Stockert E., Old L.J. and Knuth A., Simultaneous humoral and cellular immune response against cancer-testis antigen NY-ESO-1: definition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2-binding peptid epitopes, *J. Exp. Med.* 187 (1998):265-270
- [54] Jager E., Stockert E., Zidianakis Z., Chen Y.T., Karbach J., Jager D., Arand M., Ritter G., Old L.J. and Knuth A., Humoral immune responses of cancer patients against „Cancer -Testis“ antigen NY-ESO-1: Correlation with clinical events, *Int. J. Cancer* 84 (1999):506-510
- [55] Jürgens H., Halbjahrestagung der deutschen Gesellschaft für pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH) Berlin, (www.prolife.de/aktuelles/147.html)
- [56] Kaatsch P., Deutsches Kinderkrebsregister Jahresbericht 2000, IMBEI 55101 Mainz, (www.kinderkrebsregister.de)
- [57] Kaech S.M., Tan J.T., Wherry E.J., Konieczny J.T., Surh C.D. and Ahmed R., Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that gives rise to long-lived memory cells, *Nat. Immunol.* 4 (2003):1191-1198

-
- [58] Kaptain S., Tan L.K. and Chen B., Her-2/neu and breast cancer, *Diagn. Mol. Pathol.* 10 (2001):139-152
- [59] Knuth A., Danowski B., Oettgen H.F. and Old L.J., T-cell-mediated cytotoxicity against autologous malignant melanoma; analysis with interleukin-2-dependent T-cell cultures, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81 (1984):3511-3515
- [60] Kohler G. and Milstein C., Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, *Nature* 256 (1975):495-7
- [61] Kortmann R.D., HIT 1991 (Prospective, Co-Operative Study for the Treatment of Malignant Brain Tumor in Childhood): Accuracy and Acute Toxicity of the Irradiation of the Craniospinal Axis, *Strahlentherapie und Onkologie*, Urban und Vogel 1999
- [62] Kortmann R.D., Timmermann B., Kühl J., Willich N., Flentje M., Meisner C. and Bamberg M., HIT 1991 (Prospective, Co-Operative Study for the Treatment of Malignant Brain Tumor in Childhood): Accuracy and Acute Toxicity of the Irradiation of the Craniospinal Axis, *Strahlentherapie und Onkologie*, Urban und Vogel 1999
- [63] Krackhardt A.M., Witzens M., Harig S., Hodi F.S., Zauls A.J., Chessia M., Barrett P. and Gribben J.G., Identification of tumor-associated antigens in chronic lymphocytic leukemia by SEREX, *Blood* 100 (2002):2123-2131
- [64] Krauss W.C., Park J.W., Kirpotin D.B., Hong K. and Benz C.C., Emerging antibody-based HER2 (ErbB-2/neu) therapeutics, *Breast Dis.* 11 (2000):113-124
- [65] Krebs P., Kurrer M., Sahin U., Tureci O. and Ludewig B., Autoimmunity seen through the SEREX-scope, *Autoimmun. Rev.* 2 (2003):339-345
- [66] Kühl J., AWMF, Interdisziplinäre Leitlinie der Deutschen Krebsgesellschaft und der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie, (www.uni-duesseldorf.de)
- [67] Kühl J., Kortmann R.D. und Mittler U., Hirntumorprotokoll der Arbeitsgruppe für Hirntumore der Gesellschaft für pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH) in der Version 1. Juni 2000
- [68] Kuhl J., Muller H.L., Berthold F., Kortmann R.D., Deinlein F., Maass E., Graf N., Gnekow A., Scheurlen W., Gobel U., Wolff J.E., Bamberg M., Kaatsch P., Kleihues

- P., Rating D., Sorensen N. and Wiestler O.D., Preradiation chemotherapy of children and young adults with malignant brain tumors: results of the German pilot trial HIT'88/'89., *Klin. Pädiatrie* 210 (1998):227-233
- [69] Kuhl J., Müller H.L., Berthold F., Kortmann R.D., Deinlein F., Maaß E., Gnekow A., Scheurlen W., Göbel UWJEA, Bamberg M., Kaatsch P., Kleihues P., Rating D., Sörensen N. and Wiestler O.D., Preradiation chemotherapy of children and young adults with malignant brain tumors: Results of the german pilottrial HIT'88/89, *Klin. Pädiatrie* 210 (1998):227-233
- [70] Lanzavecchia A., From antigen presentation to T-cell activation, *Res. Immunol.* 149 (1998):626
- [71] Lin W., Kemper A., McCarty K.D., Pytel P., Wong J.B., Campbell I.L., Utset M.F. and Popko B., Interferon-gamma induced medulloblastoma in the developing cerebellum, *J. Neurosci.* 24 (2004):10074-10083
- [72] Lim Y., Lee D.Y., Lee S., Park S.Y., Kim J., Cho B., Lee H., Kim H.Y., Lee E., Song Y.W. and Jeoung D.I., Identification of autoantibodies associated with systemic lupus erythematosus, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 295 (2002):119-124
- [73] Livesey E.A., Hindmarsh P.C., Brook C.G., Whitton A.C., Bloom H.J., Tobias J.S., Godlee J.N. and Britton J., Endocrine disorders following treatment of childhood brain tumors, *Brit. J. Cancer* 61 (1990):622-625
- [74] Matzinger P. and Guerder S., Does T- cell tolerance require a dedeicated antigen-presenting cell?, *Nature* 338 (1989):74-76
- [75] Marchand M., van Baren N., Weynants P., Brichard V., Dreno B., Tessier M.H., Rankin E., Parmiani G., Arienti F., Humblet Y., Boulond A., Vanwijck R., Lienard D., Beauduin M., Dietrich P.Y., Russo V., Kerger J., Masucci G., Jager E., De Greve J., Atzpodien J., Brasseur F., Coulie P.G., van der Bruggen P. and Boon T., Tumor regression observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptid encoded by gene MAGE-3 and presenting by HLA-A1, *Int. J. Cancer* 80 (1998):219-230

- [76] Mayor T., Stierhof Y.D., Tanaka K., Fry A.M. and Nigg E.A., The centrosomal protein C-Nap1 is required for cell cycle regulated centrosome cohesion, *J. Cell Biol.* 151 (2000):837–846
- [77] Mischo A., Wadle A., Watzig K., Jager D., Stockert E., Santiago D., Ritter G., Regitz E., Jager E., Knuth A., Old L. and Pfreundschuh M., Recombinant antigen expression on yeast surface (RAYs) for the detection of serological immune responses in cancer patients, *Cancer Immun.* 3 (2003): 3-5
- [78] Miller R.A., Oseroff A.R., Stratk R.T. and Levy R., Monoclonal antibody therapeutic trials in seven patients with T-cell lymphoma, *Blood* 62 (1983):988-995
- [79] Morris M.J., In vitro effects of antileucaemic drugs on cartilage metabolism and their effects on somatomedin by the liver, Dissertation, Manchester University (1981)
- [80] Mukherji B. and MacAlister T.J., Clonal analysis of cytotoxic T-cell response against human melanoma, *J. Exp. Med.* 158 (1983):240-244
- [81] Nishikawa H., Kato T., Tanida K., Hiara A., Tawara I., Ikeda H., Ikarashi Y., Wakasugi H., Kronenberg M., Nakayama T., Taniguchi M., Kuribayashi K., Old L.J. and Shiku H., CD4+ CD25+ T cells responding to serologically identified autoantigens suppress antitumor immune responses, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 (2003):10902-10906
- [82] Nishikawa H., Tanida K., Ikeda H., Sakakura M., Miyahara Y., Aota T., Mukai K., Watanabe M., Kuribayashi K., Old L.J. and Shiku H., Role of SEREX-defined immunogenic wild-type cellular molecules in the development of tumor-specific immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (2001):14571-14576
- [83] Ogush T., Takahashi S., Takeuchi T., Urano T., Horie-Inoue K., Kumagai J., Kitamura T., Ouchi Y., Muramatsu M. and Inoue S., Estrogen receptor-binding fragment-associated antigen 9 is a tumor-promoting and prognostic factor for renal cell carcinoma, *Cancer Res.* 65 (2005):3700-3706
- [84] Okada H., Attanucci J., Giezeman-Smits K.M., Brissette-Storkus C., Fellows W.K., Gambotto A., Pollack L.F., Pogue-Geile K., Lotze M.T., Bozik M.E. and Chambers W.H., Immunization with an antigen identified by cytokine tumor vaccine-assisted SEREX (CAS) suppressed growth of the rat 9L Glioma in Vivo, *Cancer Res.* 61 (2001):2625-2631

-
- [85] Old L.J., Cancer Immunology: The search for Spezifity – G.H.A.Clowes
Memorial Lecture, Cancer Res. 41(1981):361-375
- [86] Ono T., Sato S., Kimura N., Tanaka M., Shibuya A., Old L.J.and Nakayama E.,
Serological analysis of BALB/C methylcholanthrene sarcoma meth a by SEREX:
Identification of a cancer/testis antigen, Int. J. Cancer 88 (2000):845-851
- [87] Pantel K., Johnson J.P. und Riethmüller G., Kap. 31 Solide Tumoren,
Immunologie 4. Aufl.:597-606
- [88] Paul A. and Brunn Jr., Immune therapy for lung cancer, Am. J. Respir. Cell. Mol.
Biol. 21 (1999):12-22
- [89] Pieper R., Christian R.E., Gonzales M.I., Nishimura M.I., Gupta G., Settlage R.E.,
Shabanowitz J., Rosenberg S.A., Hund D.F., and Topalian S.L., Biochemical
identification of a mutated human melanoma antigen recognized by CD4+ T cells, J.
Exp. Med. 189 (1999):757-766
- [90] Peters H.D., Adjuvante Therapie mit einer Tumorzellvakzine beim
Nierenzellkarzinom, Onkologe 10 (2004):189-192
- [91] Preuss K.D., Zwick C., Bormann C., Neumann F. and Pfreundschuh M., Analysis
of the B-cell repertoire against antigens expressed by human neoplasms, Immunol.
Rev. 188 (2002):43-50
- [92] Renner C., Hartmann F., Jung W., Deisting C., Juwana M. and Pfreundschuh M.,
Initiation of humoral and cellular immune response in patients with refractory
Hodgkin's disease by treatment with an anti-CD 16/CD 30 bispezifische antibody, Canc.
Immunol. Immunother. 49 (2000):173-180
- [93] Ridell S.R., Watanabe K.S., Goodrich J.M., Li C.R., Agha M.E. and Greenberg
P.D., Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive
transfer of T cell clones, Science 257 (1992):238-241
- [94] Robinson W.H., Di Gennaro C., Hueber W., Haab B.B., Kamachi M., Dean E.J.,
Fournel S., Fong D., Genovese M.C., de Vegvar H.E., Skriner K., Hirschberg D.L.,
Morris R.I., Muller S., Pruijin G.J., van Venrooig W.J., Smolen J., Brown P.O.,
Steinmann L. and Utz P.J., Autoantigen microarrays for multiplex characterization of
autoantibody responses, Nat. Med. 8 (2002):295-301

- [95] Rongcun Y., Salazar-Onfray F., Charo J., Malmberg K.J., Evrin K., Maes H., Kono K., Hising C., Petersson M., Larsson O., Lan L., Appella E., Sette A., Celis E. and Kiessling R., Identification of new Her2/neu-derived peptid epitopes that can elicit specific CTL against autologous and allogeneic carcinomas and melanomas, *J. Immunol.* 163 (1999):1037-1044
- [96] Rooney C.M., Smith C.A., Ng C.Y., Loftin S.K., Sixbey J.W., Gan Y., Srivastava D.K., Bowman L.C., Krance R.A., Brenner M.K. and Heslop H.E., Infusion of cytotoxic T cells for the prevention and treatment of Epstein-Barr-virus-induced lymphoma in allogeneic transplant recipients, *Blood* 92 (1998):1549-1555
- [97] Rosenberg S.A., Development of cancer immunotherapies based on identification of the genes encoding cancer regression antigens, *J. Natl. Cancer Inst.* 88 (1996):1635-1644
- [98] Rosenberg S.A., Lotze M.T., Muul L.M., Leitman S., Chang A.E., Ettinghausen S.E., Matory Y.L., Skibber J.M., Shiloni E. and Vetto J.T., Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer, *N. Engl. J. Med.* 313 (1985):1485-1492
- [99] Rubin I. and Yarden Y., The basic biology of Her2, *Ann. Oncol.* 12 Suppl 1 (2001):3-8
- [100] Sahin U., Türeci Ö. and Pfreundschuh M., Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995):11810-11813
- [101] Sahin U., Türeci Ö. and Pfreundschuh M., Serological identification of human tumor antigens, *Curr. Opin. Immunol.* 9 (1997):709-716
- [102] Sahin U., Türeci Ö. und Pfreundschuh M., Vom Immunsystem erkennbare Antigene auf menschlichen Malignomen, *Onkologie* 5 (1999):696-667
- [103] Scanlan M.J., Gout I., Gordon C.M., Williamson B., Stockert E., Gure A.O., Jager D., Chen Y.T., Mackay A., O'Hare M.J. and Old L.J., Humoral immunity to human breast cancer:antigen definition and quantitative analysis of mRNA expression, *Cancer Immun.* 30 (2001):1-4

- [104] Scanlan M.J., Gure A.O., Jungbluth A.A., Old L.J. and Chen Y.T., Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy, *Immunol. Rev.* 188 (2002):22-32
- [105] Scardino A., Alves P., Gross D.A., Tourdot S., Graff-Dubois S., Angevin E., Firat H., Chouaib S., Lemonnier F., Nadler L.M., Cardoso A.A. and Kosmatopoulos K., Identification of HER-2/neu immunogenic epitopes presented by renal cell carcinoma and other human epithelial tumors, *Eur. J. Immunol.* 31 (2001):3261-3270
- [106] Schmits R., Cochlovius B., Treitz G., Regitz E., Ketter R., Preuss K.D., Romeike B.F. and Pfreundschuh M., Analysis of the antibody repertoire of astrocytoma patients against antigen expressed by gliomas, *Int. J. Cancer* 98 (2002):73-77
- [107] Seiler S., Kirchner J., Horn C., Kallipolitou A., Woehlke G. and Schliwa M., Cargo binding and regulatory sites in the tail of fungal conventional kinesin, *Nat. Cell Biol.* 2 (2000):333-338
- [108] Seki N., Ohira M., Nagare T., Ishikawa K., Miyajima N., Nakajima D., Nomura N. and Ohara O., Characterization of cDNA clones in size-fractionated cDNA libraries from human brain, *DNA Res.* 4 (1997):345-349
- [109] Seliger B. und Huber C., „Immune escape“-Mechanismen von humanen Tumoren, *Onkologie* 5 (1999):668-678
- [110] Shalet S.M., Beardwell C.G., Aarons B.M. and Morris-Jones P.H., Pituitary function after treatment of intracranial tumors in children, *Lancet* 2 (1975):104-107
- [111] Shalet S.M., Clayton P.E. and Price D.A., Growth and pituitary function in children treated for brain tumors or acute lymphoblastic leukaemia, *Horm. Res.* 30 (1988):53-61
- [112] Shevach E.M., Fatal attraction: tumors beckon regulatory T cells, *Nat. Med.* 10 (2004):900-901
- [113] Slager E.H., Borghi M., Van der Minne C.E., Aarnoudse C.A., Havenga M.J., Schrier P.I., Osanto S. and Criffioen M., CD4+ and TH2 cell recognition of HLA-DR-restricted epitopes derived from CAMEL: a tumor antigen translated in an alternative open reading frame, *J. Immunol.* 170 (2003):1490-1497
- [114] Slingluff C.L.Jr., Hunt D. and Engelhard V.H., Direct analysis of tumor-associated peptid antigens, *Curr. Opin. Immunol.* 6 (1994):733-774

- [115] Stock M.F., Guerrero J., Cobb B., Eggers C.T., Huong T.G., Li X. and Hackney D.D., Formation of the compact conformer of kinesin requires a COOH-terminal heavy chain domain and inhibits microtubule-stimulated ATPase activity, *J. Biol. Chem.* 274 (1999):14617-14623
- [116] Stockert E., Jäger E., Chen Y.T., Scanlan M.J., Gout I., Karbach J., Arand M., Knuth A. and Old L.J., A survey of the humoral immune response of cancer patients to a panel of human tumor antigens, *J. Exp. Med.* 187 (1998):1349-1354
- [117] Struss AK., Romeike B.F., Munnia A., Nastainczyk W., Steudel W.I., König J., Ohgaki H., Feiden W., Fischer U. and Meese E., PHF3-specific antibody response in over 60% with glioblastoma multiforme, *Oncogene* 20 (2001):4107-4114
- [118] Thanner F., Sutterlin M.W., Kapp M., Rieger L., Dietl J., Gassel A.M. and Müller T., Heat-shock protein 70 as a prognostic marker in node-negative breast cancer, *Anticancer Res.* 23 (2003):1057-1062
- [119] Tsai V., Kawashima I., Keogh E., Daly K., Sette A. and Celis E., In vitro immunization and expansion of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes for adoptive immunotherapy using peptid-pulsed dendritic cells, *Crit. Rev. Immunol.* 18 (1998):65-75
- [120] Tsuda H., Takarabe T., Kanai Y., Fukotomi T. and Hirohashi S., Correlation of DNA hypomethylation at pericentromeric heterochromatin regions of chromosomes 16 and 1 with histological features and chromosomal abnormalities of human breast carcinomas, *Am. J. Pathol.* 161 (2002):859-866
- [121] Tureci Ö., Sahin U. and Pfreundschuh M., Serological analysis of human tumor antigens : molecular definition and implications, *Mol. Med. Today* 8 (1997):342-349
- [122] Tureci O., Sahin U., Zwick C., Koslowski M., Seitz G. and Pfreundschuh M., Identification of a meiosis-specific protein as a member of the class of cancer/testis antigens, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998):5211-5216
- [123] Tureci O., Schmitt H., Fadle N., Pfreundschuh M. and Sahin U., Molecular Definition of a Novel Human Galectin which is immunogenic in patients with Hodgkin Disease, *J. Biol. Chem.* 272 (1997):6416-6422
- [124] Untch M., Ditsch N. and Hermelink K., Immunotherapy: new options in breast cancer treatment, *Expert. Rev. Anticancer Ther.* 3 (2003):403-408

- [125] Valmori D., Dutoit V., Lienard D., Rimordi D., Pittet M.J., Champagne P., Ellefsen K., Sahin U., Speiser D., Lejeune F., Cerottini J.-C. and Romero P., Naturally occurring human lymphocyte antigen-A2 restricted CD8+ T-cell response to the cancer testis antigen NY-ESO-1 in melanoma patients, *Can. Res.* 60 (2000):4499-4506
- [126] Verhey K.J., Lizott D.L., Abromson T., Barenboim L., Schnapp B.J. and Rapoport T.A., Light chain-dependent regulation of kinesin's interaction with microtubules, *J. Cell Biol.* 143 (1998):1053-10566
- [127] Wang R.F., The role of MHC class II-restricted tumor antigens and CD4+ T cells in antitumor immunity, *Trends Immunol.* 22 (2000):269-276
- [128] Wang R.F. and Rosenberg S.A., Human tumor antigens recognized by lymphocytes: implication for cancer therapy. *J. Leukoc. Biol.* 60 (1996):296-309
- [129] Wang X.B., Zhao B.F., Zhao Q., Piao J.H., Liu J., Lin Q. and Huang H.L., A new recombinant single chain trispecific antibody recruits T lymphocytes to kill CEA (carcinoma embryonic antigen) positive tumor cells in vitro efficiently, *J. Biochem.* 135 (2004):555-565
- [130] Wing K., Suri-Payer E. and Rudin A., CD4+ CD25+ regulatory T cells from mouse to man, *Scand. J. Immunol.* 62 (2005):1-15
- [131] Wolff J.E., Huettermann U., Ritter J., Straeter R., Palm D., Ruebe C., Kraehling K.H. and Jurgens H., Medulloblastoma: Experience of a single institution, *Klin. Pädiatrie* 210 (1998):234-238
- [132] Yamaguchi K., Goto N., Kyuwa S., Haymami M. and Toyoda Y., Protection of mice from a lethal coronavirus infection in the central nervous system by adoptive transfer of virus-specific T cell clones, *J. Neuroimmunol.* 32 (1991):1-9
- [133] Yang J., Xiaoqing L., Guohua Y., Adamian M., Bulgakov O. and Li T., Rootlin, A novel coiled-coil protein, is a structural component of the ciliary rootlet, *J. Cell Biol.* 159 (2002):431-440
- [134] Zeltzer P.M., Boyett J.M., Finlay J.L., Albright A.L., Rorke L.B., Milstein J.M., Allen J.C., Stevens K.R., Stanley P., Li H., Wisoff J.H., Geyer J.R., McGuire-Cullen P., Stehbens J.A., Shurin S.B. and Packer R.J., Metastasis stage, adjuvant treatment and residual tumor are prognostic factors for medulloblastoma in children :

conclusions from the Children's Cancer Group 921 randomized phase III study., J.
Clin. Oncol. 17 (1999):832-845

- [135] Zhong X., Ran Y.L., Lou J.N., Hu D., Yu L., Zhang Y.S., Zhou Z. and Yang Z.H.,
Construction of human liver cancer vascular endothelium cDNA expression library
and screening of the endothelium-associated antigen genes, Worl of Gastroenterology
15 (2004):1402-1408

VIII.3 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1:	Das <i>SEREX</i> -Verfahren	11
Abbildung 2:	Polylinker und Enzymschnittstellen auf dem p-Bluescript SK (+/-) Phagemid	35
Abbildung 3:	Identifikation eines Antigen- bzw. IgG-kodierenden Klons durch das IgG-Ausschlußverfahren	38
Abbildung 4:	Monoklonalisierung eines positiven Klons	39
Abbildung 5:	Restriktionsanalyse der rekombinanten pBlueskript-Vektoren	40
Abbildung 6:	Sequenz des Inserts <i>MU-MB-2.32</i>	41
Abbildung 7:	Sequenz des Inserts <i>MU-MB-2.42</i>	43
Abbildung 8:	Sequenz des Inserts <i>MU-MB-2.50</i>	44
Abbildung 8:	Sequenz des Inserts <i>MU-MB-2.76</i>	45
Abbildung 10:	Homologie des Inserts <i>MU-MB-2.32</i> mit genomischer DNA	46
Abbildung 11:	Homologie des Inserts <i>MU-MB-2.42</i> mit KIAA0445 mRNA	47
Abbildung 12:	Homologie des Inserts <i>MU-MB-2.50</i> mit Kinesin-2-mRNA	48
Abbildung 14:	Homologie des Inserts <i>MU-MB-2.76</i> mit KIAA1358 mRNA	48
Tabelle 1:	Ergebnis des Screening der Medulloblastom-cDNA-Expressionsbibliothek	37
Tabelle 2:	Ak-Titer in sequentiell entnommenen autologen Serumproben	49
Tabelle 3:	Ergebnis der heterologen Serumanalyse	51

VIII.4 Curriculum vitae

Persönliche Daten:

Name: Inken Schneider
Geburtsdaten: 24.12.1974 in Göttingen
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch
Anschrift, privat: Balanstr. 16, 81669 München

Beruflicher Werdegang:

Hochschulreife: 15.06.1994 am Hainberg-Gymnasium in Göttingen
Studium: Humanmedizin von SS1995 bis WS 2002/03 an der Ludwig-Maximilians-Universität München
Examina: 19.03.1998: Ärztliche Vorprüfung
29.08.2000: Erstes Staatsexamen
27.08.2001: Zweites Staatsexamen
15.10.2002: Drittes Staatsexamen
alle erfolgreich an der LMU München absolviert
ÄiP: 01.01.03 - 30.06.04 in der Kinderchirurgie
am Dr. von Haunerschen Kinderspital, München
Assistenzärztin: 01.12.04 - 30.11.05, Kinderklinik Dritter Orden, Passau
seit 01.12.05, Kinderklinik im Klinikum Rosenheim

VIII.5 Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Stefan Burdach für die fachliche Unterstützung und Förderung meiner Arbeit.

Mein ausdrücklicher Dank gilt Frau Dr. med. Uta Behrends für die Überlassung des Themas, die Einführung in die wissenschaftliche Arbeit und die jederzeit umfassende und geduldige Betreuung sowie die effizienten Korrekturen.

Herrn Dr. rer. nat. Josef Mautner danke ich herzlich für die Einführung in die SEREX-Methodik und der jederzeit hilfsbereiten und geduldigen Betreuung im Labor.

Ebenso möchte ich mich bedanken bei Patrick Jung für die moralische und technische Unterstützung besonders in der letzten Phase meiner Arbeit.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern danken, daß sie mir das Studium ermöglicht haben und mir jegliche Unterstützung gewährten und somit auch zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.