

Identifikation von Tumorantigenen des
embryonalen Rhabdomyosarkoms
durch serologische Analyse einer Tumor-cDNS
Expressionsbibliothek (SEREX)
mit Untersuchung ihrer cDNS-Sequenz,
mRNS-Expression und Immunogenität

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

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

Identifikation von Tumorantigenen des embryonalen
Rhabdomyosarkoms
durch serologische Analyse einer Tumor-cDNA
Expressionsbibliothek (SEREX)
mit Untersuchung ihrer cDNA-Sequenz, mRNA-Expression
und Immunogenität

Carola Götz

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. Th. A. Meitinger
3. Univ.-Prof. Dr. J. Schlegel

Die Dissertation wurde am 02.11.2005 bei der Technischen Universität München eingereicht und
durch die Fakultät für Medizin am 27.09.2006 angenommen.

Gewidmet

Nini, Hubsi und Opi

Abkürzungsverzeichnis

<i>1. Einleitung</i>	1
1.1. Einführung in das Arbeitsthema	1
1.2. Fragestellung der Arbeit	2
1.3. Rhabdomyosarkome	3
1.3.1. Histopathologie	3
1.3.2. Molekularpathologie	4
1.3.3. Stadieneinteilung	5
1.3.4. Häufigkeit und Verteilung	6
1.3.5. Prognose	6
1.3.5.1. Klassische prognostische Parameter	6
1.3.5.2. Neue prognostische Parameter	7
1.3.6. Therapie	7
1.3.6.1. Konventionelle Behandlungsverfahren	7
1.3.6.2. Experimentelle Behandlungsverfahren	9
1.3.6.2.1. Immuntherapeutische Ansätze	9
1.3.6.2.2. Andere experimentelle, therapeutische Ansätze	9
1.4. Tumorantigene	10
1.4.1. Definition	10
1.4.2. Molekulare Struktur bekannter Tumorantigene	11
1.4.3. Tumorantigene von Rhabdomyosarkomen	13
1.5. Methoden zur Identifikation von Tumorantigenen	14
1.5.1. T-Zell-Verfahren	14
1.5.2. SEREX-Methode	15
1.6. Tumorimmuntherapie	20
1.6.1. Antigen-unspezifische Tumorimmuntherapie	20
1.6.2. Antigen-spezifische Tumorimmuntherapie	20
1.6.3. Tumorimmuntherapie für Sarkome	22
<i>2. Material</i>	19
2.1. Biologisches Material	19
2.1.1. Tumor cDNS-Expressionsbibliothek	19
2.1.2. Bakterien	19
2.1.3. Phagen	20
2.1.4. Serumproben	20
2.1.5. Sekundärantikörper	20
2.1.6. Gesamtzelluläre RNS und DNS aus Gewebe	20
2.1.7. Genomische DNS aus autologen Fibroblasten	21
2.2. Oligonukleotide	21

2.3. Chemikalien	23
2.4. Enzyme	24
2.5. Kits	24
2.6. Verbrauchsmaterial	24
2.7. Software und Datenbanken	24
2.8. Geräte	35
3. Methoden	27
3.1. SEREX	27
3.1.1. Bakterienanzucht	27
3.1.2. Transfektion mit λ -Phagen	28
3.1.3. Kultur der transfizierten Bakterien auf Agarplatten	29
3.1.4. Übertragung der Proteine auf Nitrozellulose-Folien	29
3.1.5. Inkubation der Folien mit Patientenserum	30
3.1.6. Inkubation der Folien mit ALP-markierten Zweitantikörper	30
3.1.7. Alkalische Phosphatase-Färbung	30
3.1.8. Isolation positiver Klone	31
3.1.9. Ausschluss von IgG-Klonen und Färbeartefakten	31
3.1.10. Vereinzelung positiver Klone	32
3.1.11. Vermehrung der positiven Phagen	32
3.1.12. Bestimmung des Phagentiters	33
3.2. Differentielle serologische Analyse SEREX-definierter Antigene	33
3.3. DNS-Präparation	34
3.3.1. Subklonierung durch „in vivo Exzision“	34
3.3.2. Mini-Präparation von Plasmid-DNS	37
3.3.3. Maxi-Präparation von Plasmid-DNS	37
3.4. DNS-Analyse	38
3.4.1. Bestimmung der Länge der cDNS-Inserts	38
3.4.1.1. DNS-Verdau mit Restriktionsenzymen	38
3.4.1.2. Agarose-Gelelektrophorese	38
3.4.2. Isolation von PCR-Produkten aus dem Agarosegel	39
3.4.3. Sequenzanalyse	39
3.5. mRNA Expressionsanalyse	40
3.5.1. RT-PCR	40
3.5.1.1. Reverse Transkription (RT)	40
3.5.1.2. Polymerasekettenreaktion (PCR)	40
3.5.2. Southern-Blot-Hybridisierung	41
3.5.2.1. Blotting auf Nylonmembranen	41
3.5.2.2. Radioaktive Hybridisierung	41

4. Ergebnisse	43
4.1. Isolierung und molekulare Charakterisierung SEREX-definierter RMS-Antigene	43
4.2. Untersuchungen zur Immunogenität der Antigene	74
4.2.1. Differentielle serologische Analyse	75
4.2.2. SEREX-Datenbankrecherche zur Immunogenität	77
4.2.3. Literaturrecherche zur Immunogenität	81
4.3. Untersuchungen zur Expression der Antigene	84
4.3.1. Literatur und Datenbank-Recherche zur Expression	84
4.3.2. mRNA-Expressionsanalyse mithilfe der RT-PCR	88
5. Diskussion	95
5.1. Die Tumorantigengruppe MU-RMS-40.10	96
5.2. Die Tumorantigene MU-RMS-40.1 und -40.14	100
5.3. Die Tumorantigengruppen MU-RMS-40.6, -40.9, -40.5, -40.17	102
5.4. Die Antigenfamilien MU-RMS-40.4, -40.11, -40.15, -40.18 und -40.21	105
5.5. Die Autoantigene MU-RMS-40.2, -3, -7, -8, -12, -13, -16, -19, -20, -22, -23	108
6. Zusammenfassung	115
7. Literaturverzeichnis	117
8. Anhang	I
8.1. Lebenslauf	I
8.2. Danksagung	III

Abkürzungsverzeichnis

AChR	Acetylcholin-Rezeptor
Ak	Antikörper
ALL	Akute lymphatische Leukämie
ALP	Alkalische Phosphatase
Amp	Ampicillin
aRMS	alveoläres Rhabdomyosarkom
AS	Aminosäure
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
AZ	Astrozytom
bp	Basenpaar
CA	Karzinom
CT-Antigene	<i>Cancer testis</i> -Antigene
CTL	Zytotoxischer T-Lymphozyt
CWS	Kooperative Weichteilsarkom Studie
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxyribonukleotid-Triphosphat
cDNS	komplementäre DNS
dsDNS	doppelsträngige DNS
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
eRMS	embryonales Rhabdomyosarkom
ET	Ewing-Tumor
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
GPOH	Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie
GSF	Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HB	Hepatoblastom
HL	Hodgkin Lymphom
HNPCC	Hereditäres nicht-polypöses Kolon Karzinom (<i>hereditary non-polyposis colorectal carcinoma</i>)
HTL	Helfer-T-Lymphozyt
Hsp90	Hitzeschockprotein 90 (<i>heat shock protein 90</i>)
hyb	Hybridisierungssonde
IGF	<i>insulin-like growth factor</i>
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalacto-Pyranosid
IRS	<i>Intergroup Rhabdomyosarcoma Study</i>
kb	Kilobasen

kg	Kilogramm
l	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase
LOH	Verlust des Heterozygotenstatus (<i>loss of heterozygosity</i>)
MB	Medulloblastom
MHC	Major Histokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
MG	Myasthenia Gravis
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
min	Minute
ml	Milliliter
MRD	Minimale Resterkrankung (<i>minimal residual disease</i>)
mRNS	Boten-RNS (<i>messenger RNS</i>)
NB	Neuroblastom
NBT	Tetrazoliumbromid
NHL	Non-Hodgkin Lymphom
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen
OS	Osteosarkom
p	Plasmid
PBL	periphere mononukleäre Blutzellen (<i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pfu	<i>plaque forming units</i>
RMS	Rhabdomyosarkom
RNS	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
RT-PCR	RT mit nachfolgender PCR
SEREX	<i>serological analysis of recombinant cDNA-expression libraries</i>
snp	<i>single nucleotid polymorphism</i>
TAA	Tumorassoziertes Antigen
TAE	Tris Acetat EDTA
TBS	TRIS-NaCl
TBS-T	TRIS gepufferte Saline mit TWEEN
Tet	Tetracyclin
THL	T-Helfer-Lymphozyt
TUM	Technische Universität München
U	<i>units</i>
ÜN	über Nacht
3'UTR	3'-untranslatierte Region
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
X-Gal	Chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid

1. Einleitung

1.1. Einführung in das Arbeitsthema

Rhabdomyosarkome (RMS) sind hochmaligne embryonale Weichteiltumoren und zählen zu den häufigsten soliden malignen Tumoren des Kindesalters (Übersicht bei Meyer et Spunt 2004). Die Inzidenz in der weißen Bevölkerung beträgt 4,4 Fälle pro 1 Million Kinder unter 15 Jahren pro Jahr. RMS gehen von undifferenzierten, pluripotenten Mesenchymzellen aus und werden histopathologisch in einen selteneren alveolären (aRMS) und einen häufigeren embryonalen (eRMS) Subtyp unterteilt. Letzterer ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Mithilfe multimodaler Therapieprotokolle werden heutzutage ca. 70 % der Patienten mit lokalisiertem RMS dauerhaft geheilt. Im Gegensatz dazu überleben derzeit trotz intensiverer Behandlung nur ca. 20 % der Patienten mit metastasierter Erkrankung. Die toxische Kombinationstherapie birgt das Risiko unerwünschter Spätfolgen wie etwa Kardiomyopathie, Leber- und Nierenschäden oder die Entwicklung von Zweitmalignomen. Um die therapiebedingte Morbidität zu vermindern und die Heilungsrate zu verbessern, hat man deshalb in den letzten Jahren nach ergänzenden neuen Therapieansätzen gesucht.

Die Beobachtung spontaner Regressionen bei verschiedenen Karzinomen des Erwachsenenalters aber auch bei Neuroblastomen von Kindern führte zu der Annahme, dass bestimmte Tumorproteine als Antigene fungieren und im Patienten eine tumor-spezifische Immunantwort auslösen können, welche die Elimination von Tumorzellen bewirkt.

Die Identifizierung tumorassoziierter Antigene (TAA) stellt die Grundlage antigenspezifischer Immuntherapiestrategien dar. Mit Hilfe von Antigenen, die ausschließlich oder überwiegend von Tumorgewebe exprimiert werden, werden Tumorzellen entwickelt, die die Heilungsrate über humorale und zelluläre Effektormechanismen verbessern sollen, ohne dabei die Toxizität der Therapie wesentlich zu erhöhen. Erste immuntherapeutische Studien an Patienten mit verschiedenen soliden Tumoren und hämatologischen Neoplasien sind in Deutschland angelaufen.

TAA sind nicht nur im Hinblick auf immuntherapeutische Ansätze interessant, sondern können darüberhinaus von diagnostischer und prognostischer Relevanz sein. Der sensitive Nachweis von tumorspezifisch exprimierten Transkripten z.B. in Knochenmark, Lymphknoten oder Blut, aber auch der serologische Nachweis von Antikörpern (Ak) gegen TAA kann beim Screening auf Tumorerkrankungen, zur Beurteilung des Therapieerfolges oder zur Früherkennung von Rezidiven geeignet sein.

Im Verlauf der letzten Jahrzehnte wurden verschiedene Verfahren zur Identifizierung von Tumorantigenen entwickelt. 1970 etablierte Lloyd Old das Verfahren der „autologen Typisierung“, bei dem autologe Tumorzellen, normale Zellen und Serum in umfangreiche Absorptionsanalysen

eingesetzt wurden. Lloyd Old konnte mit der „autologen Typisierung“ zeigen, dass Ak im Serum von Tumorpatienten an Strukturen binden, die nur von autologen Tumorzellen, nicht aber von normalen autologen Zellen exprimiert werden. Diese Beobachtung lieferte Hinweise auf das Vorhandensein tumorspezifischer Antigene und auf die Induktion einer spezifischen humoralen Immunantwort bei Tumorpatienten. Lloyd Old standen jedoch noch nicht die notwendigen molekularbiologischen Techniken zur molekularen Charakterisierung dieser Antigene zur Verfügung.

Einige Jahre später wurden verschiedene Verfahren beschrieben, die die Identifizierung und molekulare Charakterisierung von Tumorantigenen mithilfe tumor-spezifischer autologer T-Lymphozyten erlaubten. Diese Verfahren sind jedoch alle von der Verfügbarkeit etablierter Tumorzelllinien für die repetitive T-Zell-Stimulation und weiter von der erfolgreichen Generation tumorspezifischer T-Zell-Klone abhängig. Die meisten Malignome, so auch das RMS, sind jedoch schwer *in vitro* zu kultivieren, und die Generation von T-Zell-Klonen ist langwierig und nicht selten unmöglich.

Im Gegensatz dazu ist das von Michael Pfreundschuh und seinen ehemaligen Mitarbeitern Ugur Sahin und Özlem Türeci entwickelte SEREX-Verfahren („*Serological Analysis of Recombinant cDNA Expression Libraries*“) zur Identifizierung von Tumorantigenen weder abhängig von der Verfügbarkeit tumorspezifischer T-Zell-Klone noch von der Proliferation von Tumorzellen *in vitro*. Dieses Verfahren nutzt die humorale Immunantwort als Sonde zur Identifizierung von TAA in einer cDNA-Expressionsbibliothek aus primärem Tumorgewebe. Das Verfahren stellt eine indirekte Methode dar, um Antigene zu identifizieren, die von CD4-positiven Helfer-T-Lymphozyten (HTL) und teilweise von CD8-positiven, zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) erkannt werden.

SEREX-Analysen führten in den letzten zehn Jahren zur Identifikation von mehr als 1000 tumor-assoziierten Antigenen verschiedener Tumorentitäten. Zunächst waren mit diversen Karzinomen überwiegend Malignome untersucht worden, die typischerweise im Erwachsenenalter auftreten. Typische Tumoren des Kindesalters wurden erst kürzlich zum Gegenstand systematischer Tumorantigen-Suchen. RMS wurden bislang mit keiner der genannten Antigen-Suchverfahren einschließlich der SEREX-Methode untersucht.

1.2. Fragestellung der Arbeit

Hinweise darauf, dass RMS vom Immunsystem erkannt werden und Zielstrukturen für immuntherapeutische Verfahren aufweisen könnten, lieferten unterschiedliche Befunde. Zum einen konnten kürzlich Tumorantigen-Transkripte, die ursprünglich in anderen Tumorentitäten identifiziert worden waren, mithilfe der Reversen Transkription und Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) auch in RMS-Gewebe nachgewiesen werden. Zum anderen wurde über Erkennung eines RMS-spezifischen Fusionsproteins durch periphere T-Lymphozyten berichtet.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten deshalb Tumorantigene des eRMS identifiziert werden. Als Suchverfahren sollte die SEREX-Methode eingesetzt und ihre Effizienz durch gleichzeitige Anwendung von Seren mehrerer RMS-Patienten gesteigert werden.

Um die mögliche klinische Bedeutung der SEREX-definierten Antigene näher aufzuklären, sollten die cDNS-Sequenzen der klonierten Antigene zunächst einer Homologierecherche anhand großer cDNS-Datenbanken zugeführt werden. Die Homologierecherche sollte anzeigen, ob es sich bei den Antigenen um bekannte, molekular alterierte oder neue Genprodukte handelte.

Um die Spezifität der humoralen Immunantwort zu klären, sollte anschließend getestet werden, ob antigenspezifische Ak auch im Serum von Gesunden und/oder von anderen pädiatrischen Patienten mit derselben oder einer anderen malignen Erkrankung vorkommen. Diese Untersuchungen sollten Autoantigene von Tumorantigenen unterscheiden und Hinweise darauf geben, ob ein Tumorantigen nur individuell oder im Sinne eines gemeinsamen Antigens für die Behandlung mehrerer Patienten von Bedeutung sein könnte.

Um das Expressionsmuster der interessantesten Antigene zu beschreiben, sollten schließlich RT-PCR-Analysen an gesunden und maligne transformierten Geweben durchgeführt werden. Diese Experimente sollten Antigene mit möglicherweise tumorspezifischen Epitopen identifizieren, da diese für die Entwicklung gut verträglicher Vakzine entscheidend sind. Besonderes Augenmerk sollte bei den Expressionsanalysen auf neue Proteine und Antigene mit neuen molekularen Charakteristika gelegt werden.

1.3. Rhabdomyosarkome

1.3.1. Histopathologie

RMS zeigen histologisch, immunhistochemisch und elektronenmikroskopisch eine eindeutig erkennbare Differenzierung von Skelettmuskelfasern oder ihren Vorstufen, den Rhabdomyoblasten. Histologisch werden bei den im Kindesalter vorkommenden RMS das embryonale (eRMS) und das alveoläre RMS (aRMS) unterschieden (Parham et al. 2001).

Beim eRMS, das ca. 70 % der RMS im Kindesalter ausmacht und vorwiegend im Kopf-, Hals- und Urogenitalbereich lokalisiert ist, findet man Zellen aller Stadien der Myogenese. Die kleinen, runden, weniger differenzierten Zellen haben einen hyperchromatischen Kern und wenig eosinophiles Zytoplasma. Neben diesen weniger differenzierten Zellen zeigen die besser differenzierten spindelförmigen Zellen eine Querstreifung. Subtypen des eRMS sind das spindelzellige und das botryoide RMS. Die botryoide Variante, die fast ausschließlich bei Kindern gefunden wird, weist eine subepitheliale dichte Schicht aus kleinzelligen, undifferenzierten Tumorzellen auf. Die „traubenähnliche“ Form, in der diese Tumoren auftreten, gab dieser Variante ihren Namen (Newton et al. 1995, Parham et al. 2001).

Das aRMS zeigt ein charakteristisches Gewebemuster in Form von bindegewebigen Septen, die an pulmonale Alveolen erinnern. Ein Teil der kleinen, runden Tumorzellen haften diesen alveolären Strukturen an, während die übrigen Zellen in Haufen innerhalb dieser sogenannten Alveolen liegen. Zu dieser Kategorie der RMS wird der solide alveoläre Tumor gerechnet, der durch das Fehlen bindegewebiger Septen gekennzeichnet ist (Parham et al. 2001). Häufige Lokalisation des aRMS, das im Erwachsenenalter häufiger auftritt als im Kindesalter, sind die Extremitäten.

1.3.2. Molekularpathologie

Für die beiden histopathologischen Untergruppen wurden verschiedene charakteristische Veränderungen auf molekularer Ebene gefunden, die möglicherweise bei der Pathogenese eine Rolle spielen.

Als charakteristische molekulare Veränderung für das aRMS wurde die Translokation zwischen dem langen Arm von Chromosom 2 und dem langen Arm von Chromosom 13 [t(2;13)(q35;q14)] beschrieben (Turc-Carel et al. 1986, Olsen et al. 2002). Diese Translokation bewirkt die Fusion des *PAX3*-Gens mit dem *FKHR*-Gen. Man vermutet, dass das *PAX3*-Gen während der frühen muskulären Entwicklung die Transkription steuert. Das *FKHR*- (Forkhead) Gen ist ebenfalls ein Transkriptionsfaktor (Dagher et Helman 1999). Wesentlich seltener fusioniert das *FKHR*-Gen auf Chromosom 13 mit dem *PAX7*-Gen auf Chromosom 1 [t(1;13)(p36;q14)]. Zytogenetische Untersuchungen haben gezeigt, dass etwa 70 % der aRMS die Translokation t(2;13)(q35;q14) bzw. t(1;13)(p36;q14) aufweisen (Gil-Benso et al. 2003). Patienten, deren Tumor das *PAX3*-*FKHR* Protein exprimieren sind oft älter und haben eine schlechtere Prognose als diejenigen Patienten, deren Tumor die Fusion des *PAX7*-Gens mit dem *FKHR*-Gen aufweist (Kelly et al. 1997, Raney et al. 2001_(1,2)).

Im Gegensatz zum aRMS sind diese Translokationen beim eRMS nicht nachzuweisen. Demgegenüber findet man beim eRMS häufig einen Verlust der Heterozygotie an der Stelle des kurzen Arms von Chromosom 11, an der das Gen für den *insulin-like growth factor II* (IGF-II) lokalisiert ist (11p15.5) (Scrable et al. 1989, Morison et Reeve 1998). Diese molekulare Veränderung bewirkt eine Überproduktion von IGF-II, was zu einer Stimulation von Tumorzellen und somit zum Wachstum des Tumors führt (El-Badry et al. 1990).

Neben dieser strukturellen Chromosomenveränderung wurden auch numerische Aberrationen beim eRMS beschrieben. Der DNS-Gehalt der einzelnen Tumorzellen kann zwischen dem 1,1- bis 1,8-fachen des DNS-Gehaltes einer normalen Zelle liegen. Neben diploiden Chromosomensätzen findet man auch hyperdiploide Chromosomensätze (Dagher et Helman 1999). Diese Veränderung in der Ploidie, die in Tumorzellen zur Verdoppelung von Chromosomenzahlen führt, wurde bei eRMS für die Chromosomen 2, 8, 12 und 13 beschrieben (Anderson et al. 1999, Pandita et al. 1999).

Für das eRMS wurde außerdem eine erhöhte Expression der fetalen Untereinheit des Acetylcholin-Rezeptorproteins (γ AChR) beschrieben (Gattenlöhner et al. 1998). Die mRNA von γ AChR kann als Target für die RT-PCR basierte Diagnose dienen.

Tumorsuppressorgene unterdrücken unter physiologischen Bedingungen die Wirkungen von wachstumsfördernden bzw. transformierenden Genen und kontrollieren so die Zellproliferation. Mutationen dieser Gene können zur Entstehung von malignen Tumoren führen. Eines dieser Tumorsuppressorgen-Produkte ist *p53*. Neben verschiedenen Tumoren wie Osteosarkomen, Ewing-Tumoren, Leiomyosarkomen und Liposarkomen wurden Veränderungen des *p53*-Gens auch bei RMS gefunden (de Alava et al. 2000, Toguchida et al. 1992, Latres et al. 1994, Hainaut et al. 1997, Takahashi et al. 2004). Bei RMS-Patienten, die zum Diagnosezeitpunkt jünger als drei Jahre waren, wurden Keimzellmutationen im *p53*-Gen dokumentiert (Diller et al. 1995).

Onkogene spielen bei der Vermittlung von Signalen von der Zelloberfläche in den Zellkern eine entscheidende Rolle und steuern so die Proliferation und Differenzierung einer Zelle. Ebenso wie bei den Tumorsuppressorgen können Mutationen innerhalb der Onkogene zu unkontrolliertem Wachstum von Tumorzellen führen. Mutationen des *ras* Onkogens sowie die veränderte Expression des *MET* Onkogens wurden beim RMS beschrieben (Pulciani et al. 1982, Chardin 1985, Ferracini 1996). Eine weitere Studie über RMS kam zu dem Schluss, dass die Amplifikation des *Myc* Onkogens, das für ein DNS-bindendes Protein kodiert, auf den alveolären Subtyp beschränkt ist (Dias et al. 1990).

Ob die beschriebenen Mutationen in Tumorsuppressorgen und Onkogenen an der Pathogenese des RMS beteiligt sind oder bei der Progression des Tumors entstehen, ist noch nicht eindeutig geklärt.

1.3.3. Stadieneinteilung

Derzeit existieren zwei verschiedene Systeme für die Stadieneinteilung von RMS.

Die postchirurgisch-histopathologische Stadieneinteilung erfolgt in Anlehnung an die *Intergroup Rhabdomyosarcoma Study* (IRS). Die Einteilung der Patienten in eine von vier Gruppen ist abhängig von der nach chirurgischer Resektion verbliebenen Tumorgroße und dem Vorhandensein von Metastasen zum Zeitpunkt der Diagnose. Obwohl diese Einteilung im Hinblick auf den Einsatz verschiedener Therapiekonzepte sinnvoll erscheint, gibt es auch Kritikpunkte. Die Beurteilung der Tumorgroße nach erfolgter Resektion ist abhängig von den technischen Möglichkeiten und der Erfahrung der Operateure. Dadurch wird ein Vergleich von Patienten, die in unterschiedlichen Krankenhäusern behandelt werden erschwert. Ein weiterer Kritikpunkt besteht darin, dass diese Stadieneinteilung wichtige prognostische Faktoren wie die Tumorgroße bei Diagnose und die Lokalisation des Tumors außer Acht lässt (Crist et al. 1990, Crist et al. 1995).

Das zur Zeit am weitesten verbreitete TNM-System berücksichtigt neben der Tumorgroße (T), dem Vorhandensein von regionaler Lymphknotenmetastasierung (N) und dem Vorhandensein von Fernmetastasen zum Zeitpunkt der Diagnose (M) die Lokalisation des Primärtumors (Dagher and Helman 1999).

1.3.4. Häufigkeit und Verteilung

RMS repräsentieren mit ca. 5 % aller pädiatrischen Malignome nach Neuro- und Nephroblastomen die dritthäufigste solide maligne Tumorentität des Kindesalters außerhalb des Gehirns und mit ca. 60 % die häufigsten Weichteiltumoren im Kindes- und Jugendalter (Nishi et Hatae 2004) (AWMF-025/007, 2002). Die Inzidenz in der weißen Bevölkerung beträgt 4,4 Fälle pro 1 Million Kinder unter 15 Jahren pro Jahr (Wurm et al. 2005).

Beim RMS findet man eine zweigipfelige Altersverteilung: Ca. 65 % der Fälle werden bei Kindern unter sechs Jahren diagnostiziert. Der zweite Altersgipfel für das Auftreten eines RMS liegt zwischen dem 10. und 18. Lebensjahr.

Die Geschlechtsverteilung zeigt mit 1,3–1,5:1 eine leichte Knabenwendigkeit.

Auch im Hinblick auf die Lokalisation des Primärtumors lassen sich Präferenzen erkennen: Etwa die Hälfte der RMS tritt im Hals- und Kopfbereich auf (besonders Orbita, Gehörgang, Nase und Nasennebenhöhlen). Weitere Lokalisationen sind der Urogenitaltrakt und das Becken (30 %; Harnblase, Prostata, Hodenhüllen beim Jungen, Harnblase und Vagina beim Mädchen). Überwiegend handelt es sich bei den beschriebenen Lokalisationen um eRMS. An den Extremitäten treten häufiger aRMS, vorwiegend im Erwachsenenalter, auf (Dagher und Helman 1999).

1.3.5. Prognose

Heutzutage können ca. 70 % der Patienten, bei denen ein noch nicht metastasiertes RMS diagnostiziert wurde, durch eine multimodale Therapie dauerhaft geheilt werden (Dagher et Helman 1999, Breitfeld et Meyer 2005). Trotz aggressiver Therapiekonzepte haben Patienten mit metastasiertem RMS eine deutlich schlechtere Prognose. Die ereignisfreie 5-Jahres-Überlebensrate liegt für diese Patienten bei nur etwa 20–30 % (Koscielniak et al. 1997, Carli et al. 1999).

1.3.5.1. Klassische prognostische Parameter

Folgende Faktoren haben sich in den letzten Jahren im Hinblick auf die Prognose von RMS als bedeutend erwiesen: TNM-Status, Lokalisation des Primärtumors, histologischer Typ und das Alter des Patienten. Günstige prognostische Faktoren sind dabei (1) ein Tumordurchmesser von

weniger oder gleich 5 cm, (2) die Lokalisation des Primärtumors in der Orbita, im Kopf-Halsbereich (nicht parameningeal) und im Urogenitalbereich mit Ausnahme von Blase und Prostata, (3) das Fehlen von regionalen Lymphknoten- und Fernmetastasen zum Zeitpunkt der Diagnose, (4) kein makroskopischer Nachweis von Tumorgewebe nach chirurgischer Resektion des Tumors, (5) die histologische Diagnose eines eRMS und (6) ein Alter von weniger als zehn Jahren bei Diagnosestellung (Koscielniak et al. 2002, Raney et al. 2001^(1,2)).

1.3.5.2. Neue prognostische Parameter

Verbesserte Techniken auf dem Gebiet der Molekularbiologie trugen zu einem besseren Verständnis bei der RMS-Pathogenese bei und lieferten neue Ansatzpunkte für die prognostische Einschätzung.

Patienten, in deren Tumoren aufgrund der Translokation t(2;13) das *PAX3* mit dem *FKHR*-Gen fusioniert ist, sind oft älter und haben eine schlechtere Prognose als diejenigen, deren Tumor die Fusion des *PAX7* mit dem *FKHR*-Gen aufweist (Kelly et al. 1997, Raney et al. 2001^(1,2)). Der Nachweis dieser Translokationen mithilfe der PCR-Technik ist demnach nicht nur für die Diagnosestellung, sondern auch im Hinblick auf die Prognose wertvoll (Sorensen et al. 2002).

In einigen Untersuchungen wurde gezeigt, dass die Proliferationsaktivität und der DNS-Gehalt der Tumorzellen mit der Prognose in Beziehung stehen. Hiernach scheinen hyperdiploide eRMS eine bessere Prognose zu haben als diploide Tumoren (Shapiro et al. 1991, Pappo et al. 1993, Niggli 1994). In einer retrospektiven italienischen Studie konnte gezeigt werden, dass die 5-Jahres-Überlebensrate bei Patienten mit hyperdiploidem Tumor 73 % betrug und im Vergleich dazu nur 33 % bei Patienten mit diploidem Tumor und 25 % bei Patienten mit tetraploidem Tumor (De Zen et al. 1997). Diese Ergebnisse müssen jedoch kritisch bewertet werden, da sie sich von Ergebnissen anderer Veröffentlichungen unterscheiden, bei denen keine Korrelation zwischen DNS-Ploidie und 5-Jahres-Überlebensrate gefunden werden konnte (Dias et al. 1992, Kilpatrick et al. 1994).

Ob Mutationen in Tumorsuppressor- und Onkogenen in RMS prognostische Bedeutung haben, kann aufgrund der bisherigen, uneinheitlichen Ergebnisse noch nicht eindeutig beurteilt werden (Levine 1999).

1.3.6. Therapie

1.3.6.1. konventionelle Behandlungsverfahren

In den aktuellen multimodalen Behandlungskonzepten werden Chemotherapie, Operation und/oder Strahlentherapie eingesetzt. Die Reihenfolge und Durchführung einzelner Therapie-

modalitäten ist abhängig von der Größe, Ausdehnung, Histologie, Lokalisation und Resektabilität des Tumors sowie vom Alter des Patienten. Gegenüber der alleinigen Tumorresektion konnte durch adjuvante und neoadjuvante Chemotherapie die 5-Jahres-Überlebensrate bei Patienten mit lokalisiertem RMS von ca. 20 % auf ca. 60 % gehoben werden (Dagher and Helman 1999). Essentiell für eine lokoregionale Tumorkontrolle ist allerdings weiterhin der zusätzliche Einsatz von Chirurgie und/oder Strahlentherapie.

Eine komplette chirurgische Entfernung des Tumors wird nur dann empfohlen, wenn die Resektion ohne Verstümmelung möglich ist. Bei einigen, primär nicht vollständig resezierbaren Tumoren günstiger Histologie kann eine komplette Entfernung im Rahmen einer Second-look-Operation erfolgen (GPOH, 2002).

Da die komplette Tumorresektion oft nicht möglich oder vertretbar ist, spielt die Strahlentherapie eine entscheidende Rolle bei der lokoregionalen Tumorkontrolle. Alle Patienten, bei denen primär oder sekundär keine komplette operative Tumorentfernung erreicht werden kann, müssen nach den aktuellen Empfehlungen bestrahlt werden. Die Dosis richtet sich dabei nach der Radikalität der Resektion, nach dem Ansprechen auf die präoperative Chemotherapie und nach dem Alter des Patienten; die Gesamtdosis liegt bei 40–50 Gy (AWMF-025/007, 2002). Diskutiert wird der Einsatz von strahlenden Implantaten bei kleinen Tumoren an kritischer Stelle, um die Schädigung umgebender gesunder Gewebe zu minimieren (Gerbaulet et al. 1989, Healey et al. 1995).

Da die hämatogene und lymphogene Metastasierung bei RMS bereits früh im Krankheitsverlauf auftritt, spielt die systemische Therapie für die primäre Zytoreduktion und Vernichtung okkultter Metastasen eine entscheidende Rolle. Grundsätzlich wird eine Kombinations-Chemotherapie verabreicht, wobei die Zusammensetzung der Medikamente sowie die Intensität und Dauer in den einzelnen Risikogruppen sehr unterschiedlich sind. Als besonders wirksame Medikamente haben sich Dactinomycin, Vincristin und Alkylanzien (Cyclophosphamid, Ifosfamid) sowie Anthrazykline (Doxorubicin, Epi-Doxorubicin) erwiesen (Koscielniak et al. 2002). Bei Patienten mit metastasierenden Tumoren wird derzeit eine intensivierete Chemotherapie mit 4–6 Medikamenten eingesetzt.

Eine möglicherweise erfolgversprechende jüngere Therapieoption bei metastasierenden RMS ist die Verabreichung des Topoisomerase I-Inhibitors Topotecan. Es wurde berichtet, dass ca. 45 % von Patienten mit neudiagnostiziertem metastasierendem RMS auf die Behandlung mit Topotecan angesprochen haben. Unter den verschiedenen histologischen Subtypen war der Behandlungserfolg bei aRMS höher als bei eRMS (Pappo et al. 2001).

Obwohl eine Hochdosis-Chemotherapie mit anschließender autologer Stammzell-Transplantation bei verschiedenen soliden Tumoren des Kindesalters erfolgversprechend erscheint, hat dieses Behandlungsverfahren bei Patienten mit metastasierendem oder rezidiviertem RMS keine Verbesserung der Heilungsraten bewirkt (Koscielniak et al. 2002). In der laufenden Kooperativen Weichteilsarkom Studie (CWS) der Gesellschaft für pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH) wird dieser Therapieansatz nicht mehr empfohlen.

Unerwünschte mögliche Spätfolgen der multimodalen Therapie sind u.a. eine Kardiomyopathie, renale und hepatische Dysfunktionen, lokale Strahlenschäden und die Entstehung von malignen Zweitumoren (Lipshultz et al. 1991, Raney et al. 1994, Ortega et al. 1997, Heyn et al. 1993).

1.3.6.2. Experimentelle Behandlungsverfahren

Da die Aussicht auf Heilung trotz verbesserter konventioneller Therapieverfahren vor allem bei metastasierten oder progressiv wachsenden RMS gering ist, wird dringend nach alternativen Therapiekonzepten gesucht. Es mehren sich Hinweise darauf, dass Tumoren durch eine Veränderung der Genexpression, durch den Eingriff in zelluläre Proliferationsmechanismen oder mithilfe immuntherapeutischer Ansätze bekämpft werden können.

2.1.6.2.1. Immuntherapeutische Ansätze

Goletz et al. konnten in Tierversuchen zeigen, dass Peptide aus dem PAX3/FKHR-Fusionsprotein von CTL als Tumorantigene erkannt werden (Goletz et al. 1996). Dieser Sachverhalt impliziert die Möglichkeit, tumorspezifische Peptidvakzine als immuntherapeutisches Verfahren bei der Behandlung von aRMS einzusetzen.

In einer Pilotstudie an vier Patienten mit t(2;13)-positivem aRMS-Rezidiv wurde kürzlich ein Peptidvakzin aus der Bruchpunktregion untersucht (Dagher et al. 2002). Zusätzlich wurde das Zytokin Interleukin-2 verabreicht, das die Aktivierung der CTL durch das Tumorkvakzin unterstützen sollte (Shimizu et al. 1999). Die Pilotstudie ergab keinen Einfluß auf den ungünstigen klinischen Verlauf der Erkrankung. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass die Patienten einerseits aufgrund der vorangegangenen intensiven Chemotherapie extrem immunsupprimiert waren und andererseits an großen, schnell wachsenden Rezidivtumoren litten, die wie in verschiedenen Tierversuchen und in klinischen Untersuchungen gezeigt, nicht durch Immuntherapien eradiziert werden können (Greenberg 1991). Vielversprechender ist es wahrscheinlich, immuntherapeutische Konzepte für das Stadium einer minimalen Rest-erkrankung zu entwickeln, d.h. eher zur Rezidivprophylaxe als zur Therapie manifester aggressiver Tumore.

1.3.6.2.2. Andere experimentelle, therapeutische Ansätze

Weitere therapeutischen Ansatzpunkte sind u.a. die Unterbrechung der Aktivität von chimere Transkriptionsfaktoren, die Hemmung von tumorspezifischen posttranslationalen Modifikationen und damit der Aktivität von Proteinen, die ein Tumorwachstum begünstigen, die Wiederherstellung der Funktion von Tumorsuppressorgenen, die Blockade der Angiogenese, die Induktion von Apoptose oder die Einführung toxischer Genprodukte (Olsen et al. 2002).

Es wurde berichtet, dass die Behandlung von RMS-Zellen mit antisense-Oligonukleotiden, die gegen den Translationsstartpunkt des PAX/FKHR-Fusionstranskriptes gerichtet sind, die Expression der Fusionsproteine verhindert und so apoptotischen Zelltod auslöst (Bernasconi et al. 1996). Durch die Kombination von Regionen nichtverwandter Gene, wie man sie beim aRMS an den Bruchpunkten der t(2;13)- und t(1;13)-Translokationen findet, entstehen chimere Proteine mit Eigenschaften, die sich von denen der einzelnen Komponenten unterscheiden. Im Gegensatz zu den nativen Proteinen werden die entstehenden Fusionsproteine in Tumorzellen oft überexprimiert und zeigen eine erhöhte Transformationsaktivität (Olsen et al. 2002). Diese Kenntnisse lassen vermuten, dass die Inhibition der Expression dieser Fusionsproteine eine mögliche neue Therapieoption ist.

Die posttranslationale Modifikation von Proteinen ist ein wichtiger regulatorischer Mechanismus zur Kontrolle der Proteinaktivität in eukaryotischen Zellen (Hunter et Karin 1992, Hunter 1995). Der *insulin-like growth factor-1 receptor* (IGF-1R) moduliert einige tumorassoziierte Aktivitäten, wie zelluläre Proliferation, Transformation und programmierten Zelltod und spielt vermutlich in vielen verschiedenen Sarkomen eine wichtige Rolle. Die Aktivität von IGF-1R wird durch posttranslationale Glycosylierung reguliert. Diese Beobachtung veranlassten Girnita et al. (2000), die Glycosylierung von IGF-1R in Zelllinien eines Ewing-Tumors durch Tunicamycin und Lovastatin zu blockieren und dadurch möglicherweise einen antitumorigenen Effekt zu erzielen. Die Blockierung der posttranslationalen Glycosylierung resultierte in einer down-Regulation des membrangebundenen IGF-1R und in einer rapiden Abnahme zellulären Überlebens (Girnita et al. 2000). Möglicherweise stellt die Blockierung der posttranslationalen Modifizierung regulatorischer Proteine demnach einen sinnvollen Ansatz zur Entwicklung neuer Therapien dar.

Ein weiterer therapeutischer Ansatz ist die Inhibition von Angiogenesefaktoren. Vor allem schnell wachsende Gewebe wie Tumoren müssen zur Versorgung ihrer proliferierenden Zellen reichlich vaskularisiert sein. Die Angiogenese wird in einigen soliden Tumoren durch Sekretion von Faktoren stimuliert, die das Einsprossen von Kapillaren bewirken (Yancopoulos et al. 2000). Wie in einigen Arbeiten beschrieben, sollte die Inhibition dieser Angiogenesefaktoren demnach eine Tumorprogression verhindern. In Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass der Anti-Angiogenese-Faktor TNP-470 und ein Ak, der gegen den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor VEGF (*vascular endothelial growth factor*) gerichtet ist, das RMS-Tumorwachstum hemmen (Kalebic et al. 1996, Borgstrom et al. 1996).

1.4. Tumorantigene

1.4.1. Definition

Maligne entartete Zellen unterscheiden sich wesentlich von ihren nicht-malignen Ursprungszellen. Die bei der Tumorentwicklung entstehenden genetischen Veränderungen einer Tumorzelle führen zur Expression qualitativ und/oder quantitativ veränderter molekularer Strukturen.

Werden solche Strukturen vom spezifischen Immunsystem des tumortragenden Wirtes erkannt, spricht man von Tumorantigenen (Sahin et al. 1999). Gewisse Tumorantigene sind für den betreffenden Tumortyp charakteristisch, andere sind vielen Tumorarten gemeinsam (*shared tumor antigens*).

Wenn Tumorantigene ausschließlich in Tumoren vorkommen, spricht man von tumorspezifischen Antigenen. Diese Antigene sind besonders interessant für die Entwicklung von gut verträglichen Immuntherapien, da ihr Einsatz keine Schäden an Normalgeweben erwarten läßt.

Von tumorassoziierten Antigenen wird vielfach gesprochen, wenn Antigene zwar ausschließlich bei Tumorpatienten eine Immunantwort auslösen, aber mit charakteristischem oder deutlich niedrigerem Expressionsmuster auch in Normalgewebe vorkommen.

Von sogenannten „tumorabhängigen Autoantigenen“ sprechen manche Autoren dann, wenn das Antigen wiederum nur bei Tumorpatienten immungen ist, aber das Expressionsniveau im Normalgewebe nicht anders als im Tumor und das Expressionsmuster nicht charakteristisch ist (Knuth et al. 2000, Sahin et al. 1999, Sahin et al. 1997). Als mögliche Ursache für ihre tumorabhängige Immunogenität werden tumorassoziierte posttranslationale Modifikationen oder eine unterschiedliche Prozessierung bzw. Präsentation des Antigens diskutiert (Skipper et al. 1996, Chen et al. 1996).

„Tumor-unabhängige Autoantigene“ werden definitionsgemäß auch vom Immunsystem eines Menschen ohne maligne Erkrankung erkannt. Dabei kann es sich bei der reaktiven Person um völlig gesunde Menschen oder um Patienten mit Autoimmunkrankheiten handeln. Unter den Autoantigenen eines Tumors können sich auch klassische Autoantigene finden, die im Kontext mit Autoimmunkrankheiten bekannt wurden (Sahin et al. 1997).

Wenn das Expressionsmuster eines Antigens nicht bekannt und/oder nicht quantitativ untersucht ist, läßt sich ein tumorassoziiertes Antigen nicht von einem „tumor-abhängigen Autoantigen“ unterscheiden. Deshalb erfolgt die Einteilung der Tumor- versus Autoantigene in der vorliegenden Arbeit zunächst streng nach immunologischem Profil. D. h. die Gruppe der Tumorantigene wird ausschließlich durch eine nur bei Tumorpatienten nachweisbare Immunantwort definiert, die der Autoantigene durch Nachweis einer Immunantwort auch bei den Kontrollen. Das bedeutet, dass die von einigen Autoren als „tumorabhängig“ klassifizierten Autoantigene in dieser Arbeit zu den Tumorantigenen gezählt werden.

1.4.2. Molekulare Struktur bekannter Tumorantigene

Tumorspezifische Antigene werden über Epitope erkannt, die nur in Tumoren vorkommen. Tumorspezifische Epitope finden sich auf Proteinen, deren mRNA entweder von einem nur im Tumor aktiven Promotor transkribiert wird, deren Protein nur im Tumor translatiert wird, oder die

sich von einem in Normalgewebe exprimierten Wildtyp durch eine auf den Tumor beschränkte molekulare Veränderung unterscheiden. Letztere kann z.B. auf Genmutation, alternativem Splicing, alternativer Translation, alternativer Glykosylierung aber theoretisch auch auf alternativer Faltung beruhen, wobei der Nachweis der beiden letzteren Mechanismen aufwendig bzw. schwierig ist. Entsprechend sind vmtl. die Mehrzahl der sog. „tumorabhängigen Autoantigene“ tatsächlich tumorspezifische Antigene.

Mutationen in der Gensequenz können über eine entsprechend veränderte Aminosäuresequenz des kodierten Proteins zur Entstehung neuer antigener Determinanten (Neoepitope) führen, gegen die eine spezifische Immunreaktion ausgelöst wird. Aufgrund ihres seltenen und oft nur individuellen Vorkommens spielen diese Antigene im Hinblick auf Immuntherapien vermutlich eine untergeordnete Rolle (Sahin et al. 1999).

Ein Beispiel für ein tumorspezifisches Antigen, dessen mRNA anders prozessiert wird als der Wildtyp und somit eine tumorspezifische Spleißvariante darstellt, kann das beim Morbus Hodgkin gefundenen Antigen Restin genannt werden (Sahin et al. 1995).

Alternative Translation von Genen ist ein anderer wichtiger Mechanismus für die Generation tumorspezifischer Antigene (Wang et Rosenberg 1996; Probst-Kepper et al. 2001). Das mithilfe der SEREX-Analyse aus einem Neuroblastom isolierte *018/INX*-Gen wurde z. B. als alternativ translatierte Variante von α -internexin charakterisiert (Behrends et al. 2002).

Wie bereits erläutert können auch durch alternative Glykosylierung von Tumorproteinen tumorspezifische Neoepitope entstehen, die eine tumorspezifische Immunantwort auslösen. MUC 1 ist ein Beispiel für ein in Tumoren alternativ glykosyliertes Tumorantigen, welches bereits als Basis für klinische Tumorstoffe genutzt wurde (Magro et al. 2003, Richman et DeNardo 2001).

Tumorassoziierte Antigene sind Wildtyp-Proteine, die auch in Normalgeweben vorkommen, aber ein charakteristisches Expressionsmuster aufweisen. Zu diesen Antigenen zählen die im Tumor aberrant exprimierten sogenannten Cancer/Testis-Antigene (CTA), die Differenzierungsantigene und vom Tumor überexprimierte Antigene:

CTA weisen ein charakteristisches Expressionsmuster auf. Wie der Name schon vermuten lässt, werden diese Antigene in Hoden bzw. Ovar, aber darüber hinaus in keinem Normalgewebe und mit unterschiedlicher Frequenz (10–80 %) in einer Vielzahl von humanen Malignomen exprimiert (Zendman et al. 2003, Scanlan et al. 2002). Verschiedenen Publikationen zufolge sollen diese Gene, die überwiegend auf dem X-Chromosom lokalisiert sind, in Krebszellen durch Demethylierung von Sequenzen im Promotorbereich aktiviert werden (De Backer et al. 1999, De Smet et al. 1999, Li et al. 1996). Aufgrund des restriktiven Expressionsmusters mit Vorkommen in einem immunologisch geschützten (*immuno privileged site*) und darüberhinaus nicht ad vitum notwendigen Organ, werden Antigene dieser Familie als besonders gute Zielstrukturen für immuntherapeutische Interventionen angesehen. Zur Familie der CTA gehören u. a. die Antigene

der *MAGE*-Familie, *BAGE*, *GAGE* und *NY-ESO-1* (Scanlan et al. 2002, Zendman et al. 2003).

Differenzierungsantigene werden abhängig vom zellulären Ursprung der Neoplasie zelltypspezifisch exprimiert. So wurden beispielsweise Antigene in Melanomen identifiziert, die ansonsten ausschließlich in Melanozyten exprimiert werden, so z. B. Tyrosinase, Melan A, gp100 und gp75 (Jäger et Knuth 1999⁽¹⁾).

Gene, die in einem Tumor überexprimiert werden, können nach Überschreiten der immunologischen Toleranzgrenze eine Immunantwort auslösen (Viola et Lanzavecchia 1996). Ein bekanntes, in 30 % der Mamma- und Ovariakarzinome überexprimiertes, epitheliales Antigen ist das membranständige *HER2/neu*-Antigen. Dieses Antigen dient als Zielstruktur für den bei der Behandlung von Mammakarzinomen eingesetzten Ak Trastuzumab (Knuth et al. 2000, Disis et al. 1993).

Virale Antigene werden in verschiedenen Tumorentitäten, wie z. B. dem hepatozellulärem Karzinom oder dem Zervixkarzinom exprimiert. Die Tumorentstehung steht dabei in einem ursächlichen Zusammenhang mit einer Virusinfektion. Diese Tatsache ist im Hinblick auf virus-spezifische Impfungen zur Krebsprävention bedeutend, wie etwa die Hepatitis B Impfung zur Prävention des hepatozellulären Karzinoms (Jäger et Knuth 1999⁽¹⁾).

1.4.3. Tumorantigene von Rhabdomyosarkomen

Besonders dank der Entwicklung der effizienten SEREX-Methode zur Identifizierung von Tumorantigenen ist in den letzten zehn Jahren die Charakterisierung einer Vielzahl tumorassoziierter und tumorspezifischer Antigene in verschiedenen Tumorentitäten gelungen. Dabei lag der Schwerpunkt der Untersuchungen bislang auf Tumoren des Erwachsenenalters, so dass auf dem Gebiet der pädiatrischen Tumoren erst wenig über Tumorantigene bekannt ist (Behrends et al. 2002 und 2003). Bislang ist noch keine Arbeit publiziert, in der mit der SEREX-Methode nach Tumorantigenen des RMS gesucht wurde.

Einige der bisher bei anderen Tumorentitäten gefundenen Antigene konnten jedoch mithilfe der RT-PCR auch beim RMS nachgewiesen werden (Dalerba et al. 2001). Dalerba et al. untersuchten die Expression der *Cancer/Testis*-Antigene *MAGE*, *BAGE* und *GAGE* in alveolären und embryonalen RMS. Diese Studie konnte zeigen, dass 58 % der untersuchten RMS mindestens ein CTA exprimierten, 35 % sogar mehr als drei Gene gleichzeitig. Gene aus der *MAGE*-Familie wurden dabei bei einer größeren Anzahl von Tumorpatienten exprimiert als Gene aus der *BAGE*- und *GAGE*-Familie. Diese Ergebnisse könnten für die Entwicklung einer spezifischen Immuntherapie gegen *MAGE*-, *BAGE*- und *GAGE*-Antigene bei RMS von Bedeutung sein.

Zwei weitere Gene *SAGE* und *HAGE*, die auf mRNA-Ebene ebenfalls ausschließlich in Tumorgewebe und in Testis (*SAGE*), bzw. 100 mal stärker in Tumorgewebe und Testis als in Normal-

gewebe (*HAGE*) exprimiert werden, wurden kürzlich bei Untersuchungen an einer RMS-Zelllinie identifiziert (Martelange et al. 2001). Die gefundenen Gene weisen keine Homologien zu Genen der *MAGE*-, *BAGE*-, *GAGE*- und *LAGE/NY-ESO-1*-Familie auf. Das *SAGE*-Gen ist wie auch das *MAGE-A*-Gen auf Chromosom X lokalisiert. Anhand von RT-PCR-Analysen zeigte sich, dass das *SAGE*-Gen hauptsächlich in Blasenkarzinomen, Lungenkarzinomen und in Karzinomen des Kopf-/Halsbereiches exprimiert wird. Demgegenüber war die Expressionsanalyse des *SAGE*-Gens nur bei einem der 20 untersuchten Sarkome positiv. Das vom *HAGE*-Gen kodierte Protein scheint zur Familie der DEAD-box Proteine zu gehören, die an verschiedenen Schritten des RNS-Metabolismus, der Spermiogenese, der Embryogenese und des Zellwachstums beteiligt sind (Linder et al. 1989).

Ebenso wie die bereits bekannten CTA kodieren *SAGE* und *HAGE* möglicherweise ebenfalls für tumorassoziierte Antigene, die bei zukünftigen Immuntherapiestrategien zum Einsatz kommen könnten. Ihre Immunogenität ist jedoch noch nicht belegt.

GM2 ist ein Gangliosidantigen, das u. a. auf der Zelloberfläche von Sarkomen exprimiert wird, aber auch auf Zellen des ZNS und auf der Zelloberfläche der meisten epithelialen Gewebe (Livingston 1998). Die Expression dieses Antigens ist in den verschiedenen Subtypen von Sarkomen unterschiedlich (Chang et al. 1992). eRMS zeigten nur eine schwache Expression dieses Gens. Daher sind weitere Untersuchungen erforderlich, die eine Aussage darüber machen, ob man *GM2* für Immuntherapien bei RMS nutzen kann. An Sarkomen von Erwachsenen wurde bereits in zwei Phase I-Studien die Vakzinierung mit an Träger gekoppelten *GM2*-Peptiden begonnen (Linehan et al. 1999).

Beim aRMS führen die oben genannten Chromosomen-Translokationen zur Expression immuno-gener Fusionsproteine. Einen ersten Hinweis darauf geben die bereits erwähnten Untersuchungen zur Immunerkennung des PAX3/FKHR Fusionsproteins durch CTL (Goletz et al. 1996).

1.5. Methoden zur Identifikation von Tumorantigenen

1.5.1. T-Zell-Verfahren

Vor der Entwicklung der SEREX-Methode wurden hauptsächlich T-Zell-Verfahren zur Identifikation von Tumorantigenen eingesetzt.

Bei dem von Boon und Kollegen entwickelten sogenannten „genetischen Verfahren“ müssen zunächst mithilfe von Tumorzellen aus autologen peripheren Blutzellen tumorspezifische CTL-Klone generiert werden. Mithilfe dieser CTL werden anschließend Antigen-präsentierende Zellen untersucht, die nach Transfektion mit einer Tumor cDNA-Bibliothek in ihrem Zytosol Antigene des Tumors bilden, und diese nach Prozessierung auf Molekülen der *major histocompatibility complex* (MHC) Klasse I präsentieren. Wenn Eptiope dieser Antigene im Kontext von MHC-

Klasse-I Molekülen von den CTL-Klonen erkannt werden, können diese Antigene kloniert und molekular charakterisiert werden (Van der Bruggen et al. 1991, Rosenberg 1996).

Bei der sogenannten „biochemischen Methode“ zur Identifikation von Tumorantigenen werden Peptide aus der Bindung an MHC-Moleküle auf Tumorzellen eluiert. Anschließend werden gereinigte Fraktionen des Eluates auf antigenpräsentierende Zellen geladen. Diejenigen Fraktionen des Eluates, die von zuvor generierten tumorspezifischen CTL-Klonen erkannt werden, enthalten Peptid-Epitope von Tumorantigenen. Ihre Aminosäuresequenz kann anschließend aufgeklärt werden (Storkus et al. 1993).

Aufgrund des wesentlich komplexeren Antigenpräsentationswegs auf MHC-Klasse II und der schwierigeren Klonierung von THL, konnten mit verschiedenen Verfahren bislang nur einige wenige THL-Tumorantigene molekular charakterisiert werden (Wang et al. 1999, Pieper et al. 1999, Topalian et al. 1994).

Ein großer Nachteil der beschriebenen T-Zell-Verfahren liegt darin, dass diese von der Verfügbarkeit von tumorspezifischen T-Zell-Klonen und Tumorzelllinien abhängig sind, die z. T. schwer oder gar nicht zu etablieren sind.

1.5.2. SEREX-Methode

Ein alternatives Verfahren zur Identifikation von Tumorantigenen, das unabhängig von tumorspezifischen T-Zell-Klonen und Tumorzelllinien ist, ist die von Pfreundschuh und seinen Kollegen Türeci und Sahin etablierte SEREX-Methode (Sahin et al. 1995).

Dieses Verfahren basiert auf der von Lloyd Old entwickelten autologen Typisierung (Old 1981). Mithilfe des *autologous typing*, bei dem Patientenserum mit autologen Zelllinien aus normalen und malignen Geweben getestet wurde, konnte Lloyd Old zeigen, dass Tumorzellen, nicht aber gesunde Körperzellen desselben Patienten von Serum-Ak gebunden werden. Diese Befunde gaben erste Hinweise darauf, dass es Tumorantigene gibt; allerdings konnten sie noch nicht molekular charakterisiert werden.

Bei dem SEREX-Verfahren wird aus frischem Tumorbiopsiematerial eine cDNS-Expressionsbibliothek hergestellt, und diese mithilfe von Bakteriophagen rekombinant in *E. Coli*-Bakterien exprimiert. Die rekombinanten Proteine werden darauf getestet, ob sie von hochtitrigen IgG-Antikörpern im Serum von Krebspatienten erkannt werden. Positive Phagenklone, d. h. Klone die ein seroreaktives Protein kodieren, können isoliert und die inklonierte Tumor-cDNS sequenziert werden.

Mit SEREX wurden in den letzten zehn Jahren über 1000 Antigene identifiziert (Li et al. 2004). Die meisten davon wurden in Malignomen gefunden, die nahezu ausschließlich im Erwachsenen-

alter vorkommen wie z. B. Nierenzell-, Magen-, Ösophagus- oder Lungenkarzinome (Scanlan et al. 1999, Obata et al. 2000, Chen et al. 1997, Güre et al. 1999), und kürzlich in den seltenen Synovialsarkomen, die ebenfalls überwiegend bei Erwachsenen auftreten (Lee et al. 2003).

Erst in den letzten Jahren wurde das Verfahren erstmals auf typisch pädiatrische Tumore angewandt (Behrends et al. 2002 und 2003). Die von Behrends et al. untersuchten Tumore waren häufige embryonale Neubildungen neuroektodermalen Ursprungs. Die Ausbeuten an interessanten neuen Antigenen pro Tumor waren ähnlich groß wie bei den Untersuchungen mit Serum und Tumorgewebe von erwachsenen Patienten. Diese Befunde gaben Anlaß, die SEREX-Analysen auf weitere problematische Tumorarten von Kindern auszudehnen. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals ein typisches Sarkom des Kindesalters untersucht.

1.6. Tumorimmuntherapie

1.6.1. Antigen-unspezifische Tumorimmuntherapie

Um eine Immunantwort gegen möglichst viele der von einem Tumor exprimierten Antigene auszulösen, wurden bestrahlte autologe oder allogene Tumorzellen als Vakzine eingesetzt. Eine exakte Beurteilung des Immunisierungserfolges war bisher jedoch nicht möglich (Jäger et Knuth 1999⁽¹⁾).

Eine Alternative zur Applikation unmanipulierter Zellen ist die Vakzinierung mit Tumorzellen, deren Immunogenität durch genetische Veränderungen gesteigert ist. So wurden Gene immunstimulatorischer Faktoren wie z. B. Interleukin-2 (IL-2) und Granulozyten-Makrophagen-Koloniestimulierender Faktor (GM-CSF) in Tumorzellen eingebracht, und ihre rekombinante Expression in den Tumorzellen induziert. Über Tierversuche und klinische Studien mit rekombinanten Zellvakzinen wurde berichtet (Tepper et Mule 1994, Simons et al. 1997, Bowman et al. 1998^(1, 2), Soiffer et al. 1998, Roskrow et al. 1999).

Nachteile ergeben sich bei den beschriebenen immuntherapeutischen Verfahren dadurch, dass sich ihre Anwendung auf diejenigen Tumorentitäten beschränkt, deren Zellen sich problemlos *in vitro* expandieren lassen. Außerdem kann sich die durch die Immunisierung mit abgetöteten Tumorzellen induzierte Immunantwort auch gegen Gene richten, die in Normalgewebe exprimiert werden. Dies birgt die Gefahr von Autoimmunreaktionen. Schließlich ist wahrscheinlich auch die Effizienz dieser Antigen-unspezifischen Vakzine geringer als diejenige von Antigen-spezifischen Impfstoffen.

Die Identifizierung möglichst vieler und möglichst tumorspezifischer Antigene bleibt demnach neben der Optimierung der einzelnen Impftechniken die wichtigste Voraussetzung für die Entwicklung wirksamer und sicherer Tumorstoffe.

1.6.2. Antigen-spezifische Tumorimmuntherapie

Die molekulare Analyse der über T-Zell-Klone und Serum-Ak identifizierten Tumorantigene hat in diesem Jahrzehnt wesentlich zur Entwicklung neuer Immuntherapiestrategien beigetragen. Auf der Basis von Tumorantigenen wurden bereits erste vielversprechende klinische Impfprotokolle, die sowohl passive wie auch aktive Immunisierungen beinhalten, erstellt (Kuball et Wölfel 1999).

Um eine passive Immunisierung zu erreichen, werden dem Patienten monoklonale Ak appliziert, die gegen die auf der Oberfläche von Tumorzellen exprimierten Antigene gerichtet sind. Neben diesen monoklonalen Ak, die bereits für die Therapie verschiedener hämato-onkologischer Erkrankungen etabliert sind, wird derzeit in Phase-I- und frühen Phase-II-Studien der Einsatz bispezifischer Ak untersucht. Diese Ak enthalten Bindungsstellen für zwei unterschiedliche Antigene. Die Vernetzung immunologischer Effektorzellen mit Tumorzellen soll über unterschiedliche Mechanismen zur Lyse der Tumorzellen führen (Winkler et al. 1999).

Ein weiteres passives Impfkonzept ist die Behandlung mit *in vitro* expandierten T-Lymphozyten (adoptive Immunotherapie). Antigen-spezifische, malignomreaktive T-Zellen werden von Patienten isoliert, *in vitro* expandiert und dem Patienten reinfundiert. Die Wirksamkeit dieses adoptiven T-Zelltransfers muss in weiteren klinischen Studien überprüft werden (Bernhard et al. 1999).

Ziel der aktiven antigen-spezifischen Immunisierung ist die Induktion und Vermehrung tumorspezifischer T-Zellen *in vivo*, die zur Elimination der Tumorzellen führen soll. Zur aktiven Immunisierung werden bereits Peptide verschiedener Tumorantigene, modifizierte Peptide mit stärkerer MHC-Bindung, Tumorproteine, „nackte“ Antigen-DNS und antigen-präsentierende Zellen, die mit Tumorpeptiden inkubiert oder mit tumorassoziierten Antigenen transfiziert wurden, eingesetzt (Kuball et Wölfel 1999). Als antigen-präsentierende Zellen werden überwiegend autologe dendritische Zellen eingesetzt. Sie werden *ex vivo* kultiviert und nach Inkubation mit tumorassoziierten Peptiden oder Tumorproteinen dem Patienten intravenös reinfundiert. Möglicherweise kann mithilfe dieser Vakzinierungsstrategie die Intensität der Immunantwort gesteigert werden (Jäger et Knuth 1999⁽¹⁾). Im Gegensatz zur passiven Immunisierung wird von einer aktiven Immunisierung eine langfristige Kontrolle der Tumorzellproliferation erwartet; für stark immunsupprimierte Patienten ist dies allerdings in der Regel keine Option.

Ein bedeutendes Problem aller Vakzinierungsstrategien liegt darin, dass sich Tumorzellen der T-Zell-vermittelten Erkennung und damit der Elimination entziehen können. Dies kann z. B. durch einen Expressionsverlust verschiedener Antigene erfolgen, gegen die eine CTL Reaktion nach Immunisierung gerichtet war, oder durch den Verlust von MHC-Molekülen (Jäger et al. 1999⁽²⁾). Für effektivere Immuntherapieverfahren sollten mögliche Veränderungen von Antigen- und MHC-Expression daher berücksichtigt werden. Eine Option, dem Auswachsen resistenter Klone vorzubeugen ist der Einsatz polyvalenter Vakzine, die gegen mehrere Antigene eines Tumors gerichtet sind.

1.6.3. Tumorimmuntherapie für Sarkome

Wie bereits erwähnt, wurden im Gegensatz zu anderen Tumorentitäten erst einige wenige tumorassoziierte Antigene bei Sarkomen identifiziert. Dies kommt u.a. darin zum Ausdruck, dass bislang nur wenige klinische Studien zu neuen immuntherapeutischen Behandlungsverfahren für Sarkome initiiert wurden:

In einer Phase-I Studie an 17 erwachsenen Patienten mit Weichteilsarkom wurden bestrahlte und dadurch proliferationsgehemmte, autologe Tumorzellen, die mit dem Zytokin GM-CSF transfiziert worden waren, als Vakzin eingesetzt. Zwar wurden die intradermalen Injektionen der mit GM-CSF behandelten autologen Tumorzellen lokal und systemisch gut vertragen. Es konnte jedoch nur bei einer Minderzahl der Patienten (4/17) eine klinisch relevante einer GM-CSF-Expression in den Tumorzellen gemessen werden. Nur bei einem von diesen vier Patienten kam es zur Induktion einer systemischen Immunantwort gegen den autologen Tumor in Form einer verzögerten Hypersensitivitätsreaktion und bei einem weiteren Patienten zeigte sich eine transiente partielle Remission einer Metastase. Aufgrund dieser Ergebnisse wird versucht, die eingesetzte Vakzinierungsstrategie zu optimieren und möglicherweise dadurch einen besseren Erfolg im Hinblick auf die Induktion einer Immunantwort zu erzielen (Mahvi et al. 1997, Mahvi et al. 2002).

Livingston et al. konnten zeigen, dass Vakzin-induzierte bzw. vorgefertigte monoklonale Ak gegen Ganglioside, insbesondere GM2 bei Melanompatienten mit einer besseren Prognose assoziiert sind (Livingston et al. 1987). Da GM2 z.T. auch stark auf den meisten Sarkomzellen exprimiert wird (Chang et al. 1992), wurde eine weitere Vakzinierungsstudie mit GM2 an erwachsenen Sarkompatienten gestartet. Um die Effizienz einer Ak-Bildung zu steigern wurden zusätzlich zu GM2 die Immunadjuvantien KLH und QS21 appliziert (Linehan et al. 1999). Ein Ergebnis dieser Studie liegt noch nicht vor.

Die an 16 jungen Patienten mit rezidivierendem Ewing-Tumor und aRMS durchgeführte Pilot-Studie mit einer tumorspezifischen Peptidvakzination und gleichzeitiger Infusion von IL-2 zeigte im Hinblick auf die Progression des Tumorwachstums keine befriedigende Resultate. Die Peptide entstammten jeweils tumorspezifischen Fusionsproteinen, die von den Bruchpunktregionen der Translokationen EWS/FLI-1 und PAX3/FKHR kodiert wurden (Dagher et al. 2000). Wie oben erwähnt bleibt zu prüfen, ob eine tumorspezifische Peptidvakzination möglicherweise bei Patienten mit einer geringeren Tumormasse bessere Resultate liefert.

2. Material

2.1. Biologisches Material

2.1.1. Tumor cDNS-Expressionsbibliothek

Die Tumor-cDNS war von Frau Dr. Behrends zur Verfügung gestellt worden. Zusammenfassend war aus einer schockgefrorenen Gewebeprobe eines eRMS mRNS isoliert (STRATAGENE mRNS Isolation Kit), diese in cDNS umgeschrieben, über die Restriktionsenzyme *EcoR1* und *Xho1* in den Polylinker des Uni-ZAP-XR Vektor kloniert und zu rekombinanten λ -Phagen verpackt worden (STRATAGENE ZAP-cDNA Synthesis Kit und ZAP-cDNA® Gigapack III Gold Cloning Kit). Die primäre cDNS-Expressionsbibliothek enthielt etwa eine Million rekombinanter λ -Phagen. Um eine erhöhte Stabilität zu erzielen, wurde die Primärbibliothek protokollgemäß in *Escherichia coli* (*E. coli*) Bakterien des Stammes XL-1 Blue MRF' (XL-1) amplifiziert. Die amplifizierte cDNS-Expressionsbibliothek hatte einen Phagentiter von 7×10^3 Plaque bildenden Einheiten (*plaque forming units*, pfu)/ml. Der Polylinker des UNI-ZAP-XR Vektors, in den die Tumor cDNS ein-kloniert worden war, lag innerhalb des *lacZ*-Gens, welches für eine Untereinheit des Enzyms β -Galaktosidase kodiert. Mithilfe des Galaktose-Analogons Isopropyl- β -D-Thiogalactosid (IPTG) konnte die Repression des *lacZ*-Genpromotors aufgehoben, und damit die Expression der rekombinanten Tumorproteine induziert werden (siehe **Abb. 1**).

2.1.2. Bakterien

Die Verwendung der *E. coli* Bakterienstämme XL-1 und SOLR erfolgte protokollgemäß (STRATAGENE).

Da XL-1-Bakterien ein F' Episom enthalten wurden sie für die Transfektion mit rekombinanten Phagen der RMS-cDNS Expressionsbibliothek (vgl. 3.1.2) und für die „*in vivo* Excision“ des pBluescript Vektors aus dem λ -Vektor mithilfe des filamentösen f1-Helferphagen verwendet (vgl. 3.3.1.). Das F' Episom enthält einen lac Repressor (*lacI^q* Gen). In Abwesenheit von IPTG wird die Transkription des *lacZ* Promotors, der im λ -Vektor stromaufwärts des *lacZ*-Gens liegt, durch den lac Repressor blockiert. Die Synthese rekombinanter Proteine kann daher durch den Zusatz von IPTG im Transfektionsansatz, das die Blockierung des *lacZ* Promotors aufhebt, induziert werden. Ein weiterer Grund für die Verwendung von XL-1 Bakterien liegt darin, dass das F' Episom Gene für die Bildung von F' Pili auf der Oberfläche der Bakterien enthält. Nur mithilfe der F' Pili können f1-Helferphagen XL-1 infizieren, wie es für die „*in vivo* Exzision“ des Plasmidanteils (p) der λ -Phagen-DNS nötig ist (vgl. 3.3.1.).

Ein zweiter ampicillinresistenter *E. coli* Bakterienstamm, SOLR, kam bei der Aufreinigung der DNS rekombinanter Phagemide zum Einsatz (vgl. 3.3.1.).

2.1.3. Phagen

Für ein effizientes Screening erfolgte die Konstruktion der cDNS-Expressionsbibliothek in λ -Phagen nach Angaben des Herstellers (STRATAGENE).

Mithilfe von f1-Helferphagen (ExAssist™, STRATAGENE) wurde der Plasmidteil aus dem Uni-ZAP®-XR Vektor isoliert (vgl. 3.3.1.).

2.1.4. Serumproben

Alle Serumproben von pädiatrisch-onkologischen Patienten waren mit Einverständnis der Sorgeberechtigten und Genehmigung durch die Ethikkommission der Technischen Universität München (TUM) zum Zeitpunkt der jeweiligen Diagnose entnommen worden (Sahin et al. 1995, Behrends et al. 2002, Behrends et al. 2003). Für die serologische Analyse der RMS cDNS-Expressionsbibliothek war gepooltes Serum von vier Patienten mit RMS zur Verfügung gestellt worden. Der Serumpool enthielt eine Serumprobe des sechs Jahre alten Jungen mit eRMS, dessen Tumor mit dem SEREX-Verfahren untersucht werden sollte (Patient #40), sowie drei weitere Serumproben eines neuneinhalb jährigen Jungen und eines achteinhalb jährigen Mädchens mit eRMS und eines dreieinhalb jährigen Jungen mit aRMS. Jedes einzelne Serum lag in einer Verdünnung von 1:300 vor. Für die differentielle Serumanalyse wurden präabsorbierte Seren von 30 gesunden Probanden und von 30 pädiatrisch-onkologischen Patienten, einschließlich der vier genannten RMS-Patienten jeweils in einer Verdünnung von 1:100 zur Verfügung gestellt. Alle Seren wurden nach Präabsorption mit 1xTBS 1:100 verdünnt, mit 10 % Natrium-Acid und 10 % Thimerosal versetzt und bei 4° C konserviert.

2.1.5. Sekundärantikörper

Es wurde ein Alkalische Phosphatase gekoppelter anti-human IgG-Fc-Ak aus der Ziege (Dianova, Hamburg) eingesetzt. Die 0,03 % Stammlösung wurde mit 0,6 mg lyophilisiertem Ak in 1 ml autoklaviertem ddH₂O + 1 ml Glycerol hergestellt.

2.1.6. Gesamtzelluläre RNS und cDNS aus Gewebe

Die Gewebe-RNS-Proben und Gewebe-cDNS-Proben waren entweder kommerziell erworben (Gehirn, Thymus, Milz, Herz, Lunge, Leber, Pankreas, Dünndarm, Nebenniere, Niere, Prostata, Testis, Mamma) (BD Biosciences Clontech Palo Alto) oder von Frau Dr. Behrends aus klinischem Probenmaterial hergestellt worden (Tumorgewebe, Tonsille, Lymphknoten, Schilddrüse, Blase, Uterus, Plazenta, Adnexe, Knochenmark, Haut, periphere mononukleäre Blutzellen (PBL)) (vgl. 3.5.1.).

2.1.7. Genomische DNS aus autologen Fibroblasten

Die genomische DNS aus Fibroblastenkulturen des Patienten #040 war von Frau Dr. Behrends zur Verfügung gestellt worden. Die autologen Fibroblasten waren mit Einwilligung der Sorgeberechtigten aus einer kleinen im Rahmen der operativen Katheteranlage entnommenen Hautprobe angezüchtet worden.

2.2. Oligonukleotide

Die Synthese der bei der Sequenzierung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verwendeten Oligonukleotide wurde bei der Firma Metabion (Planegg-Martinsried, D) in Auftrag gegeben. Die Sequenzen der sense (se) und antisense (an) Oligonukleotidprimer für die PCR und der Hybridisierungssonden (hyb) sind in 5' nach 3'-Orientierung angegeben (**Tab. 1 und 2**).

Name	Sequenz	Beschreibung (GenBank Acc. No, Position)	Annealing Temp. (°C)	Größe des Produkts (bp)
pr40.1.se1	gtg ttt ggt tcc tca act tg	AY517556.1; bp 1491-1510	55	364
pr40.1.an1	att cag tcc caa ttc tct gg	AY517556.1; bp 1854-1835	55	
pr40.2a.se1	gac agg agt gtg aaa cca ag	AY517554.1; bp 824-843	55	259 und 400
pr40.2a.an1	cgc tcc tca tga att gct tg	AY517554.1; bp 1082-1063	55	
pr40.4a.se1	gag cta aac tag atg aat tg	AY517557.1; bp 1393-1412	55	302
pr40.4a.an1	ctt ctt cag ctg cat atc ca	AY517557.1; bp 1694-1675	55	
pr40.4a.se2	acg ctg agg cct taa gtg aa	AY517557.1; bp 1732-1751	55	236
pr40.4a.an1	tga ggc aag tgg cac cgt ac	AY517557.1; bp 1967-1948	55	
pr40.6b.se1	aaa gaa gtt ctt cgt cgg cg	AY518536.1; bp 30-49	55	271 und 399
pr40.6b.an1	ttg ctt gca ctt tgc tcc ag	AY518536.1; bp 300-281	55	
pr40.6c.se1	cgt tgc cac aat tag atg gt	AY518535.1; bp 601-620	55	298
pr40.6c.an1	cca tag cgt gag agt tct tc	AY518535.1; bp 898-879	55	
pr40.7a.se1	aag tca agc tgg agc agc aa	40.7a; bp 173-192	55	424
pr40.7a.an1	tgt tca tct cga tct gca cg	40.7a; bp 596-577	55	
pr40.7b.se1	gac cag atg aat gag cac cg	AY518538.1; bp 1493-1512	55	368
pr40.7b.an1	tca tac ttg gtc ctc cac tg	AY518538.1; bp 1860-1841	55	
pr40.8.se1	ggc aga ttt caa gct gat gt	40.8; bp 98-117	55	380 und 440
pr40.8.an1	tcc tct tca gat agc cca tc	40.8; bp 477-458	55	
pr40.10b.se1	ggt aca gat ccc ctt ttc ta	AY540750.1; bp 1606-1625	55	243 und 356
pr40.10b.an1	gct act cca tag aat ggg ag	AY540750.1; bp 1948-1929	55	
pr40.10b.se2	acg ttg ctg gtg aca gca aa	AY540750.1; bp 21-40	55	580
pr40.10b.an2	cta aga acg atg tca gct gc	AY540750.1; bp 600-581	55	
pr40.10e.se1	atg gca gtg gcc aca ta ctt	AY540751.1; bp 569-588	55	383 und 500
pr40.10e.an1	acg agt aga ttc ctt tag gc	AY540751.1; bp 951-932	55	
pr40.10e.se2	gaa gag agc cat tga aca gg	AY540751.1; bp 1986-2005	55	385 und 639
pr40.10e.an2	gct act cca tag aat ggg ag	AY540751.1; bp 2370-2351	55	

Name	Sequenz	Beschreibung (GenBank Acc. No, Position)	Annealing Temp. (°C)	Größe des Produkts (bp)
pr40.10e.se3	act gac ttt ccg ggt cat ca	AY540751.1; bp 71-90	55	329
pr40.10e.an3	agg tgc atc aac agc ctt ga	AY540751.1; bp 399-380	55	
pr40.11c.se1	aca ttc cac acg tgc aga tg	AY523634.1; bp 1544-1563	55	757
pr40.11c.an1	tac aac atg ttt ata gtt tca agt	AY523634.1; bp 2300-2277	55	
pr40.12a.se1	agg agc ttc tgg aca tca ag	AY528714.1; bp 1197-1216	55	356 und 611
pr40.12a.an1	atg gag cag gtc atc tcc at	AY528714.1; bp 1552-1533	55	
pr40.14.se2	cat tgt cac tgc tgg aca ag	40.14; bp 2354-2373	55	265
pr40.14.an1	tca cag tca tca tcc agc ct	40.14; bp 02618-2599	55	
pr40.15.se1	aga cgc att ctg tgg agt tg	40.15; bp 1262-1281	55	248
pr40.15.an1	aaa ggt ctc tgc agt ggc at	40.15; bp 1509-1490	55	
pr40.16a.se1	gtg tta acg tgg cta tag at	AY528715.1; bp 2421-2440	55	346
pr40.16a.an1	ctg aac tgc ctc aag ttg ga	AY528715.1; bp 2767-2748	55	
pr40.18.se1	aat gcg atg cca ata cca gg	40.18; bp 211-230	55	486
pr40.18.an1	act cca gat cat tgt gct gg	40.18; bp 696-677	55	
pr40.21.se1	aat gtc atc tgc cca ctt gg	AY536376.1; bp 179-198	55	322 und 480
pr40.21.an1	ctt gtt gtc cag acc att gg	AY536376.1; bp 500-481	55	
pr40.22.se1	cca tcc agc tac tac aga ca	AY540752.1; bp 190-209	55	713
pr40.22.an1	tcc tac ctg agc aag act ag	AY540752.1; bp 902-883	55	532
prTFIIS.an1	gcc atc ttg tca cag ttg ac	AK027024; bp 754-735	55	

Tab. 1. Oligonukleotide für die PCR.

Die Position aller Primerpaare in Bezug auf die relevanten Antigen-cDNS sind schematisch in die Abbildungen in Kapitel 4 (Ergebnisse) eingetragen. Die PCR diente der Expressionsanalyse oder der Sequenzanalyse in anderen Geweben.

Name	Sequenz	Beschreibung (GenBank Acc. No, Position)	Hybridisierungs- Temperatur
pr40.6b.hyb1	ctg tag taa gac ttc atc ttc agc agg cag	MU-RMS-40.6b; bp 108-79	65°C
pr40.8.hyb1	agg gac agg ttc ctc aac agc tgt atc ttc	MU-RMS-40.8; bp 260-231	65°C
pr40.10b.hyb1	cta aga acg atg tca gct gcg gaa aca tct	MU-RMS-40.10b; bp 600-571	65°C
pr40.10e.hyb1	acc att cgc tgt aag acg agg atc aga cag	MU-RMS-40.10e; bp 2225-2196	65°C
pr40.11c.hyb1	ttc aaa gtc tac tgt gct tgt act cct ggc	MU-RMS-40.11c; bp 2077-2048	65°C
pr40.22.hyb1	gtc ctt aga aaa tcc tcc tgc ccc agg tct	MU-RMS-40.22; bp 630-601	65°C

Tab. 2. Oligonukleotide für die Southern-Blot-Hybridisierung

Diese Oligonukleotid-Primer hybridisiernten an zwischen den jeweils eingesetzten PCR-Primern gelegene Sequenzen der PCR Produkte: pr40.6b.se1 x pr40.6b.an1 (pr40.6b.hyb1), pr40.8.se1 x pr40.8.an (pr40.8.hyb1), pr40.10b.se1 x pr40.10b.an1 (pr40.10b.hyb1), pr40.10e.se1 x pr40.10e.an1 (pr40.10e.hyb1), pr40.11c.se1 x pr40.11c.an1 (pr40.11c.hyb1) und pr40.22.se1 x pr40.22.an1 (pr40.22.hyb1).

2.3. Chemikalien

- Agarose (Top-Agar), #11404, Serva (Heidelberg)
- Ampicillin, #835269, Roche (Mannheim)
- BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate-toluidine), #02291, Biomol (Hamburg)
- dNTP Set, 100mM Solutions, #27-2035-01, Amersham Pharmacia (NJ, USA)
- Ethanol absolut, #1.00983.2500, Merck (Darmstadt)
- EthidiumBromid 1%ige Lösung in Wasser, #1.11608.0030, Merck (Darmstadt)
- Formamid RNS-Ladepuffer, #Sigma P-040.1, Sigma (München)
- Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder, #SM0311, MBI (Eggenstein)
- IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalacto-pyranoside), #R0392, Fermentas (St.Leon-Rot)
- Isopropanol, #1.00547, Merck (Darmstadt)
- Kanamycin, #K0879, Sigma (München)
- Maltose, #M-5885, Sigma (München)
- MgSO₄·7H₂O, #M-5921, Sigma (München)
- MOPS (4-Morpholine-propanesulfonic acid), #1124684, Roche (Mannheim)
- NaCl, #1.06404, Merck (Darmstadt)
- NaOH, #6498, Merck (Darmstadt)
- NBT (Nitroblue-Tetrazolium-chloride), #06428, Biomol (Hamburg)
- N-N-Dimethylformamide (DMF), #D-4551, Sigma (München)
- Polyoxyethylene-sorbitan Monolaurate (Tween 20), #P-1379, Sigma (München)
- Primer p(dT)₁₅, 8nmol, #814270, Roche (Mannheim)
- RNA Ladder, High Range, #SM0421, MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
- Salzsäure (HCl) 32 %, #1.00319, Merck (Darmstadt)
- Seakem-Agarose, #50004, Cambrex (Maine, USA)
- Select Agar, #30391-023, Gibco BRL (Eggenstein)
- Select Peptone 140, #30392-021, Gibco BRL (Eggenstein)
- Select Peptone, #Q-04-05, Gibco BRL (Eggenstein)
- Select Yeast Extract, #30393-020, Gibco BRL (Eggenstein)
- Tetracyclin, #T7660, Sigma (München)
- Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, #1.08382.2500, Merck (Darmstadt)
- X-Gal (5Bromo-4chloro-3indolyl-β-D-galactopyranoside), #02249, Biomol (Hamburg)
- [γ-³²P]-ATP, 370MBq/ml, 10mCi/ml, #AA0068, Amersham Pharmacia (NJ, USA)

2.4. Enzyme

- MuLV-Reverse Transkriptase, New England Biolabs (Schwalbach)
- Pfu-DNS Polymerase, #11070205, Promega (Mannheim)
- Restriktionsenzyme, NEB (Schwalbach) bzw. MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
- Taq-DNS Polymerase, #15756305, Promega (Mannheim)

2.5. Kits

- Jetstar, Plasmid Mini/Maxiprep Kit/20, #220020, Genomed (Bad Oeynhausen)
- Sephadex-G25, #G-25-80, Sigma-Aldrich (München)
- Quiaex II Gel-Extraction Kit, Qiagen (Hilden)

2.6. Verbrauchsmaterial

- Blotting Membran, Hybond N+, Porengröße 0,45 µm, #RPN203B, Amersham Pharmacia (NJ, USA)
- Falcon-Röhrchen, Becton Dickinson (Heidelberg)
- Gestopfte Pipettenspitzen, #2149P, ART Molecular Bio Produkts (San Diego, USA)
- Sartorius Membran, Porengröße 0,45 µm, #11306-41BL, Sartorius (Göttingen)
- Sartorius minisart membrane (0,2 µm), #SA16532A, Sartorius (Göttingen)
- Parafilm „M“, Laboratory Film, PM-996, American National Can (Chicago, IL)
- Petrischalen, #639102, M&B Stricker (München)

2.7. Software und Datenbanken

- BCM searchlauncher: <http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-search/gene-search.html>
- BLAST: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>
- Clone Manager 7.04, Sci Ed Central (NC, USA)
- Gentool 1.0, BioTools (Edmonton, Canada)
- SEREX-Database: <http://www2.licr.org/CancerImmunomeDB/>
- PubMed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=snp>

2.8. Geräte

- Beheiztes Wasserbad, Typ WB 22, Memert (Schwabach)
- Brutschrank, Memert Modell 400, Memert (Schwabach)
- Dampfsterilisator, Varioklav 300 E, H+P (Oberschleißheim)
- Gelelektrophoresekammer OWL, Peqlab (Erlangen)
- Kühlzentrifuge, Sigma 2K15, Sigma Laborzentrifugen (Osterode am Harz)
- ml-Pipetierhilfen, Pipetus-Akku, Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt)
- Photometer, Uvikon-Spectrophotometer 922, Bio-Tek Kontron (Neufahrn)
- Netzgerät, Bio Rad Power PAC 300, Bio Rad (München)
- Rüttler beheizt, Innova 4000, New Brunswick Scientific Co. (Edison, NJ, USA)
- Rüttler, Vortex-Genie 2, Scientific Industries (Bohemia, NY, 11716, U.S.A)
- Sicherheitswerkbank, Mobilien W 90, SWB, Variolab, Waldner (Wangen)
- Standzentrifuge, Varifuge 3.2RS, Heraeus Sepatech (Hanau)
- Taumelrüttler, Unitwist V, UniEquip (Martinsried)
- Thermocycler, GeneAmp PCR System 2400, Perkin Elmer (Weiterstadt)
- Tischzentrifuge, Centrifuge 5415C, Eppendorf (Hamburg)
- Ultrazentrifuge, Centrikon H-401, ZK 401, Berthlod Hermele (Gosheim)
- UV-Transilluminator, Bio Rad Gel Doc 2000, Bio Rad (München)
- Zentrifuge, Rotina 35R, Typ 1710, Hettich (Tuttlingen)
- μ l-Pipetierhilfen, Pipetman, Gilson S.A.S. (Villiers le Bel, Frankreich)

3. Methoden

3.1. SEREX

Wie oben beschrieben (vgl. 2.1.1.) wurde mithilfe einer Bibliothek rekombinanter λ -Bakteriophagen, die eRMS-cDNS enthielten, und gepooltem, 1:300 verdünntem Serum von Patienten mit dem gleichen Tumor (eRMS) bzw. eines eng verwandten Tumors (aRMS) nach Tumorantigenen gesucht. Um eine repräsentative Aussage über das Vorkommen von Tumorantigenen in der Expressionsbibliothek treffen zu können, wurden ca. eine Million cDNS-Expressionsklone untersucht.

Zusammenfassend wurden XL-1-Bakterien mit den rekombinanten Phagen infiziert, die infizierten Bakterien auf Agarplatten ausplattiert, und durch Zugabe von IPTG die rekombinante Proteinsynthese induziert. Die innerhalb von lytischen Plaques exprimierten rekombinanten Proteine wurden von den Agarplatten auf Nitrozellulose übertragen. Nach Inkubation der Nitrozellulose-Folien mit Serum wurde die Bindung von Serum-Ak an rekombinante Tumorproteine durch Zugabe eines markierten Zweit-Ak und anschließende enzymatische Färbung nachgewiesen (**Abb. 1**).

Die entsprechenden Arbeitsschritte sind im Folgenden genauer beschrieben.

3.1.1. Bakterienanzucht

Es wurden ca. 10 Kolonien der XL-1 Bakterien-Stammpalte gepickt, in das Transfektionsmedium überführt und bei 37 °C unter Schütteln mit 200 rpm kultiviert. Dem Medium waren Maltose und Magnesiumsulfat zugesetzt, die die spätere Phagenanheftung an die Bakterien erleichtern sollten. Da die Transfektion der Bakterien in der exponentiellen Wachstumsphase am effizientesten gelingt, und ein exponentielles Wachstum der Bakterien bei einer optischen Dichte (OD) von 0,5 (Wellenlänge 600nm) anzunehmen ist, wurde die Kultur bei dieser OD geerntet. Der Kulturansatz wurde bei 500g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in sterilem 0,01 M $MgSO_4$ bis zu einer OD von 0,5 resuspendiert. Um später auf den Agarplatten einen dichten Bakterienrasen zu erzielen, wurden 600 μ l einer Bakterien-suspension von OD 0,5 pro Platte mit 14 cm Durchmesser vorbereitet.

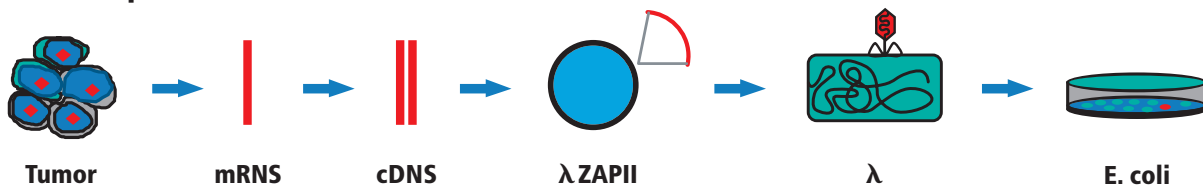
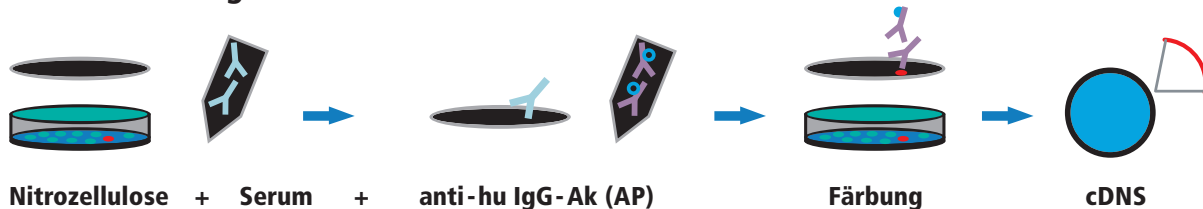
LB-Medium:

10g NaCl
10g Select Peptone
5g Select Yeast Extract

auf 1000 ml mit dd H_2O , mit 5N NaOH auf pH 7,0 einstellen, autoklavieren

Transfektionsmedium:

LB-Medium	50 ml
Maltose (20%)	500 µl
MgSO ₄ (1M, sterilfiltriert)	500 µl
Tetrazyklin-Stammlösung (10 mg/ml)	75 µl

cDNS-Expressionsbibliothek**Immunscreening****Abb. 1** – Herstellung der DNS-Expressionsbibliothek und SEREX-Methode.

Zur Herstellung einer cDNS-Expressionsbibliothek war aus einer schockgefrorenen Gewebeprobe eines eRMS mRNS isoliert worden, diese in cDNS umgeschrieben, über die Restriktionsenzyme *EcoR1* und *Xho1* in den Polylinker des Uni-ZAP-XR Vektor kloniert und zu rekombinanten λ-Phagen verpackt worden. Die primäre cDNS-Expressionsbibliothek wurde in *Escherichia coli* Bakterien amplifiziert, die infizierten Bakterien auf Agarplatten ausplattiert, und durch Zugabe von IPTG die rekombinante Proteinsynthese induziert. Die innerhalb von lytischen Plaques exprimierte rekombinante Proteine wurden von den Agarplatten auf Nitrozellulose übertragen. Nach Inkubation der Nitrozellulose-Folien mit Serum wurde die Bindung von Serum-Ak (anti-hu IgG-Ak) an rekombinante Tumorproteine durch Zugabe eines markierten Zweit-Ak und anschließende enzymatische Färbung nachgewiesen. Das Tumorantigen-Insert konnte anschließend isoliert und analysiert werden.

3.1.2. Transfektion mit λ-Phagen

Bei der anschließenden Transfektion der XL-1 Bakterien mit λ-Phagen, wurde das Volumen der Phagensuspension pro Transfektionsansatz so gewählt, dass etwa 3000 pfu auf einer Agarplatte mit einem Durchmesser von ca. 14 mm zu liegen kamen. Die Plaques, die jeweils einen rekombinanten Phagenklon und damit ein rekombinantes Tumorprotein repräsentierten, sollten dicht genug liegen, um ein effizientes Screening zu gewährleisten und weit genug voneinander entfernt, um ein Überwachsen einzelner Plaques zu vermeiden. Die pro Platte gewählte Phagenmenge (3000 pfu) wurde mit 600 µl der XL-1 Batersuspension für 15 Minuten bei 37°C (Wasserbad) inkubiert, um das Anheften der λ-Phagen an die Bakterienwand zu erleichtern. Direkt anschließend wurde der Transfektionsansatz auf LB-Agar ausplattiert.

3.1.3. Kultur der transfizierten Bakterien auf Agarplatten

Vor dem Ausplattieren gab man zu einem Transfektionsansatz 30µl 1M IPTG-Stammlösung und 6ml vorgewärmten Topagar (52°C Wasserbad). Isopropyl-1-thio-β-D-galactosid induziert die Proteinexpression. Das Gemisch wurde auf vorgewärmten LB-Tet-Platten (37°C Brutschrank) gleichmäßig ausplattiert und nach Festwerden über Nacht in den 37°C Brutschrank gestellt.

Top-Agar:

200ml LB-Medium
+ 1,4g Agarose

autoklavieren, auf 52°C warmstellen bis zum Ausplattieren

LB-Tet-Platten:

400ml LB-Medium
+ 8g Select Agar,

autoklavieren, abkühlen auf 52°C im Wasserbad
+ 600µl Tetrazyklin-Stammlösung (10mg/ml)

3.1.4. Übertragung der Proteine auf Nitrozellulose-Folien

Zur Übertragung der Proteine wurden die inkubierten Agar-Platten mit beschrifteten Nitrozellulose-Blotting Membranen luftblasenfrei bedeckt. Damit seroreaktive Plaques später sicher auf der Agar-Platte wiedergefunden werden konnten, wurden die Membranen mit 3 asymmetrischen Einstichen einer 20G-Kanüle markiert. Anschließend stellte man die Platten für zwei Stunden in den 37°C Brutschrank, da die exprimierten Proteine so auf die Nitrozellulosefilter übertragen werden konnten. Die Agarplatten mit Membranen wurden bei 4°C mindestens 30 Minuten abgekühlt, damit sich die Membranen besser vom Topagar lösen konnten. Nach Ablösen der Membranen wurden sie in einer Schale mit 1xTBS-T Puffer gesammelt (mindestens 20ml Puffer pro Membran) und für 30 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Beim Ablösen verbliebene Agarreste auf den Membranen wurden anschließend mit rauen Handschuhen abgestreift. Die gereinigten Membranen wurden in frischem 1xTBS-T-Puffer (mindestens 20ml pro Membran) gesammelt und 15 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Um unspezifische Bindungen zu blocken, wurden die Membranen einzeln in saubere Petrischalen gelegt, mit je 20ml 1xTBS/Magermilch-Lösung überschichtet und eine Stunde sanft geschüttelt.

TBS-Puffer:

10 x Stammlösung:	87,5g NaCl + 60g Tris-Base, in wenig dd H ₂ O lösen, mit 32% HCl auf pH 7,5 einstellen, auf 1000ml mit dd H ₂ O
1 x Gebrauchslösung:	900ml dd H ₂ O + 100ml 10xTBS

TBS-T Puffer:

10 x Stammlösung: 1 Liter 10xTBS Puffer
+ 5 ml TWEEN 20
1 x Gebrauchslösung: 900 ml dd H₂O + 100 ml 10xTBS-T

TBS/Magermilchlösung:

1xTBS-Puffer mit 0,5 % Magermilchpulver

3.1.5. Inkubation der Folien mit Patientenserum

Nach dreimaligem Waschen für je 10 Minuten in frischem 1xTBS-Puffer wurden die Membranen in einzelnen Petrischalen mit je 20 ml präabsorbiertem Serum überschichtet. Waren im Serum Ak gegen vom Tumor exprimierte Antigene, so banden diese an die auf Nitrozellulose übertragenen entsprechenden Proteine. Um die Effizienz der Antigensuche zu steigern, wurde ein Gemisch von Seren von vier RMS-Patienten eingesetzt. Jedes einzelne Serum lag in einer Verdünnung von 1:300 vor, zur Stabilisierung war initial 10 % NaAcid und 10 % Thimerosal zugegeben worden. Die inkubierten Membranen wurden über Nacht sanft bei Raumtemperatur geschüttelt.

3.1.6. Inkubation der Folien mit ALP-markiertem Zweitantikörper

Seroreaktive Antigene wurden mit einer immunologischen Färbetechnik identifiziert. Ein Alkalische Phosphatase-gekoppelter Sekundär-Ak aus der Ziege, der gegen den Fc-Teil menschlichen IgGs gerichtet war, wurde eingesetzt, um Antigen-bindende IgG-Ak aus Patientenserum zu detektieren.

Die Membranen wurden nach Abnehmen des Serums dreimal je 10 Minuten in jeweils frischen 1xTBS-Puffer gewaschen. Die in einzelne Petrischalen gelegten Membranen wurden danach mit je 20 ml verdünnter Ak-Stammlösung überschichtet und eine Stunde sanft geschüttelt.

Verdünnte Ak-Lösung:

0,03 % Stammlösung 1:2500 in 1xTBS mit 0,5 % Magermilchpulver verdünnen

3.1.7. Alkalische Phosphatase-Färbung

Durch Zugabe von 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP) und Nitroblautetrazolium (NBT) in der Entwicklerlösung und nachfolgende enzymatische Reaktion mit der an den Sekundär-Ak gebundenen Alkalischen Phosphatase wurde der gebildete Antigen-Ak-Komplex auf den Nitrozellulosefolie nachgewiesen.

Nach zweimaligem Waschen für je 15 Minuten in jeweils frischem 1xTBS-Puffer wurden die Membranen mit je 20ml Entwicklerlösung für ein bis zwei Stunden bei 37°C inkubiert.

Entwicklerlösung pro Membran:

20ml 1 x CDS + je 20µl BCIP-Stammlösung und NBT-Stammlösung

5 x CDS:

250ml 2M NaCl

+ 500ml 1M Tris

+ 5,083g $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$, auf 1000ml mit ddH₂O, auf pH 9,5 einstellen

3.1.8. Isolation positiver Klone

Phagenplaques, in denen Serum-Ak an rekombinante Antigene gebunden hatten, färbten sich durch die beschriebene enzymatische Reaktion blau. Mithilfe der initialen Markierung wurden die seroreaktiven Plaques auf den kühl aufbewahrten, ursprünglichen Agarplatten identifiziert und zusammen mit zwei bis drei angrenzenden seronegativen Plaque polyklonal ausgestochen. Die gestochenen Plaques wurden in beschriftete 1,5 ml Eppendorf-Gefäße überführt, mit 500µl SM-Puffer überschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Dabei diffundierten die Phagen in den Puffer. Am folgenden Tag wurden die Eppendorfgefäße ca. 30 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand, der die Phagen enthielt, wurde in ein neues Gefäß überführt und mit 20µl Chloroform 30 Sekunden gevortext. Die mit Chloroform versetzten Phagenlösungen wurden bei 4°C aufbewahrt.

SM-Puffer:

5,8g NaCl + 2,0g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

+ 50ml 1M TRIS-HCl (pH 7,5)

+ 5ml Gelatine (2%)

auf 1000ml mit dd H₂O, steril filtrieren

3.1.9. Ausschluß von IgG-Klonen und Färbeartefakten

Wie in jedem durchblutetem Tumorgewebe, waren auch in diesem Tumor B-Lymphozyten enthalten, die IgG-mRNS exprimierten. Diese mRNS wurde bei der reversen Transkription (RT) wie Tumorzell-mRNS in cDNS umgeschrieben und in das Phagen genom inseriert. Diejenigen Plaques, in denen rekombinantes IgG exprimiert wurde, banden den gegen IgG gerichteten Sekundär-Ak direkt und zeigten unabhängig von etwaigen Serum-Ak eine positive Farbreaktion. Auch Färbeartefakte z.B. durch Luftblasen, Randeefekte, Falten der Folie oder Farbkrümel waren auszuschließen.

Zum Ausschluss von rekombinantem IgG und Färbeartefakten wurde das oben beschriebene SEREX-Verfahren abgewandelt: Aufgrund des unbekanntes Titers der primären Phagenlösungen, wurden diese einmal 1:100 und einmal 1:1000 mit 0,01M MgSO₄ verdünnt und je 10 µl der verdünnten Lösung wie beschrieben mit IPTG ausplattiert. Vor Belegen der über Nacht inkubierten Agarplatten wurden die Membranen in zwei Teile geteilt, die Hälften unterschiedlich beschriftet, und die Position beider Membranhälften mit je drei Nadelstichen markiert. Nach Inkubation im 37°C Brutschrank für zwei Stunden, Entfernen und Waschen der Membranen, wurden diese wie beschrieben mit Magermilch überschichtet und eine Stunde sanft geschüttelt. Je eine Hälfte der Membranen wurde über Nacht wie beschrieben mit Serum, die andere mit reinem 1xTBS inkubiert.

Klone, die für ein seroreaktives Antigen kodierten, wurden nur nach Inkubation mit Serum, nicht aber nach Inkubation mit reinem 1xTBS angefärbt. IgG-Klone färbten sich aufgrund der Serumunabhängigen Bindung des Sekundär-Ak sowohl nach Inkubation mit Serum als auch mit reinem 1xTBS an, Färbeartefakte zeigten weder nach Inkubation mit Serum noch mit reinem 1xTBS eine positive Farbreaktion.

3.1.10. Vereinzelung positiver Klone

Zur Monoklonalisierung der polyklonal gestochenen Klone wurde die Plaquedichte so gewählt, dass einzelne Klone deutlich getrennt voneinander zu liegen kamen. Dies entsprach etwa 200 pfu pro Platte. Die übrigen Arbeitsschritte entsprachen denen des oben beschriebenen SEREX-Verfahrens. Entsprechend dem Verhältnis des positiven Klons zu den negativen Klonen bei einem polyklonal gestochenen Klon, färbte sich ein Teil der 200 Plaques gegenüber dem negativen Hintergrund an, und positive Klone konnten monoklonal gestochen werden. Durch eine weitere SEREX-Runde wurde die Monoklonalität bestätigt. Dabei färbten sich im positiven Falle alle Plaques gleich blau an.

Positive Klone wurden mit drei Zahlen bezeichnet (z.B. 40.286-1), wobei die erste für die individuelle Tumor-cDNS-Bibliothek, die zweite für die Agarplatte, von der der Phage isoliert worden war, und ggf. die dritte für einen von mehreren Plaques einer Platte steht.

3.1.11. Vermehrung der positiven Phagen

Damit eine ausreichende Menge an Phagen für nachfolgende Untersuchungen jederzeit zur Verfügung stand, wurden die positiven Phagenklone amplifiziert. Über Nacht wurde eine XL-1 MRF-Bakterienkultur bei 30°C angesetzt. Der Transfektionsansatz aus 600 µl Bakteriensuspension (OD 0,5) und 5×10^4 pfu wurde zur Anheftung der Phagen an die Bakterien 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Mit 6 ml vorgewärmtem Topagar (48°C) wurde der Transfektionsansatz auf frisch gegossenen LB-Tet-Platten ausplattiert. Nach Erstarren des Agars wurden die Platten bei

37°C für sechs bis acht Stunden inkubiert. Um eine möglichst effiziente Ausbeute zu erzielen, sollten die Phagen nicht größer als ein bis zwei Millimeter im Durchmesser betragen, nicht zusammenfließen, sich jedoch berühren. Die Platten wurden anschließend mit je 8 bis 10 ml SM-Puffer überschichtet und bei 4°C über Nacht sanft geschüttelt. Die Phagensuspension wurde von jeder Platte abgenommen und in einem sterilen Polypropylenbehälter gesammelt. Die Platten wurden mit weiteren 2 ml SM-Puffer gespült und diese asserviert. Chloroform wurde bis zu einer Endkonzentration von 5% hinzugefügt, gut durchmischt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation bei 500g für 10 Minuten wurden die Zelltrümmer entfernt. Der klare Überstand mit den amplifizierten Phagen wurde in ein neues steriles Polypropylengefäß überführt. Falls der Überstand noch trüb erschien, wurde erneut Chloroform zugesetzt und zentrifugiert. Die amplifizierten Phagen wurden in 7% DMSO bei -80°C aufbewahrt.

3.1.12. Bestimmung des Phagentiters

Zur Ermittlung des Phagentiters wurde eine Verdünnungsreihe (10^{-2} bis 10^{-10}) der Phagenlösungen mit 0,01 M $MgSO_4$ angesetzt und wie beschrieben nach Bakterienanzucht und Infektion ohne IPTG ausplattiert. Nach über Nacht-Inkubation konnte anhand der Anzahl der Plaques pro Platte der Titer berechnet werden: $Plaques/\mu l = Anzahl\ der\ Plaques \times Verdünnung / Volumen\ Einsatz$.

3.2. Differentielle serologische Analyse SEREX-definierter Antigene

Das Vorhandensein von Ak gegen gefundene SEREX-definierte Antigene im Serum von pädiatrischen Patienten mit RMS (n = 10), mit anderen Tumoren (n = 20) und im Serum gesunder Probanden (n = 30) wurde mit der differentiellen Serumanalyse untersucht. Exemplarisch für eine Antigenfamilie wurde mangels ausreichenden Serummaterials jeweils nur einer der homologen Phagenklone in die Analyse eingesetzt (**Tab. 4**).

Um positive Resultate eindeutig darstellen zu können, wurden die Test-Klone jeweils etwa im Verhältnis 1:10 mit negativen Klonen ausplattiert. Die Phagen-Bank diente hier als Pool negativer Klone, da anzunehmen war, dass die eingesetzten Seren erfahrungsgemäß mit maximal zwei bis drei der 500 plaquebildenden Einheiten der Phagenbank pro Platte reagierten, sich aber bei positiver Reaktion mit dem getesteten Klon etwa 50 Plaque anfärben sollten. Der Transfektionsansatz setzte sich entsprechend aus dem Volumen einer angemessenen Verdünnung des positiven Klons zusammen, das ca. 50 plaquebildenden Einheiten entsprach und dem Volumen einer angemessenen Verdünnung der Phagenbank, das ca. 500 plaquebildenden Einheiten entsprach. Mit 600 μl der Bakteriensuspension wurde der Transfektionsansatz nach Inkubation in einem 37°C Wasserbad für 15 Minuten gemeinsam mit IPTG ausplattiert und über Nacht in einen 37°C Brutschrank gestellt. Die weiteren Arbeitsschritte der heterologen Serumanalyse entsprachen denen des SEREX-Suchverfahren, an Stelle des Serumpools wurden jedoch die erwähnten Normal- bzw. Tumorseren verwendet.

3.3. DNS-Präparation

3.3.1. Subklonierung durch „*in vivo* Exzision“

Um das Tumorantigen-Insert weiter analysieren und im Besonderen sequenzieren zu können, benötigte man die DNS des rekombinanten Vektors in reiner Form. Der große λ -Vektor (Uni-ZAP-XR; **Abb. 2**) enthielt in seinem Genom ein Plasmid, p-Bluescript (**Abb. 3**), in dessen multiple Klonierungsstelle (**Abb. 4**) das Tumorprotein-kodierende cDNS-Insert kloniert wurde.

Mithilfe eines filamentösen f1-Helferphagen (Ex-Assist) wurde das cDNS-Insert im lebenden Bakterium („*in vivo*“) und mit flankierenden Plasmid-Sequenzen aus dem großen Phagen-Vektor kopiert bzw. quasi „ausgeschnitten“ (Exzision): Der große λ -Vektor trägt Replikationssignale, die von Replikations-Proteinen des f1-Helferphagen erkannt werden können. Bringt man den großen λ -Vektor mit einem f1-Helferphagen gleichzeitig in ein Bakterium (XL-1) ein, so erkennen die Replikations-Proteine des f1-Helferphagen f1-typische Start- und Stop-Signale auf dem λ -Vektor und kopieren den dazwischenliegenden DNS-Abschnitt. Dieser Abschnitt entspricht dem vollständigen Plasmidvektor pBlueskript mit einkloniertem cDNS-Insert. Das rekombinante Plasmid wird von f1-Hüllproteinen verpackt und bei der Bakterienlyse durch die λ -Phagen mit diesen freigesetzt.

Die DNS des Plasmidvektors muss anschließend von der DNS des λ -Phagen und f1-Helferphagen durch Passage in einem zweiten *E. coli*-Bakterienstamm (SOLR) getrennt werden. Dieser Bakterienstamm ist resistent gegen das Eindringen von λ -Phagen. Die Helfer-Phagen dringen zwar ein, können sich aber nicht in SOLR vermehren, da die Synthese essentieller f1-Proteine nicht möglich ist. Verantwortlich dafür ist eine sogenannte amber-Mutation in dem Phagen genom, deren Effekt der SOLR-Stamm im Gegensatz zu XL-1 nicht unterdrücken kann. Das bedeutet, dass in den infizierten SOLR-Bakterien nur die rekombinanten Plasmide übrig bleiben.

Über Nacht wurden separate Schüttelkulturen bei 30°C für XL-1 und SOLR angesetzt. Dabei dienten Maltose und MgSO₄ der Vorbereitung zur Transfektion. Die Bakterienkulturen wurden für 10 Minuten bei 500g zentrifugiert, der Überstand abgegossen und das Pellet in 0,01M MgSO₄ bis zu einer OD von 1 (Wellenlänge 600nm) resuspendiert. Die SOLR-Suspension wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei 4°C aufbewahrt. Für die Exzision des Plasmidvektors in lebenden Bakterien („*in vivo*“) wurden 200 μ l XL-1-Blue MRF⁺ mit 250 μ l eines positiven Phagen-Klons (> 1 x 10⁵ pfu) und 1 μ l des Helferphagen „Ex-Assist“ (> 1 x 10⁶ pfu) zum Anheften der Phagen an die Bakterienwand 15 Minuten im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 3 ml LB-Tet-MM hinzugefügt und für drei Stunden bei 37°C geschüttelt. Der Transfektionsansatz wurde für 20 Minuten auf 70°C aufgeheizt und danach 15 Minuten bei 1000g zentrifugiert. Der Überstand, der λ -Phagen, f1-Helferphagen und die rekombinanten Phagemide enthielt, wurde in sterilen Falconröhrchen aufgefangen. Um später sichere Einzelkolonien zu erhalten, wurden für die Transfektion des SOLR-Bakterienstammes 200 μ l der SOLR-Bakteriensuspension einmal mit 100 μ l des Überstandes, ein weiteres mal mit 10 μ l des Überstandes in einem Eppendorf-Cup

angesetzt. Der Transfektionsansatz wurde für 15 Minuten in ein 37°C Wasserbad gestellt, anschließend auf jeweils einer kleinen LB-Ampicillin-Platte mit einem Glasspatel ausplattiert und über Nacht im 37°C Brutschrank inkubiert. Aufgrund des Ampicillin-Resistenzgens im p-Bluescript Vektor konnten die rekombinanten Phagemide selektioniert werden. Die auf der LB-Ampicillin-Platte gewachsenen Kolonien wurden zur Aufreinigung in der Mini-Präparation angesetzt.

XL-1 MRF⁺ Bakterien-Kultur:

1 Kolonie XL-1
5 ml LB-Medium
50 µl 1 M MgSO₄
50 µl Maltose (20%)
7,5 µl Tetrazyklin

SOLR Bakterienkultur:

1 Kolonie SOLR
5 ml LB-Medium
50 µl 1 M MgSO₄
50 µl Maltose (20%)
25 µl Kanamycin

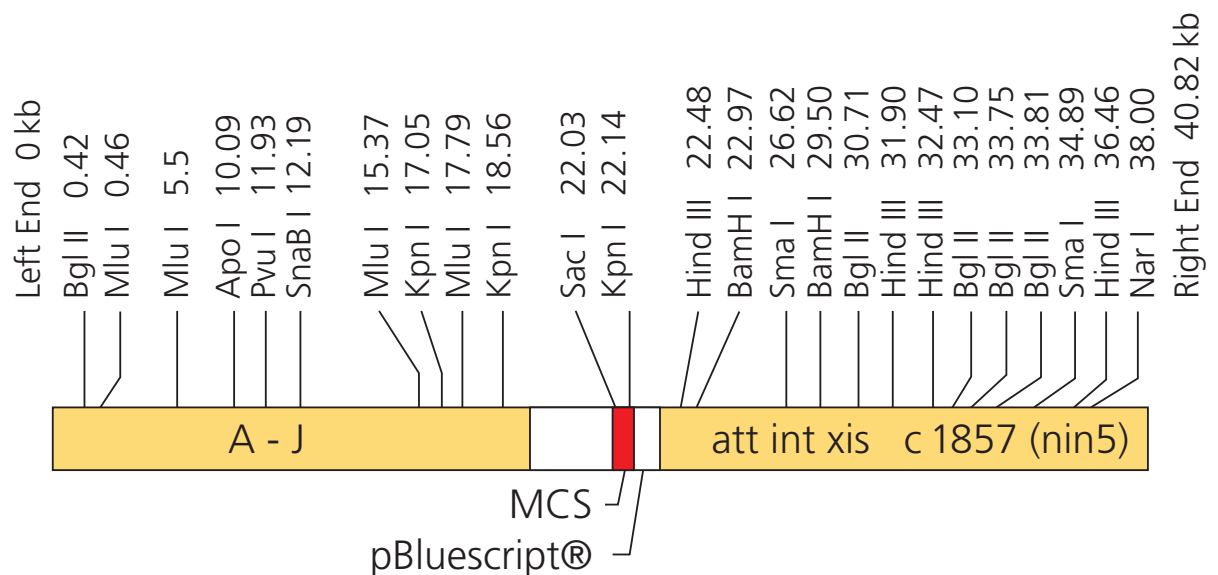


Abb. 2 – Karte des Uni-ZAP XR Insertionsvektors (STRATAGENE).

Die RMS-cDNS wurde über die Restriktionsenzyme *EcoR1* und *Xho1* in den Polylinker des Uni-ZAP-XR Vektors kloniert (siehe **Abb. 4**). Der Polylinker des UNI-ZAP-XR Vektors, in den die Tumor cDNS einkloniert worden war, lag innerhalb des *lacZ*-Gens, welches für eine Untereinheit des Enzyms β -Galaktosidase kodiert. Mithilfe des Galaktose-Analogons Isopropyl- β -D-Thiogalactosid (IPTG) konnte die Repression des *lacZ*-Genpromotors aufgehoben, und damit die Expression der rekombinanten Tumorproteine induziert werden (siehe **Abb. 3**). Um das cDNS-Insert in einem Plasmidsystem charakterisieren zu können, wurde das pBluescript-Phagemid (siehe **Abb. 3**) mithilfe des Helferphagen ExAssist™ *in vivo* exzidiert.

pBluescript® II SK (+/-) Phagemids

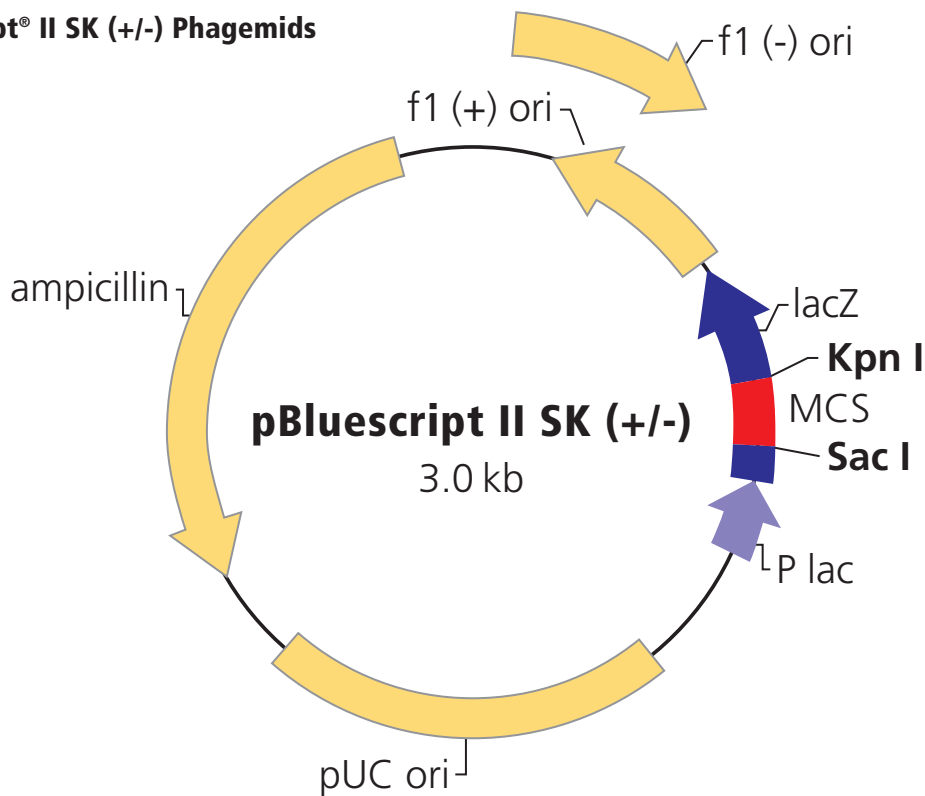


Abb. 3 – Zirkuläre Vektorkarte des pBlueskript-Phagemids (STRATAGENE).

Der pBluescript-Vektor hat eine Länge von 2958bp. f1 (+) ori = Ursprung der DNS-Replikation des sense-Stranges des *lacZ*-Gens. f1 (-) ori = Ursprung der DNS-Replikation des antisense-Stranges des *lacZ*-Gens. lacZ' = *lacZ*-Gen. MCS = *multiple cloning site*. P lac = lac Promoter. pUC ori = Ursprung der DNS-Replikation des Plasmids. ampicillin = Ampicillin-Resistenzgen.

pBluescript® II SK (+/-) Multiple Cloning Site Region (sequence shown 598-826)

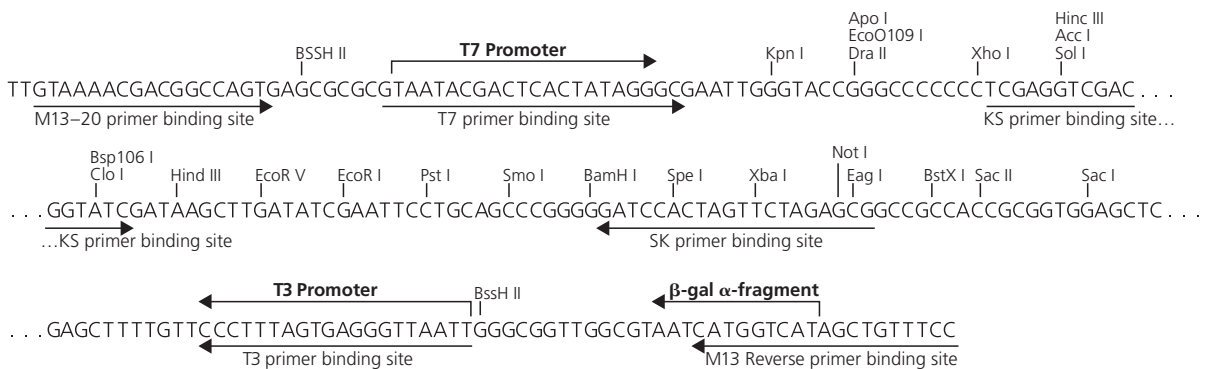


Abb. 4 – Sequenz der *multiple cloning site* des pBlueskript-Phagemids (STRATAGENE).

Der Polylinker des pBlueskript-Phagemids wird von T7- und T3-Promotoren flankiert.

3.3.2. Mini-Präparation von Plasmid-DNS

Die Mini-Präparation durch alkalische Lyse ermöglichte die schnelle Gewinnung kleinerer Plasmidmengen. Eine Schüttelkultur mit 5 ml LB-Medium, 25 μ l Ampicillin und 1 Kolonie der SOLR-Platte wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert. Etwa 1,5 ml jeder Kultur wurden in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und 5 Minuten bei 18000 rpm und Raumtemperatur in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Bakterienpellet wurde in 100 μ l Lösung 1 resuspendiert und vorsichtig gemischt. Die im Präparat enthaltene RNS wurde mithilfe der Ribonuklease in Lösung 1 abgebaut. Für die Lyse der Zellen wurden 100 μ l Lösung 2 zugegeben und wiederum vorsichtig gemischt, damit die chromosomale Bakterien-DNS nicht beschädigt wurde und dadurch gut von der Plasmid-DNS (pDNS) getrennt werden konnte. Nach Inkubation bei Raumtemperatur für 5 Minuten wurden 100 μ l Lösung 3 hinzupipettiert, vorsichtig gemischt und bei 15000 rpm und Raumtemperatur 20 Minuten zentrifugiert. Dadurch wurden die Zelltrümmer von der pDNS getrennt. Der Überstand mit pDNS wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt, zum Ausfällen der DNS mit 750 μ l 100% Ethanol versetzt und 15 Minuten bei 15000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und das Plasmid-Sediment nach kurzem Trocknen in 100 μ l autoklaviertem H₂O aufgenommen. Mit der anschließenden Restriktionsanalyse (siehe 3.4.1.) wurde überprüft, ob die gewonnene pDNS ein cDNS-Insert enthielt.

Lösung 1:

50 mM Sucrose
25 mM TRIS (pH 8)
10 mM EDTA
1 μ l RNSse A (10 mg/ml)

Lösung 2:

1% w/v SDS
0,2 M NaOH

Lösung 3:

600 ml 5 M Kaliumacetat (pH 5,3)
115 ml Eisessig
ddH₂O ad 1000 ml

3.3.3. Maxi-Präparation von Plasmid-DNS

Diese Methode diente der Gewinnung reiner pDNS, die anschließend sequenziert werden konnte. Nach Restriktionsanalyse wurden 400 μ l geeigneter Mini-Präp-Kulturen auf 400 ml LB-Amp (2 ml Ampicillin 100 μ g/ml) in großen Erlenmeyerkolben angesetzt und über Nacht bei 37 °C geschüttelt, bis die Bakterien eine maximale Dichte erreicht hatten. Die Kultur wurde 10 Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgegossen und das Bakterienpellet in 10 ml Lösung 1 (siehe 3.3.2.) resuspendiert. 800 μ l der Bakteriensuspension wurden mit 1 ml LB-Medium und 100 μ l DMSO bei -80 °C weggefroren. Der Rest der Bakteriensuspension wurde zur Auflösung der Zellmembran mit 10 ml Lösung 2 versetzt und vorsichtig gemischt. Nach Inkubation von 5 Minuten bei Raumtemperatur wurden 10 ml der Lösung 3 zugegeben, kräftig geschüttelt und 30 Minuten bei 20000 rpm zentrifugiert. Die pDNS befand sich im klaren Überstand, das gelatinöse Sediment enthielt chromosomale DNS und Zelltrümmer. Zur weiteren Lysatreinigung diente die Anionenaustauschchromatographie. Die stark negativ geladenen Nucleinsäuren banden dabei an das Säulenmaterial, während die weniger stark geladenen Proteine durchliefen.

Die Säulen (Qiagen) wurden mit 15 ml Lösung 4 equilibriert. Der klare Überstand wurde zum Abfangen von Sediment durch Verbandmull auf die Säule gegeben. Nach zweimaligem Waschen mit 30 ml Lösung 5, wurde die DNS mit 15 ml Lösung 6 eluiert. Zur Ausfällung der Nukleinsäuren wurde dem Eluat 11 ml Isopropanol hinzugefügt und anschließend 30 Minuten bei 5000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen, das Pellet luftgetrocknet und in 1 ml autoklaviertem Wasser gelöst. Die Konzentrationsmessung der gewonnenen pDNS erfolgte mit einer 1:20 Verdünnung in einem Kontron-Photometer bei 260 nm. Anschließend folgte eine Kontrollspaltung der gereinigten pDNS mithilfe von Restriktionsenzymen (siehe 3.4.1.).

Die aufgereinigte pDNS wurde, korrespondierend zum monoklonalen Phagen, mit drei Zahlen bezeichnet (z. B. p40.286-1), wobei die erste für die individuelle Tumorbank, die zweite für die Agarplatte, von der der Phage isoliert worden war, und ggf. die dritte für ein individuelles von mehreren Isolaten steht.

3.4. DNS-Analyse

3.4.1. Bestimmung der Länge der cDNS-Inserts

3.4.1.1. DNS-Verdau mit Restriktionsenzymen

Um die Größenordnung der DNS-Inserts beurteilen zu können, wurden Restriktionsanalysen mit den Endonuklease BamHI, EcoRI und XhoI durchgeführt. BamHI linearisierte den rekombinanten Phagenvektor. Das entstandene Fragment entsprach der Länge des Vektors (2,9 kb) plus der Länge des Inserts, sofern das Insert keine BamHI-Schnittstelle enthielt. Mithilfe der Enzyme EcoRI und XhoI, über die das Insert ursprünglich in Uni-ZAP-XR hineinkloniert worden war, konnte das Insert bzw. Insertfragmente herausgeschnitten werden und in der anschließenden Gelelektrophorese die Basenlänge bestimmt werden. Es wurden 17 µl der Mini-Präp-DNS mit 1 µl Enzym und 2 µl des geeigneten 10 x Puffers angesetzt und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Größenaufftrennung erfolgte mit der Agarosegelelektrophorese (siehe 3.4.1.2.). Für die Kontrollspaltung der Maxi-Präp-DNS wurden 1 µg DNS mit 2 µl geeigneten 10 x Restriktionspuffer und 1 µl Enzym angesetzt, mit ddH₂O auf 20 µl aufgefüllt und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde zur Größenaufftrennung die Gelelektrophorese durchgeführt (siehe 3.4.1.2.).

3.4.1.2. Agarose-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese diente der Größenbestimmung von PCR- (siehe 3.5.1.2.) und Restriktionsprodukten. Es wurde ein 1% Agarosegel aus Agarose und 1 x TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA) hergestellt und in der Mikrowelle 3 Minuten aufgekocht. Um die DNS im Gel sichtbar zu machen, wurde 0,1 µg/ml Ethidiumbromid hinzugefügt. Das interkalierende Agens Ethidiumbromid bildet mit Nukleinsäuren Komplexe, die unter UV-Licht helle Fluoreszenzen zeigen. Nach Festwerden

des Gels in der Kammer wurden pro Tasche 17 µl DNS mit 3 µl Glycerol-Ladepuffer aufgetragen. Als Größenmarker diente die 1 kb DNS-Leiter (Gene Ruler). Nach Anlegen einer Spannung von 80 bis 100 Volt ließ man die Proben etwa eine Stunde durch das Gel laufen. Mithilfe eines Transilluminators wurden die Fragmente unter UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert.

50 x TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer) (50-fach konzentriert)

2,0 M Tris-Base 242,2 g

1,0 M Eisessig 57,1 mL

0,1 M EDTA 18,61 g Na₂EDTA x 2 H₂O, auf pH 8,3 einstellen

3.4.2. Isolation von PCR-Produkten aus dem Agarosegel

Die PCR-Produkte wurden im Agarosegel gröbensepariert und unter langwelligem UV-Licht mit einem sauberen Skalpell knapp aus dem Gel ausgeschnitten. Die DNS-Isolation aus dem Gel erfolgte mit Hilfe des *Quiaex II Gel-Extraction Kit* (QUIAGEN) nach den Angaben des Herstellers.

3.4.3. Sequenzanalyse

Die Sequenzierung der cDNS-Inserts wurde von der Firma SEQUIERVE durchgeführt. Es wurden 4 µg Plasmid oder 100 ng PCR-Produkt in 20 µl ddH₂O und 2 µl einer Lösung des jeweils geeigneten, 18-Basen langen Oligonukleotidprimers in ddH₂O (100 pmol/µl) zur Sequenzierung versandt. Als Primer für die initialen Sequenzierungsreaktionen dienten Sequenzen der T3- (5'-AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG) und T7-Promoterregionen (5'-CAT TAT GCT GAG TGA TAT CCC G) des p-Bluescript Vektors, die die multiple Klonierungsstelle (657-759 bp) und damit die inserierte cDNS flankierten. Da die zuverlässige Leseweite der Sequenzierung bei etwa 500 Nukleotiden lag, wurden Inserts mit einer Länge von mehr als 1500 Basen nach Auswahl geeigneter Primer sequenziell sequenziert.

Die fertigen Sequenzen der Antigen-cDNS wurden mithilfe des Programmes Gene Tool untereinander auf eventuelle Homologien überprüft. Homologien zu bereits bekannten und veröffentlichten Sequenzen wurden mit dem Suchprogramm BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) der GenBank des *National Center for Biotechnology Information* (NCIB, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) und mithilfe der SEREX-Datenbank (www.licr.org/SEREX.html) untersucht.

Die Antigene wurden auf der Basis ihrer cDNS-Homologie in die Antigengruppen MU-RMS-40.1-23 untergeordnet, die jeweils von einem Gen kodiert wurden. Die einzelnen cDNS einer Gruppe wurden der Übersichtlichkeit halber mit a-f bezeichnet. Jeder Buchstabe kodiert dabei für ein individuelles cDNS-Isolat. cDNS mit neuen molekularen Charakteristika wurden in die GenBank-Datenbank eingespeist und erhielten eine GenBank-Zugangsnummer.

Offene Leserahmen (ORF)-Analysen wurden mit dem Programm Clone Manager 5 durchgeführt, der *cut off* wurde bei einer ORF-Mindestlänge von 20 Aminosäuren (AS) gesetzt.

3.5. mRNS Expressionsanalyse

3.5.1. RT-PCR

Mit der RT-PCR wurde die mRNS-Expression bestimmter SEREX-definierter Antigene und bekannter Homologe in einer repräsentativen Sammlung von verschiedenen Normalgeweben und zahlreichen Tumorgeweben untersucht.

3.5.1.1. Reverse Transkription (RT)

Für das Umschreiben der Gewebe-mRNS in cDNS wurden 3 µg RNS in 15 µl RNSase-freiem ddH₂O (1:1000 mit DEPC verdünnt) gelöst, mit 1 µl Oligo-dT-Primer 10 Minuten bei 70°C denaturiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 2 µl dNTP (10 mM), 2 µl 10 x Puffer und 1 µl M-MuLV-Reverser Transkriptase (200 U/µl) erfolgte die Auffüllreaktion durch Inkubation bei 42°C für eine Stunde.

3.5.1.2. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für die mRNS-Expressionsanalyse wurden 3 µl cDNS, je 1 µl der beiden ausgewählten 20bp langen Oligonukleotidprimer (**Tab. 1**) in einer Verdünnung von 1:10 (vgl. 2.2.1.), 5 µl 10 x Polymerasepuffer, 3 µl MgCl₂, 2,5 µl DMSO, 1 µl dNTP (10 mM) und 33 µl ddH₂O angesetzt und gemischt. DMSO diente als PCR-Beschleuniger. Nach Denaturierung der dsDNS für eine Minute bei 95°C, wurde jeder Probe auf Eis 0,2 µl Taq DNS-Polymerase zugegeben. Bei Verwendung der stabilen Platinum Taq[®] DNS-Polymerase (5 U/µl), konnte diese bereits vor dem Denaturierungsschritt zugegeben werden. In Abhängigkeit von der Schmelztemperatur der Primer, banden diese bei 50°C bis 60°C an die denaturierte Matrize und wurden bei 72°C von der Polymerase verlängert. Dieser PCR-Zyklus wurde 40-mal wiederholt.

Die Primerpaare wurden so gewählt, dass sie im Bereich von zwei Exons liegend ein möglichst große Intron überspannten, und somit PCR-Produkte von genomischer DNS entweder gar nicht oder nicht mit derselben Größe wie von cDNS entstehen konnten. Dies wurde durch eine einmalige PCR mit humaner genomischer DNS bestätigt.

Die Effektivität und Spezifität der PCR wurde mit zwei Positivkontrollen beurteilt. Als Positivkontrollen wurden 3 µl der mit SEREX untersuchten RMS-Phagenbank und 1 µl der entsprechenden pDNS (1:100 verdünnt) eingesetzt. Durch Negativkontrollen (3 µl ddH₂O) wurde ausgeschlossen, dass die Proben kontaminiert waren.

Die Größenbestimmung der PCR-Produkte erfolgte mithilfe eines kommerziell erhältlichen DNS-Größenmarkers in der Agarose-Gelelektrophorese (1,5%) (siehe 3.4.1.2.). Es wurden 15 µl der Probe mit 5 µl Glycerolladepuffer aufgetragen und für eine Stunde eine Spannung von 100 Volt angelegt.

3.5.2. Southern-Blot-Hybridisierung

Um die mittels Elektrophorese entsprechend ihrer Länge getrennten DNS-Fragmente durch Hybridisierung spezifisch nachweisen zu können, wurden diese aus dem Gel auf eine Nylon-Membran transferiert.

3.5.2.1. Blotting auf Nylonmembranen

Das Gel wurde 15 bis 30 Minuten bis zum kompletten Umschlagen des Farbindikators in eine Wanne mit 0,2M HCl gegeben und leicht geschwenkt. Die DNS wurde dabei teilweise depuriniert und zerbrach in kleinere Fragmente. Um eine Diffusion von beiden Seiten zu ermöglichen, sollte das Gel schwimmen. Anschließend wurde das Gel mit ddH₂O gespült und 30 Minuten in Denaturierungslösung (1,5M NaCl und 0,5M NaOH) inkubiert.

Die DNS wurde durch kapillären Transfer auf eine Nylonmembran übertragen. Der verwendete Puffer entsprach in der Zusammensetzung der Denaturierungslösung. Zum Fixieren der DNS wurde die Membran zwischen zwei Bögen von trockenem Whatman-3MM-Filterpapier für zwei Stunden bei 80 °C gebacken.

3.5.2.2. Radioaktive Hybridisierung

Die Markierung der Oligonukleotid-Sonden (**Tab. 1**) erfolgte mithilfe der T4-Polynukleotidkinase und radioaktiv markierter Nukleotide: zunächst wurden 10 µl Oligonukleotidprimer mit 25,5 µl ddH₂O 5 Minuten lang auf 70 °C erhitzt und anschließend sofort auf Eis gegeben. Dieser Probe wurden 5 µl 10 x Polynukleotidkinase-Puffer, 7,5 µl [γ -³²P]-ATP und 2 µl T4 Polynukleotidkinase zugesetzt und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde daraufhin durch Zugabe von 1 µl 0,5M EDTA gestoppt.

Nach der Markierung der Oligonukleotide wurden diese von nicht eingebauten Nukleotiden mithilfe von G-25 Säulen getrennt: nach Equilibrierung der G-25 Säule mit 3 x 1 ml 1 x TE-Puffer wurden 50 µl des Markierungsansatzes mit 450 µl 1 x TE-Puffer auf die Säule gegeben, und das Eluat anschließend aufgefangen. Mit jeweils 200 µl 1 x TE-Puffer wurden sieben weitere Fraktionen aufgefangen und die Radioaktivität jeder Fraktion gemessen. Die Fraktionen mit der höchsten Radioaktivität wurden auf etwa 1 ml gepoolt.

Um verbleibende freie Bindungsstellen abzusättigen, wurde die Membran, auf der die nachzuweisende DNS gebunden war, zunächst mit Hybridisierungspuffer geblockt: diese sogenannte Prähybridisierung der Membran erfolgte in 25ml Hybridisierungspuffer nach Church für 30 Minuten bei 65 °C. Nach dieser Zeit wurde der Hybridisierungspuffer erneuert, die radioaktiv markierte Probe zugegeben, und die Hybridisierung an homologe DNS-Bereiche über Nacht bei 65 °C durchgeführt. Die hybridisierte Nylonmembran wurde bei 65 °C in 2 x SSC + 1 % SDS gewaschen, getrocknet und bei -80 °C autoradiographiert. Die optimale Dauer der Exposition richtete sich nach der Intensität der radioaktiven Strahlung. Um die Hybridisierung jedes einzelnen PCR-Produkts optimal beurteilen zu können, wurden alle Membranen nach Exposition über 2 Stunden, 5 Stunden und über Nacht untersucht.

Church-Puffer:

350ml 20% SDS

2ml 0,5M EDTA

148ml ddH₂O

100ml NaH₂PO₄ 1M (pH 7,2)

400ml Na₂HPO₄ 1M (pH 7,2)

TE-Puffer:

10mM Tris (pH 8)

1mM EDTA (pH 8)

4. Ergebnisse

4.1. Isolierung und molekulare Charakterisierung SEREX-definierter RMS Antigene

Zur Identifizierung von Tumorantigenen wurde eine RMS-cDNS Expressionsbibliothek mit dem SEREX-Verfahren analysiert. Dafür wurde ein Pool aus Seren vier verschiedener Tumorpatienten verwendet. Unter 1×10^6 untersuchten Klonen waren 55 Klone positiv. Fünf dieser Klone wurden mithilfe des bereits beschriebenen Verfahrens als IgG-Klone identifiziert und von weiteren Analysen ausgeschlossen (vgl. 3.1.9).

Die restlichen 50 Plasmide kodierten mindestens 45 verschiedene Antigene, die aufgrund ihrer cDNS-Homologie zu *GenBank*-Einträgen 23 Genen zugeordnet und entsprechend in 23 Untergruppen unterteilt werden konnten (**Tab. 3**). Von den 23 Gruppen zeigten 19 eine Homologie zu cDNS, die für bekannte Proteine kodierten, und vier zu cDNS mit bislang unbekannter Funktion (**Tab. 4-7**). Die gefundenen Antigenfamilien wurden in Analogie zu anderen publizierten SEREX-Antigenen mit MU-RMS-40.1 bis MU-RMS-40.23 benannt. Die erste Angabe kodiert den Ort München, die zweite die Tumorentität.

Die meisten der identifizierten Antigene wurden wahrscheinlich von dem ORF abgelesen, der auch ihre Homologe kodierte, da dieser in der Regel dem ersten und größten ORF in der kodierenden cDNS entsprach. Entsprechend werden neue molekulare Charakteristika der cDNS in erster Linie mit Bezug auf diesen ORF bzw. auf die korrespondierenden, hypothetischen Antigene diskutiert. Einige wenige Antigene mussten von einem alternativen ORF kodiert sein, da die entsprechenden Plasmide die bekannten kodierenden Sequenzen nicht enthielten.

Falls sich gegenüber dem publizierten Homolog nicht-konservative einzelne Basenaustausche innerhalb der hypothetischen kodierenden Sequenzen fanden, wurde die betreffende Sequenz aus autologer, genomischer Fibroblasten-DNS amplifiziert und sequenziert, um genomische Polymorphismen im Sinne der *snp* (*single nucleotide polymorphism*) von tumorspezifischen Mutationen trennen zu können.

In den nachfolgenden Abbildungen sind alle molekularen cDNS-Charakteristika, die weder in Einträgen der *GenBank* noch in Eingaben der SEREX database enthalten waren, rot gekennzeichnet. Zu ihnen zählten eine tumorspezifische Mutation, mehrere neue *snp*, Speißvarianten, Deletionen und Insertionen ebenso wie erweiterte 3' und 5'-*untranslated region* (UTR) Sequenzen.

RMS-Antigene	Plasmide
MU-RMS-40.1	p40.2
MU-RMS-40.2	a) <u>p40.5</u> ; b) p40.7; c) p40.89-1; d) p40.97; e) p40.254; f) p40.288-1
MU-RMS-40.3	a) p40.13; b) p40.79-1; c) p40.163-2; d) p40.209; e) p40.285; f) p40.288-2
MU-RMS-40.4	a) p40.19; b) p40.68; c) p40.282; d) p40.286-2
MU-RMS-40.5	p40.22
MU-RMS-40.6	a) p40.45; b) p40.79-2; c) <u>p40.177</u>
MU-RMS-40.7	a) p40.57; b) p40.88-2
MU-RMS-40.8	p40.58
MU-RMS-40.9	a) p40.64; b) p40.298; c) p40.124
MU-RMS-40.10	a) p40.81; b) p40.152-2; c) p40.173; d) p40.275; e) p40.301
MU-RMS-40.11	a) p40.88-1; b) p40.118; c) p40.170
MU-RMS-40.12	a) <u>p40.60-2</u> ; b) <u>p40.152-1</u>
MU-RMS-40.13	p40.96
MU-RMS-40.14	p40.101
MU-RMS-40.15	p40.105
MU-RMS-40.16	a) p40.111; b) p40.163-1
MU-RMS-40.17	p40.152-3
MU-RMS-40.18	p40.128
MU-RMS-40.19	a) p40.136; b) p40.222
MU-RMS-40.20	p40.168
MU-RMS-40.21	p40.190
MU-RMS-40.22	p40.268-1
MU-RMS-40.23	p40.286-1

Tab. 3. Zuordnung der Antigengruppen zu den korrespondierenden Plasmiden
Die Plasmide, deren cDNS-Inserts tumorspezifische Veränderungen trugen, sind unterstrichen.

Tumorantigen-Gruppe [GenBank]	Anzahl isolierter Klone	Beste cDNS Homologie [GenBank] Temp. (°C)	Biologische Bedeutung von Genprodukten homologer cDNS)	Sequenzunterschiede zum genannten GenBank-Homolog	Sequenzunterschiede zu bekannten Genprodukten des GenBank-Homologs
MU-RMS-40.1 [AY517556.1]	1	AND-1, <i>Acidic nucleoplasmic DNA Binding protein</i> [XM_051658.1]	DNS-bindendes Protein	Nur 3'UTR kloniert 3'UTR erweitert	Alternatives Genprodukt der 3'UTR
MU-RMS-40.2 [a] AY517554.1]	6	RALBP, <i>RalA binding protein</i> [BC013126.1]	RalA: Protein der Ras-Familie mit GTPase-Aktivität	a-f) 5'ORF inkomplett a) 141 bp Deletion in ORF a,f) 3 bp Substitution in 3'UTR c) 1 bp Insertion in 3'UTR	a- f) Inkompletter N-Terminus a) 47 AS Deletion
MU-RMS-40.3 [AY517555.1]	6	MYH3, <i>Myosin, heavy polypeptide 3</i> [X15696.1]	Schwerkette des embryonalen Skelettmuskel-Myosins Myosin: kontraktiles Protein der Muskelfasern	a-f) 5'ORF inkomplett 1 bp Substitution in ORF	a-f) Inkompletter N-Terminus
MU-RMS-40.4 [a] AY517557.1)	4	FLJ20364 [XM_047960.1]	Nicht bekannt	a-d) 3 bp Substitution in ORF a,d) Erweiterte 5'UTR b,c) 5'ORF inkomplett	a-d) 2 AS Substitution a,d) Inkompletter N-Terminus
MU-RMS-40.5 [AY517558.1]	1	MLH1, <i>MutL homolog 1</i> [XM_044890.1]	DNS-Reparaturprotein	1 bp Substitution in ORF 3 bp Deletion in 3'UTR	Keine

ab. 4. cDNS-Homologie der Antigene MU-RMS-40.1 bis -40.5 zu Einträgen in die GenBank-Datenbank.

Tumorantigen-Gruppe [GenBank]	Anzahl isolierter Klone	Beste cDNS Homologie [GenBank] Temp. (°C)	Biologische Bedeutung von Genprodukten homologer cDNS)	Sequenzunterschiede zum genannten GenBank-Homolog	Sequenzunterschiede zu bekannten Genprodukten des GenBank-Homologs
MU-RMS-40.6 [a] AY518537.1 b) AY518536.1 c) AY518535.1]	3	FLJ20644 [XM_046637.1]	Nicht bekannt	a,c) 5'ORF inkomplett b) 128bp Deletion im ORF c) 1 bp Substitution im ORF	a,c) Inkompletter N-Terminus b) 1 Altern. C-Terminus (ORF shift) 2 Trunkierter N-Terminus c) 1 AS Substitution (tumorspezifisch)
MU-RMS-40.7 [b] AY518538.1]	2	MYH7 <i>Myosin, heavy polypeptide 7</i> [XM_033374.1]	Isoform der Myosin-Schwereketten des Herzmuskels	a,b) 5'ORF inkomplett a) 1 bp Insertion im ORF b) 1 bp Substitution im ORF	a,b) Inkompletter N-Terminus a) Altern. C-Terminus (ORF shift) b) 1 AS Substitution (<i>snp</i>)
MU-RMS-40.8	1	FLJ13441 [XM_049510.1]	Nicht bekannt	5'ORF inkomplett 60bp Deletion	Inkompletter N-Terminus 20 AS Deletion
MU-RMS-40.9 [a] AY518933.1 c) AY518934.1]	3	SMYD1 [XM_097915.2]	Chromatinregulation	a-c) 5'ORF inkomplett a) 1 bp Substitution i.m ORF a,b) 2 bp Substitution in 3'UTR c) 39bp Deletion im ORF 5 bp Substitution in 3'UTR	a-c) Inkompletter N-Terminus c) 13 AS Deletion
MU-RMS-40.10 [b] AY540750.1 e) AY540751.1]	5	PMS1 <i>Human homolog of yeast MutL 1</i> [U13695.1] b: EEF1α <i>Eukaryotic translation Elongation factor 1α</i> [BC010735.1]	PMS1: DNS-Reparaturprotein EEF1: Translationselongationsfaktor	a,d) längere 5'UTR 1 bp Substitution in 5'UTR b) Inkompletter, altern.5'ORF 1 bp Substitution im ORF 113bp Deletion im ORF c) 5'ORF inkomplett e) 5'UTR: alternativ gespleißt Exon 6 gespleißt (ORF) 254bp Deletion im 3'ORF	b) Inkompletter, altern. N-Terminus 1 AS Substitution (<i>snp</i>) Altern. C-Terminus (ORF shift) c) Inkompletter N-Terminus e) 39 AS Deletion Altern. C-Terminus (ORF shift)

Tab. 5. cDNS-Homologie der Antigene MU-RMS-40.6 bis -40.10 zu Einträgen in die GenBank-Datenbank.

Tumorantigen-Gruppe [GenBank]	Anzahl isolierter Klone	Beste cDNS Homologie [GenBank] Temp. (°C)	Biologische Bedeutung von Genprodukten homologer cDNS)	Sequenzunterschiede zum genannten GenBank-Homolog	Sequenzunterschiede zu bekannten Genprodukten des GenBank-Homologs
MU-RMS-40.11 [c] AY523634.1]	3	TTC3 <i>Tetratricopeptide repeat domain 3</i> [NM_003316.1]	Protein, das in RNS-Synthese und Mitose eingreift	a-c) 5'ORF inkomplett a) 3'ORF inkomplett c) Alternativ gespleißter 3'ORF	a-c) Inkompletter N-Terminus a) Inkompletter C-Terminus c) Alternativer, kurzer C-Terminus
MU-RMS-40.12 [b] AY528714.1]	2	LMN C <i>Lamin C</i> [XM_044162.1]	Intermediärfilament der Kernhülle	255 bp Deletion in ORF	85 AS Deletion
MU-RMS-40.13	1	LDH1 <i>Laktatdehydrogenase A</i> [NM_005566.1]	Enzym der Glykolyse	Keine	Keine
MU-RMS-40.14	1	TTN, <i>titin</i> [XM_038278.1]	Muskelfilamentprotein	Nur 5'UTR kloniert 1 bp Insertion in 5'UTR	Alternatives Genprodukt der 5'UTR Alternativer C-Terminus (ORF <i>shift</i>)
MU-RMS-40.15	1	PIMT <i>PRIP-interacting protein</i> [BC011999.1, NM_024831.5]	Interaktion mit PRIP (Koaktivator nukleärer Rezeptoren)	5'ORF inkomplett 1 bp Insertion im ORF	Inkompletter N-Terminus Alternativer C-Terminus (ORF <i>shift</i>)
MU-RMS-40.16 [a] AY528715.1]	2	AKAP450 <i>A kinase anchor protein 9</i> [XM_029162.1]	Proteinkinase A Anker Protein	a,b) 5' und 3'ORF inkomplett a) 1 bp Substitution im ORF	a,b) Inkompletter N- und C-Terminus a) Substitution 1 AS (<i>snp</i>)
MU-RMS-40.17 [AY528716.1]	1	RUFY2 [AF461266.1, BC041092.1]	Effektor der Tyrosinkinase Elk	3'UTR inkomplett	Inkompletter N-Terminus

Tab. 6. cDNS-Homologie der Antigene MU-RMS-40.11 bis -40.16 zu Einträgen in die GenBank-Datenbank.

Tumorantigen-Gruppe [GenBank]	Anzahl isolierter Klone	Beste cDNS Homologie [GenBank] Temp. (°C)	Biologische Bedeutung von Genprodukten homologer cDNS)	Sequenzunterschiede zum genannten GenBank-Homolog	Sequenzunterschiede zu bekannten Genprodukten des GenBank-Homologs
MU-RMS-40.18	1	golgin-245 [U31906.1]	Protein des Golgi-Apparates	5'-ORF inkomplett 1 bp Substitution im ORF 1 bp Substitution in 3'UTR	Inkompletter N-Terminus 1 AS Substitution (<i>snp</i>)
MU-RMS-40.19	2	<i>Kinectin</i> [Z22551.1]	Protein des Kinesin Rezeptors → Intrazellulärer Transport von Zellorganellen	a,b) 5'ORF inkomplett a) 1 bp Substitution b) 3'ORF inkomplett	a) Inkompletter N-Terminus a) 1 AS Substitution (<i>snp</i>) b) Inkompletter N- und C-Terminus
MU-RMS-40.20	1	FLJ11588 [BC007932.1]	Nicht bekannt	5'ORF inkomplett	Unbekannter N-Terminus
MU-RMS-40.21 [AY536376.1]	1	RPS18 <i>ribosomal protein S18</i> [XM_016854.1]	Ribosomales Protein	158 bp Insertion in ORF	₁ Kurzer, alt. C-Terminus (ORF <i>shift</i>) ₂ Trunkierter N-Terminus
MU-RMS-40.22 [AY540752.1]	1	TCEA3 <i>Transcription elongation Factor S-II, protein 3</i> [XM_114075.3]	Transkriptions- Elongationsfaktor	Alternativ gespleißter 3'ORF	Alternativer C-Terminus (ORF <i>shift</i>)
MU-RMS-40.23 [AY540753.1]	1	RAD52 <i>Repair and recombination homolog gene</i> [L33262.1]	DNS-Reparaturprotein	1 bp Substitution 2 bp Insertion in 3'UTR	Keine

Tab. 7. cDNS-Homologie der Antigene MU-RMS-40.18 bis -40.23 zu Einträgen in die GenBank-Datenbank.

MU-RMS-40.1 war ein alternatives Translationsprodukt der erweiterten AND-1 3'UTR

Die cDNS 40.1 (AY517556.1) war 100% homolog zur cDNS des Homo sapiens AND-1 (*acidic nucleoplasmic DNA-binding protein*; XM_051658.1), welche erstmals von Köhler et al. (1997) isoliert und charakterisiert worden war (**Abb. 5**). Das *AND-1*-Gen war auf Chromosom 14 kartiert worden (*International Radiation Hybrid Mapping Consortium*; RH104447). AND-1 ist ein DNS-bindendes Protein. Es gehört zu einer Familie von Proteinen, die hauptsächlich im Nukleoplasma nachgewiesen wurden und regulierend in verschiedene Zellfunktionen wie z. B. Chromatinverdichtung, Replikation, Transkription, Polyadenylierung und Spleißen eingreifen (Köhler et al. 1997).

Die cDNS 40.1 überlappte die AND-1 cDNS stromabwärts des beschriebenen AND-1 ORF im Bereich der vormals als 3'-untranslatierten Region (3'UTR) beschriebenen Sequenzen. Die cDNS 40.1 war um 440 bp länger als die bislang publizierten Sequenzen. Der neue Sequenzabschnitt war bis auf wenige einzelne Basen identisch mit genomischen Sequenzen unmittelbar stromabwärts des bekannten langen Exons des *AND-1*-Gens auf Chromosom 14 (AL160471.5, bp 93980 – 94418). Das SEREX-definierte Antigen MU-RMS-40.1 wurde damit von einem alternativen downstream ORF kodiert.

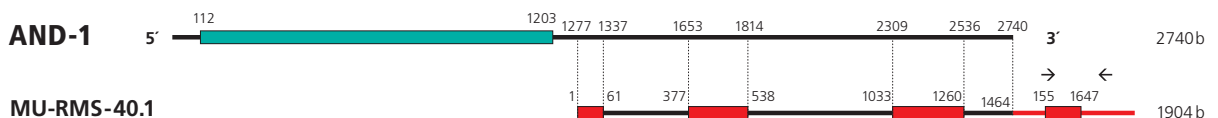


Abb. 5 – Schematischer Vergleich der cDNS-Sequenzen von AND-1 (XM_051658.1) und MU-RMS-40.1 (AY517556.1).

Die 1904 bp lange cDNS 40.1 lag stromabwärts des beschriebenen AND-1 ORF (bp 112 – 1206, grüne Box) und überlappte die vormals als 3'UTR bezeichneten Sequenzen der AND-1 cDNS. Die 440 bp lange erweiterte 3' Sequenz der cDNS 40.1 (rote Linie) war neu und bis auf wenige Positionen identisch mit genomischen Sequenzen unterhalb des bekannten langen AND-1 Exons auf Chromosom 14 (AL160471.5, bp 93980 – 94418). Das bedeutete, dass MU-RMS-40.1 von einem der alternativen downstream ORFs kodiert wurde (rote Boxen). Ein 5'-inkompletter ORF von MU-RMS-40.1 endete an Position 64 und könnte in *E. coli* vom stromaufwärts *in frame* liegenden Vektor-ATG exprimiert worden sein. Von sechs weiteren, kompletten ORFs zeigten die beiden längsten etwas bessere Kozak-Konsensussequenzen [bp 377 – 538 (54 AS) (aggggatga) bzw. bp 1033 – 1263 (77AS) (aggggatga)] als die vier kürzeren ORFs [bp 510-605 (32 AS) (ggtaaatga), bp 699 – 767 (23 AS) (gcatcatgt), bp 1329 – 1415 (29 AS) (tataaatgtt) und 1552 – 1647 (32 AS) (agtaaatgc)]. Innerhalb der neuen 3' Sequenzen von cDNS 40.1 lag ausschließlich einer dieser kürzeren ORFs [bp 1552 – 1647]. Die eingezeichneten Primer pr40.1.se1 (→) und pr40.1.an1 (←) ergaben ein Produkt von 364 bp [40.1].

Unter den RALBP-homologen Antigenen der Gruppe MU-RMS-40.2 fand sich eine durch eine neue Deletion verkürzte Variante (MU-RMS-40.2A)

Die cDNS MU-RMS-40.2a-f waren homolog zur cDNS des RalA-bindenden Proteins 1 (RALBP1; BC013126.1) (**Abb. 6**), und zu einer mithilfe des SEREX-Verfahrens identifizierten Ovarialkarzinom-cDNS (HOM-OvIGA4-3) (siehe Kap. 4.2.2.). RALBP1 war 1995 erstbeschrieben und einem Gen auf Chromosom 18 zugeordnet worden (Jullien-Flores et al. 1995). Ral-Proteine gehören zur Ras-Superfamilie und zeigen ebenso wie Ras GTPase-Aktivität. Ral-bindende Proteine können diese GTPase-Aktivität aktivieren und greifen daher vermutlich regulierend in Signaltransduktionswege ein (Jullien-Flores et al. 1995).

Die Sequenz der cDNS 40.2a (AY517554.1) wies innerhalb des RALBP1-homologen ORF eine Deletion von 141 bp auf, die im korrespondierenden Antigen MU-RMS-40.2A in einer Deletion von 47 AS resultierte. Der deletierte Bereich entsprach keinem der bislang in diesem Bereich beschriebenen Exons (**Abb. 6**). Im Bereich der 3'UTR der cDNS 40.2a und 40.2f fanden sich dieselben Austausche von drei einzelnen Basen, von denen einer inzwischen als *snp* bekannt ist. Bei der cDNS 40.2c war in der 3'UTR ein Thymin inseriert. Ein von cDNS 40.2b-f kodiertes, hypothetisches Antigen war 100% zu RALBP1 homolog und wurde MU-RMS-40.2B genannt. Über den N-Terminus der RALBP1-homologen Antigene konnte aufgrund der 5'-inkompletten Klonierung der cDNS nichts ausgesagt werden.

Die Antigene der Gruppe MU-RMS-40.3 waren wahrscheinlich mit MYH3 identisch

Die cDNS 40.3a-f (AY517555.1) waren homolog zur Schwerekette des embryonalen Skelettmuskel-Myosins MYH3 (X15696.1) (**Abb. 7**), welche von Karsch-Mizrachi et al. (1989) und Eller et al. (1989) erstbeschrieben worden waren. Das *MYH3*-Gen war auf Chromosom 17 kartiert worden (Eller et al. 1989). Ebenso wie Aktin ist auch Myosin ein kontraktiles Protein von Muskelfasern (Warrick et Spudich 1987).

Die sechs cDNS inserts unterschieden sich nur durch ihre Länge. Ihr längster ORF kodierte ein Antigen, das im klonierten Abschnitt mit MYH3 identisch war. Über den N-Terminus dieses Antigens konnte aufgrund der 5'-inkompletten Klonierung der cDNS nichts ausgesagt werden. Bei allen Klonen lag im Bereich des ORF von MYH3 ein einzelner, neuer, konservativer Nukleotidaustausch. Die cDNS 40.3a, 3b und 3e waren identisch und entsprachen damit wahrscheinlich Amplifikaten einer cDNS-Vorlage.

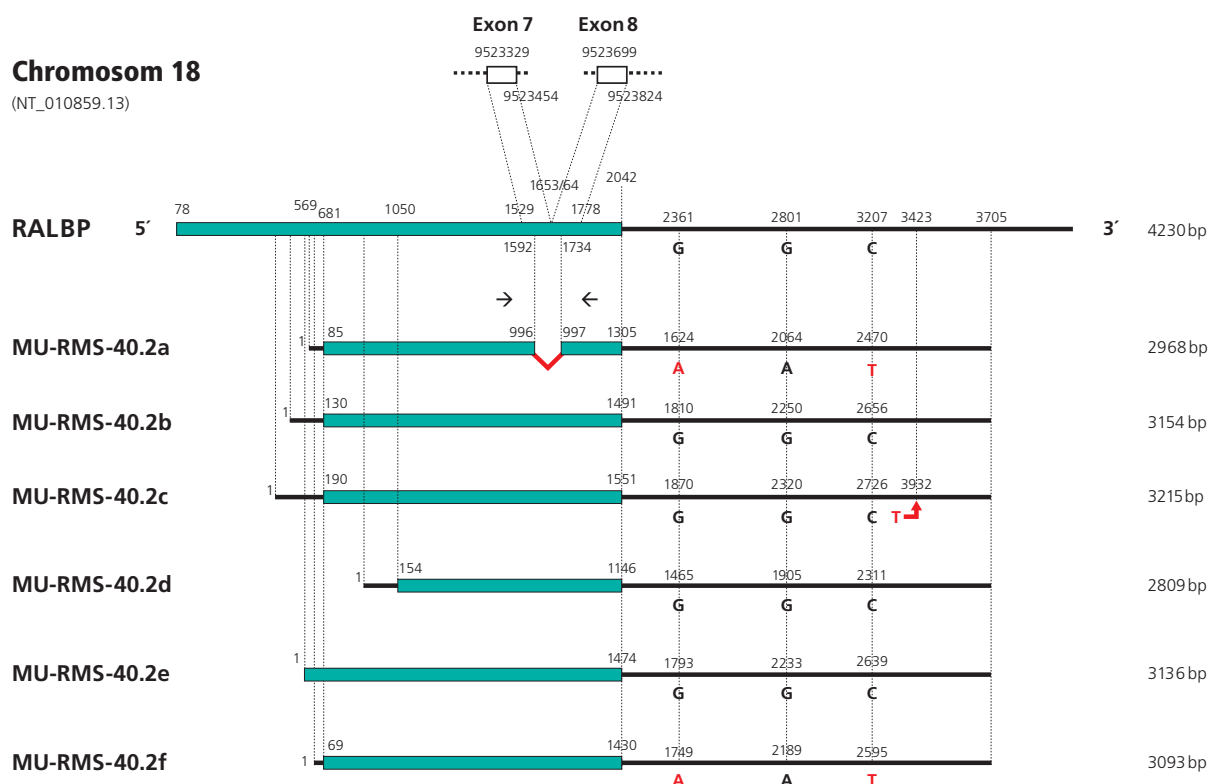


Abb. 6 – Schematischer Vergleich der cDNS-Sequenzen von RALBP1 (BC013126.1), MU-RMS-40.2a (AY517554.1) -2f und genomischen Sequenzen auf Chromosom 18 (NT_010859.13).

Die RALBP1-homologen ORFs sind als grüne Boxen dargestellt. Die cDNS 40.2a wies an Position 995/6 im Vergleich mit der RALBP1-cDNS eine Deletion von 141 bp auf (BC13126.1, bp 1592 – 1734) (rot), die im RALBP1-homologen ORF in einer Deletion von 47 AS resultierte. Diese Deletion entsprach keinem der vorbeschriebenen RALBP1-Exons, sondern überlappte Exon 7 und 8 des *RALBP1*-Gens auf Chromosom 18 (NT_010859.13, e7: 9523392-778). Das von cDNS 40.2a kodierte RALBP1-homologe Antigen wurde MU-RMS-40.2A genannt, während der zu RALBP1 100% homologe Antigentypus als MU-RMS-40.2B (cDNS 40.2b-f) bezeichnet wurde. Ohne Auswirkung auf die AS-Sequenz dieser hypothetischen Antigene fanden sich im Bereich der 3'UTR der cDNS 40.2a (bp 1624, 2064 und 2470) und 40.2f (bp 1749, 2189 und 2595) zwei neue Austausche einzelner Basen (rot) und ein bekannter *snp* (40.2a, bp 2064) sowie im Bereich des 3'UTR der cDNS 40.2c eine Insertion von Thymin (bp 3932) (roter Pfeil). Diese Veränderungen der 3'UTR waren auch gegenüber den korrespondierenden genomischen Sequenzen neu (NT_010859.13, bp 9526251, 9526691, 9527097 und 9527313). Die cDNS aller SEREX-Antigene waren vermutlich 5'-inkomplett, so dass die N-Termini der RALBP1-homologen Antigene unbekannt bleiben. Wenn das stromaufwärts gelegene Vektor-ATG mit dem RALBP1-homologen ORF *in frame* lag, war es wahrscheinlich Startpunkt der Translation in *E. coli* (MU-RMS-40.2e). Wenn das Vektor-ATG in einem anderen ORF lag, wurde das nächste stromabwärts im RALBP1-ORF liegende ATG als wahrscheinlicher Translationsstart in *E. coli* angegeben (MU-RMS-40.2a-d und f). Neben dem RALBP1-homologen ORF fanden sich zwei bis vier alternative kleine ORFs in allen cDNS der Gruppe 40.2 (nicht eingezeichnet). Die eingezeichneten Primer pr40.2a.se1 (→) und pr40.2a.an1 (←) ergaben ein Produkt von 259 bp [40.2a] und 400 bp [RALBP1].

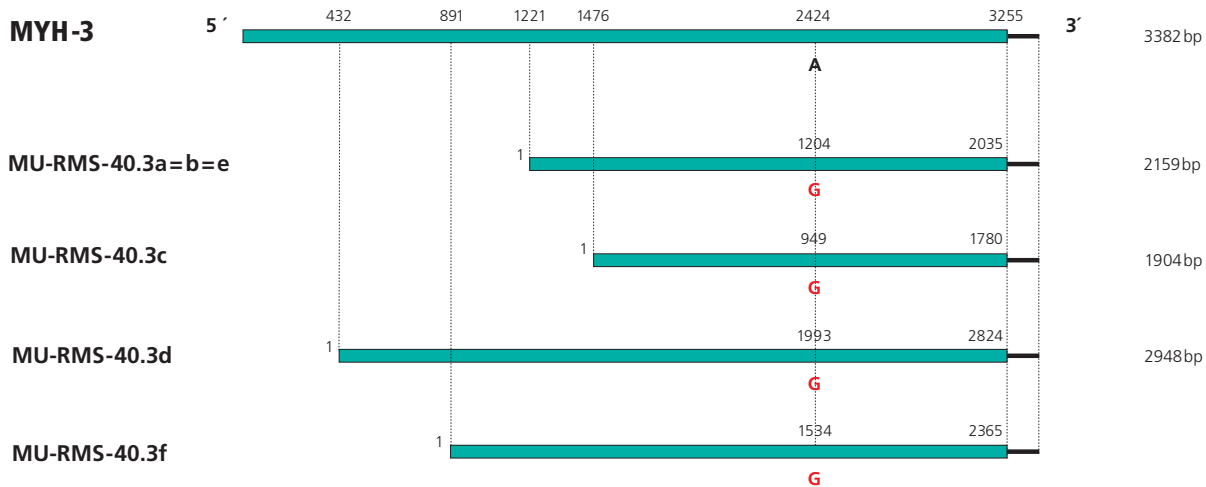


Abb. 7 – Schematischer Vergleich der cDNS-Sequenzen von MYH3 (X15696.1) und MU-RMS-40.3a–c, d (AY517555.1) und e–f.

MYH3-homologe ORFs sind als grüne Box dargestellt. Die cDNS 40.3a, 3b und 3e waren identisch. Bei allen Klonen fand sich ein neuer Austausch von Adenin durch Guanin an den angegebenen Positionen (rot), die der Position 2424 in der MYH3-cDNS entsprach. Dieser Basenaustausch führte nicht zur Veränderung der AS-Abfolge im MYH3-homologen Genprodukt (Arg → Arg). Die korrespondierende genomische DNS auf Chromosom 17 zeigte an dieser Position wie die MYH3-cDNS (X15696.1, bp 2424) ein Adenosin (AC002347, bp 114059). Die cDNS aller SEREX-Antigene waren vermutlich 5'-inkomplett, so dass die N-Termini der MYH3-homologen Antigene unbekannt sind. Alle rekombinanten Proteine wurden in *E. coli* möglicherweise vom stromaufwärts *in frame* liegenden Vektor-ATG abgelesen. Neben dem MYH3-homologen ORF fanden sich neun alternative kleine ORFs in 40.2d, der längsten der 40.2 cDNS (nicht eingezeichnet).

Die FLJ20364-homologen Antigene der Gruppe MU-RMS-40.4 unterschieden sich vom Wildtyp an zwei einzelnen Aminosäurepositionen.

Die cDNS 40.4a–d (AY517557.1) waren homolog zu der aus genomischen Sequenzen des Chromosom 5 abgeleiteten FLJ20364-cDNS (XM_047960.1) (**Abb. 8**) und zur cDNS des SEREX-Antigens MO-OVA-45 (siehe Kap. 4.2.2.). Die Funktion des hypothetischen *FLJ20364*-Genprodukts ist nicht bekannt.

Die vier cDNS inserts unterschieden sich voneinander nur durch ihre Länge, wobei die 5'UTR der identischen cDNS 40.4a und 40.4d im Vergleich zur FLJ20364-cDNS um 105 bp erweitert waren. Die 105 bp lange Sequenz war identisch mit unmittelbar stromaufwärts liegenden genomischen Sequenzen auf Chromosom 5 (NT_030676.2; bp 645360-645464).

Unterschiede zur FLJ20364-cDNS ergaben sich durch einen erweiterten 5'UTR und bezüglich des FLJ20364-ORF konservativen und zwei nicht-konservative Nukleotidaustausche, von denen letztere laut eigener Sequenzanalyse autologer, genomischer Fibroblasten-DNS auf genomischem Polymorphismen beruhten; inzwischen sind alle drei als *snp* bekannt.

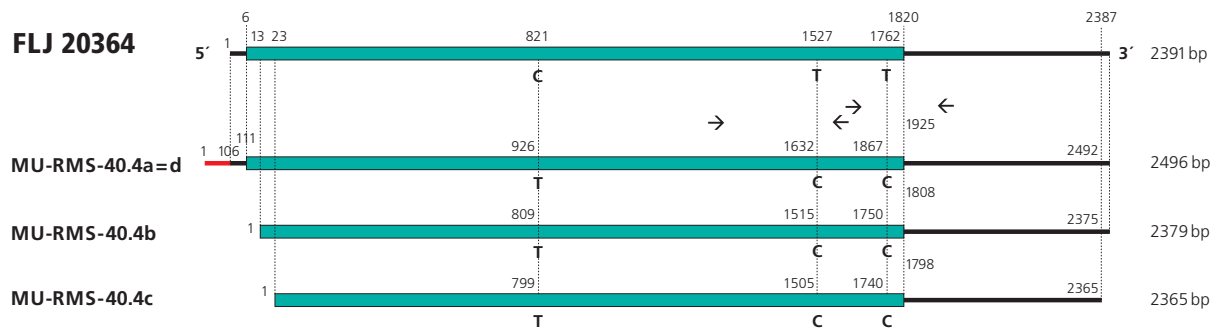


Abb. 8 – Schematischer Vergleich der cDNS-Sequenzen von FLJ20364 (XM_047960.1) und MU-RMS-40.4a (AY517557.1) -d.

FLJ20364-homologe ORFs sind als grüne Box dargestellt. Die cDNS 40.4a und 40.4d waren identisch; ihr 5'UTR war verglichen mit dem der FLJ20364-cDNS um 105 bp erweitert (rot) und entsprach unmittelbar stromaufwärts liegenden genomischen Sequenzen auf Chromosom 5 (NT_030676.2; bp 645360-645464). Bei allen Klonen fanden sich drei Nukleotidaustausche, korrespondierend zu den Positionen 821 (C → T), 1527 (T → C) und 1762 (T → C) in der FLJ20364 cDNS (XM_047960) und zu bekannten *snp*. Die beiden T → C Austausch (XM_047960, bp 1527 und bp 1762) führten im FLJ20364-homologen Genprodukt zum Austausch von Tyrosin durch Leucin bzw. Leucin durch Serin. Die cDNS 40.4b und 4c waren vermutlich 5'-inkomplett, so dass die N-Termini dieser Antigene unbekannt sind. Die FLJ20364 homologen Genprodukte der cDNS 40.4b und 40.4c wurden möglicherweise in *E. coli* vom stromaufwärts *in frame* liegenden Vektor-ATG abgelesen. Stromabwärts des dargestellten FLJ10364-homologen ORF fanden sich in 40.4a und 4d, den längsten cDNS dieser Antigengruppe, sechs kleine, alternative ORFs (nicht eingezeichnet). Die eingezeichneten Primer pr40.4a.se1 (→) und pr40.4a.an1 (←) ergaben ein Produkt von 302 bp [40.4a]; die stromabwärts eingezeichneten Primer pr40.4a.se2 (→) und pr40.4a.an2 (←) ergaben ein Produkt von 236 bp [40.4a].

Das Antigen MU-RMS-40.5 war wahrscheinlich mit MLH1 identisch

Die cDNS 40.5 (AY517558.1) zeigte Homologie zur cDNS des DNS-Reparaturproteins MLH1 (*mutL Homolog*) (XM_044890.1) (**Abb. 9**), welches erstmals von Lindblom et al. (1993) beschrieben worden war, und zur cDNS eines SEREX-definierten Ovarialkarzinom-Antigens (MO-OVA-20) (siehe Kap. 4.2.2.). Mutationen im *MLH1*-Gen, das auf dem kurzen Arm von Chromosom 3 (3p21.3) lokalisiert wurde, sind für die Entwicklung des hereditären nicht-polypösen Kolonkarzinoms (HNPCC) mitverantwortlich (Leach et al. 1993, Bronner et al. 1994, Papadopoulos 1994).

Innerhalb des MLH1-homologen ORF fand sich bei cDNS 40.5 ein neuer konservativer Nukleotid-austausch. Eine neue Deletion des Basentriplets TTC lag stromabwärts dieses ORF in der 3'UTR. Der MLH-homologe ORF war 5'-inkomplett, so dass der N-Terminus des mit MLH1 identischen Antigens MU-RMS-40.5 unbekannt blieb.

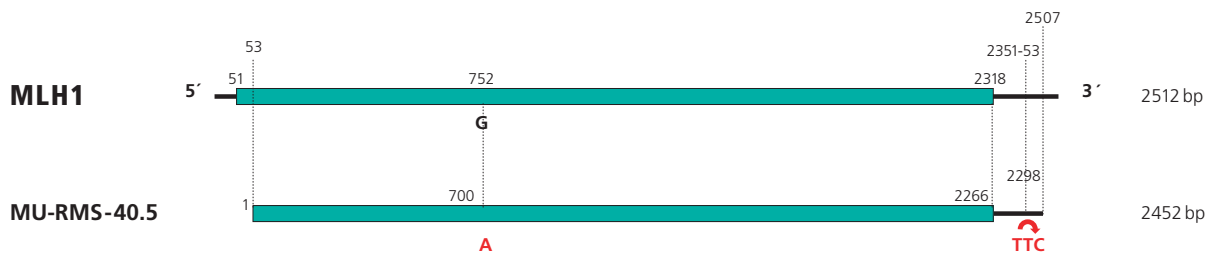


Abb. 9 – Schematischer Vergleich der cDNS-Sequenzen von MLH1 (XM_044890.1) und MU-RMS-40.5 (AY517558.1). MLH1-homologe ORFs sind als grüne Box dargestellt. Bezüglich des MLH1-homologen ORF fand sich an der zu Position 752 in der MLH1 cDNS korrespondierenden Position 700 der cDNS 40.5 ein neuer konservativer Austausch von Guanin durch Adenin (rot). In der genomischen Sequenz fand sich an der korrespondierenden Position wie in MLH1 ein Guanin (NT_022517.16, bp 36981570). Innerhalb der 3'UTR der cDNS 40.5 zeigte sich an Position 2298 eine neue Deletion des Basentriplets TTC (rot). Die cDNS 40.5 war vermutlich 5'-inkomplett, so dass der N-Terminus des MLH1-homologen Genprodukts unbekannt ist. In *E. coli* wurde dieses Genprodukt möglicherweise vom stromaufwärts *in frame* liegenden Vektor-ATG abgelesen. Stromabwärts des dargestellten ORF fanden sich in der cDNS 40.5 dreizehn alternative, kleine ORFs (nicht eingezeichnet).

Unter den FLJ20644-homologen Antigenen der Gruppe MU-RMS-40.6 fand sich eine bislang nur aus einem embryonalen Karzinom klonierte Spleißvariante (MU-RMS-40.6B1) sowie eine tumorspezifische Mutante (MU-RMS-40.6C).

Die cDNS 40.6a (AY518537.1), 6b (AY518536.1) and 6c (AY518535.1) zeigten Homologie mit der aus genomischen Sequenzen von Chromsom 14 abgeleiteten FLJ20644-cDNS (XM_046637.1) (**Abb. 10**). Die biologische Funktion des hypothetischen FLJ20644 Genprodukts ist noch nicht bekannt.

Die 5'-inkomplette cDNS 40.6a kodierte ein zu FLJ20644 100% homologes Antigen (MU-RMS-40.6A). Dagegen wurde bei der cDNS 40.6b eine Deletion des zweiten Exons des *FLJ20644*-Gens identifiziert, die im FLJ20644 ORF zu einem Leserasterwechsel und durch ein vorzeitiges Stopcodon zu einem verkürzten, alternativen C-Terminus führte. Das entsprechende, hypothetische Antigen wurde MU-RMS-40.6B₁ genannt. Ein zweiter FLJ20644-homologer ORF der cDNS 40.6b fand sich stromabwärts und kodierte ein N-terminal trunkiertes, ansonsten mit FLJ20644 identisches Protein (MU-RMS-40.6B2). Interessanterweise war dieselbe Deletion von 128 bp auch in der kurzen NIH_MGC_92 cDNS einer embryonalen Hodenkarzinom-Zelllinie zu erkennen, die sich von der cDNS 40.6b durch Deletion von vier einzelnen Nukleotiden unterschied. Die cDNS 40.6c zeigte innerhalb des FLJ20644 ORF einen einzelnen, neuen, nicht-konservativen Basenaustausch, der in einem dritten zu FLJ20644 homologen Antigentypus resultierte (MU-RMS-40.6C). Die autologe Fibroblasten-DNS war an der entsprechenden Position homozygot für das bekannte Thymidin, so dass eine tumorspezifische Mutation zu Cytosin postuliert werden konnte.

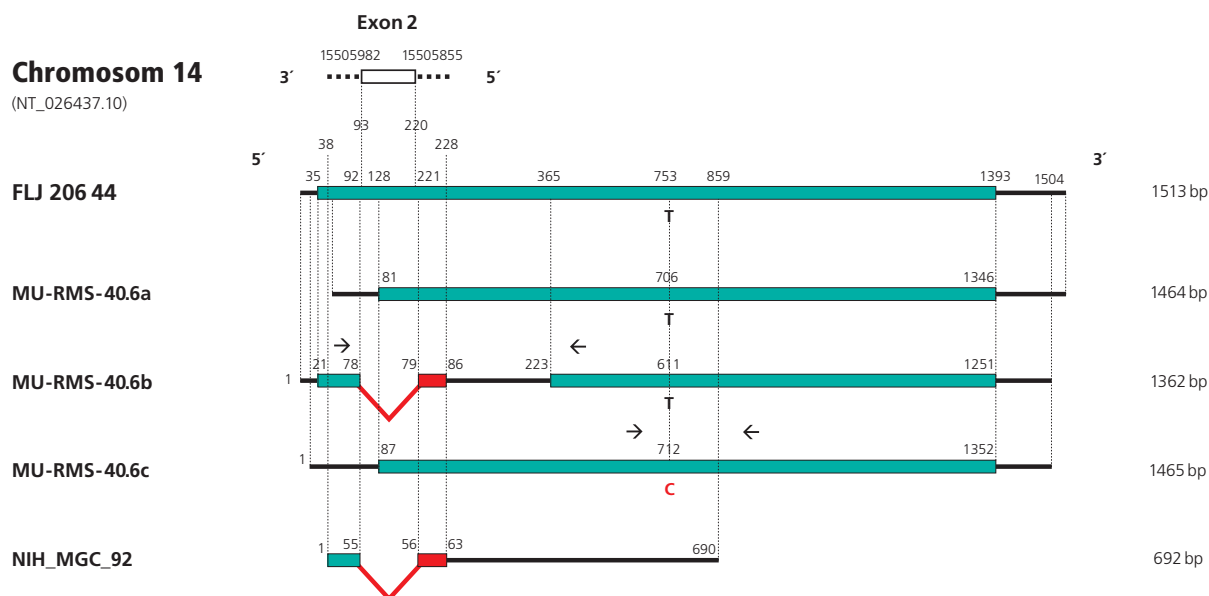


Abb. 10 – Schematischer Vergleich der cDNS-Sequenzen von FLJ20644 (XM_046637.1), MU-RMS-40.6a (AY518537.1), b (AY518536.1) und c (AY518535.1) und genomischen Sequenzen auf Chromosom 14 (NT_026437.10). FLJ20644-homologe ORFs sind als grüne Box dargestellt, alternative ORFs sind als rote Box dargestellt. Die cDNS 40.6a kodiert ein zu FLJ20644 100% homologes Antigen (MU-RMS-40.6A). Die cDNS 40.6b zeigte zwischen bp 78 und 79 eine Deletion von 128 bp, die einem Exon des FLJ20644 Gens entspricht (NT_026437.10, bp 15505982 – 15505855), und die über einen Leserasterwechsel zu einem vorzeitigen Terminationscodon an Position 87 und damit zu einem verkürzten, alternativen C-Terminus des ersten FLJ20644-homologen ORF (MU-RMS-40.6B1) führte (rote Box). Eine cDNS mit demselben Spleißmuster war auch aus einer embryonalen Karzinom-Zelllinie kloniert worden (BG391568, bp 55/56); diese cDNS unterschied sich von cDNS 40.6b an vier Positionen (XM_046637, bp 461, 537, 828 und 842). Ein zweiter FLJ20644-homologer ORF der cDNS 40.6b fand sich stromabwärts (bp 223 – 1251) (MU-RMS-40.6B2); das korrespondierende Protein war gegenüber dem *FLJ20644*-Genprodukt N-terminal aufgrund eines *in frame* stromaufwärts gelegenen Stop-Kodons um 110 AS verkürzt. Die cDNS 40.6c zeigt an Position 712 einen einzelnen, neuen, bezüglich des FLJ20644-ORF nicht-konservativen, tumorspezifischen Basenaustausch (T→C) (rot), der im Austausch von Isoleucin durch Threonin resultierte (MU-RMS-40.6C). Die korrespondierenden autologen und publizierten genomischen Sequenzen zeigten wie FLJ20644 ausschließlich Thymin (NT_026437.10, bp 15499113). Die cDNS 40.6a und c waren vermutlich 5'-inkomplett, so dass die N-Termini der FLJ20644-homologen Proteine unbekannt sind. Da der FLJ20644-homologe ORF dieser beiden cDNS nicht *in frame* mit dem stromaufwärts gelegenen Vektor-ATG lag, wurde das nächste stromabwärts *in frame* liegende ATG als möglicher Translationsstart in *E. coli* angegeben (Position 81 bzw. 87). Neben den dargestellten ORFs waren in allen cDNS der Gruppe 40.6 vier alternative kleinere ORFs zu finden (nicht eingezeichnet). Die eingetragenen Primer pr40.6b.se1 (→) und pr40.6b.an1 (←) ergaben ein Produkt von 271 bp [40.6b] und 399 bp [FLJ20644]. Die eingezeichneten Primer pr40.6c.se1 (→) und pr40.6c.an1 (←) ergaben ein Produkt von 298 bp [40.6c].

Das MYH7-homologe Antigen MU-RMS-40.7 unterschied sich vom Wildtyp an einer einzelnen Aminosäureposition und möglicherweise insertionsbedingt am Carboxyterminus

Die cDNS 40.7 (AY518538.1) war homolog zur cDNS der siebten Isoform der Myosin-Schwerkette des Herzmuskels (MYH7; XM_033374.1) (**Abb. 11**) und zu den SEREX-definierten Antigen-cDNS HOM-Ts-PMRI-25 aus Testis und HOM-MA1-2 aus Mammakarzinom (siehe Kap. 4.2.2.).

Das *MYH7*-Gen wurde auf Chromosom 14 kartiert (Matsuoka et al. 1989). Mutationen in diesem Gen sind mit der familiären hypertrophen Kardiomyopathie assoziiert (Cuda et al. 1993, Anan et al. 1994).

Im Vergleich zur *MYH7*-cDNS fand sich in eine adenosinreiche Region der cDNS 40.7a ein zusätzliches Adenin inseriert. Diese Insertion führte zu einem Leserasterwechsel mit vorzeitigem Stop und dadurch zu einem kurzen, alternativen C-Terminus des hypothetischen Genprodukts; in autologer, genomischer Fibroblasten-DNS fand sich diese Insertion nicht, so dass eine tumorspezifische Veränderung oder ein Klonierartefakt anzunehmen sind. Die cDNS 40.7b zeigte innerhalb des *MYH7*-ORF einen einzelnen, neuen, nicht-konservativen Nukleotidaustausch. Durch Amplifikation und Sequenzierung der entsprechenden autologen Fibroblasten-DNS konnte dieser Nukleotidaustausch als neuer *snp* identifiziert werden. Die N-Termini beider *MYH7*-homologen Antigene blieben aufgrund unvollständiger Klonierung der cDNS unbekannt.

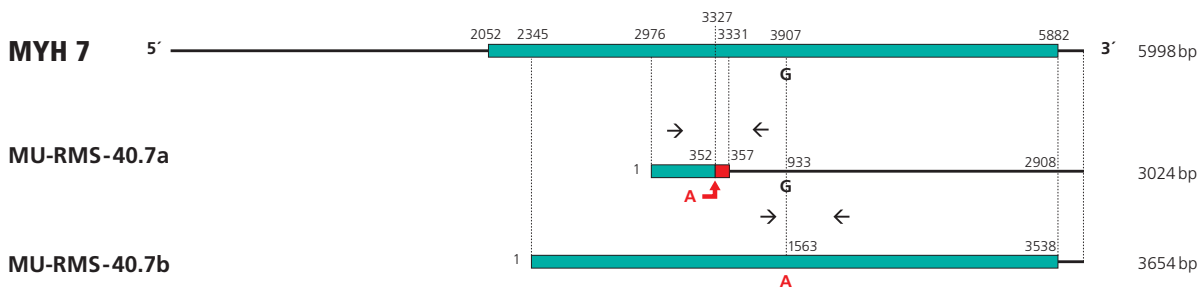


Abb. 11 – Schematischer Vergleich der cDNS-Sequenzen von *MYH7* (XM_033374.1) und *MU-RMS-40.7a* und *b* (AY518538.1).

MYH7-homologe ORFs sind als grüne Box dargestellt. Im Vergleich zur *MYH7*-cDNS (bp 3327) war in die cDNS 40.7a (bp 352) ein zusätzliches Adenin inseriert (roter Pfeil). Diese Insertion führte zu einem vorzeitigem Stopcodon (bp 358 – 60) und kurzen, alternativen C-Terminus (rote Box). Ein einzelner Basenaustausch innerhalb des *MYH7*-homologen ORF von cDNS 40.7b (bp 1563) resultierte im Austausch von Arginin durch Glutamin. Diese Basensubstitution war gegenüber der publizierten genomischen Sequenz neu (NT_026437.10, bp 3808843) und konnte als neuer *snp* identifiziert werden (rot). Die cDNS 40.7a und b sind vermutlich 5'-inkomplett, so dass die N-Termini der *MYH7*-homologen Antigene unbekannt sind; in *E. coli* wurden sie möglicherweise vom stromaufwärts *in frame* gelegenen Vektor-ATG abgelesen. Stromabwärts des dargestellten ORF fanden sich in cDNS 40.7a zwölf kleine, alternative ORFs. Die Primer pr 40.7a se1/an1 (→) pr40.7b.se1/an1 (←) ergaben Produkte von 424 bp bzw. 368 bp [40.7b] Größe.

Das FLJ13441-homologe Antigen *MU-RMS-40.8* war eine Spleißvariante des Wildtyps

Die cDNS 40.8 war eine Spleißvariante der auf Chromosom 5 kartierten FLJ13441-cDNS (XM_049510.1), deren Funktion bislang unbekannt ist (**Abb. 12**).

Bei cDNS 40.8 fehlten wie in der cDNS eines aus Pankreaskarzinom klonierten SEREX-Antigens (HOM-Pa1-3) 60bp eines Exons, so dass es sich bei beiden Antigenen wahrscheinlich um dieselbe Spleißvariante des Wildtyps handelte. Der N-Terminus des RMS-Antigens blieb bei unvollständig klonierter cDNS unbekannt.

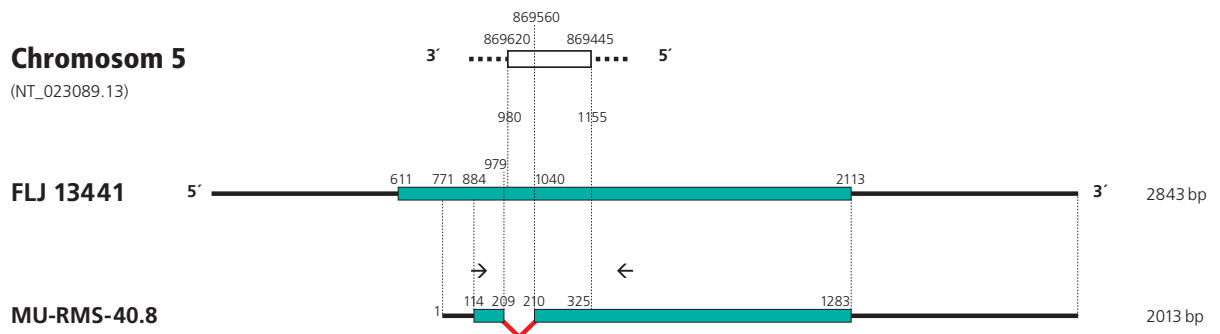


Abb. 12 – Schematischer Vergleich der cDNS-Sequenzen von FLJ13441 (XM_049510.1), MU-RMS-40.8 und genomischen Sequenzen auf Chromosom 5 (NT_023089.13).

FLJ20644-homologe ORFs sind als grüne Box dargestellt. Zwischen Position 209 und 210 der cDNS 40.8 war der 5' Bereich eines Exons mit einer Länge von 60 bp herausgespleißt worden (rot). Der Verlust dieses Exons (NT_023089.13, bp 869620 – 869560) führte im FLJ13441-homologen Genprodukt zu einer Deletion von 20 AS. Die cDNS 40.8 war vermutlich 5'-inkomplett, so dass der N-Terminus des FLJ13441-homologen Antigens nicht bekannt ist. Da der FLJ13441-homologe ORF nicht zum stromaufwärts gelegenen Vektor-ATG *in frame* lag, wurde das nächste stromabwärts *in frame* liegende ATG als möglicher Translationsbeginn in *E. coli* angegeben. Stromabwärts des dargestellten ORF fanden sich in der cDNS 40.8 sechs kleine, alternative ORFs (nicht eingezeichnet). Die eingezeichneten Primer pr40.8.se1 (→) und pr40.8.an1 (←) ergaben ein Produkt von 380 bp [40.8] und 440 bp [FLJ13441].

Unter den SMYD1-homologen Antigenen der Gruppe MU-RMS-40.9 fand sich eine neue Spleißvariante (MU-RMS-40.9C)

Die cDNS 40.9a – c zeigten Homologien zur *SET and MYND domain containing 1* (SMYD1) cDNS, die von genomischen Sequenzen auf Chromosom 2 abgeleitet worden war (XM_097915.2) (**Abb. 13**) und zu den muskelspezifischen, murinen Bop (*CD8 beta opposite*)-Spleißvarianten skm-Bop-1 und skm-Bop-2 (U76373.2, U76374.2) (Hwang et Gottlieb 1995 und 1997). Die murinen Bop-Gene kodieren für Muskel-(skm-Bop) und T-Zell-Proteine (t-Bop), die über MYND- und SET-Domänen in die Chromatinregulation eingreifen (Gottlieb et al. 2002).

Alle SMYD1-homologen cDNS waren am 5' Ende bezüglich des SMYD1-ORF inkomplett und zeigten im Bereich der 3'UTR zwei (40.9a, -b) bzw. fünf (40.9c) einzelne Basenaustausche. Unter diesen Nukleotidaustauschen waren drei bereits als *snp* beschrieben, die übrigen drei Basenaustausche wurden als neue *snp* identifiziert. Bei cDNS 40.9a (AY518933.1) zeigte sich zusätz-

lich innerhalb des ORF ein einzelner konservativer Basenaustausch in dem zu SMYD1 100% homologen und mit dem murinen skm-Bop-1 eng verwandten Genprodukt MU-RMS-40.9A. Bei cDNS 40.9c (AY518934.1) wurde die Deletion des 39 bp langen Exon 5 des *SMYD1*-Gens auf Chromosom 2 identifiziert, die in einer Deletion von 13 AS im SMYD1-homologen Genprodukt MU-RMS-40.9C resultierte. Eine analoge Deletion von 13 AS innerhalb der SET Domäne fand sich in dem murinen skm-Bop-2, so dass es sich bei MU-RMS-40.9C wahrscheinlich das humane Homolog von skm-Bop-2 handelte.

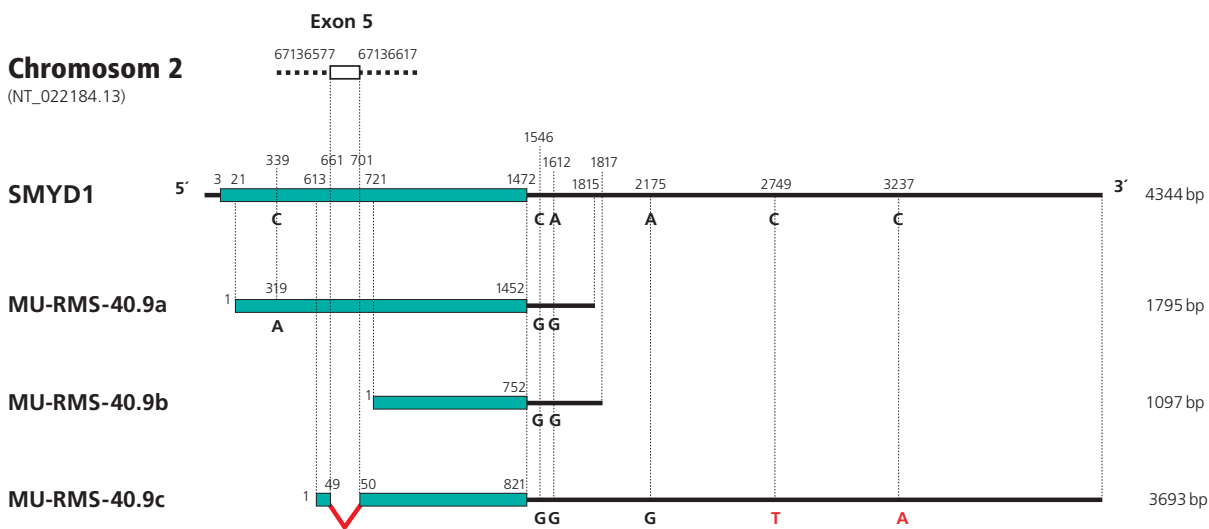


Abb. 13 – Schematischer Vergleich der cDNS-Sequenzen von SMYD1 (XM_097915.2), MU-RMS-40.9a (AY518933.1), b und c (AY518934.1) und genomischen Sequenzen auf Chromosom 2 (NT_022184.13).

SMYD1-homologe ORFs sind als grüne Box dargestellt. Die cDNS 40.9a zeigte einen bezüglich des SMYD1-ORF konservativen Basenaustausch an Position 319 (C→A) und zwei einzelne, bereits als *snp* identifizierte Basenaustausche in den als 3'UTR vorbeschriebenen Sequenzen (bp 1526: C→G und bp 1592: A→G), korrespondierend zu Position 339, 1546 und 1612 in der SMYD1-cDNS. Die cDNS 40.9b war bis auf zwei einzelne Basenaustausche an Position 826 (C→G) und 892 (A→G) innerhalb der 3'UTR (bekannte *snp*) 100% homolog zur SMYD1-cDNS. Die cDNS 40.9c zeigte fünf einzelne Basenaustausche innerhalb der 3'UTR an Position 895 (C→G), 961 (A→G), 1524 (A→G), 2098 (C→T) und 2586 (C→A), korrespondierend zu Position 1546, 1612, 1815, 2175, 2749 und 3237 in der SMYD1-cDNS. Zwei dieser Nukleotidaustausche sind bislang noch nicht als *snp* identifiziert worden (rot). Zusätzlich zu diesen einzelnen Basenaustauschen fand sich bei cDNS 40.9c zwischen Position 49 und 50 im Vergleich mit der SMYD1-cDNS (bp 661 – 701) die Deletion des 39bp langen Exon 5 des *SMYD1*-Gens, die im Genprodukt zu einer Deletion von 13 AS führte (NT_022184.13, bp 67136577 – 67136617). Die cDNS aller SEREX-Antigene waren vermutlich 5'-inkomplett, so dass die N-Termini der SMYD1-homologen Genprodukte der cDNS 40.9a und b (MU-RMS-40.9A) sowie cDNS 40.9c (MU-RMS-40.9C) unbekannt sind. Alle rekombinanten Proteine wurden vermutlich in *E. coli* vom stromaufwärts *in frame* liegenden Vektor-ATG abgelesen. Die 3' Enden der cDNS 40.9a und c liegen im Bereich einer Adenosin-reichen Sequenz der SMYD1-cDNS, so dass ihre Verkürzung wahrscheinlich artifiziell durch *false priming* des dt-Primers bei der reversen Transkription zustande gekommen ist. Stromabwärts des dargestellten ORF fanden sich in der cDNS 40.9c zehn kleine, alternative ORFs (nicht eingezeichnet).

Unter den PMS1-homologen Antigenen der Gruppe MU-RMS-40.10 fanden sich zwei neue Spleißvarianten (10B, 10E)

Neben dem bereits beschriebenen MLH1-homologen- Antigen (MU-RMS-40.5), zeigten auch die cDNS der Antigengruppe MU-RMS-40.10 Homologien zur cDNS eines Reparaturgens (**Abb. 14a – c**). Die homologe PMS1 cDNS (U13695.1) war erstmals von Horii et al. (1994) isoliert und charakterisiert worden. Das *PMS1*-Gen (AY267352.1) war auf Chromosom 2 kartiert worden (Papadopoulos et al. 1994). Eine Keimbahnmutation am Ende des Exon 6 und verschiedene mRNS-Spleißvarianten dieses Gens waren in HNPCC identifiziert worden (Nicolaidis et al. 1994, Liu et al. 2001).

Die cDNS 40.10a und 10d waren bis auf eine um 33 bp stromaufwärts längere 5'UTR und einen einzelnen Basenaustausch (C→G) in der 5'UTR 100% homolog zur PMS1-cDNS (U13695.1). Die längere 5'cDNS Sequenz entsprachen direkt stromaufwärts auf Chromosom 2 liegenden genomischen Sequenzen; das Guanin war bereits in der genomischen Sequenz bekannt (**Abb. 14c**).

Die cDNS 40.10c war vermutlich 5'-inkomplett, so dass der N-Terminus des kodierenden Antigens unbekannt blieb; ansonsten war sie identisch mit der PMS1 cDNS (**Abb. 14b**).

Die cDNS 40.10b (AY540750.1) zeigte von bp 1 – 112 100% Homologie zur cDNS des eukaryotischen Translationelongationsfaktors 1 α (EEF-1 α ; BC010735.1), dessen Gen auf Chromosom 6 lokalisiert worden war (Lund et al. 1996), sowie 100% Homologie zu genomischen Sequenzen auf Chromosom 9 und 5, 99% Homologie zu genomischen Sequenzen auf Chromosom 4 und 98% Homologie zu genomischen Sequenzen auf Chromosom 2, 7 und 1 (NCBI Homepage) (**Abb. 14a**). Die nachfolgenden Sequenzen ab bp 113 waren 100% homolog zur PMS1 cDNS, mit Ausnahme eines einzelnen, nicht-konservativen Basenaustausches im Exon 6 des PMS1-Gens, der einem bekannten *snp* entsprach, und einer *out-of frame* Deletion von 113bp im 3' Bereich des Exon 10 des *PMS1*-Gens (**Abb. 14b**), die in einem alternativen C-Terminus des PMS1-homologen Antigens resultierte. Diese Deletion hatte denselben Endpunkt wie Exon 10 und eine Deletion in cDNS 40.10e (**Abb. 14b**) sowie eine in HNPCC vorbeschriebene Spleißvariante (Liu et al. 2001).

Die ersten 178bp der cDNS 40.10e (AY540751) enthielten einen alternativen 5'UTR, der durch Spleißen von partiellen Sequenzen des Exon 1 an partielle Sequenzen des Intron 1 und von dort an das 5'Ende des Exon 2 zustande gekommen war (**Abb. 14c**). Da der PMS1-homologe ORF stromabwärts dieser Region begann, hatte diese Veränderung keinen Einfluß auf das PMS1-homologe Antigen. In der neuen 5'cDNS-Region war ein kleiner alternativer ORF mit Startcodon im Kontext einer schlechten Kozczak-Konsensussequenz zu finden (**Abb. 14c**). Die nachfolgenden Sequenzen ab bp 179 waren 100% homolog zur PMS1, mit Ausnahme von zwei Deletionen. Die erste war eine *in frame* Deletion von 117bp, die exakt Exon 6 des *PMS1*-Gens entsprach und bereits in HNPCC gefunden worden war (Nicolaidis et al. 1994). Diese Deletion führte im PMS1-

homologen Antigen MU-RMS-40.10E zu einem Verlust von 39 AS. Die weiter stromabwärts lokalisierte *out-of frame* Deletion von 254 bp in MU-RMS-40.10e resultierte in einem alternativen C-Terminus des PMS-homologen Antigens. Diese Deletion hatte denselben Endpunkt wie die 3' Deletion in cDNS 40.10b und wie die Deletion des gesamten Exon 10, die in drei verschiedenen Familien mit HNPCC detektiert worden war (F5, F33, F75: del 1937 – 2422) (Liu et al. 2001) (s.o.).



Chromosom 2
(NT_022171.13)

Chromosom 6
(NT_007299.12)

MU-RMS-40.10b

EEF 1α

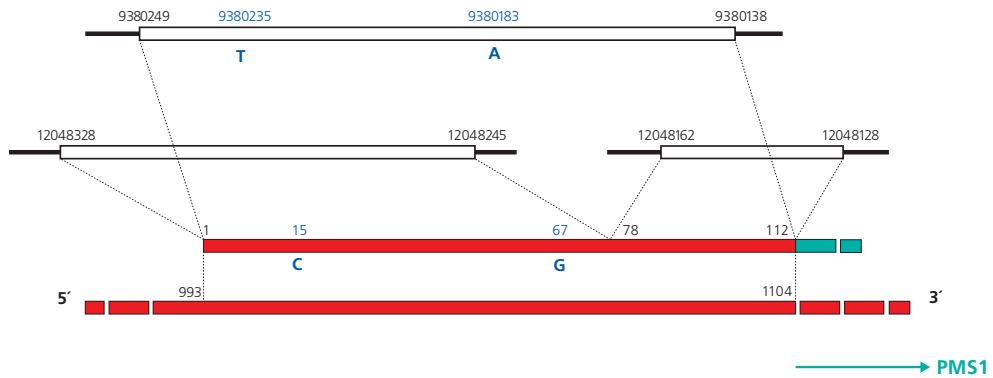


Abb. 14a – Schematischer Vergleich der cDNS-Sequenzen von EEF1α (BC010735.1), MU-RMS-40.10b (AY540750.1) und genomischen Sequenzen auf Chromosom 2 (NT_022171.13) und Chromosom 6 (NT_007299.12).

EEF1α-homologe ORFs sind als rote Box dargestellt, PMS1-homologe ORFs sind als grüne Box dargestellt. Bp 1 – 112 der cDNS 40.10b sind 100% homolog zu bp 993-1104 der EEF1α-cDNS, 100% homolog zu Sequenzen auf Chromosom 6 (NT_007299.12, bp 12048328 – 12048245 und 12048162 – 12048128) und zu Sequenzen auf Chromosom 5 (NT_086666.1, bp 13823491 – 13823380) und 9 (NT_086756.1, bp 19905661 – 19905772) sowie 99% zu Sequenzen auf Chromosom 4 (NT_086651.1, bp 53444917-53445027) und 98% zu Sequenzen auf Chromosom 2 (NT_022171.13, bp 9380249 – 9380138; zwei Basenpaaraustausche an Position 15 und 67 der cDNS 40.10b, entsprechend zu bp 9380235 und 9380183 der genomischen Sequenzen auf Chromosom 2 (blau)), Chromosom 7 (NT_086703.1, bp 15790153–15790112) und Chromosom 1 (NT_086583.1, bp 13005915 – 13006026) (z.T. nicht gezeigt). Die cDNS 40.10b ist vermutlich 5'-inkomplett, so dass der N-Terminus des EEF1α-homologen Antigens unbekannt ist. Dieses rekombinante Protein wurde in *E. coli* vermutlich vom stromaufwärts gelegenen Vektor-ATG abgelesen. Dem in dieser Abbildung dargestellten EEF1α-homologem Abschnitt der cDNS 40.10b folgte eine 2140bp lange Sequenz, die zur PMS1-cDNS homolog ist (siehe **Abb. 14b**). Die klonierten Abschnitte des EEF1α- und PMS1-ORF lagen *in frame* hintereinander.

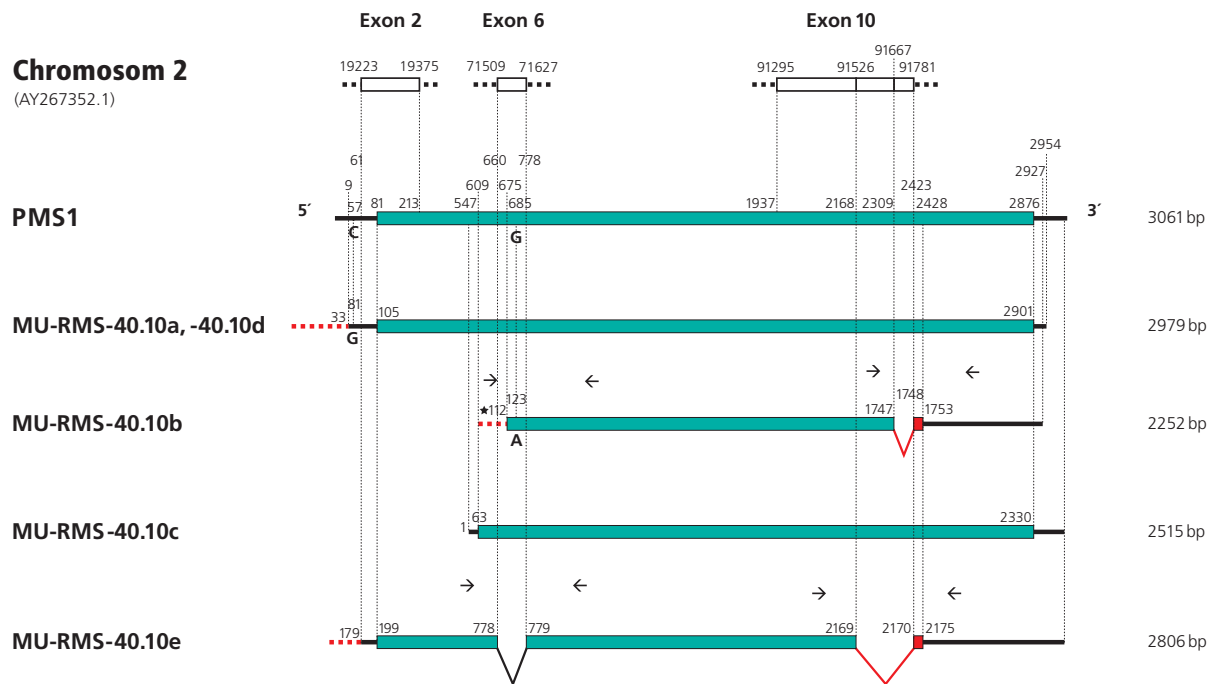


Abb. 14b – Schematischer Vergleich der cDNS-Sequenzen von PMS1 (U13695.1), MU-RMS-40.10a-e (b: AY540750.1, e: AY540751.1) und genomischen Sequenzen auf Chromosom 2 (AY267352.1).

PMS1-homologe ORFs sind als grüne Box dargestellt, alternative ORFs sind als rote Box dargestellt. Der 5'UTR der cDNS 40.10a war gegenüber dem der PMS1 cDNS erweitert (rot) (siehe **Abb. 14c**) (die ersten 8 bp des publizierten PMS1 sind sehr wahrscheinlich Vektorsequenzen). Außerdem fand sich an Position 81 wie in der publizierten genomischen Sequenz (AY267352.1, bp 1964) ein Guanidin (C→G), so dass hier ein *snp* anzunehmen war. Die ersten 112 bp der cDNS 40.10b (rot) zeigte eine 100%-ige Homologie zur cDNS des EEF-1 α auf Chromosom 6 und zu Sequenzen diverser anderer Chromosomen (* siehe **Abb. 14a**). Die nachfolgenden Sequenzen ab bp 113 waren 100% homolog zur PMS1-cDNS, mit Ausnahme eines einzelnen, nicht-konservativen Basenaustausches im Exon 6 des PMS1-Gens (bp 123, G→A) (Arginin → Lysin), der als *snp* bekannt war, und einer *out-of frame* Deletion von 113 bp im 3' Bereich des PMS1-Exon 10 (rot), deren Folge ein alternativer C-Terminus im PMS1-homologen Antigen MU-RMS-40.10B war. Die cDNS 40.10c war vermutlich 5'-inkomplett, so dass der N-Terminus des PMS1-homologen Antigen unbekannt ist; da der PMS1-homologe ORF von cDNS 40.10c nicht zum stromaufwärts gelegenen Vektor-ATG *in frame* lag und somit nicht von diesem abgelesen werden konnte, wurde das nächste stromabwärts liegende ATG als möglicher Translationsstart in *E. coli* angegeben. Die cDNS 40.10e wies im Vergleich zur PMS1-cDNS einen alternativ gespleißten 5'UTR (rot) (siehe **Abb. 14c**) und zwei Deletionen auf. Letztere zeigten sich in einem in HNPCC vorbeschriebenen Verlust des 117 bp langen von Exon 6 des PMS1-Gens (bp 778/779) (AY267352.1, bp 71511 – 71629), der im PMS1-homologen Genprodukt zu einem Verlust von 39 AS führte, und in einer neuen Deletion von 254 bp (bp 2169/2170) aus dem Exon 10 (rot), welche infolge eines Leserasterwechsels zu einem vorzeitigen Stopcodon (bp 2176) und zu einem entsprechend kurzen, alternativen C-Terminus des PMS1-homologen Genprodukts führte. Die eingezeichneten Primer pr40.10b.se2 (→) und pr40.10b.an2 (←) ergaben ein Produkt von 580 bp [40.10b]. Die eingezeichneten Primer pr40.10b.se1 (→) und pr40.10b.an1 (←) ergaben ein Produkt von 243 bp [40.10b] und 356 bp [PMS1]. Die eingezeichneten Primer pr40.10e.se1 (→) und pr40.10e.an1 (←) ergaben ein Produkt von 383 bp [40.10e] und 500 bp [PMS1]. Die eingezeichneten Primer pr40.10e.se2 (→) und pr40.10e.an2 (←) ergaben ein Produkt von 385 bp [40.10e] und 639 bp [PMS1]. Die eingezeichneten Primer pr40.10e.se3 (→) und pr40.10e.an3 (←) ergaben ein Produkt von 329 bp [40.10e].

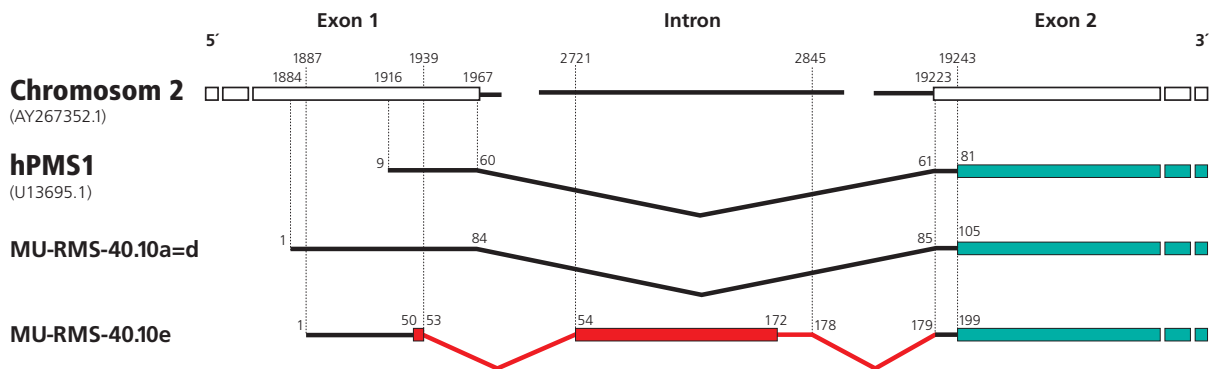


Abb. 14c – Schematischer Vergleich der cDNS-Sequenzen des 5' Endes von MU-RMS-40.10e (AY54751.1), MU-RMS-40.10a=d, hPMS1 (U13695.1) und genomischen Sequenzen auf Chromosom 2 (AY267352.1).

PMS1-homologe ORFs sind als grüne Box dargestellt. Die cDNS 40.10e wies im Vergleich zur PMS1-cDNS und der 5'-erweiterten cDNS 40.10a und d einen alternativ gespleißten 5' UTR auf. Die ersten 178bp der cDNS 40.10e waren homolog zu partiellen Sequenzen von Exon 1 und Intron 1 des *PMS1*-Gens (AY267352.1, bp 1887–1939 und 2721–2845) und schlossen an das 5' Ende des Exon 2 des *PMS1*-Gens an (AY267352.1, ab bp 19223) (rot). Innerhalb dieses alternativ gespleißten 5'UTR der cDNS 40.10e fand sich ein kleiner alternativer ORF (bp 50–172, rote Box).

Unter den TTC3-homologen Antigenen der Gruppe MU-RMS-40.11 fand sich ein neue Spleißvariante (11C)

Die cDNS 40.11a-c zeigten Homologien zu einer Isoform der TTC3-cDNS (*Tetratricopeptide repeat domain 3*, NM_003316.1) (**Abb. 15a und b**), die erstmals von Ohira et al. (1996) isoliert und charakterisiert worden war, auf dem langen Arm von Chromosom 21 kartiert worden war (Ohira et al. 1996, Tsukahara et al. 1996), und die möglicherweise bei der phänotypischen Ausprägung des Down Syndroms eine Rolle spielt (Ohira et al. 1996). Die TTC-Domäne wurde in Proteinphosphatasen und in verschiedenen anderen Proteinen nachgewiesen, die regulierend in die RNS-Synthese und Mitose eingreifen (Boguski et al. 1990, Hirano et al. 1990, Goebel et Yanagida 1991, Sikorski et al. 1991).

Die inkomplette cDNS 40.11a und b waren zur TTC3 cDNS 100% homolog und kodierten für den Antigentypus MU-RMS-40.11A, der im klonierten Teil mit TTC3 identisch war. Die cDNS 40.11c (AY523634.1) zeigte nach einem TTC3-homologen Abschnitt ein alternatives 3'-Ende, für das sich keine Homologien zu bekannten cDNS-Sequenzen, allerdings zu 5'-Intronsequenzen des TTC3-Gens auf dem langen Arm von Chromosom 21 fanden (**Abb. 15b**). Nach elf weiteren Codons fand sich auf dem alternativen 3'-Ende ein Terminationscodon, so dass das Antigen MU-RMS-40.11C durch einen kurzen, alternativen C-Terminus charakterisiert war.

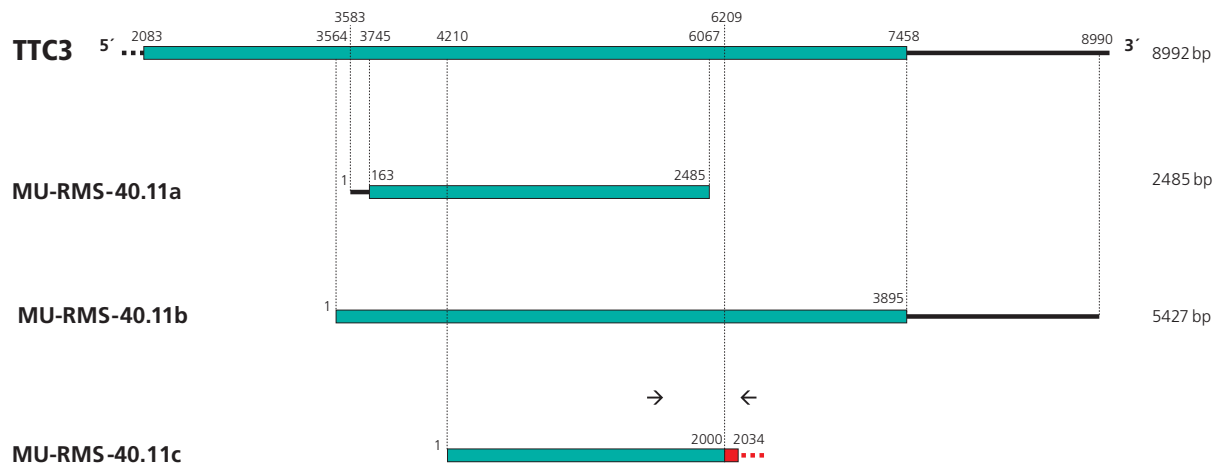


Abb. 15a – Schematischer Vergleich der cDNS-Sequenzen von TTC3 (NM_003316.1) und MU-RMS-40.11a, b und c (AY523634.1).

TTC3-homologe ORFs sind als grüne, alternative ORF als rote Box dargestellt. Die cDNS 40.11a und c waren 100 % homolog zur TTC3-cDNS; sie kodierten im klonierten Abschnitt den mit TTC3 identischen Antigentypus MU-RMS-40.11A. Die cDNS 40.11c zeigte ab Position 2000 im Vergleich mit der TTC3-cDNS ein alternatives 3'-Ende (rot), das 100 % Homologie zu genomischen Sequenzen auf Chromosom 21 zeigte (NT_011512.9, bp 2421847 – 24218776) (siehe **Abb. 15b**). Das alternative 3'-Ende enthielt nach elf weiteren alternativen Codons ein Terminationscodon (bp 2034 der cDNS 40.11c) und kodierte einen entsprechend kurzen, alternativen C-Terminus im Antigen MU-RMS-40.11C (rote Box). Die cDNS aller SEREX-Antigene waren vermutlich 5'-inkomplett, so dass die N-Termini der TTC3-homologen Antigene unbekannt sind. Wenn der TTC-homologe ORF nicht zum stromaufwärts gelegenen Vektor-ATG *in frame* lag und somit in *E. coli* nicht von diesem abgelesen wurde, wurde das nächste stromabwärts *in frame* liegende ATG mit Positionsangabe als möglicher Translationsstart angegeben (MU-RMS-40.11a). Die cDNS 40.11a war darüberhinaus 3'-inkomplett, so dass auch der C-Terminus des korrespondierenden Antigens unbekannt ist. Es ist anzunehmen, dass der Poly(dT)-Primer bei der reversen Transkription an eine interne Adenosin-reiche Region, wie sie sich in den homologen mRNS findet, und nicht an den Poly-A-Schwanz der isolierten mRNS gebunden hatte. Stromabwärts des TTC3-homologen ORF in cDNS 40.11a-c fanden sich zahlreiche sehr kleine, alternative ORFs. Die Primer pr40.11c.se1 (→) und pr40.11c.an1 (←) ergaben ein Produkt von 757 bp [40.11c].

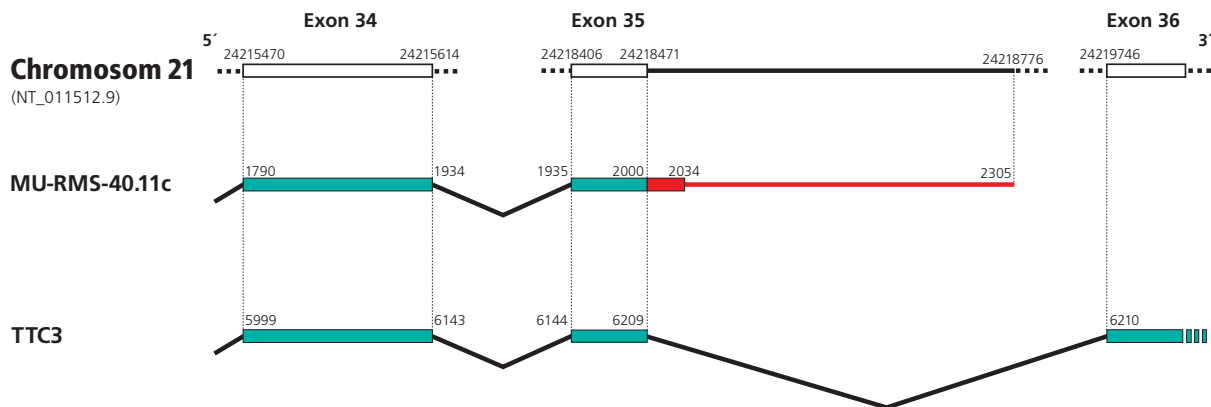


Abb. 15b – Schematischer Vergleich der cDNS-Sequenzen von TTC3 (NM_003316.1), MU-RMS-40.11c (AY523634.1) und genomischen Sequenzen von Chromosom 21 (NT_011512.9), auf dem die MU-RMS-40.11c-cDNS lokalisiert ist.

TTC3-homologe ORFs sind als grüne Box dargestellt, alternative ORFs sind als rote Box dargestellt. Die cDNS 40.11c zeigte ab Position 2000 im Vergleich mit der TTC3-cDNS ein alternatives 3'-Ende (rot), das 100% Homologie zu genomischen Sequenzen auf Chromosom 21 zeigte (NT_011512.9, bp 2421847 – 24218776) (rote Box). Das alternative 3'-Ende enthielt an Position 2035-7 in der cDNS 40.11c ein Stopcodon und führte zu einem entsprechend kurzen, alternativen C-Terminus im TTC3-homologen Antigen MU-RMS-40.11C.

Das Lamin-C-homologe Antigen MU-RMS-12 war durch eine neue Deletion gegenüber dem Wildtyp verkürzt

Die cDNS 40.12a und 12b waren identisch (AY528714.1) und zeigten bis auf eine Deletion von 255bp eine 100% Homologie zur zweiten Isoform der Lamin A/C cDNS (XM_044162.1, Lamin C) (**Abb. 16**). Das *Lamin A/C*-Gen ist auf Chromosom 1 lokalisiert (Wydner et al. 1996) und kodiert mindestens vier verschiedene Spleißvarianten (Lamin A, Lamin A Δ 10, Lamin C und Lamin C2), wobei sich A-Typ-Lamine von C-Typ-Laminen am C-Terminus unterscheiden. Die A- und C-Lamine sowie das verwandte Lamin B sind wichtige Komponenten der Kernhülle. Mutationen des *Lamin A*-Gens wurden für mindestens sechs verschiedene Erbkrankheiten verantwortlich gemacht (Übersicht in Burke und Stewart 2002).

Die Deletion von 255bp in den cDNS 40.12a und b war bislang nicht beschrieben und führte zu einem Verlust von 85 AS. Die deletierte Region enthielt 3'Sequenzen des Exon 7, das komplette Exon 8 und 5'Sequenzen des Exon 9 des *Lamin A/C*-Gens.

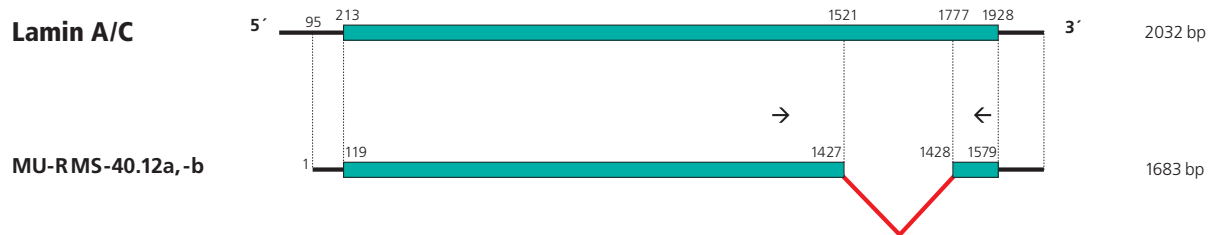


Abb. 16 – Schematischer Vergleich der cDNS-Sequenzen von Lamin A/C (XM_044162.1) und MU-RMS-40.12a und 12b (AY528714.1).

Lamin A/C-homologe ORFs sind als grüne Box dargestellt. Die cDNS 40.12a und b waren identisch. Die cDNS 40.12a und b zeigten im Vergleich zur Lamin A/C-homologen-cDNS zwischen Position 1427 und 1428 eine Deletion von 255 bp (rot), korrespondierend zu Position 1521 und 1777 in der Lamin A/C-cDNS. Diese Deletion führte im Genprodukt zu einem Verlust von 85 AS. Stromabwärts des Lamin C-homologen ORF in cDNS 40.12a und b fanden sich zwei, 56 AS und 240 AS lange, alternative ORFs (bp 234 – 401 und bp 783 – 1502; nicht eingezeichnet). Die eingezeichneten Primer pr40.12a.se1 (→) und pr40.12a.an1 (←) ergaben ein Produkt von 356 bp [40.12a] und 611 bp [Lamin A/C].

Das Antigen MU-RMS-40.13 war wahrscheinlich mit LDH A identisch

Die cDNS 40.13 war 100% homolog zur cDNS der Laktat-Dehydrogenase A (LDHA) (NM_005566.1) (**Abb. 17**). Das kodierende Gen ist auf Chromosom 11 lokalisiert (Francke et al. 1977). LDHA katalysiert in der anaeroben Glykolyse die Konversion von L-Lactat zu Pyruvat (Shim et al. 1997).

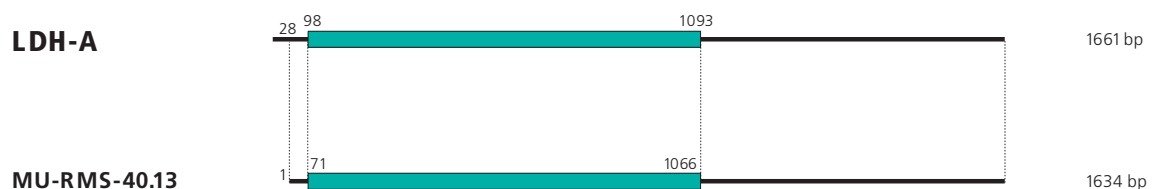


Abb. 17 – Schematischer Vergleich der cDNS-Sequenzen von LDHA (NM_005566.1) und MU-RMS-40.13.

LDH-homologe ORFs sind als grüne Box dargestellt. Die cDNS von MU-RMS-40.13 war 100 % homolog zur LDHA-cDNS. Stromabwärts des LDH-homologen ORF in cDNS 40.13 fanden sich drei kleine, alternative ORFs (nicht eingezeichnet).

MU-RMS-40.14 war ein alternatives Translationsprodukt der Titin-mRNS

Die cDNS 40.14 zeigte Homologien zur cDNS des Muskelfilamentproteins Titin (XM_038278.1) (**Abb. 18**), welches als riesiges elastisches Protein die Struktur und Dehnbarkeit der Muskelsarkomere kontrolliert (Übersicht bei Tskhovrebova und Trinck 2003). Das kodierende Gen war auf Chromosom 2 kartiert worden (Labeit et al. 1990). Mutationen in diesem Gen sind mit diversen nicht-malignen Muskelerkrankungen assoziiert (Übersicht bei Hackman et al. 2003).

Die cDNS 40.14 liegt stromaufwärts des ORF der Titin-cDNS innerhalb der 5'UTR. Das bedeutet, dass MU-RMS-40.14 von einem alternativen *upstream* ORF kodiert wurde. Im Vergleich zur Titin-cDNS fand sich in der cDNS 40.14 ein zusätzliches Adenin inseriert, das sich in autologer, genomischer Fibroblasten-DNS nicht zeigte (vgl. MU-RMS-40.7).

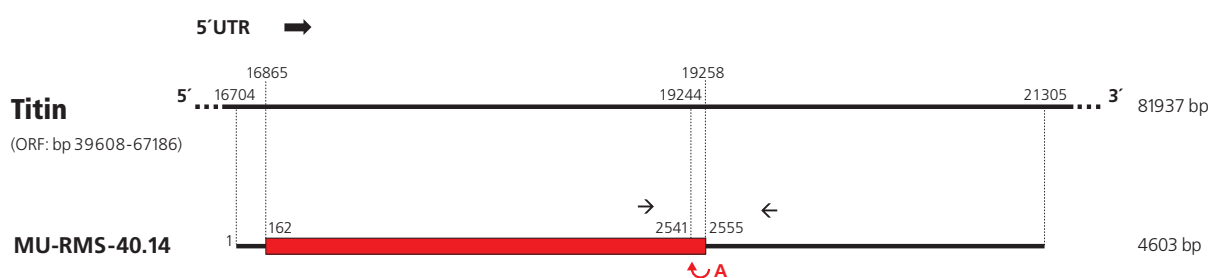


Abb. 18 – Schematischer Vergleich der cDNS-Sequenzen von Titin (XM_038278.1) und MU-RMS-40.14.

Die Sequenz der cDNS 40.14 war in der 5'UTR der Titin-cDNS lokalisiert (bp16704 und 21305). Das bedeutet, dass MU-RMS-40.14 von einem alternativen *upstream* ORF kodiert wurde, von denen der längste abgebildet ist (bp 162 – 2555) (rote Box) und in der Titin cDNS zu den Positionen 16865 und 19258 korrespondierte. Im Vergleich zur homologen Titin-cDNS (bp 19244) war in cDNS 40.14 (bp 2541) ein zusätzliches Adenin inseriert (roter Pfeil). Diese Insertion führte zu einem Leserasterwechsel und vorzeitigem Stopcodon (bp 2556 – 2558). Das Genprodukt des längsten alternativen ORF war entsprechend gegenüber einem evtl. Wildtyp durch einen verkürzten, alternativen C-Terminus charakterisiert. Die eingezeichneten Primer pr40.14.se1 (→) und pr40.14.an1 (←) ergaben ein Produkt von 265 bp [40.14].

Das PIMT-Homolog MU-RMS-40.15 zeigte gegenüber dem Wildtyp möglicherweise insertionsbedingt ein alternatives Carboxyende

Die cDNS 40.15 war homolog zur cDNS des humanen PRIP-interagierenden Proteins (*peroxisome proliferator-activated receptor-interacting protein*, PIMT; NM_024831.5, BC011999.1), die auf Chromosom 8 lokalisiert ist (Zhu et al. 2001) (**Abb. 19**). Die PIMT-cDNS kodiert ein RNS-bindendes Protein mit Methyltransferase-Aktivität (Zhu et al. 2001).

Die cDNS 40.15 war im Vergleich zur PIMT-cDNS durch zwei nicht-konservative Nukleotid-austausche und durch die Insertion einer zusätzlichen Base innerhalb des ORF charakterisiert (NM_024831.5). In einer weiteren publizierten Sequenz von PIMT (BC011999.1) sowie in der publizierten genomischen Sequenz auf Chromosom 8 (NT_008183.17) waren an den korrespondierenden Positionen ebenfalls Adenine zu finden, was bedeutete, dass es sich um bekannte *snp* handelte. Die Insertion eines Thymidins in die cDNS 40.15 bewirkte einen verkürzten, alternativen C-Terminus; sie konnte in autologer Fibroblasten-DNS nicht detektiert werden, so dass wiederum eine tumorspezifische Mutation oder ein Klonierartefakt angenommen werden müssen.

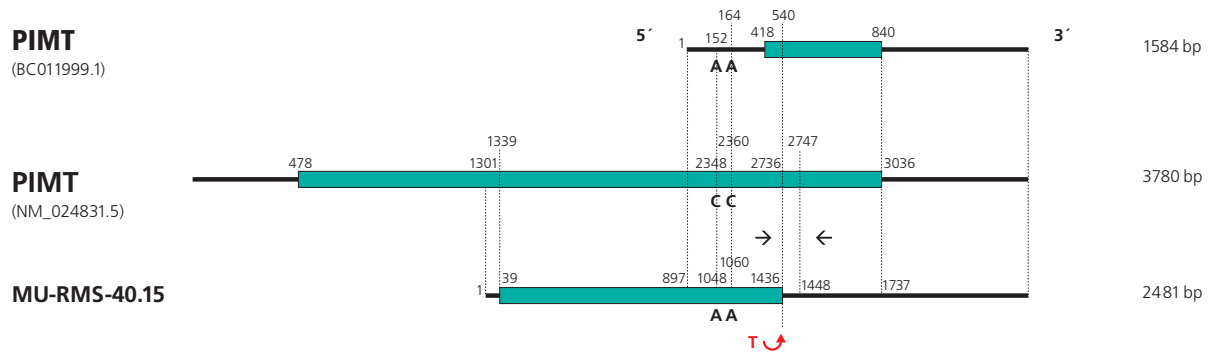


Abb. 19 – Schematischer Vergleich der cDNS-Sequenzen von PIMT (BC011999.1; NM_024831.5) und MU-RMS-40.15.

PIMT-homologe ORFs sind als grüne, alternative ORFs als rote Box dargestellt. Die cDNS 40.15 zeigte im Vergleich zur PIMT-cDNS zweimal eine Substitution der Base Guanin durch Adenin (bp 1048 und 1060), korrespondierend zu Position 2348 und 2360 in der PIMT-cDNS (NM_024831.5). Diese Basenaustausche führten im hypothetischen Genprodukt zu Austauschen von Aspartat durch Glutamat. In einer weiteren publizierten Sequenz von PIMT (BC011999.1, bp 152 und 164) sowie in der publizierten genomischen Sequenz auf Chromosom 8 (NT_008183.17, bp 8557586 und 8557598) waren an korrespondierenden Stellen ebenso wie in der cDNS 40.15 Adenine zu finden (*snp*). Die Insertion des Thymins in die cDNS 40.15 (bp 1436) (roter Pfeil) resultierte in einem Leserasterwechsel. Infolge dessen kam es zu einem vorzeitigen Stopcodon (bp 1449 – 1451) und damit zu einem verkürzten, alternativen C-Terminus im hypothetischen Genprodukt. Stromabwärts des PIMT-homologen ORF in cDNS 40.15 fanden sich zwei kleine, alternative ORFs (bp 1522 – 1737 und bp 2020 – 2325). Die cDNS des SEREX-Antigens war vermutlich 5'-inkomplett, so dass der N-Terminus des PIMT-homologen Antigens unbekannt ist. Da der PIMT-homologe ORF nicht zum stromaufwärts gelegenen Vektor-ATG *in frame* lag und somit vermutlich nicht von diesem abgelesen wurde, wurde das nächste stromabwärts *in frame* liegende ATG mit Positionsangabe als möglicher Translationsstart in *E. coli* angegeben. Die eingezeichneten Primer pr40.15.se1 (→) und pr40.15.an1 (←) ergaben ein Produkt von 248bp [40.15].

Ein AKAP450-homologes Antigen der Gruppe MU-RMS-40.16 unterschied sich vom Wildtyp an einer einzelnen Aminosäureposition (16A)

Die cDNS 40.16a (AY528715.1) und 16b wiesen Homologien zur cDNS des A-Kinase Anker Proteins 450 (AKAP450; XM_029162.1) auf (**Abb. 20**). Das kodierende Gen ist auf Chromosom 7 lokalisiert (Witczak et al. 1999). A-Kinase Anker Proteine gehören zu einer Gruppe strukturell unterschiedlicher Proteine, die an regulatorische Untereinheiten des Enzyms Proteinkinase A binden. Durch alternatives Spleißen dieses Gens entstehen mehrere Isoformen von AKAP450, die mit einer Vielzahl von Signalproteinen verschiedener Signaltransduktionswege interagieren (Lin et al. 1998, Witczak et al. 1999, Westphal et al. 1999, Takahashi et al. 1999).

Die cDNS 40.16a und b hatten keine gemeinsamen Sequenzen, was darauf schliessen liess, dass mindestens zwei Ak-Epitope von dem AKAP450-Gen kodiert werden. Die cDNS 40.16a war etwa 2,8kb stromabwärts der cDNS 40.16b lokalisiert. Die cDNS 40.16a wies einen einzelnen nicht-konservativen Basenaustausch innerhalb des ORF von AKAP450 auf, der durch Sequenzanalyse autologer Fibroblasten-DNS als neuer *snp* identifiziert werden konnte.

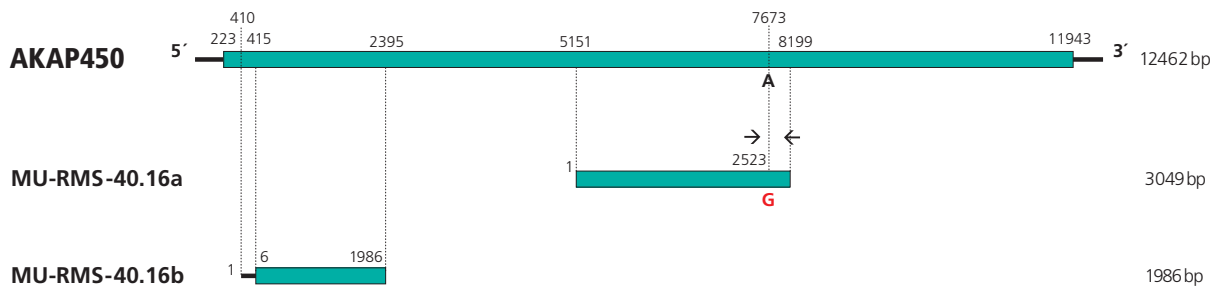


Abb. 20 – Schematischer Vergleich der cDNS-Sequenzen von AKAP450 (XM_029162.1) und MU-RMS-40.16a (AY528715.1) und b.

AKAP-homologe ORFs sind als grüne Box dargestellt. Die cDNS der isolierten Antigene überlappten nicht. Die cDNS 40.16a war homolog zu bp 5151 – 8199 der AKAP450-cDNS. Die cDNS 40.16b war homolog zu 2,8 kb stromaufwärts gelegenen Sequenzen der AKAP450 cDNS (bp 410 – 2395). Die cDNS der beiden AKAP450-homologen Antigene waren vermutlich 3'- und 5'-inkomplett, so dass die N- und C-Termini dieser Antigene unbekannt sind. Die cDNS 40.16a wurde vermutlich vom stromaufwärts *in frame* gelegenen Vektor-ATG abgelesen. Bei cDNS 40.16b war der AKAP-homologe ORF nicht *in frame* mit dem stromaufwärts gelegenen Vektor-ATG, so dass das nächste stromabwärts *in frame* liegende ATG mit Positionsangabe als möglicher Translationsstart in *E. coli* angegeben wurde (Position 6). Die cDNS 40.16a und b waren vermutlich deshalb 3'-inkomplett, weil innerhalb der AKAP450 cDNS Adenosin-reiche Regionen zu finden waren, die den Poly(dT)-Primer bei der Synthese der cDNS anstelle des Poly-A Schwanzes gebunden haben könnten. Die cDNS 40.16a zeigte an Position 2523 den Austausch der Base Adenin durch Guanin, korrespondierend zu Position 7673 in der AKAP-cDNS. Dieser einzelne Basenaustausch resultierte im Genprodukt in der Substitution der AS Lysin durch Arginin (neuer *snp*) (rot). Neben dem AKAP450-homologen ORF in cDNS 40.16a und b fanden sich fünf bzw. zwei sehr kleine, alternative ORFs (nicht eingezeichnet). Die eingezeichneten Primer pr40.16a.se1 (→) und pr40.16a.an1 (←) ergaben ein Produkt von 346 bp [40.16a].

Das Antigen MU-RMS-40.17 war wahrscheinlich mit RUFY-2 identisch

Die cDNS 40.17 (AY528716.1) war homolog zur RUFY2-cDNS (*RUN and FYVE domain-containing protein*; AF461266.1, BC041092) (**Abb. 21**). Das kodierende Gen ist auf Chromosom 10 lokalisiert (*NCBI homepage*). Die Proteine der RUFY-Familie wurden als Effektoren von Etk, einer Tyrosinkinase, identifiziert, die in verschiedene zelluläre Prozesse, wie z. B. Proliferation, Differenzierung und Apoptose eingreift (Qiu et al. 1998, Xue et al. 1999, Tsai et al. 2000, Chen et al. 2001). Die cDNS 40.17 war innerhalb des ORF 100 % homolog zur RUFY2-cDNS.

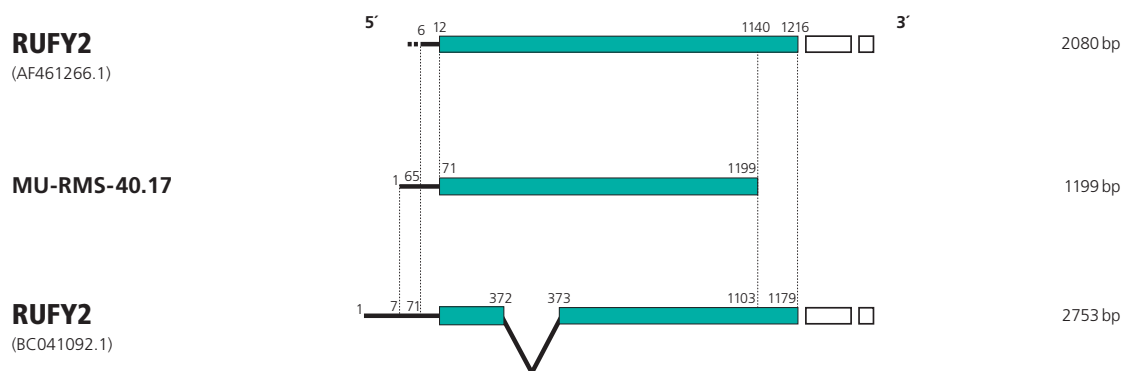


Abb. 21 – Schematischer Vergleich der cDNS-Sequenzen von RUFY2 (AF461266.1, BC041092.1) und MU-RMS-40.17 (AY528716.1).

RUFY2-homologe ORFs sind als grüne Box dargestellt. Die Sequenz zwischen Position 65 bis 1199 in der cDNS 40.17 war 100 % homolog zur korrespondierenden Sequenz zwischen Position 6 und 1140 in der RUFY2-cDNS (AF461266.1). Die ersten 64 Nukleotide der cDNS 40.17 sind auf einer anderen publizierten Sequenz lokalisiert, die ebenfalls das RUFY2-Protein kodiert (BC041092, bp 7 – 70). Die cDNS der publizierten RUFY2-Sequenzen zeigten keine Homologie im Bereich des 3'ORF (AF461266.1, ab bp 1216 bzw. BC041092.1, ab bp 1179) (farblose Boxen). Die cDNS des RUFY2-homologen Antigens war vermutlich 3'-inkomplett, so dass der C-Terminus von MU-RMS-40.17 unbekannt ist. Möglicherweise hat der Poly(dT)-Primer bei der Synthese der MU-RMS-40.17-cDNS an eine Adenosinreiche Region und nicht an den Poly-A-Schwanz der isolierten mRNA gebunden. Stromabwärts des RUFY2-homologen ORF in cDNS 40.17 fand sich ein einziger, 20 AS langer, alternativer ORF (bp 954 – 1013) (nicht eingezeichnet).

Das Golgin-homologe Antigen MU-RMS-40.18 hatte möglicherweise insertionsbedingt einen alternativen Carboxyterminus

Die cDNS 40.18 (AY531221.1) war homolog zur Golgin-245 cDNS (U31906.1) (**Abb. 22**). Golgin wird von Chromosom 3 kodiert (Daigo et al. 1999) und ist Teil des Golgi-Apparates. Die Aufgaben des Golgi-Apparates bestehen im Wesentlichen im Modifizieren und Transportieren von Makromolekülen (Kingsley et al. 1986, Scheiffele et Fullekrug 2000).

Im Vergleich zur Golgin-245-cDNS zeigte die cDNS 40.18 innerhalb des ORF den Austausch einer einzelnen Base, die im Genprodukt zum Austausch einer AS führte. Die Sequenzanalyse autologer Fibroblasten-DNS zeigte, dass ein neuer *snp* vorlag. Ein weiterer einzelner Basenaustausch war in der 3'UTR lokalisiert (neuer *snp*). Innerhalb des Golgi-245-ORF war ausserdem ein Adenin inseriert, das über einen Leserasterwechsel zu einem alternativen C-Terminus des korrespondierenden Antigens führte. Die Insertion war in autologer Fibroblasten-DNS nicht zu erkennen, so dass auch hier entweder eine tumorspezifische Mutation oder ein Klonierartefakt vorliegt.

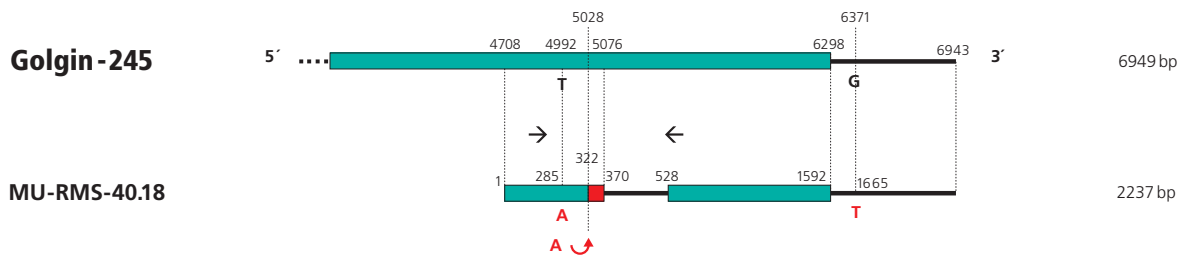


Abb. 22 – Schematischer Vergleich der cDNS-Sequenzen von Golgin-245 (U31906.1) und MU-RMS-40.18

Golgin-245-homologe ORFs sind als grüne, alternative ORFs als rote Box dargestellt. Die cDNS 40.18 zeigte im Vergleich zur Golgin-245-cDNS an Position 285 den nicht-konservativen Austausch von Thymin durch Adenin; die entsprechende Position in Golgin-245-cDNS ist Position 4992. Dieser neue *snp* (rot) führte im Genprodukt zum Austausch von Methionin durch Lysin. Im Plasmid 40.18 war innerhalb des Golgi-245-ORF in eine adenosinreiche Region ein zusätzliches Adenin inseriert (roter Pfeil), das zu einem alternativen C-Terminus des hypothetischen Antigens führte. In der 3'UTR war die cDNS 40.18 an Position 1665 durch den Austausch von Guanin durch Thymin charakterisiert; korrespondierend dazu ist Position 6371 in der Golgin-245-cDNS (neuer *snp*). Die cDNS von MU-RMS-40.18 war vermutlich 5'-inkomplett, so dass der N-Terminus unbekannt blieb. Das rekombinante Protein wurde vermutlich in *E. coli* vom stromaufwärts gelegenen Vektor-ATG abgelesen. Stromabwärts des Golgin-245-homologen ORF in cDNS 40.18 ohne Adenin-Insertion fanden sich sieben kleine alternative ORFs (nicht gezeigt). Im Falle der Adenininsertion fand sich ein größerer zweiter Golgin-245-homologer ORF stromabwärts des alterierten ORF (MU-RMS-40.18, bp 528–1592) (grüne Box). Die eingezeichneten Primer pr40.18.se1 (→) und pr40.18.an1 (←) ergaben ein Produkt von 486 bp [40.18].

Das Antigen MU-RMS-40.19 war wahrscheinlich mit Kinectin identisch

Die cDNS der Antigene MU-RMS-40.19a (AY536375.1) und 19b waren homolog zu mehreren Varianten der Kinectin1-cDNS (z.B. Z225551.1, NM_182926.1, D13629.1) (**Abb. 23**). Das kodierende Gen wurde auf dem kurzen Arm von Chromosom 14 kartiert (Print et al. 1996). Kinectin1 kodiert ein Protein, das in der Membran des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert ist und dem intrazellulären Transport von Zellorganellen dient (Toyoshima et al. 1992, Ong et al. 2000).

Die cDNS 40.19a zeigte im Vergleich zur Kinectin1-cDNS (Z225551) innerhalb des ORF den Austausch von Guanin durch Adenin, der im Genprodukt MU-RNS-40.19A zum Austausch einer AS führte. Bei den Spleiß-Varianten des *Kinectin1*-Gens (NM_004986, D13629.1), sowie in der publizierten genomischen Sequenz auf Chromosom 14 (Hs14_26048; bp 10256720) war an korrespondierender Stelle ebenfalls ein Adenin zu finden, so dass es sich um einen bekannten *snp* handelte.

Chromosom 14

(NT_026437.10)

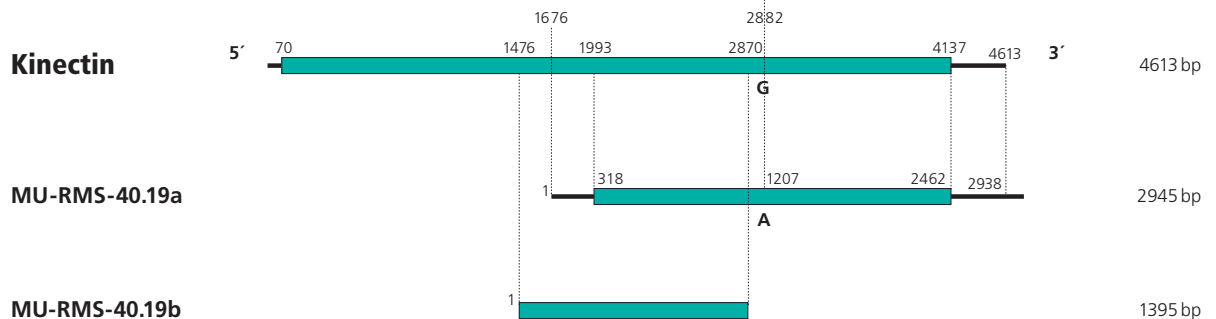


Abb. 23 – Schematischer Vergleich der cDNS-Sequenzen von Kinectin1 (Z225551.1), MU-RMS-40.19a und 19b und genomischen Sequenzen auf Chromosom 14 (NT_026437.10).

Kinectin1-homologe ORFs sind als grüne Box dargestellt. Bei wahrscheinlich inkompletter Klonierung blieben die N-Termini beider und der C-Terminus des Antigen MU-RMS-40.19b unbekannt. Eine Erklärung für das verkürzte 3'-Ende von cDNS 40.19b wäre wiederum eine *false priming* des Poly(dT)-Primers bei der reversen Transkription. Da der Kinectin1-homologe ORF von cDNS 40.19a nicht *in frame* zum stromaufwärts gelegenen Vektor-ATG lag, wurde das nächste stromabwärts *in frame* liegende ATG an Position 318 der MU-RMS-40.19a-cDNS als möglicher Translationsstart in *E. coli* angegeben. MU-RMS-40.19b wurde vermutlich vom stromaufwärts *in frame* liegenden Vektor-ATG abgelesen. Die cDNS 40.19a zeigte im Vergleich zur Kinectin1-cDNS an Position 1207 ein Adenin, welches zum Austausch von Glycin durch Glutamat führte. Da das Adenin auch in publizierten genomischen Sequenzen von Chromosom 14 (NT_026437.10, bp 36042815) und bekannten Kinectin-Spleißvarianten zu finden war, entsprach es einem bekannten *snp*. Stromabwärts des Kinectin-homologen ORF in cDNS 40.19a fanden sich sechs alternative, kleine ORFs (nicht eingezeichnet).

Das Antigen MU-RMS-40.20 war wahrscheinlich mit FLJ11588 identisch

Die inkomplette cDNS 40.20 war 100 % homolog zur FLJ11588-cDNS, die ebenfalls aus einem RMS kloniert worden war (BC007932.1) (**Abb. 24**). Das kodierende Gen ist auf Chromosom 1 lokalisiert (*NCBI-homepage*). Die biologische Funktion des Genprodukts ist nicht bekannt.



Abb. 24 – Schematischer Vergleich der cDNS-Sequenzen von FLJ11588 (BC007932.1) und MU-RMS-40.20.

FLJ11588-homologe ORFs sind als grüne Box dargestellt. Die cDNS 40.20 und FLJ11588 waren 100 % homolog. Die cDNS 40.20 war vermutlich 5'-inkomplett, so dass der N-Terminus des FLJ11588-homologen Antigens unbekannt ist. Da der FLJ11588-homologe ORF in cDNS 40.20 nicht zum stromaufwärts gelegenen Vektor-ATG *in frame* lag, wurde das nächste stromabwärts *in frame* liegende ATG an Position 159 in der MU-RMS-40.20-cDNS als möglicher Translationsstart in *E. coli* angegeben. Stromabwärts des FLJ11588-homologen ORF in cDNS 40.20 fanden sich vier, 39 AS, 5 AS, 21 AS und 45 AS lange, alternative ORFs (nicht eingezeichnet).

Das Antigen MU-RMS-40.21 wurde von einer neuen PRS18 mRNA-Spleißvariante kodiert

Die cDNS 40.21 (AY536376.1) war homolog zur cDNS des ribosomalen Proteins RPS18 (XM_016854.1) (**Abb. 25**), die ohne Veränderung auch aus RMS kloniert worden war (BG826199.1). Das RPS18 Gen wurde auf Chromosom 6 lokalisiert (Chassin et al. 1993, Kenmochi 1998). Ribosomen sind Zellorganellen, die die Proteinbiosynthese katalysieren. Sie bestehen aus einer kleinen 40S Untereinheit und aus einer großen 60S Untereinheit (Pachler et al. 2004). Das ribosomale Protein S18 ist eine Komponente der kleinen 40S Untereinheit.

Die cDNS 40.21 war eine neue Spleißvariante der RPS18-cDNS. Im Vergleich zur cDNS des RPS18 war die cDNS 40.21 durch Insertion einer zusätzlichen 158bp-langen Sequenz charakterisiert. Das erste Codon dieser neuen Sequenz war bereits ein Terminationscodon, so dass ein deutlich verkürzter, erster RPS18-homologer ORF resultierte (MU-RMS-40.21₁). Weiter stromabwärts fand sich ein zweiter RPS18 homologer ORF, der entsprechend ein N-terminal trunkiertes RPS18-Homolog kodierte (MU-RMS-40.21₂). Dazwischen lagen zwei alternative ORFs.

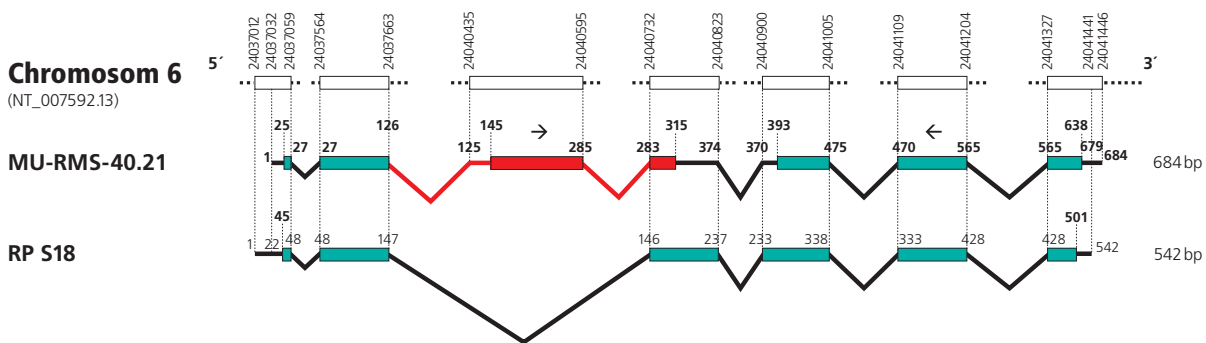


Abb. 25 – Schematischer Vergleich der cDNS-Sequenzen von RPS18 (XM_016854.1), MU-RMS-40.21 (AY536376.1) und der korrespondierenden genomischen Sequenz auf Chromosom 6 (NT_007592.13).

RPS18-homologe ORFs sind als grüne, alternative ORFs als rote Box dargestellt. Die cDNS 40.21 war im Vergleich zur RPS18-cDNS durch Insertion einer 158bp-langen Sequenz charakterisiert (bp 127 – 284) (rot), die mit genomischer DNS von Chromosom 6 identisch war (NT_007592.13, bp 24040437 – 24040594). Das erste Codon dieser Insertion war ein Terminationscodon (AY536376.1, bp 127 – 129), so dass der korrespondierende, erste RPS18 homologe ORF extrem verkürzt war und Codon 1 – 34 des RPS18 entsprach (XM_016854.1). Weiter stromabwärts lag ein zweiter RPS18-homologer ORF (MU-RMS-40.21, bp 393 – 638), der Codon 71 – 153 des RPS18 kodierte (MU-RMS-40.21₂). Zusätzlich zu den RPS18-homologen ORFs in cDNS 40.21 fanden sich zwei, 24 AS und 57 AS lange, alternative ORFs (bp 180 – 251 und bp 145 – 315), von denen der längere eingezeichnet ist (rote Box). Die eingezeichneten Primer pr40.21.se1 (→) und pr40.21.an1 (←) ergaben ein Produkt von 322 bp [40.21] und 480 bp [RPS18].

Das TCEA3-homologe Antigen MU-RMS-40.22 ist eine neue Spleißvariante des Wildtyps

Die cDNS des Antigens MU-RMS-40.22 (AY540752.1) war homolog zur cDNS der dritten Isoform des Transkriptionselongationsfaktors TFIS (TFISS.h/TCEA3) (XM_114075.3), der von einem der

drei verwandten TFIS/TCEA-Gene exprimiert wird (**Abb. 26**). Das kodierende Gen ist auf Chromosom 1 lokalisiert (DiMarco et al. 1996).

Die ersten 518 bp der cDNS 40.22 waren mit Ausnahme eines Nukleotidaustausches innerhalb der 5'UTR 100 % (neuer *snp*) homolog zur TCEA3-cDNS. Die alternative 3'-Region von cDNS 40.22 war 100 % homolog zu genomischen Sequenzen auf Chromosom 1, die bei TCEA3 herausgespleißt wurden. Das alternative 3'-Ende enthielt nach sechs weiteren Codons ein Terminationscodon, so dass das TCEA3-homologe Antigen MU-RMS-40.22 durch einen kurzen, alternativen C-Terminus charakterisiert war.

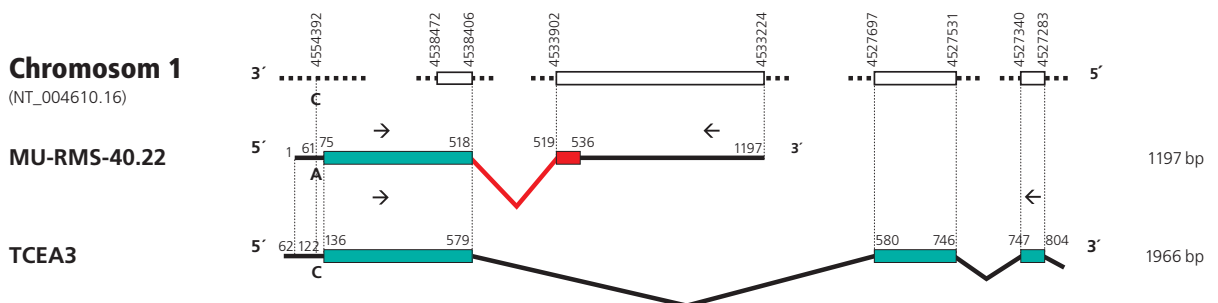


Abb. 26 – Schematischer Vergleich der cDNS-Sequenzen von TCEA3 (XM_114075.3), MU-RMS-40.22 (AY540752.1) und genomischen Sequenzen auf Chromosom 1.

TCEA3-homologe ORFs sind als grüne, alternative ORFs als rote Box dargestellt. Die ersten 518 bp in der cDNS 40.22 waren mit Ausnahme eines Nukleotidaustausches innerhalb der 5'UTR, der als neuer *snp* identifiziert wurde (bp 61, C→A; rot), 100 % homolog zur TCEA3-cDNS (Position 62–579). Die 679 bp lange, alternative 3'-Region von cDNS 40.22 (bp 519–1197) ist auf Chromosom 1 innerhalb einer Intronsequenz lokalisiert, die in der TCEA3-mRNA herausgespleißt wurde (NT_004610.16, bp 4533902–4533224). Das alternative 3'-Ende in cDNS 40.22 enthielt nach sechs weiteren Codons ein Terminationscodon (bp 537), so dass der C-Terminus von 40.22 alternativ und verkürzt war (rote Box). Stromabwärts des TCEA3-homologen ORF in cDNS 40–22 fanden sich vier 26, 50, 52 und 60 Codons lange alternative ORFs (nicht eingezeichnet). Das Primerpaar pr40.22.se1/an1 (→/←) ergab ein Produkt von 713 bp [40.22], das Primerpaar pr40.22.se1/prTFIS.an1 (→/←) ein Produkt von 532 bp [TFIS].

Das Antigen MU-RMS-40.23 ist wahrscheinlich mit RAD52 identisch

Die cDNS des Antigens MU-RMS-40.23 (AY540753.1) war homolog zur RAD52-cDNS (*homo sapiens DNA repair and recombination homologue gene*; L33262.1) (**Abb. 27**). Das kodierende Gen wurde auf Chromosom 12 kartiert (Shen et al. 1995). RAD52 kodiert ein Protein, das ebenso wie MLH1 und PMS1 in DNS-Reparaturmechanismen eingreift (Kanaar et al. 1998, Pastink et Lohman 1999, Paques et Haber 1999).

Die cDNS 40.23 zeigte bis auf einzelne aus anderen publizierten cDNS-Sequenzen bekannte Veränderungen der 3'UTR keine Veränderungen gegenüber diesem und anderen RAD52-cDNS-Einträgen in der Datenbank, so dass das Antigen MU-RMS-40.23 wahrscheinlich mit RAD52 identisch ist.

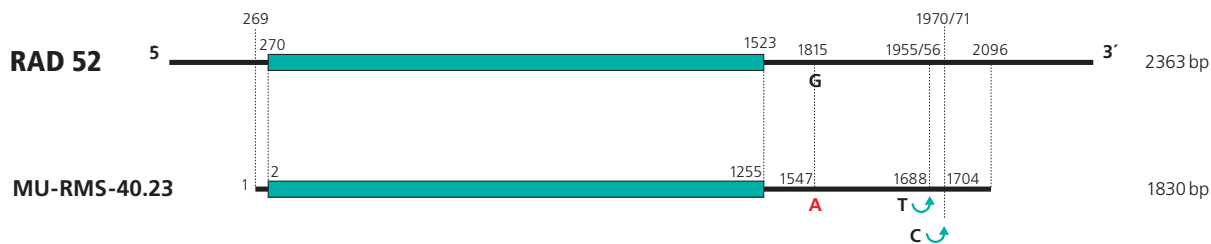


Abb. 27 – Schematischer Vergleich der cDNS-Sequenzen von RAD52 (L33262.1) und MU-RMS-40.23 (AY540753.1). RAD52-homologe ORFs sind als grüne Box dargestellt. Die cDNS 40.23 war innerhalb des ORF 100 % homolog zur RAD52-cDNS. Die 3'UTR der cDNS 40.23 war im Vergleich zur RAD52-cDNS durch einen einzelnen Basenaustausch (neuer *snp*, rot), sowie die Insertion zweier Basen charakterisiert. An Position 1547 cDNS 40.23 war Guanin durch Adenin ersetzt worden, korrespondierend zu Position 1815 in der RAD52-cDNS. In die cDNS 40.23 war an Position 1688 ein zusätzliches Thymin, an Position 1704 ein zusätzliches Cytosin inseriert. Andere überwiegend aus Normalgewebe klonierten cDNS-Einträge in die GenBank waren an diesen Positionen mit cDNS 40.23 identisch, differierten dafür aber an anderen einzelnen Positionen der 3'UTR oder waren Spleißvarianten des RAD52 (U12134.1, NM_002879.2, U27516.1, BC42136.1, AF125948). Stromabwärts des RAD52 -homologen ORF in cDNS 40.23 fanden sich sechs alternative, kleine ORFs (nicht eingezeichnet).

4.2. Untersuchungen zur Immunogenität der SEREX-definierten RMS Antigene

Das Vorkommen von Serum-Ak gegen die SEREX-definierten RMS-Antigene sollte zunächst durch eine differentielle Serumanalyse mit Proben von anderen pädiatrisch-onkologischen Patienten und jungen Kontrollpersonen näher untersucht werden (siehe 4.2.1.)

Anschließend sollte festgestellt werden, ob die in dieser Arbeit beschriebenen RMS-Antigene und/oder verwandte Genprodukte bereits durch Eintrag in die Serex-Datenbank (siehe 4.2.2.) und/oder in der Literatur (siehe 4.2.3.) als immunogen vorcharakterisiert worden waren, oder ob der Nachweis der Immunerkennung einen neuen Befund darstellt.

Falls bereits über die Immunogenität der Antigengruppe berichtet worden war, sollte geprüft werden, ob und welche Angaben zum Vorkommen von Serum-Ak gemacht worden waren. Im Falle von Homologen in der Serex-Datenbank sollte darüberhinaus untersucht werden, ob die gegenüber den GenBank-Einträgen neuen molekularen cDNS-Charakteristika der RMS-Antigene in der Serex-Datenbank zu finden waren.

Die Serex-Datenbank war gegründet worden, um Daten zu den zahlreichen in verschiedenen Tumoren identifizierten SEREX-Antigenen international austauschen zu können, ohne dass bereits alle in kritisch redigierten Fachzeitschriften publiziert sind. Eine Eingabe der eigenen neuen Antigene in die Serex-Datenbank ist geplant.

4.2.1. Differentielle Serumanalyse

Mithilfe der Analyse autologer und heterologer Seren wurde das Vorkommen von Ak gegen gefundene SEREX-definierte Antigene bei 10 Patienten mit dem gleichen Tumor, 20 Patienten mit anderen Tumoren und 30 gesunden Probanden untersucht (**Tab. 8, 9**). Unter den 10 Seren von Patienten mit RMS war nicht gepooltes Serum der Patienten enthalten, deren Proben in die initiale SEREX-Recherche eingesetzt worden war. Mithilfe dieser differentiellen serologischen Analyse konnten die identifizierten RMS-Antigene definitionsgemäß als Tumorantigene oder Autoantigene identifiziert werden. Für jede Antigen-Gruppe war stellvertretend der Phagenklon mit dem längsten cDNS insert untersucht worden.

Sieben der 23 Antigenfamilien kodierten Tumorantigene

Sieben der 23 MU-RMS-40 cDNS-Familien kodierten Tumorantigene, da spezifische Serum-Ak nur bei Tumorpatienten nachgewiesen wurden (MU-RMS-40.1, -40.5, -40.6b, -40.9a, -40.9c, -40.10b, -40.14, -40.17) (**Tab. 8**).

Ak gegen MU-RMS-40.10b wurden nur im Serum eines screening-Patienten detektiert, während Immunantworten gegen alle anderen Tumorantigene bei mindestens zwei Patienten nachzuweisen waren.

Ak gegen Antigene der Gruppe MU-RMS-40.9, die stellvertretend mit den zu MU-RMS-9a und 9c korrespondierenden Klonen untersucht worden waren, fanden sich bei etwa einem Drittel der Patienten mit RMS, aber auch bei Patienten mit anderen Tumoren. Das heißt, es handelt sich bei dieser Antigengruppe vermutlich um ein häufig immunogenes und um ein gemeinsames (*shared*) Tumorantigen vieler Tumorentitäten. Die Differenz der gegen die MU-RMS-40.9-Varianten -9a und -9c reaktiven Seren könnte z. B. mit dem Vorkommen verschiedener Epitope erklärt werden.

16 der 23 Antigenfamilien kodierten wahrscheinlich Autoantigene

Gegen 16 der 23 MU-RMS-40-cDNS Familien wurden bei mindestens einer gesunden Kontrollperson Ak detektiert (MU-RMS-40.2a, -40.3a, -40.4a, -40.7, -40.8, -40.11c, -40.12b, -40.13, -40.15, -40.16a, -40.18a, -40.19c, -40.20, -40.21, -40.22, -40.23) (**Tab. 9**). Diese Antigene sind somit wahrscheinlich Autoantigene.

MU-RMS-40 Antigene	1	5	6b	9a	9c	10	14	17
¹ Kontrolle (30) ²	0 ³	0	0	0	0	0	0	0
¹ Patienten (30)	2	2	2	3	3	1	2	2
Rhabdomyosarkom (10)	2	2	2	1	1	1	2	1
Osteosarkom (2)	0	0	0	1	0	0	0	0
Ewing-Tumor (2)	0	0	0	0	0	0	0	0
Neuroblastom (2)	0	0	0	0	0	0	0	0
Medulloblastom (2)	0	0	0	1	0	0	0	0
Astrozytom (2)	0	0	0	0	0	0	0	0
Ependymom (2)	0	0	0	0	0	0	0	0
Wilms Tumor (2)	0	0	0	0	1	0	0	0
Hodgkin Lymphom (2)	0	0	0	0	1	0	0	0
Non Hodgkin Lymphom (2)	0	0	0	0	0	0	0	0
Akute lymphoblastische Leukämie (2)	0	0	0	0	0	0	0	0

Tab. 8. Ergebnis der differentiellen Serumanalyse SEREX-definierter RMS-Tumorantigene.

¹Serum von 30 gesunden Freiwilligen, von den vier Patienten mit RMS, deren Serum in den Pool eingegangen ist, und von weiteren 26 pädiatrischen Tumorpatienten wurden in Plaque-Assays getestet (Verdünnung 1:100). - (n)² = Anzahl der untersuchten Individuen. - n³ = Anzahl der Individuen mit Serum-Ak gegen SEREX-definierte RMS-Antigene.

Unter den Autoantigenen konnten solche identifiziert werden, gegen die bei einer einzigen scheinbar gesunden Kontrollperson Ak detektiert wurden; hier kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich um einen serologischen Marker eines unerkannten Tumors bzw. doch um ein Tumorantigen handelt (MU-RMS-40.4a, -40.11c, -40.15, -40.18a, -40.21). Diese Antigene wurden daher auf ihre Reaktion mit den Tumorseren getestet. Die Anzahl reaktiver Tumorseren war durchweg höher als die reaktiver Seren von Kontrollpersonen. Ak gegen die Antigene MU-RMS-40.4a, -40.11c und -40.18a wurden bei mindestens drei Patienten mit verschiedenen Tumoren detektiert. Ak gegen die Antigene MU-RMS-40.15 und -40.21 waren bei mindestens zwei Patienten mit RMS nachweisbar.

Ak gegen MU-RMS-40.22 wurden bemerkenswerterweise in allen 30 Kontrollseren und allen 30 Seren von Tumorpatienten nachgewiesen. Es handelt sich damit offensichtlich um ein ubiquitär immunogenes Autoantigen.

MU-RMS-40 Antigene	2a	3a	4a	7	8	11c	12b	13	15	16a	18a	19a	20	21	22	23
¹ Kontrolle (30) ²	2 ³	14	1	6	2	1	3	2	1	10	1	7	3	1	30	2
¹ Patienten (30)	- ⁴	-	2	-	-	4	-	-	3	-	3	-	-	2	30	-
Rhabdomyosarkom (10)			1			2			3		2			2	10	
Osteosarkom (2)			1			0			0		0			0	2	
Ewing-Tumor (2)			0			0			0		0			0	2	
Neuroblastom (2)			0			1			0		1			0	2	
Medulloblastom (2)			0			0			0		0			0	2	
Astrozytom (2)			0			0			0		0			0	2	
Ependymom (2)			0			0			0		0			0	2	
Wilms Tumor (2)			0			0			0		0			0	2	
Hodgkin Lymphom (2)			0			1			0		0			0	2	
Non Hodgkin Lymphom (2)			0			0			0		0			0	2	
Akute lymphoblastische Leukämie (2)			0			0			0		0			0	2	

Tab. 9. Ergebnis der differentiellen Serumanalyse SEREX-definierter RMS-Autoantigene.

¹Serum von 30 gesunden Freiwilligen, von einem Patient mit RMS (Nr. 40) und von weiteren 29 pädiatrischen Tumorpatienten wurden in Plaque-Assays getestet (Verdünnung 1:100). -(n)² = Anzahl der untersuchten Individuen. -n³ = Anzahl der Individuen mit Serum-Ak gegen SEREX-definierte RMS-Antigene. -⁴ = nicht untersucht.

4.2.2. SEREX-Datenbank-Recherche

Von 13 der 23 RMS-Antigen-kodierenden Gene werden auch Antigene der Serex-Datenbank kodiert

Für 13 der 23 RMS-Antigen-kodierenden Gene war bereits gezeigt worden, dass sie SEREX-Antigene kodieren. Homologe zu cDNS der entsprechenden RMS-Antigenengruppen waren mithilfe des SEREX-Verfahrens aus verschiedenen anderen Tumorentitäten, überwiegend aus Karzinomen, isoliert worden (MU-RMS-40.2, -40.4, -40.5, -40.7, -40.8, -40.11, -40.12, -40.13, -40.15, -40.16, -40.18, -40.19, -40.21) (**Tab. 10, 11**).

Für die Produkte von zehn der 23 RMS-Antigen-kodierenden Gene, darunter sechs von sieben der Tumorantigen-kodierenden Gene, fand sich durch die SEREX-Datenbank-Recherche kein früherer Hinweis auf Immunogenität (MU-RMS-40.1, -40.3, -40.6, -40.9, -40.10, -40.14, -40.17, -40.20, -40.22, -40.23) (**Tab. 10, 11**).

Mit einer Ausnahme unterscheiden sich alle SEREX-Datenbank-Einträge von den RMS-cDNS

Mit Ausnahme einer Nierenzellkarzinom-cDNS (NY-REN-59), die gegenüber MU-RMS-40.13 bzw. LDH A-cDNS keine Sequenzunterschiede aufwies und einer weiteren ebenso aus einem Nieren-

zellkarzinom isolierten cDNS (MO-REN-1), die identisch zu einem Sequenzabschnitt der MU-RMS-40.16a-cDNS bzw. AKAP450-cDNS war, war keiner der Datenbank-Einträge 100 % homolog zu den in dieser Arbeit klonierten cDNS-Varianten.

Die cDNS des Antigens MU-RMS-40.21 unterschied sich von RPS18-cDNS durch die Insertion von 158 bp, welche über einen ORF-shift zu einem alternativen C-Terminus führte. Die cDNS aller zur cDNS 40.21 homologen SEREX-Antigene enthielten zwar ebenfalls Sequenzen desselben Introns; keine zeigte jedoch dieselbe 158bp-lange Insertion (NGO-St-8, HGO-St-103, TE-77B, TM-27, HOM-TSSem4-84, TL15-22, TL15-80.2, TL15-83.3, NY-REN-28, HOM-Mel2-1.13, NY-BR-71, NY-BR-80, NGO-Br-17, NGO-Br-44, MO-BC-237, HGO-Pr-14, HOM-HD2-117, NY-LU-5).

Die gegenüber den GenBank-Einträgen neuen Charakteristika der Antigene MU-RMS-40.8 und 40.19a fanden sich auch bei cDNS-Einträgen der Serex-Datenbank

Die Mehrzahl der „neuen“ cDNS-Charakteristika der RMS-Antigen-Gruppen waren auch in der Serex-Datenbank nicht beschrieben. Dies gilt für die Antigene der Gruppen MU-RMS-40.2, -40.4, -40.5, -40.7, -40.11, -40.12, -40.13, -40.15, -40.16 und -40.18.

Lediglich drei der als neu beschriebenen cDNS-Charakteristika fanden sich auch bei Einträgen der Serex-Datenbank. Bei den entsprechenden Antigenen handelte es sich um die Autoantigene MU-RMS-40.8, -40.19a und -40.21:

Die cDNS des Antigens MU-RMS-40.8 unterschied sich von FLJ13441 cDNS durch eine Deletion von 60 bp, die in einer Deletion von 20 AS resultierte. Die gleiche 60 bp-Deletion zeigte eine cDNS, die aus Pankreaskarzinomgewebe isoliert worden war (HOM-Pa1-3). Eine weitere cDNS der Datenbank (NY-SAR-29), die aus einer Sarkomzelllinie isoliert worden war, war zwar ebenfalls homolog zu MU-RMS-40.8-cDNS, enthielt aber den entscheidenden, Deletion-tragenden Sequenzabschnitt nicht.

Homologe der SEREX-Datenbank					
MU-RMS-	Name	Gewebeursprung	„neue“ RMS cDNS-Charakteristika ?	Getestete Seren	Publikation
40.1	-				
40.2	Hom-OvIGA4-3	Ovarial-CA	Deletion: - ¹ Subst./Ins.: <i>n.k.</i> ²	? ³	- ⁵
40.3	-				
40.4	MO-OVA-45	Ovarial-CA	-	NS ⁴ (2/24 pos)	-
40.5	MO-OVA-20	Ovarial-CA	Subst.: - Del.: <i>n.k.</i>	?	-
40.6	-				
40.7	HOM-Ts-PMR1-25	Testis	-	NS (3/19 pos) Arteriitis (5/19 pos)	-
	HOM-MA1-2	Mamma-CA	-		-
40.8	HOM-Pa1-3	Pankreas-CA	60bp Deletion: <i>idem</i>	NS (0/14 pos) Pankr.-CA (2/24 pos)	- Lee et al. 2003
	NY-SAR-29	Synovialsarkom	<i>n.k.</i>	NS (6/33 pos)	
40.9	-				
40.10	-				
40.11	NGO-St-128	Magen-CA	-	NS (2/50 pos) Magen-CA (3/31 pos)	-
40.12	NY-REN-32	Nierenzell-CA	-	NS (0/19 pos) Kolon-CA (2/16 pos) Nieren-CA (3/32 pos)	Scanlan et al. 1999
	HOM-Ts-PMR1-10	Testis	<i>n.k.</i>	NS (0/12 pos) Arteriitis (6/19 pos)	Schmits et al. 2002
	TE-69b	Testis	<i>n.k.</i>	?	-
	MO-BC-429-5'	Klz. Bronchial-CA	<i>n.k.</i>	?	-
-					
40.13	NY-REN-59	Nierenzell-CA	<i>entfällt</i> ⁶	NS (1/19 pos)	Scanlan et al. 1999
	HOM-HCC-7.14.1	Hepatozell. CA		?	-
	cl #1	Mamma-CA		NS (0/20)	Forti et al. 2002
40.14	-				
40.15	MO-OVA-195	Ovarial-CA	<i>n.k.</i>	NS (2/14 pos)	-
	HCA137	Hepatozell. CA	Insertion: - Subst.: <i>n.k.</i>	NS (0/20 pos) HBV (0/25 pos) Kopf-/Hals CA (0/10 pos) HCC (3/55 pos)	Wang et al. 2002

Tab. 10. cDNS-Homologie der SEREX-definierten RMS-Antigene MU-RMS-40.1 bis 40.15 zu Antigenen, die mithilfe von SEREX aus anderen Geweben kloniert worden waren.

Die Tabelle zeigt zusammenfassend die Ergebnisse der Datenbank- und Literaturrecherche. Mehrere gegenüber der GenBank neue cDNS-Charakteristika der MU-RMS-Antigene wurden auch nicht in anderen SEREX-cDNS gefunden (¹), oder die relevanten cDNS-Abschnitte waren bei den Homologen der SEREX-Datenbank nicht kloniert worden (*n.k.*²); ?³ = In der Literatur finden sich keine Angaben zur Reaktivität der Antigene mit Seren von Tumorpatienten und/oder gesunden Probanden. NS⁴ = getestete Seren von gesunden Probanden. -⁵ = Zu den in der SEREX-Datenbank veröffentlichten Antigenen liegen keine Publikationen vor. *entfällt*⁶ = Die cDNS des RMS-Antigens wies gegenüber Einträgen der GenBank keine „neuen“ cDNS-Charakteristika auf.

Homologe der SEREX-Datenbank					
MU-RMS-	Name	Gewebeursprung	„neue“ RMS cDNS-Charakteristika ?	Getestete Seren	Publikation
40.16	MU-REN-1	Nierenzell-CA	<u>16a: <i>snp idem</i></u>	?	-
40.17	-				
40.18	NGO-St-67	Magen-CA	-	NS (0/50 pos) Magen-CA (6/44 pos)	-
40.19	NGO-Br-1	Mamma-CA	<u>19a: <i>snp idem</i></u>	NS (30/100 pos) Magen-CA (22/44 pos)	-
	NGO-St-47	Magen-CA	<u>19a: <i>snp idem</i></u>	NS (30/100 pos) Magen-CA (22/44 pos)	-
	HOM-HD2-2	Hodgkin Lymphom	<i>n.k.</i>	?	-
	HOM-HD2-177	Hodgkin Lymphom	<i>n.k.</i>	?	-
	HOM-HD2-228	Hodgkin Lymphom	<i>n.k.</i>	?	-
	HOM-HD2-191	Hodgkin Lymphom	<i>n.k.</i>	?	-
	HOM-HD2-232	Hodgkin Lymphom	<i>n.k.</i>	?	-
	MO-OVA-42	Ovarial-CA	<i>n.k.</i>	?	-
	HOM-OVA-206	Ovarial-CA	<i>n.k.</i>	?	-
	HOM-TSOv3-41	Testis	<i>n.k.</i>	?	-
	HOM-HCC-27.9.3	hepatozelluläres CA	<i>n.k.</i>	?	-
	HOM-HCC-27.12.2	hepatozelluläres CA	<i>n.k.</i>	NS (0/20 pos) HCC (4/5 pos)	Stenner-Liewen et al. 2000
40.20	-				
40.21	NGO-St-8	Magen-CA	Alle Klone enthalten nur partielle Sequenzen der 158bp-langen Insertion	NS (0/16 pos) Magen-CA (1/13 pos)	-
	NGO-St-103	Magen-CA		NS (1/16 pos) Magen-CA (1/13 pos)	-
	TE-77B	Testis		?	-
	TM-27	Testis		?	-
	HOM-TSSem4-84	Testis		NS (3/12 pos)	-
	TL15-22	Testis		?	-
	TL15-80.2	Testis		?	-
	TL15-83.2	Testis		?	-
	NY-REN-28	Nierenzell-CA		?	-
	HOM-Mel2-1.13	Melanom		NS (0/19 pos) Melanom (2/50 pos) Nieren-CA (0/19 pos) Gliom (0/8 pos)	-
	NY-BR-71	Mamma-CA		?	-
	NY-BR-80	Mamma-CA		?	-
	NGO-Br-17	Mamma-CA		NS (0/30 pos) Mamma-CA (2/31 pos)	-
	NGO-Br-44	Mamma-CA		?	-
	MO-BC-237	Mamma-CA	NS (3/7 pos)	-	
	NGO-Pr-14	Prostata-CA	?	-	
	HOM-HD2-117	Hodgkin Lymphom	?	-	
	NY-LU-5	Lungentumor	?	-	
40.22	-				
40.23	-				

Tab. 11. cDNS-Homologie der SEREX-definierten Antigene MU-RMS-40.16 bis -40.23 zu Antigenen, die mithilfe von SEREX aus anderen Geweben kloniert worden waren.

Erklärungen wie zu Tabelle 10.

Die cDNS des Antigens MU-RMS-40.19a unterschied sich von Kinectin-cDNS durch eine einzelne Base, was den Austausch einer AS im Genprodukt bewirkte. Die gleiche einzelne Basensubstitution wurde in der aus Mammakarzinomgewebe isolierten HGO-Br-1-cDNS und in der aus Magenkarzinomgewebe isolierten NGO-St-47-cDNS identifiziert. In den übrigen 10 zur MU-RMS-40.19a-cDNS homologen cDNS-Inserts (HOM-HD2-2, HOM-HD2-177, HOM-HD2-228, HOM-HD2-191, HOM-HD2-232, MO-OVA-42, HOM-OVA-206, HOM-TSOv3-41, HOM-HCC-27.9.3, HOM-HCC-27.12.2) war der Sequenzabschnitt von MU-RMS-40.19a, in dem die Basensubstitution lokalisiert war, nicht enthalten.

4.2.3. Literatur-Recherche

Die Literaturrecherche zu Genprodukten der homologen GenBank-Einträge ergab Hinweise auf eine Immunerkennung von FLJ13441 (Lee et al. 2003), PMS1 (Casciola-Rosen et al. 2001), Lamin A/C (Philipp et al. 1995, Malka et al. 1997, Scanlan et al. 1999, Schmits et al. 2002), LDH-A (Scanlan et al. 1999, Forti et al. 2002), Titin (Skeie 2000), von PIMT (Wang et al. 2002), Golgin-245 (Rodriguez et al. 1982, Kooy et al. 1992, Fritzler et al. 1995) und Kinectin (Stenner-Liewen et al. 2000, Hirano et al. 2003) (**Tab. 10, 11**).

Ein FLJ13441-Genprodukt war als Autoantigen charakterisiert worden

Die zur MU-RMS-40.8 und FLJ13441 cDNS homologe cDNS NY-SAR-29 wurde mithilfe der SEREX-Analyse aus einer synovialen Sarkomzelllinie isoliert. Zum Screening der Sarkom-cDNS-Expressionsbibliothek wurde Serum von zwei Sarkom-Patienten eingesetzt. Ak gegen das NY-SAR-29-Antigen wurden bei 6/33 untersuchten gesunden Kontrollpersonen detektiert. NY-SAR-29 wurde somit als Autoantigen charakterisiert. Der Nachweis von Ak gegen NY-SAR-29 im Serum von weiteren Tumorpatienten wurde nicht durchgeführt (Lee et al. 2003).

Ein PMS1-Genprodukt war als Myositis-spezifisches Autoantigen charakterisiert worden

Casciola-Rosen et al. (2001) charakterisierten das zu der Antigengruppe MU-RMS-40.10 homologe PMS1 als ein Myositis-spezifisches Autoantigen. Mithilfe von Präzipitationsanalysen untersuchten sie Seren von Patienten mit den Autoimmunerkrankungen Myositis, systemischer Lupus erythematodes bzw. Sklerodermie und außerdem Seren gesunder Probanden auf das Vorhandensein von Ak gegen PMS1. Ak gegen PMS1 wurden bei 4/53 Patienten mit autoimmuner Myositis detektiert, jedoch bei keinem der 94 Patienten mit einer anderen Autoimmunerkrankung (0/94) und auch bei keinem der gesunden Kontrollpersonen (n = nicht angegeben) (Casciola-Rosen et al. 2001).

Lamin C-Genprodukte war als Tumorantigen und als Autoantigen im Rahmen entzündlicher Erkrankungen charakterisiert worden

Die zu MU-RMS-40.12 cDNS homologe cDNS des Antigens NY-REN-32 (Lamin A/C) wurde mithilfe der SEREX-Analyse aus einem spindelzelligem Nierenzellkarzinom isoliert. Die in dieser SEREX-Analyse eingesetzten cDNS-Expressionsbibliotheken wurden aus Tumorgewebe von drei Patienten mit Nierenzellkarzinom sowie aus einer Nierenzellkarzinom-Zelllinie konstruiert und mit autologem Serum der Nierenzellkarzinompatienten gescreent. Ak gegen NY-REN-32 wurden bei keiner gesunden Kontrollperson detektiert (0/19), jedoch bei 2/16 Patienten mit Kolonkarzinom und bei 3/32 Patienten mit Nierenzellkarzinom. NY-REN-32 wurde somit als Tumorantigen charakterisiert (Scanlan et al. 1999). Ein ebenso zur Lamin A/C-cDNS homologes cDNS-insert wurde mithilfe der SEREX-Methode außerdem aus gesundem Testisgewebe isoliert (HOM-Ts-PMR1-10). Zum Screening dieser cDNS-Expressionsbibliothek wurde Serum von drei Patienten mit Riesenzellarteriitis, der häufigsten Vaskulitis großer Gefäße, eingesetzt. Ak gegen HOM-Ts-PMR1-10 wurden bei 2/8 Patienten mit Riesenzellarteriitis, bei 4/9 Patienten mit Polymyalgia rheumatica und bei keinem gesunden Probanden (0/12) detektiert (Schmits et al. 2002). Dass Lamin A/C, wie von Schmits et al. gezeigt, im Rahmen entzündlicher Erkrankungen als Autoantigen fungieren kann, war zuvor bereits am Beispiel der akuten Hepatitis beschrieben worden (Philipp et al. 1995, Malka et al. 1997).

Ein LDH-A-Genprodukt war als Autoantigen und als Tumorantigen charakterisiert worden

Die zu MU-RMS-40.13 cDNS homologe cDNS des Antigens NY-REN-59 (LDH-A) wurde mithilfe der SEREX-Analyse aus der Zelllinie eines Nierenzellkarzinoms isoliert. Die in dieser SEREX-Analyse eingesetzten cDNS-Expressionsbibliotheken wurden aus Tumorgewebe von drei Patienten mit Nierenzellkarzinom sowie aus einer Nierenzellkarzinom-Zelllinie konstruiert und mit autologem Serum der Nierenzellkarzinompatienten gescreent. Ak gegen NY-REN-59 wurden bei 1/19 gesunden Kontrollpersonen detektiert und bei 4/31 Patienten mit Nierenzellkarzinom. NY-REN-59 wurde somit als Autoantigen identifiziert (Scanlan et al. 1999). Ein ebenso zur LDH-A-cDNS homologes cDNS-inserts wurde mithilfe der SEREX-Methode auch aus einer Mammakarzinom-Zelllinie isoliert. Zum Screening dieser cDNS-Expressionsbibliothek wurde Serum einer Patientin mit Mammakarzinom eingesetzt. Eine Ak-Bildung gegen dieses Antigen wurde nur bei Patienten mit Mammakarzinom, jedoch bei keinem gesunden Probanden detektiert (Forti et al. 2002). Im Gegensatz zu den von Scanlan et al. erzielten Ergebnissen, identifizierten Forti et al. LDH-A demnach nicht als Autoantigen, sondern als ein Tumorantigen.

Ein Titin-Genprodukt war als Autoantigen bei Patienten mit Myasthenia gravis charakterisiert worden

Myasthenia gravis (MG), eine Autoimmunerkrankung mit Störung der neuromuskulären Übertragung, ist nicht nur mit Ak gegen den Acetylcholin-Rezeptor (AChR) assoziiert, sondern auch mit Ak gegen das Muskelfilamentprotein Titin (Skeie 2000), von dessen cDNS das alternative

Translationsprodukt MU-RMS-40.14 abgelesen worden war. Während die Konzentration von Ak gegen den AChR bei Patienten mit *early-onset* MG am höchsten ist (Romi et al. 2000₍₁₎), wird die höchste Konzentration von Ak gegen Titin bei Patienten mit *late-onset* MG gemessen (Aarli et al. 1987, Voltz et al. 1997, Romi et al. 2000₍₁₎). Zudem korreliert die Konzentration von Ak gegen Titin bei Patienten mit *late-onset* MG mit der Schwere der Erkrankung (Skeie et al. 1995, Romi et al. 2000₍₂₎). In einer retrospektiven Studie an 34 thymektomierten und 18 nicht-thymektomierten Patienten mit *early-onset* MG untersuchten Romi et al. (2003₍₁₎) den klinischen Effekt einer Thymektomie und dessen Korrelation mit der Schwere der Erkrankung und der Konzentration von Anti-Titin-Ak. Diese Studie zeigte einen Benefit einer Thymektomie bei Patienten mit *early-onset* MG. Die Konzentration von Anti-Titin-Ak korrelierte jedoch nicht mit dem outcome von thymektomierten *early-onset* MG Patienten (Romi et al. 2003₍₁₎). In einer weiteren retrospektiven Studie an 24 MG-Patienten, bei denen ein Thymom diagnostiziert worden war und 24 MG-Patienten ohne Thymom, konnte eine signifikant höhere Konzentration von Anti-Titin-Ak bei den Patienten mit Thymom gemessen werden (Romi et al. 2003₍₂₎). Bei Patienten ohne Thymom war die Anwesenheit von Anti-Titin-Ak mit einer weniger günstigen Prognose assoziiert (Romi et al. 2003₍₂₎).

Ein PIMT-Genprodukt war als Tumorantigen von Leberkarzinomen charakterisiert worden

Die zu MU-RMS-40.15 cDNS homologe cDNS des Antigens HCA137 (PIMT) wurde mithilfe der SEREX-Methode aus einem hepatozellulären Karzinom isoliert. Die aus vier hepatozellulären Karzinomen konstruierten Expressionsbibliotheken wurden mit autologem oder allogenen Serum der betroffenen vier Patienten gescreent. Ak gegen HCA137 wurden bei 3/55 Patienten mit hepatozellulärem Karzinom detektiert. Keine Ak gegen dieses SEREX-definierte Antigen fanden sich dagegen bei Patienten mit chronischer Hepatitis B (0/25), bei Patienten mit Kopf- bzw. Halskarzinom (0/10) oder bei gesunden Probanden (0/20). HCA137 wurde somit als Tumorantigen charakterisiert (Wang et al. 2002).

Antikörper gegen Proteine des Golgi-Apparates waren bei Autoimmunerkrankungen und Infektionen beobachtet worden

Immunreaktionen gegen Genprodukte der zu MU-RMS-40.18 homologen golgin245 cDNS sind bislang nicht speziell beschrieben. Allerdings wurden Ak gegen Proteine des Golgi-Apparates bei Autoimmunerkrankungen und Infektionen beobachtet. Ak gegen den Golgi-Komplex waren zuerst im Serum eines Sjögren-Syndrom-Patienten mit Lymphom detektiert worden (Rodriguez et al. 1982, Kooy et al. 1992, Fritzler et al. 1995). Auto-Ak gegen Proteine des Golgi-Apparates wurden bereits für Patienten mit rheumatischen Erkrankungen wie systemischer Lupus erythematoses (Fritzler et al. 1984), rheumatoide Arthritis (Hong et al. 1992) und Wegener's Granulomatose (Mayet et al. 1991), außerdem bei Patienten mit idiopathischer zerebellärer Ataxie (Gaspar et al. 1988) und viralen Infektionen, wie beispielsweise Epstein-Barr Virus- oder HIV-Infektionen (Huidbuchel et al. 1991, Gentric et al. 1991) beschrieben.

Kinectin-Genprodukte waren als Tumorantigene und als Autoantigene bei Aplastischer Anämie charakterisiert

Die zu MU-RMS-40.19 cDNS homologe cDNS des SEREX-definierten Antigens HOM-HCC-27.12.2 (Kinectin) wurde aus einem hepatozellulären Karzinom isoliert. Zur Identifizierung von Antigenen wurde autologes Serum des Patienten mit hepatozellulärem Karzinom eingesetzt, aus dessen Tumorgewebe die cDNS-Expressionsbibliothek konstruiert worden war. Neben HOM-HCC-27.12.2 wurden aus dem hepatozellulären Karzinom noch vier weitere Klone isoliert, deren cDNS homolog zur Kinectin-cDNS war, die jedoch nicht mit der cDNS von MU-RMS-40.19 überlappten. Ak gegen die verschiedenen Kinectin-homologen Klone wurden bei 4/5 untersuchten Patienten mit hepatozellulärem Karzinom und bei keinem der getesteten gesunden Kontrollpersonen (0/20) detektiert. Die aus dem hepatozellulären Karzinom isolierten Antigene wurden somit als Tumorantigene charakterisiert (Stenner-Liewen et al. 2000).

Im Gegensatz zu den von Stenner-Liewen et al. (2000) erzielten Ergebnissen, wurde Kinectin von Hirano et al. (2003) nicht als Tumorantigen, sondern als mit aplastischer Anämie assoziiertes Autoantigen charakterisiert. Mit Serum von acht Patienten mit aplastischer Anämie wurde eine cDNS-Expressionsbibliothek aus fetalem Lebergewebe gescreent. Aplastische Anämie ist in einigen Fällen autoimmun bedingt. Ak gegen Kinectin wurden bei 7/18 Patienten mit aplastischer Anämie detektiert. Bei Patienten mit Thalassämie bzw. Sichelzellenanämie (0/20) und bei gesunden Kontrollpersonen (0/35) wurden keine Ak gegen Kinectin gefunden. Das Serum von Tumorpatienten wurde nicht untersucht (Hirano et al. 2003).

4.3. Untersuchungen zur Expression der SEREX-definierten RMS-Antigene

4.3.1. Literatur und Datenbank-Recherche zur Expression

Um nicht überflüssige eigene Untersuchungen zur mRNA-Expression der SEREX-definierten Antigene durchzuführen, wurde zunächst in der Literatur bzw. im Internet (www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene) nach Hinweisen auf das Expressionsmuster von homologen cDNS gesucht (Tab. 12, 13).

Die meisten der RMS-Antigen-kodierenden Gene werden in verschiedenen Normal- und Tumorgeweben exprimiert

cDNS mit Homologie zu 14 der 23 RMS-Antigen-kodierenden Gene wurden aus zahlreichen, verschiedenen Normal- und Tumorgeweben kloniert; diese respektiven Gene werden daher vermutlich sehr breit oder ubiquitär exprimiert (*AND1*, *RALBP*, *FLJ20364*, *hMLH1*, *FLJ20644*, *FLJ13441*, *PMS1*, *TTC3*, *AKAP450*, *Golgin245*, *Kinectin*, *FLJ11588*, *RPS18*, *RAD52*) (Unigene).

Name	Homologe MU-RMS-Antigen-gruppe	mRNS Expression in Normalgewebe	mRNS Expression in Tumorgewebe	Referenzen in der Literatur
AND-1	40.1	Gehirn, Leber, Magen; Diverse (UniGene)	Diverse (UniGene)	Köhler et al. 1997
RALBP	40.2	schwache ubiquitäre Expression 1995	Diverse (UniGene)	Jullien-Flores et al. Cantor et al. 1995
MYH3	40.3	beschränkt auf die embryonale Phase der Skelettmuskelentwicklung	Tumore mit muskulärer Differenzierung (einschließlich RMS)	Fitzsimons et Hoh 1981 Whalen et al. 1981 Bandman et al. 1982 Schiaffino et al. 1986 Webster et al. 1988 Eller et al. 1989 Karsch-Mizrachi et al. 1989 Tonin et al. 1991
FLJ20364	40.4	Diverse (UniGene)	ubiquitär (UniGene)	
MLH1	40.5	Diverse (UniGene)	ubiquitär (UniGene) [molekulare Alterationen des <i>MLH1</i> - Gens sind assoziiert mit hereditärem nicht-polypösen Kolon-CA (HNPCC), HNPCC-Syndrom assoziiertem Endometrium-CA, Prostata-CA und Nierenzell-CA]	Umar et al. 1994 Liu et al. 1996 Peltomaki et Vasen 1997 Leach et al. 2002 Chen et al. 2003
FLJ20644	40.6	Diverse (UniGene)	ubiquitär (UniGene)	
MYH7	40.7	vorwiegend Herzmuskel, langsame Fasern der Skelettmuskulatur	Alveoläres RMS, embryonales CA, Ovarialkarzinom (UniGene)	Jandreski et al. 1987, Yamauchi-Takihara et al. 1989
FLJ13441	40.8	Diverse (UniGene)	Diverse (UniGene)	
SMYD1	40.9	Zytotoxische T-Zellen, Herzmuskel, Skelettmuskel		Hwang et Gottlieb 1995 Gottlieb et al. 2002
PMS1	40.10	Diverse (UniGene)	Diverse (UniGene) [Molekulare Alterationen von PMS1 sind mit dem HNPCC assoziiert]	Leach et al. 1993 Bronner et al. 1994
EEF1 α	40.10b	ZNS, Plazenta, Lunge, Leber, Niere, Pankreas	Diverse (einschließlich RMS) (UniGene)	LocusLink Report
TTC3	40.11	Diverse (UniGene)	Diverse (UniGene)	
LMN A/C	40.12	<u>Allgemein:</u> nicht-proliferierende, gut differenzierte Zellen exprimieren A-Typ-Lamine, während undifferenzierte Zellen A-Typ-Lamine nur Schwach bzw. in nicht nachweisbarer Menge exprimieren. ubiquitär (Herz, Plazenta, Lunge, Leber, Niere, Skelettmuskel, Pankreas, schwache ZNS-Expression)	Promyelozytäre Leukämie, CML, kolorektales CA, Lungen-CA, Melanoms; Neoplasien des Gastrointestinaltrakts	Roerber et al. 1989 Machiels et al. 1996 Lin et Worman 1997 Stuurman et al. 1998 Moss et al. 1999 Wilson 2000
LDH A	40.13	Diverse (UniGene), aber vorwiegend in Muskelgewebe exprimiert	ubiquitär (UniGene), Nierenzell-CA >> normale Niere auf weniger als 50 % reduzierte Expression in 9/11 untersuchten diffusen Astrozytomen im Vergleich zu normalem Gehirngewebe	Vilà et al. 2000 Huang et al. 2000 Forti et al. 2002 LocusLink Report

Tab. 12. Bekannte Expressionsdaten von mRNS-Homologen der Antigene MU-RMS-40.1 bis -40.13

Name	Homologe MU-RMS-Antigen-gruppe	mRNS Expression in Normalgewebe	mRNS Expression in Tumorgewebe	Referenzen in der Literatur
Titin	40.14	vorwiegend quergestreifte Muskulatur [molekulare Alteration des <i>Titin</i> -Gens sind mit diversen nicht-malignen Muskel-erkrankungen assoziiert]	RMS	Osborn et al. 1986, Cavazzana et al. 1992 Sartelet et al. 1998 LokusLink Report
PIMT	40.15	ubiquitär (starke Expression in Herz, Skelettmuskel, Niere, Leber, Plazenta)	überexprimiert in Mamma-CA und Kolon-CA	Lee et al. 1999 Zhu et al. 2001
AKAP450	40.16	ubiquitär (UniGene), Niere >> ZNS, Herz, Plazenta, Lunge >> Skelettmuskel, Leber, Dünndarm, PBL	Diverse (UniGene)	Witczak et al. 1999
RUFY-2	40.17	nur ZNS, Lunge, Testis	Neuroblastom, Endometrium-CA, Chondrosarkom, Granulosazell-Tumor, Hypernephrom (UniGene)	Yang et al. 2002
Golgin-245	40.18	Diverse (UniGene)	Diverse (UniGene)	
Kinectin	40.19	hämatopoetische Zellen, Leber, Testis, Ovar, Gehirn	Diverse (UniGene), hepatozelluläres CA, Melanom	Toyoshima et al. 1992 Stenner-Liewen et al. 2000 Grottko et al. 2000
FLJ11588	40.20	Diverse (UniGene)	Neuroblastom, Chondrosarkom, Retinoblastom, Insulinom, Leiomyosarkom, anaplastisches Oligodendrogliom, Nebenschilddrüsen-tumor, Keimzelltumor (UniGene)	
RPS18	40.21	Diverse (UniGene)	Diverse (UniGene)	
TCEA3	40.22	Diverse	Kolontumor, anaplastisches Oligodendrogliom, Karzinoid, CLL, Endometrium-CA, Chondrosarkom, Glioblastom, Retinoblastom, Meningeom hepatozelluläres CA, Leiomyosarkom (UniGene)	Kanai et al. 1991 Labhart et Morgan 1998
RAD52	40.23	Diverse (UniGene)	Diverse (UniGene), *Alterationen von RAD52 sind evtl. mit Mamma-CA assoziiert	Goode et al. 2002 Tong et al. 2003

Tab. 13. Bekannte Expressionsdaten von mRNS-Homologen der Antigene MU-RMS-14.1 bis -40.23

Transkripte des *EEF1 α* -Gens kommen laut LokusLink Report normalerweise nur in Gehirn, Plazenta, Lunge, Niere und in Pankreas vor; ESTs wurden auch aus RMS kloniert (UniGene).

Für die nachfolgenden Gene gibt es gezielte Expressionsanalysen, die eine normalerweise auf sehr wenige Gewebe beschränkte Expression anzeigen.

Das *Lamin A/C*-Gen wird ubiquitär und vorwiegend in nicht-proliferierenden, gut differenzierten Zellen exprimiert. Undifferenzierte Zellen exprimieren *Lamin A/C* hingegen nur schwach bzw. in nicht nachweisbarer Menge (Roeber et al. 1989, Stuurman et al. 1998, Machiels et al.

1996, Wilson 2000, Lin und Worman 1997). Lamin A/C-Transkripte wurden darüberhinaus in promyelozytären Leukämiezellen sowie Zelllinien der chronisch myeloischen Leukämie, des kolorektalen Karzinoms, Lungenkarzinoms und Melanoms exprimiert. In lymphoblastischen Leukämiezellen und in Burkitt-Lymphomzellen zeigte sich keine Lamin A/C-mRNS-Expression (Lin und Worman 1997). Moss et al. konnten für Neoplasien des Gastrointestinaltraktes eine verminderte bzw. fehlende Lamin A/C-mRNS-Expression nachweisen (Moss et al. 1999).

Das LDHA-Gen wird ubiquitär, jedoch vorwiegend in Muskelgewebe exprimiert (Forti et al. 2002, LokusLink Report). Vilà et al. zeigten eine erhöhte LDH-A-mRNS-Expression in mehr als 85 % der von ihnen untersuchten Nierenzellkarzinomen im Vergleich zu normalem Nierengewebe (Vilà et al. 2000). Im Gegensatz dazu wurde von Huang et al. in 9/11 untersuchten diffusen Astrozytomen WHO Grad II eine auf weniger als 50 % des in normalem Gehirngewebe exprimierten LDH-A-Expressionslevels nachgewiesen (Huang et al. 2000).

Das *PIMT*-Gen wird ebenfalls ubiquitär und besonders stark in Herz, Skelettmuskulatur, Niere, Leber und Plazenta exprimiert (Zhu et al. 2001). In Brustdrüsenkarzinomen und kolorektalen Karzinomen konnte eine verstärkte mRNS-Expression von PIMT nachgewiesen werden (Lee et al. 1999).

Das *TFIIS.h/TCEA3*-Gen wird in diversen Xenopus- und Mausgeweben exprimiert; *TFIIS.h/TCEA3* ist das in Xenopus-Muskelgewebe vorherrschende Transkript der drei bekannten *TFIIS/TCEA*-Gene (Labhart et Morgan 1998). *TCEA3*-homologe ESTs wurden bereits aus verschiedenen Tumorentitäten, jedoch bislang noch nicht aus RMS isoliert (UniGene).

Transkripte des *RUFY-2*-Gens wurden mithilfe von Northern-Blot-Hybridisierungen nur in Gehirn, Lunge und Testis nachgewiesen (Yang et al. 2002). *RUFY2*-homologe cDNS wurde aus einem Neuroblastom, Endometriumkarzinom, squamösem Zellkarzinom, Chondrosarkom, Granulosazell-Tumor und aus einem Hypernephrom isoliert (UniGene).

MYH3, MYH7, Titin und das murine SMYD1-Homolog skm-Bop-1 werden normalerweise nur in Muskelgewebe exprimiert

Die Expression des *MYH3*-Gens ist beim Gesunden auf die embryonale Phase der Skelettmuskelentwicklung beschränkt (Fitzsimons et Hoh 1981, Whalen et al. 1981, Bandman et al. 1982, Karsch-Mizrachi et al. 1989). Bei einigen genetisch bedingten Muskelerkrankungen, wie der muskulären Dystrophie und der infantilen muskulären Atrophie wird *MYH3* auch nach der embryonalen Phase verstärkt exprimiert (Fitzsimons et Hoh 1981, Webster et al. 1988). Eine *MYH3*-mRNS-Expression ist außerdem bereits in Tumoren muskulärer Differenzierung, einschließlich RMS, nachgewiesen worden (Tonin et al. 1991, Schiaffino et al. 1986).

Das *MYH7*-Gen wird vorwiegend in Herzmuskulatur und in langsamen Fasern der Skelettmuskulatur exprimiert (Jandreski et al. 1987, Yamauchi-Takahara et al. 1989). *MYH7*-homologe

cDNS wurde bereits aus einem alveolären RMS, der Zelllinie eines embryonalen Karzinoms und aus einem Ovarialkarzinom isoliert (UniGene).

Das zum humanen SMYD1 homologe murine *Bop*-Gen wird nur in Muskelgewebe und T-Zellen exprimiert. Die zur MU-RMS-40.9a und 9c cDNS homologen mRNS der murinen *Bop*-Spleißvarianten *skm-Bop-1* und *skm-Bop-2* werden nur in Herz- bzw. Skelettmuskulatur exprimiert. T-*Bop*-mRNS wird nur in zytotoxischen T-Zellen exprimiert (Hwang et Gottlieb 1995, Gottlieb et al. 2002).

Das *Titin*-Gen wird vorwiegend in quergestreifter Muskulatur exprimiert (LokusLink Report). Eine *Titin*-mRNS-Expression wurde außerdem in RMS nachgewiesen (Osborn et al. 1986, Cavazzana et al. 1992, Sartelet et al. 1998).

4.3.2. mRNS-Expressionsanalyse mithilfe der RT-PCR

Mithilfe der RT-PCR wurde die mRNS-Expression der SEREX-definierten RMS-Antigene in 22 Normalgeweben und 23 pädiatrischen Tumoren untersucht, um zu prüfen, ob sich unter den Antigenen tumorspezifische Genprodukte fanden (**Abb. 28, 29; Tab. 14, 15**).

Da tumorspezifische molekulare Alterationen nicht nur zur Generation tumorspezifischer Epitope führen und damit für die Immuntherapie nützlich sein können, sondern auch als molekulare Gewebemarker interessant sind, wurde das Expressionsmuster aller Antigene untersucht, deren neue oder bislang nur in Tumoren beschriebene molekulare Eigenschaft durch RT-PCR und anschließende Gelelektrophorese gut darstellbar war (MU-RMS-40.1, MU-RMS-40.2a, MU-RMS-40.6b, MU-RMS-40.8, MU-RMS-40.10b, MU-RMS-40.10e, MU-RMS-40.11c, MU-RMS-40.12a, MU-RMS-40.21 und MU-RMS-40.22). Um eine maximale Spezifität und Sensitivität zu erreichen, folgte der RT-PCR jeweils eine Southern-Blot-Hybridisierung der PCR-Produkte mit radioaktiv markierten spezifischen internen Oligonukleotiden (**Tab. 1**). Alle in die Expressionsanalyse eines Tumorantigens eingesetzten Primerpaare hybridisierten mit Sequenzen auf zwei verschiedenen Exons (Ausnahme MU-RMS-40.1). Ihre Positionen sind schematisch in die Abbildung zu den jeweiligen Antigenen in Kapitel 4.1. eingetragen.

Die meisten der untersuchten neuen mRNS-Varianten und ihre Homologe kamen in zahlreichen Normalgeweben vor

Die durch einen erweiterten 3' Terminus charakterisierte MU-RMS-40.1-mRNS wurde in allen untersuchten Normalgeweben ausser Gehirn exprimiert und in Tumoren nicht untersucht.

Die durch eine Deletion von Exon 2 charakterisierte MU-RMS-40.6b-mRNS zeigte eine ähnlich weit gestreute Expression in Normal- und Tumorgeweben wie die längere homologe FLJ20644-mRNS. Eine gemeinsame Expression beider mRNS-Varianten fand sich in allen untersuchten

hämatopoetischen und lymphoretikulären Geweben, Niere und Gehirn sowie in 3/4 Neuroblastomen (NB), 3/4 Medulloblastomen (MB), 1/2 Astrozytomen (AZ), 1/1 Ewing-Tumoren (ET), 2/3 Hodgkin Lymphomen (HL), 2/3 Non-Hodgkin Lymphomen (NHL), 1/2 Osteosarkomen (OS), 1/2 Hepatoblastomen (HB) und 2/2 RMS. Während in Hodengewebe, 1/4 MB, 1/3 HD und 1/3 NHL ausschließlich FLJ20644 mRNA detektiert wurde, fand sich in 1/3 HL und 1/3 NHL ausschließlich MU-RMS-40.6b-mRNA. Diese Befunde lassen eine geweberestringierte, nicht-tumor-spezifische und für beide Varianten etwas unterschiedliche Regulation der Expression vermuten.

Die durch eine Deletion von 60bp charakterisierte Spleißvariante MU-RMS-40.8-mRNA war wie das homologe FLJ13441-mRNA ebenfalls in mehreren Normal- und Tumorgeweben nachweisbar. Eine gemeinsame Expression fand sich in Testis, ZNS, Thymus, Lunge und Leber sowie in 1/3 NB, 1/3 MB und 1/1 ET. Während MU-RMS-40.8-mRNA außerdem in Milz, PBL, Niere und Darm, 3/4 MB und 1/3 NHL zu detektieren war, wurde FLJ13441-mRNA zusätzlich nur in zwei NB nachgewiesen. Auch für diese beiden mRNA-Varianten ergab sich demnach eine geweberestringierte, nicht tumor-spezifische und für beide Varianten etwas unterschiedliche Regulation der Expression, wobei die MU-RMS-40.8-mRNA in deutlich mehr gesunden und malignen Geweben zu detektieren war.

Gewebe	1 3'UTR	2a	RAL BP1	6b	FLJ 20644	8	FLJ 13441	11c 3'	12a,b	LMN A/C	21	22	TFIIS
ZNS	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
Thymus	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
PBL	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-
Milz	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-
Leber	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
Pankreas	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Darm	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-
Herz	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Lunge	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
Niere	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
Prostata	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
Testis	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Ovar	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Skelettmuskel	+	-	+	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	-	+	+	n.u.	n.u.

Tab. 14. mRNA-Expression von Antigenen mit neuen molekularen Charakteristika in Normalgewebe ohne MU-RMS-10

Die in die PCR und Southern-Blot-Hybridisierung eingesetzten Oligonukleotide wurden in **Tab. 1** und **2** (siehe 2.2.) beschrieben, und die Lokalisation der PCR-Primer darüber hinaus schematisch in die Abbildungen zu den GenBank-Homologen (**Abb. 5–27**) eingezeichnet. Die mRNA-Expression der Antigene MU-RMS-40.1, -40.2a, -40.12a, b und -40.21 wurde mit Hilfe von Normalgewebe-cDNA-Panels durchgeführt, für die der Hersteller (CLONTECH) Freiheit von genomischer DNA angab. Der PCR-Analyse des erweiterten MU-RMS-1 3'UTR wurde keine Southern-Blot-Hybridisierung der PCR-Produkte angeschlossen.

Gewebe	10b	10b	10e	10e	10e
	5' se2 x an2	3' se1 x an1	5' se3 x an3	Mitte se1 x an1	3' se2 x an2
Gehirn	-	+	-	+	-
Thymus	-	-	-	+	+
PBL	-	-	-	+	+
Knochenmark	-	-	n.u.	n.u.	-
Lymphknoten	-	-	n.u.	n.u.	+
Milz	-	-	-	+	-
Leber	-	-	-	+	+
Pankreas	-	-	-	+	-
Dünndarm	-	+	-	+	-
Herz	-	-	-	+	-
Lunge	-	+	-	+	+
Niere	-	-	-	+	-
Prostata	-	-	-	+	-
Testis	-	-	-	+	-
Ovar	-	-	-	+	-
Skelettmuskel	n.u.	n.u.	+	+	n.u.

Tab. 15. mRNS-Expression der neuen MU-RMS-10-Spleißvarianten in Normalgewebe.
Die verwendeten Oligonukleotide finden sich in **Tab. 1** (siehe 2.2.) und **Abb. 14b**.

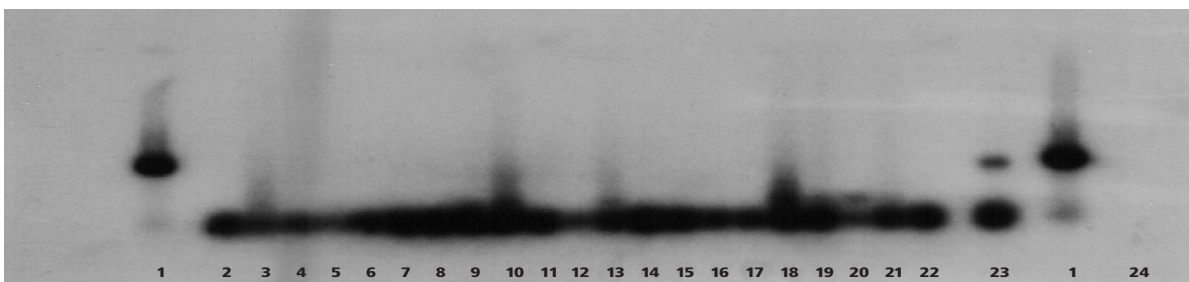


Abb. 28 – Southern-Blot-Analyse der MU-RMS-40.10b¹-spezifischen RT-PCR-Produkte aus Normalgewebe.

In keinem der 21 untersuchten Normalgewebe konnte eine Expression des charakteristischen 5'Endes von MU-RMS-40.10b¹ nachgewiesen werden. Der sense Primer MU-RMS-40.10bse1 hybridisierte an die in dieser Arbeit beschriebene, alternative 5'-Region des Antigens, während der antisense Primer MU-RMS-40.10ban1 and die stromabwärts anschließende, zu PMS1 100 % homologe Region der MU-RMS-40.10b mRNS band. Das PCR-Produkt hatte eine Länge von 580bp. Die Spuren 1–24 zeigen 1) MU-RMS-40.10b kodierendes p40.152-2 (Positivkontrolle), 2) Milz, 3) periphere Blutleukozyten, 4) Pankreas, 5) Blase, 6) Nebenniere, 7) Niere, 8) Prostata, 9) Mamma, 10) Uterus, 11) Ovar, 12) Herz, 13) Knochenmark, 14) Testis, 15) Dünndarm, 16) Gehirn, 17) Thymus, 18) Tonsille, 19) Lymphknoten, 20) Lunge, 21) Schilddrüse, 22) Leber, 23) Phagenbank RMS-40 (Positivkontrolle) und 24) ddH₂O (Negativkontrolle). Die unspezifischen Signale am unteren Bildrand über den Spuren 2 bis 23 können durch überlappende Sequenzen der in der RT-PCR bzw. in die radioaktiven Hybridisierung eingesetzten Oligonukleotide erklärt werden.

Gewebe	Labor-Nr.	6b	FLJ 20644	8	FLJ 13441	11c	22	TFIIS
Rhabdomyosarkom	26	+	+	-	-	-	-	+
Rhabdomyosarkom	40	+	+	+	+	+	+	+
Neuroblastom	1	+	+	-	+	+	-	-
Neuroblastom	18	+	+	+	+	-	-	-
Neuroblastom	62	-	-	-	+	-	-	-
Neuroblastom	173	+	+	-	-	-	-	-
Medulloblastom	2	+	+	+	-	-	-	-
Medulloblastom	17	+	+	+	+	-	-	+
Medulloblastom	20	+	+	+	-	+	-	+
Medulloblastom	50	-	+	+	-	+	-	+
Astrozytom	16	-	-	-	-	-	-	-
Astrozytom	21	+	+	-	-	-	-	-
Ependymom	64	-	-	-	-	-	-	-
Ewing-Tumor	127	+	+	+	+	+	-	+
Hodgkin Lymphom	11	+	+	-	-	-	-	-
Hodgkin Lymphom	13	-	+	-	-	-	-	-
Hodgkin Lymphom	44	+	+	-	-	-	-	-
Non-H.-Lymphom	7	-	+	+	-	-	-	-
Non-H.-Lymphom	56	+	+	-	-	-	-	-
Non-H.-Lymphom	70	+	+	-	-	-	-	-
Osteosarkom	8	+	+	-	-	-	-	+
Osteosarkom	23	-	-	-	-	-	+	+
Hepatoblastom	59	+	+	+	+	+	+	+
Hepatoblastom	12	-	-	-	-	-	+	+

Tab. 16. mRNA Expression SEREX-definierter RMS-Antigene und einiger Homologe in Tumorgewebe.

Die in der Expressionsanalyse eingesetzten PCR-Primer, die Größe der PCR Produkte und die Hybridisierungsprimer sind in **Tab. 1** (siehe 2.2.) beschrieben, und die Lokalisation der PCR-Primer schematisch in die **Abb. 10, 12, 15** und **26** eingezeichnet.

Gewebe	Labor-Nr.	10b	10b	10e	10e	10e
		5' se1 x an1	3' se2 x an2	5' se3 x an3	Mitte se4 x an4	3' se2 x an2
Rhabdomyosarkom	26	-	-	n.u.	n.u.	+
Rhabdomyosarkom	40	+	+		+	+
Neuroblastom	1	+	-		n.u.	-
Neuroblastom	18	+	+		+	-
Neuroblastom	62	+	-		n.u.	-
Neuroblastom	173	+	-		n.u.	+
Medulloblastom	2	+	-		n.u.	-
Medulloblastom	17	-	-		n.u.	-
Medulloblastom	20	-	-		n.u.	+
Medulloblastom	50	+	-		n.u.	-
Astrozytom	16	-	-		n.u.	+
Astrozytom	21	-	-		n.u.	+
Ependymom	64	-	-		n.u.	+
Ewing Tumor	127	+	-		n.u.	-
Hodgkin Lymphom	11	-	-		n.u.	-
Hodgkin Lymphom	13	+	+		n.u.	-
Hodgkin Lymphom	44	-	-		n.u.	+
Non-H.-Lymphom	7	-	+		n.u.	+
Non-H.-Lymphom	56	-	+		n.u.	+
Non-H.-Lymphom	70	-	+		n.u.	+
Osteosarkom	8	-	-		n.u.	-
Osteosarkom	23	-	-		n.u.	-
Hepatoblastom	59	-	+		n.u.	+
Hepatoblastom	12	-	-		n.u.	-

Tab. 17. mRNS Expression SEREX-definierter RMS-Antigene und einiger Homologe in Tumorgewebe.

Die in der Expressionsanalyse eingesetzten PCR-Primer, die Größe der PCR Produkte und die Hybridisierungsprimer sind in **Tab. 1** (siehe 2.2.) beschrieben, und die Lokalisation der PCR-Primer schematisch in die **Abb. 14b** eingezeichnet.

Die durch eine Insertion charakterisierte MU-RMS-40.11c-mRNS wurde sowohl in gesunden als auch in malignen Geweben exprimiert.

Die durch eine Insertion charakterisierte MU-RMS-40.11c-mRNS wurde wie die homologe TTC3 mRNS in einigen gesunden und malignen Geweben exprimiert. MU-RMS-40.11c-spezifische PCR-Produkte konnten in ZNS, allen lymphoretikulären Geweben und Testis sowie in 5/23 Tumorgeweben (1/4 NB, 2/4 MB, 1/1 ET, 1/2 HB) nachgewiesen werden.

Die durch eine 158bp Insertion charakterisierte MU-RMS-40.21-mRNS wurde in Normalgewebe ubiquitär exprimiert und in Tumoren nicht untersucht.

Die durch ein alternatives 3'Ende charakterisierte Spleißvariante MU-RMS-40.22-mRNS wurde wie ihr Homolog TFIS-mRNS in nur wenigen Geweben des gesunden Urogenitaltrakts und in einigen Tumorgeweben detektiert (MU-RMS-40.22-mRNS: 1/2 OS, 2/2 HB; TFIS mRNS ausserdem in 1/1 OS, 1/1 ET, 3/4 MB). Beide mRNS-Varianten zeigten demnach eine sowohl in normalen als auch in malignen Geweben sehr beschränkte Gewebeexpression mit etwas unterschiedlicher Regulation.

Die durch neue Deletionen charakterisierten MU-RMS-40.2a und -40.12a waren weder in Normalgeweben noch in Tumorgeweben zu detektieren.

Die durch eine mRNS-Deletion von 141bp charakterisierte RLBP1-Variante MU-RMS-40.2a wurde in keinem der untersuchten Normal- und Tumorgewebe detektiert. Auch in Gewebe des RMS40 waren diese Transkripte nicht nachweisbar, was auf eine sehr gering exprimierte, möglicherweise individuelle mRNS-Variante schliessen liess.

Dasselbe galt für die durch eine Deletion von 255bp charakterisierte Lamin-Variante MU-RMS-40.12a, die möglicherweise ebenfalls individuell und/oder sehr gering exprimiert war.

Unter den MU-RMS-40.10 Antigene waren gewebespezifische und tumorspezifische PMS1-Spleißvarianten

Die 5'Spleißvariante MU-RMS-40.10b-mRNS war in keinem Normalgewebe (**Abb. 28, Tab. 6, 7**), neben dem Ausgangstumor RMS40 aber in diversen neuroektodermalen (4/4 NB, 2/4 MB, 1/1 ET) Tumorgeweben sowie in 1/3 HL nachzuweisen. Bei dieser PMS1-Variante handelte es sich demnach um ein tumorspezifisches Antigen. Interessanterweise zeigten aufgereinigte RT-PCR-Produkte aus zwei weiteren Tumoren (1 MB, 1 OS) exakt dieselbe Sequenz wie die 40.10b cDNS, was eher für alternatives Spleißen als für eine Deletion oder Translokation als Entstehungsmechanismus sprach.

Alle anderen Spleißvarianten der PMS1 mRNS wurden sehr gering und mit deutlich gewebe-spezifischer Verteilung exprimiert. Für mRNS-Sequenzen, die im 5' Bereich des ORF wie MU-RMS-

40.10e gespleißt waren (Deletion von 118bp) fand sich eine nachweisbare Expression ausschließlich in Skelettmuskulatur. Aus der Phagenbank 40 konnte dieses Transkript nicht amplifiziert werden, was vermutlich auf eine sehr geringe Expression im Tumorgewebe hindeutete. Die Tatsache, dass die MU-RMS-40.10b mRNA bei Anwendung von 3' lokalisierten Primern in einigen Geweben zu finden war, sprach dafür, dass es verschiedene 5'-Varianten dieser mRNA-Form geben musste.

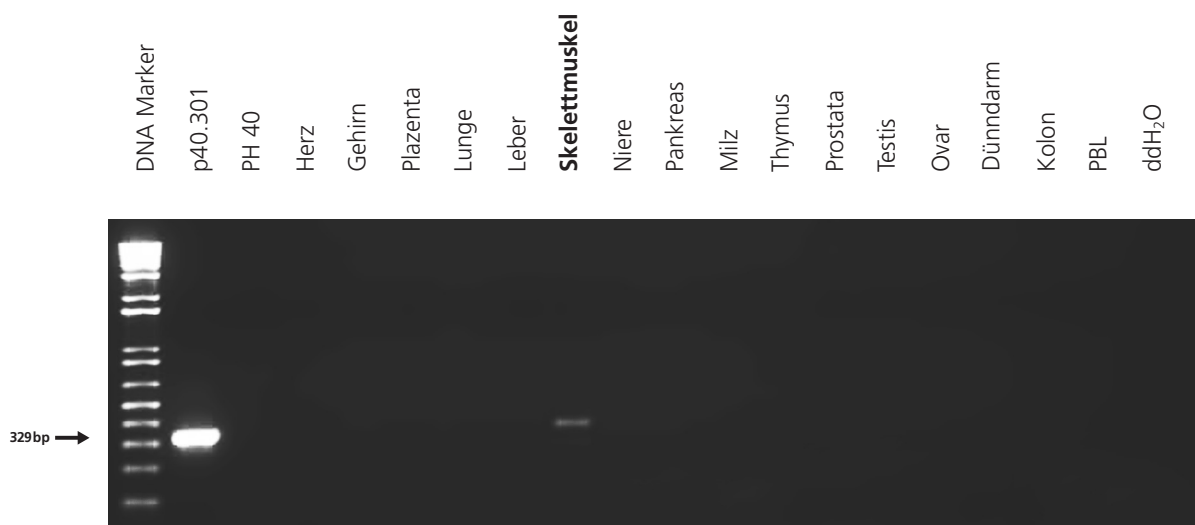


Abb. 29 – mRNA Expression des alternativen 5'UTR von MU-RMS-40.10e in Normalgewebe. Das PCR-Produkt von 329bp wurde ausschließlich in Skelettmuskel detektiert. Das MU-RMS-40.10e kodierende Plasmid p40.301 diente als Positivkontrolle, ddH₂O diente als Negativkontrolle. Aus der Phagenbank RMS-40 konnte das PCR-Produkt nicht amplifiziert werden, was vermutlich auf eine sehr geringe Expression dieses Transkriptes im Tumorgewebe hindeutete. Die in der Expressionsanalyse eingesetzten PCR-Primer pr40.10e.se3 und pr40.10e.an3 sind in **Tab. 1** (siehe 2.2.) beschrieben, und die Lokalisation der PCR-Primer schematisch in die **Abb. 14b** eingezeichnet.

5. Diskussion

Die SEREX-Analyse zeigte, dass eRMS über ein komplexes Set von Tumor- und Autoantigenen vom Immunsystem erkannt werden können

In der vorliegenden Arbeit wurden mithilfe von Seren vier verschiedener, pädiatrischer RMS-Patienten in einer rekombinanten cDNS-Expressionsbibliothek aus eRMS-Gewebe 45 verschiedene Antigene identifiziert, die 23 verschiedenen Genen bzw. Genfamilien zugeordnet werden konnten. 19 der isolierten Antigene waren homolog zu cDNS, die für Proteine mit bekannter Funktion kodierten, vier Antigene waren homolog zu cDNS von Proteinen mit unbekannter Funktion.

Die identifizierten cDNS zeigten gegenüber bekannten Homologen insgesamt 45 neue molekulare Alterationen. Diese neuen molekularen Charakteristika schlossen eine tumorspezifische Mutation, neue *snp*, neue Deletionen, neue Insertionen sowie erweiterte 3' und 5'UTR ein. Mindestens zwei Antigene waren von einem alternativen ORF in der 3' (AND1) bzw. 5'UTR (Titin) abgelesen worden.

Im Rahmen einer differentiellen Serumanalyse wurde die Ak-Antwort gegen die isolierten Antigene bei gesunden Probanden und bei Patienten mit einer malignen Erkrankung untersucht und auf diese Weise Tumorantigene von Autoantigenen unterschieden. Sieben der 23 in dieser Arbeit mithilfe von SEREX-definierten Antigen-cDNS-Familien kodierten Tumorantigene (MU-RMS-40.1, 5, 6, 9, 10, 14 und 17); ihre cDNS wurde vom *AND1*-, *MLH1*-, *FLJ20644*-, *SMYD1*-, *PMS1*-, *Titin*- und *RUFY-2*-Gen kodiert. Fünf Antigengruppen zeigten nur bei einem der untersuchten Kontrollen eine Immunantwort und repräsentieren damit mögliche Autoantigene (MU-RMS-40.4, 11, 15, 18 und 21). Elf Antigengruppen enthielten definitionsgemäß typische Autoantigene (MU-RMS-40.2, 3, 7, 8, 12, 13, 16, 19, 20, 22 und 23).

Mithilfe von RT-PCR-Analysen wurde das mRNA-Expressionsmuster der Antigene in einer repräsentativen Sammlung von Normalgeweben und verschiedenen pädiatrischen Tumorgeweben analysiert. Auf diese Weise konnten ubiquitär exprimierte von gewebespezifischen und tumorspezifischen Antigenen unterschieden werden.

So konnte mit der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal gezeigt werden, dass in RMS-Gewebe von Kindern eine Vielzahl unterschiedlicher Proteine exprimiert wird, die vom Immunsystem erkannt werden. Sowohl im Hinblick auf die Entwicklung neuer immuntherapeutischer Verfahren zur Behandlung des RMS als auch auf eine Erweiterung der diagnostischen und prognostischen Werkzeuge spielt dies eine bedeutende Rolle.

5.1. Die Tumorantigenengruppe MU-RMS-40.10

Der neue 5'-Abschnitt der PMS1-cDNS-Variante 40.10b war wahrscheinlich das Ergebnis tumorspezifischen trans-Spleißens

Für sichere Tumorstämme und/oder als Marker für eine minimale Resterkrankung (*minimal residual disease*, MRD) geeignet sind in erster Linie diejenigen Tumorantigene, die sich durch ein tumorspezifisches, molekulares Charakteristikum bzw. durch tumorspezifische Expression auszeichnen, wie für das putative PMS1-Homolog MU-RMS-40.10b gezeigt.

Das charakteristische 5'Ende der 40.10b-cDNS wurde in neun der 24 untersuchten Tumorgewebe, jedoch in keinem der untersuchten Normalgewebe detektiert. Damit war dieses Transkript nicht entitätsspezifisch wie beispielsweise das *PAX3/FKHR*-Fusionsprodukt (t(2;13)) in aRMS (Parham et al. 2001), sondern kodierte ein gemeinsames (*shared*) Tumorantigen vieler Entitäten.

Die neuen 5'Sequenzen der cDNS 40.10b waren unter anderem 100% homolog zu cDNS-Sequenzen des Translationelongationsfaktors *EEF1 α* , so dass es sich bei dieser PMS1-Variante theoretisch um ein neues Fusionstranskript handeln könnte. Das *EEF1 α* -Gen war auf Chromosom 6q14 (Lund et al. 1996), das *PMS1*-Gen auf Chromosom 2q31–33 lokalisiert worden (Nicolaidis et al. 1994). Während die Translokation des *PAX3*- und *FKHR*-Gens (t(2;13)) typischerweise in aRMS gefunden wird (Parham et al. 2001), haben Translokationsrecherchen in eRMS bislang nur innerhalb einer Region des Chromosom 1 (1p11–q11) eine häufige Translokationsbruchstelle aufgedeckt, und einheitliche Partnerchromosomen waren nicht nachzuweisen (Gordon et al. 2001).

Gegen eine Translokation, bei der der Bruchpunkt in der Regel von Tumor zu Tumor um einige Basen variiert, sprach die Tatsache, dass die exakte 40.10b-Sequenz auch in zwei weiteren positiven Tumoren (1MB, 1OS) zu finden war. Dieser Befund sprach eher für eine alternative mRNS-Prozessierung durch Spleißen. Beispiele für tumorspezifische Spleißvarianten sind in der Literatur vorbeschrieben (Krackhardt et al. 2002, Sahin et al. 2002, Schmid et al. 2003, Schmittgen et al. 2003, Meng et al. 2004, Wang et al. 2004). Im Falle der cDNS 40.10b müssen allerdings ungewöhnliche Spleißmechanismen diskutiert werden: Während die neuen 5'Sequenzen der muskelspezifischen Spleißvariante 40.10e topographisch eindeutig der *PMS1*-Gen-Region auf Chromosom 2q32 zugeordnet werden konnten, war das 5'Ende der cDNS 40.10b homolog zu weit entfernt in Nähe des Zentromers auf Chromosom 2q12 bzw. gar auf anderen Chromosomen gelegenen Sequenzen.

In den letzten zehn Jahren mehrten sich zunächst in Nematoden, dann auch in Säugerzellen Evidenzen dafür, dass mRNS nicht nur durch Entfernung von Introns, dem sogenannten *cis*-Spleißen, sondern auch durch intergenes *trans*-Spleißen prozessiert werden können (Übersicht bei Hastings 2005). Durch *trans*-Spleißen können Abschnitte verschiedener, auch Kopf an Kopf auf einem Chromosom orientierter Gene nach Transkription chimäre mRNS bilden. Ein

Beispiel für gewebspezifische aminoternale Varianten, die durch *trans*-Spleißen zustande gekommen sind, bieten humane GTPase aktivierende RGS-Proteine (*Regulators of G-Protein Signaling*) (Chatterjee und Fisher 2000). Auch verschiedene Cytochrome der humanen Leber (Finta und Zaphiropoulos 2002) entstehen durch intergenes *trans*-Spleißen. Ob *trans*-Spleißprozesse auch zwischen Genen auf verschiedenen Chromosomen stattfinden können, ist noch nicht untersucht worden und damit nicht auszuschließen. MU-NB-40.10b ist damit das erste Tumorantigen, für das eine Generation durch *trans*-Spleißen postuliert werden kann.

Aufgrund des tumorspezifischen Vorkommens der neuen 5'-Sequenzen, sind diese nicht nur immuntherapeutisch hochinteressant, sondern darüber hinaus für die MRD-Dignostik und möglicherweise tumorbiologisch relevant.

Die neue PMS1-cis-Spleißvariante 40.10e war muskelspezifisch

Prinzipiell sind auch stark geweberestringierte Tumorantigene potentielle Kandidaten für die Tumorimmuntherapie, solange die unbeeinträchtigte Funktion der betroffenen Gewebe nicht – wie etwa bei dem von Herz, Lunge, Leber, Niere und Gehirn – lebensnotwendig ist. Die charakteristischen neuen 5'-Sequenzen der cDNS 40.10e wurden in Skelettmuskel, sonst aber in keinem der untersuchten Normalgewebe einschließlich des Herzmuskels detektiert. Damit wären bei 40.10e-basierter Vakzinierung lediglich Myositis-ähnliche Nebenwirkungen zu befürchten. Falls durch quantitative mRNS-Analysen belegt werden könnte, dass diese PMS1-Variante in RMS gegenüber normalem Muskel deutlich überexprimiert wird, wären diese Nebenwirkungen evtl. tolerabel oder gar nicht signifikant. Zukünftig sollten möglichst viele pädiatrische Tumoren auf das Vorkommen der 40.10b- und 10e-Spleißvariante getestet werden, um die klinische Bedeutung beider Antigene nicht nur als Vakzinkandidaten, sondern auch als MRD-Marker genauer einschätzen zu können.

Dass eine geringe Expression der anderen alternativ gespleißten Regionen beider cDNS auch in anderen Normalgeweben nachweisbar war, stellt die Gewebespezifität der 5'-Enden nicht in Frage, sondern spricht eher dafür, dass es weitere, ähnliche Spleiß-Varianten mit breiterem Gewebevorkommen gibt. Ähnliche Beobachtungen waren bei der RT-PCR-Analyse der stark geweberestringierten 5'-Varianten der neuronalen Hu-Antigen-mRNS gemacht worden (Behrends et al. 2002).

Der Mechanismus der PMS1-Immunogenität muss durch Kartierung der verantwortlichen T-Zell-Epitope geklärt werden

Die in dieser Arbeit gemessene tumorspezifische Immunogenität der Antigenfamilie MU-RMS-40.10 ist gut mit der Generation eines tumorspezifischen Epitops in der 40.10b-Variante zu erklären. Darüber hinaus sind aber alternative immunogene Mechanismen zu diskutieren, die sich zum einen aus den eigenen Befunden und zum anderen aus der Literatur zur PMS1-Immunerkenung ergeben.

Von insgesamt 49 der in dieser Arbeit identifizierten cDNS-Inserts waren vier verschiedene homolog zur PMS1-cDNS, was insgesamt für eine relativ hohe, tumorassoziierte Expression des in Normalgeweben eher schwach exprimierten *PMS1*-Gens sprach. Eine solche relative Überexpression von *PMS1*-Genprodukten in Tumorgeweben könnte allein durch Überschreiten der immunologischen Toleranzschwelle zur Initiation einer Immunantwort geführt haben.

Passend zur Hypothese der Immunogenität durch Überexpression identifizierten Casciola-Rosen et al. (2001) PMS1 als ein Myositis-spezifisches Autoantigen. Sie fanden Ak gegen PMS1 bei einigen Patienten mit autoimmuner Myositis (4/53), jedoch bei keinem der 94 Patienten mit systemischem Lupus erythematoses oder Sklerodermie und bei keiner der gesunden Kontrollpersonen (Casciola-Rosen et al. 2001). Vorstellbar ist, dass nicht nur eine Entzündungs- oder Tumor-assoziierte Überexpression, sondern auch eine vermehrte Präsentation aus entzündungs- oder tumorbedingt untergegangenen Zellen zur Sprengung der Toleranzbarriere beitragen. Möglicherweise ist die 40.10e-Variante von besonders hoher Immunogenität.

Um den tatsächlich verantwortlichen immunogenen Mechanismus zu identifizieren, müssen die verantwortlichen T-Zell-Epitope der *PMS*-Genprodukte kartiert werden. Wenn sich tumorspezifische bzw. muskelspezifische Epitope in den Antigenen MU-RMS-40.10b und 10e belegen ließen, könnten diese für die Immuntherapie bedeutsam sein. Um die mögliche Bedeutung der geweberestringierten *PMS*-1-Varianten für eine Ak-Therapie zu eruieren, wäre es zudem sinnvoll, ihre intrazelluläre Lokalisation zu bestimmen; nur membranständige Antigene sind Ak-basierten Impfstoffen zugänglich.

Die Tatsache, dass Ak gegen die MU-RMS-40.10-Antigenfamilie bzw. PMS1 nur im Serum eines Tumorpatienten und weniger Myositispatienten detektiert wurden, könnte bedeuten, dass i) die *PMS*-Genprodukte insgesamt nur schwach immunogen sind, und die Testsensitivität deshalb in vielen Fällen ungenügend ist, oder ii) dass sie nur im Kontext mit einem selteneren HLA-Typ immunogen sind. Neben der Kartierung der verantwortlichen T-Zellepitope in Ak-positiven Patienten wäre deshalb eine Bestimmung der HLA-Restriktion der reaktiven T-Zellen aufschlussreich.

Diagnostische, prognostische und tumorbiologische Relevanz von PMS1-Genprodukten

Die mögliche Bedeutung der 40.10b- und 10e-Varianten als MRD-Marker wurde bereits angesprochen. Insbesondere für Neuroblastome, die hier über alle untersuchten Krankheitsstadien hinweg eine konstante Expression der 5'Sequenzen von 40.10b zeigten, könnte die 40.10b-Variante ein hilfreiches neues Werkzeug zum spezifischen und sensitiven Nachweis von einzelnen Tumorzellen in Knochenmark- oder Lymphknoten darstellen. Um die Sensitivität und klinische Relevanz dieser möglichen neuen MRD-Marker näher zu untersuchen, sind einerseits Verdünnungs-Analysen mithilfe von negativen und positiven Zellen und andererseits Expressionsanalysen von möglichst vielen pädiatrischen Tumoren vorzuschlagen.

Für einige Tumoren könnte die mRNA-Expression von MU-RMS-40.10b darüber hinaus prognostische Bedeutung haben. So fiel in den vier untersuchten Medulloblastomen eine nicht konstante Expression dieses Transkripts auf, die möglicherweise mit dem uneinheitlichen Krankheitsverlauf korrelierte. Die beiden Patienten mit MU-RMS-40.10b-positivem Tumor hatten die Erkrankung überlebt, während die beiden Patienten mit MU-RMS-40.10b-negativem Tumor verstorben waren. Es sollten deshalb weitere Medulloblastome auf das Vorkommen dieses Transkripts getestet, und die Ergebnisse mit dem klinischen Verlauf der Erkrankungen korreliert werden. Über die mögliche prognostische Bedeutung in RMS kann erst anhand von Untersuchungsergebnissen an weiteren Proben von Tumoren dieser Entität geurteilt werden.

Die Ak-Antwort gegen MU-RMS-40.10b ist aufgrund ihrer niedrigen Frequenz bei den untersuchten pädiatrischen Patienten im Gegensatz zur Ak-Antwort gegen andere Tumor- (Graus et al. 1997, Kairemo et al. 2002) und Autoantigene (Conroy et al. 1998, Ciocca et Calderwood 2005) wahrscheinlich nicht als diagnostischer und/oder prognostischer Parameter geeignet. Um diese Möglichkeit weiter abzuklären, sollten weitere Serumproben von Tumorpatienten, v. a. solchen mit RMS, Medullo- und Neuroblastom, untersucht werden.

Mit Hinblick auf die mögliche biologische Bedeutung der neuen tumorspezifischen PMS1-Variante erscheint die Hypothese interessant, dass mit molekularen Veränderungen entscheidende DNS-Reparaturfunktionen verloren gehen könnten und so evtl. Voraussetzungen für die Tumorentstehung geschaffen werden. *PMS1* gehört zu einer Gruppe von DNS-Reparaturgenen mit einer großen Homologie zum *mutL*-Homolog der Hefe (*γPMS1*). Da Mutationen in zwei weiteren humanen DNS-Reparaturgenen, dem *MLH1*- bzw. *MSH1*-Gen, mit der Entstehung des HNPCC assoziiert werden konnten (Leach et al. 1993, Bronner et al. 1994), wurde auch für *PMS1*-Alterationen eine mögliche Bedeutung in der Tumorgenese postuliert (Nicolaidis et al. 1994). So hatte etwa eine Keimbahnmutation am Ende des Exon 6 durch Generation eines Stopcodon zu dem Phänomen des *Exon skipping* geführt (Nicolaidis et al. 1994). Für *PMS1*-Mutationen im Zusammenhang mit familiär gehäuften Tumoren konnte allerdings bislang keine Segregation und nur selten eine Keimbahnmutation belegt werden (Nicolaidis et al. 1994, Liu et al. 1996). Auch wiesen Experimente mit *PMS1*-defizienten Mäusen auf eine deutlich geringere Rolle von *PMS1*- gegenüber *MLH*-Genmutationen in der familiären Tumorprädisposition (Prolla et al. 1996, Prolla et al. 1998, Olschwang 1999). Ob und inwieweit die diversen nicht-tumorspezifischen *PMS1*-Spleißvarianten möglicherweise in Tumoren hoch- oder herunterreguliert werden und so den funktionellen Input des *PMS1*-Gens modifizieren ist noch nicht systematisch untersucht, aber eine aus tumorbiologischer und eventuell prognostischer Sicht interessante Frage.

Neu identifizierte nicht-konservative Nukleotidaustausche in *PMS1*-Transkripten müssen immer darauf geprüft werden, ob es sich um tumorspezifische Mutationen, Keimbahnmutationen mit oder ohne Segregation oder genetische Polymorphismen in der gesunden Bevölkerung handelt. So war z. B. in der cDNS 40.10b neben den neuen Spleißresultaten ein bekannter *snp* detektiert worden. Genetische Polymorphismen sind nicht nur für *PMS1*, sondern auch für das eng verwandte *PMS2*-Gen bekannt (Nicolaidis et al. 1994).

5.2. Die Tumorantigene MU-RMS-40.1 und -40.14

MU-RMS-40.1 und 40.14 wurden von alternativen 3' bzw. 5'ORF abgelesen

Die tumorspezifische alternative Translation ist, wie in der Einleitung ausgeführt, ein wichtiger, möglicher Mechanismus bei der Generation von tumorspezifischen Antigenen und damit von möglichen Ansatzpunkten für tumorspezifische Vakzine (Wang et Rosenberg 1996, Probst-Keppler et al. 2001).

Die cDNS 40.1 war homolog zu AND-1-cDNS-Sequenzen, die stromabwärts des bekannten AND-1-ORF in dem als 3'UTR vorbeschriebenen Bereich lokalisiert waren. Das MU-RMS-40.14-cDNS-insert enthielt Sequenzen, die stromaufwärts des bekannten ORF von der bislang als 5'UTR betrachteten Region stammten. Zur Identifikation der immunogenen, alternativen *AND1*- und *Titin*-Genprodukte müssen nun die relevanten ORFs der klonierten cDNS rekombinant exprimiert und serologisch untersucht werden.

Aus pädiatrischen Tumoren waren kürzlich mit SEREX zwei andere Tumorantigene kloniert worden, die von der 3'UTR bekannter Transkripte abgelesen worden waren (Behrends et al. 2002 und 2003). Diese Antigene wurden von der Neurofilament-mRNS α -internexin eines Neuroblastoms und der Onkogen-mRNS rab18 eines Medulloblastoms kodiert. Das alternative Genprodukt der α -Internexin-mRNS 018INX konnte bereits durch serologische Analyse des rekombinanten Proteins als ein 81 AS-langes Antigen identifiziert werden und erfolgreich zur Generation spezifischer T-Zelllinien aus Patientenlymphozyten eingesetzt werden (Behrends et al., Manuskript in Vorbereitung).

Das Muster der Gewebeexpression dieser alternativen Genprodukte ist ein wichtiges Kriterium bei der Beurteilung ihrer Eignung für Tumorvakzine; nur eine tumorspezifische oder auf weniger kritische Gewebe beschränkte Expression würde sie zu Kandidaten für Tumorimpfstoffe qualifizieren. Die entsprechenden Experimente sind allerdings nicht trivial, da mRNS-Analysen nicht weiter helfen. Es müssen mithilfe rekombinanter Proteine zunächst spezifische monoklonale Antikörper generiert, und diese auf ihre Eignung für immunhistologische Analysen getestet werden. Diese Experimente erscheinen für die Antigene MU-RMS-40.1 und -40.14 durchaus lohnenswert, da beide Antigene bei jeweils zwei der zehn RMS-Patienten eine nachweisbare Immunantwort ausgelöst hatten, und es sich damit wahrscheinlich bei beiden Antigenen um ein für mehrere Patienten relevantes Tumorantigen handelte. Bei Nachweis einer Tumorspezifität dieser Antigene, sollten die nächsten experimentellen Schritte in einer Analyse der antigenspezifischen T-Zell-Proliferation mit Charakterisierung des verantwortlichen Epitops und der HLA-Restriktion liegen.

Antikörper gegen MU-RMS-40.1 und -40.14 könnten neben Titin-Antikörpern ebenfalls von klinischer Bedeutung sein

Da das Vorkommen von Ak gegen MU-RMS-40.1 und -40.14 innerhalb der untersuchten RMS-Patienten heterogen war, erscheint es interessant, zu untersuchen ob das Ak-Vorkommen mit der Aggressivität des Tumors bzw. der Prognose der Erkrankung korreliert. Zu diesem Zweck sollen in der Arbeitsgruppe prospektiv alle weiteren RMS-Patienten auf das Vorkommen dieser Ak getestet und die Ergebnisse mit dem klinischen Verlauf korreliert werden.

In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass auch das klassische *Titin*-Genprodukt zur Induktion einer Ak-Bildung führen kann. Allerdings wurde eine humorale Immunreaktion bislang nur für Patienten mit der Autoimmunerkrankung Myasthenia gravis (Skeie 2000) beschrieben. Ak gegen das klassische *Titin*-Genprodukt wurden im Rahmen der Myasthenia gravis, wie im Ergebnisteil ausführlich besprochen, als diagnostische und prognostische Marker vorgeschlagen (Aarli et al. 1987, Voltz et al. 1997, Romi et al. 2000, Skeie et al. 1995 und 2000, Romi et al. 2000 und 2003^(1,2)). Ob auch bei RMS-Patienten Ak gegen das klassische Genprodukt vorkommen, und ob sie möglicherweise im Rahmen maligner Muskelerkrankungen diagnostische oder prognostische Bedeutung haben, wurde bislang nicht untersucht.

Titin-Transkripte und das klassische Titin-Protein werden bereits diagnostisch genutzt

Mithilfe von monoklonalen Ak wurde in immunhistochemischen Untersuchungen an verschiedenen Tumorentitäten gezeigt, dass das klassische Titin in RMS, aber weder in Leiomyosarkomen und Leiomyomen noch in Tumoren, die nicht muskulärer Differenzierung waren, exprimiert wird (Osborn et al. 1986). In einer Studie an 21 Patienten mit einem Spindelzell-RMS, einem histologischen Subtyp des embryonalen RMS, konnte mithilfe immunzytochemischer Analysen eine starke mRNA-Expression von Titin im Tumorgewebe nachgewiesen werden (Cavazzana et al. 1992). Immunhistochemische Untersuchungen mithilfe monoklonaler Ak gegen das muskelspezifische Antigen Titin könnten demzufolge durchaus hilfreich in der Diagnostik und histopathologischen Klassifizierung eines RMS sein und werden dafür heute bereits eingesetzt (CWS-2002P). Möglicherweise ist das in dieser Arbeit identifizierte alternative Genprodukt von Titin ein weiterer immunhistochemischer Marker für die eRMS-Diagnostik.

Die Funktion der alternativen AND-1 und Titin-Genprodukte MU-RMS-40.1 und -40.14 ist unbekannt

Der bekannte offene Leserahmen von AND-1 kodiert ein 1.127 AS langes, DNS-bindendes Protein, das vorwiegend im Nukleoplasma verschiedener Zellen vorkommt. Es weist Merkmale zweier verschiedener Regulatorprotein-Familien auf, zum Einen sieben konsekutive „WD-repeats“ in der aminoterminalen Region und carboxyterminal eine DNS-bindende „HMG-Box“, die bei der

Regulation von Chromatinverdichtung, Transkription und Replikation beteiligt ist (Köhler et al. 1997). Interessant wären Experimente, mit denen diese zellulären Prozesse in Transfektanten mit hoher Expression des alternativen Genprodukts untersucht werden können.

Das klassische *Titin*-Genprodukt ist ein Protein der quergestreiften Muskulatur und mit einer Länge von 34.350 AS das größte bekannte Polypeptid (Labeit et Kolmerer 1995). Die cDNS des SEREX-definierten *Titin*-Genprodukts kodierte ein 798 AS langes, alternatives Genprodukt von Titin. Interessant wäre es, zu untersuchen, ob die beiden *Titin*-Genprodukte gemeinsam in Rhabdomyosarkomzellen vorkommen, ob sie interagieren, und ob das alternative Genprodukt für die Tumorphagenese relevant ist.

5.3. Die Tumorantigengruppen MU-RMS-40.6, -40.9, -40.5 und 40.17

MU-RMS-40.6c trägt eine tumorspezifische Mutation

Im putativen FLJ20644-Homolog MU-RMS-40.6c fand sich eine tumorassoziierte Mutation, die das Antigen zu einem tumorspezifischen Antigen qualifizierte, und die möglicherweise für die Immunerkennung der Antigengruppe verantwortlich war. Überraschenderweise konnten in der heterologen Serumanalyse bei zwei Patienten mit RMS spezifische Ak nachgewiesen werden, so dass im Gegensatz zu vielen mutierten Antigenen (Sahin et al. 1999) nicht allein ein individuelles Neopepitop angenommen werden konnte. Ob das *FLJ20644*-Gen auch im RMS des zweiten Patienten mutiert war, konnte leider mangels Tumormaterial nicht untersucht werden. Die serologischen Ergebnisse ermutigen jedoch zur Ak- und Mutationsuche bei weiteren RMS-Patienten und damit zur weiteren Evaluation dieser Antigengruppe für therapeutische Zwecke.

Mit der vorliegenden Arbeit wurde erstmals belegt, dass von der FLJ20644-cDNS tatsächlich ein Protein kodiert wird, und dass *FLJ20644*-Genprodukte im Kontext von Tumoren molekular alteriert und immunogen sein können. Darüber hinaus wurde das Expressionsmuster der beiden bekannten FLJ20644-Spleißvarianten in dieser Arbeit erstmals an einem repräsentativen Normalgewebepanel und in diversen pädiatrischen Tumoren untersucht; es hatte sich eine gewebe-restringierte Expression in Normalgewebe und ein breites Vorkommen in den verschiedenen Tumorentitäten ergeben; bei einer immuntherapeutischen Relevanz der Antigene sollten quantitative mRNS-Analysen in Normal- und Tumorgewebe folgen und somit die Sicherheit eventueller antigenspezifischer Impfstoffe besser abgeschätzt werden. Über die Funktion der auf Chromosom 14q11 kodierten *FLJ20644*-Genprodukte ist bislang noch nichts bekannt.

Muskelrestringierte *SMYD1*-Genprodukte sind immunogen und für verschiedene pädiatrische Tumorentitäten klinisch relevant

Die putativen Antigene der Familie MU-RMS-40.9 waren homolog zu den muskelrestringierten murinen Bop-Spleißvarianten 1 und 2 (Hwang et Gottlieb 1995 und 1997, Gottlieb et al. 2002)

und dem humanen Homolog SMYD1; sie lieferten die ersten Evidenzen für eine Immunogenität dieser geweberestringierten Transkriptionsfaktor-Familie.

Aufgrund der Muskelrestriktion der Bop1- und Bop2-Homologe ist wie bei MU-RMS-40.10e durchaus eine therapeutische Bedeutung dieser Antigengruppe zu diskutieren. Falls sich eine tumorassoziierte Überexpression belegen ließe, wäre eine gute Verträglichkeit MU-RMS-40.9-basierter Vakzine durchaus vorstellbar. Entsprechende Impfstoffe wären wahrscheinlich nicht nur für RMS-, sondern auch für Osteosarkom- und Medulloblastom-Erkrankungen interessant, wie aus der differentiellen Serumanalyse abzulesen war. Eine Expressionsanalyse der SMYD1-Varianten in verschiedenen pädiatrischen Tumorentitäten erscheint angesichts der serologischen Daten lohnenswert.

Interessant erscheint in diesem Zusammenhang auch die Frage, ob alle SMYD1-Varianten in adultem Herz- und Skelettmuskelgewebe vorkommen, oder ob es frühe Formen gibt, die zwar in Tumoren hoch, aber in adultem Muskelgewebe nicht mehr signifikant exprimiert werden. Dazu geben die In-Situ-Hybridisierungs-Untersuchungen zur Expression des murinen *Bop*-Gens von Gottlieb et al. (2002) keine Auskunft; die Geweberestriktion der SYMD1-Transkripte in fetalem und adultem Normalgewebe wurde bislang nicht untersucht.

Inwieweit und ob bestimmte Spleißvarianten oder andere molekulare Derivate der SMYD1-Familie an der RMS-Pathogenese beteiligt sind, ist eine tumorbiologisch und evtl. prognostisch interessante Frage. Bekannt ist nur, dass artifizielle Deletionen im *Bop*-Gen der Maus Reifungsstörungen in ventrikulären Herzmuskelzellen auslösen und so zu Formveränderungen des rechten Ventrikels führen können (Gottlieb et al. 2002).

Ob Ak gegen MU-RMS-40.9-Antigene für die Diagnose, Prognose und/oder Verlaufskontrolle pädiatrischer Tumorerkrankungen hilfreich sein können, kann anhand der eigenen Analysen noch nicht beurteilt werden. Entsprechende serologische Zusatzuntersuchungen an einer möglichst großen Zahl von Patienten erscheinen lohnenswert.

Die zu MLH1-homologe MU-RMS-40.5-cDNS war aminoterminal inkomplett

Das menschliche Protein MLH1 gehört zu einer Familie von DNS-Reparaturproteinen, die DNS-Replikationsfehler korrigieren (Modrich 1997, Marti et al. 2002). Alterationen im humanen *MLH1*-Gen konnten bei einigen Neoplasien identifiziert und als Mitursache für die Tumorentstehung verantwortlich gemacht werden. Zu den untersuchten Tumoren mit Mutationen im *MLH1*-Gen gehören u.a. das hereditäre HNPCC (Liu et al. 1996, Peltomaki et Vasen 1997), das mit dem HNPCC-Syndrom assoziierte Endometriumkarzinom (Umar et al. 1994), das Prostatakarzinom (Chen et al. 2003) und das Nierenzellkarzinom (Leach et al. 2002). Nicht nur deshalb erscheint es sinnvoll, nach Mutationen des *MLH1*-Gens in RMS zu suchen.

MU-RMS-40.5 und das aus Ovarialkarzinom klonierte SEREX-Antigen sind bislang die einzigen Indizien für eine Immunogenität von *MLH1*-Genprodukten. Mögliche molekulare Alterationen in nicht klonierten *MLH1*-Abschnitten könnten die tumorassoziierte Immunogenität erklären. Dafür, dass es sich nicht um individuelle molekulare Alterationen handelte, sprach die Tatsache, dass bei zwei RMS-Patienten eine Ak-Bildung detektiert werden konnte. Eine RMS-assoziierte Überexpression von *MLH*-Genprodukten kam als immunogener Mechanismus weniger in Frage, da nur ein einziger Klon mit *MLH*-Sequenzen aus der RMS-cDNS-Bibliothek isoliert wurde; quantitative mRNA-Analysen wurden allerdings nicht durchgeführt. Von Bedeutung für die streng tumorassoziierte Immunantwort könnten bei ubiquitärer mRNA-Expression letztlich auch tumorspezifische posttranslationale Modifikationen oder Veränderungen bei der Prozessierung bzw. Präsentation des Antigens sein (Skipper et al. 1996, Türeci et al. 1999).

Die zu RUFY2 homologe MU-RMS-40.17-cDNS war carboxyterminal inkomplett

Die cDNS von MU-RMS-40.17 war bis auf einen inkompletten 3'ORF mit der RUFY2-cDNS identisch. RUFY1 und RUFY2 gehören zu einer relativ neuen Proteinfamilie, die eine aminoterminaler RUN-Domäne und eine carboxyterminale FYVE-Domäne enthält (Yang et al. 2002). Da RUFY2 als ein Effektor der Tyrosinkinase Etk in die zelluläre Proliferation, Differenzierung, Motilität und Apoptose eingreift (Qiu et al. 1998, Xue et al. 1999, Tsai et al. 2000, Chen et al. 2001), erscheint es nicht nur aus immunologischer, sondern auch aus tumorbiologischer Sicht interessant, die RMS-cDNS-Bibliothek noch einmal gezielt nach molekularen RUFY2-Varianten abzusuchen.

Wie bei den Antigenen der Familien MU-RMS-40.5 und -40.6 sprach auch hier die differentielle Serumanalyse gegen einen individuellen, immunogenen Mechanismus. Solange allerdings kein tumorspezifisches Neoepitop definiert ist, kann das Tumorantigen MU-RMS-40.17 trotz restriktiver Gewebeexpression des Homologs RUFY2 (Gehirn, Lunge, Testis) nicht als tumorimmunologisches Target vorgeschlagen werden. Das Hodengewebe wäre zwar vor dem immunologischen Angriff geschützt (*immunoprivileged site*), Gehirn und Lunge wären aber kritische Orte für toxische Nebenwirkungen eines T-Zell-basierten RUFY2-spezifischen Impfstoffes. Die Bluthirnschranke stellt für peripher aktivierte T-Zellen keine Barriere dar (Hickey 1991).

Interessant ist die Beobachtung, dass weder RUFY1 noch RUFY2 in normalem Muskelgewebe exprimiert werden (Yang et al. 2002), so dass man sich fragen muss, ob die aberrante Expression in dem embryonalen Muskel tumorbiologische Bedeutung hat. Möglicherweise ist allein die aberrante Expression im Tumor für die Immunogenität dieses Antigens verantwortlich. Inwieweit sich die RUFY2-Expression eventuell in verschiedenen RMS unterscheidet, wurde hier nicht untersucht. Eine Analyse von mehreren RMS mit der Frage nach einer möglichen tumorbiologischen bzw. prognostischen Bedeutung dieses Transkriptes erscheint lohnenswert.

5.4. Die Antigenfamilien MU-RMS-40.4, -40.11, -40.15, -40.18 und -40.21

Antigenspezifische IgG-Ak, die nur bei einer Kontrollperson nachweisbar waren, könnten auf eine latente Tumorerkrankung hinweisen

Neben den definitionsgemäß eindeutigen Tumorantigenen wurden in der differentiellen Serumanalyse einige Antigene identifiziert, die nur bei einer von 30 Kontrollpersonen eine nachweisbare Ak-Antwort aufwiesen. In dieser Antigengruppe fanden sich die Familien MU-RMS-40.4, -11, -15, -18 und -21. Aufgrund der geringen Frequenz der Ak-Bildung bei klinisch gesunden, jungen Probanden, ließ sich zunächst nicht ausschließen, dass es sich bei diesen Antigenen doch um Tumorantigene handelte.

Ein klassisches Literaturbeispiel für Tumorantigen-spezifische Ak, die bei scheinbar tumorfreien Personen auf eine maligne Erkrankung hinweisen sind die anti Hu-Ak. Sie sind gegen aberrant in diversen neuroektodermalen Tumoren exprimierte neuronale Antigene gerichtet und werden in der Routinediagnostik von unklaren, neurologischen Symptomen zum Ausschluss bzw. zur Diagnose eines paraneoplastischen Geschehens eingesetzt (Rauer et Kaiser 2001, Rauer et Andreou 2002⁽¹⁾, Rauer et al. 2002⁽²⁾, AWMF-030/064). Anti-Hu-Ak fanden sich auch bei diversen pädiatrischen Tumorpatienten (Behrends et al. 2002).

Gegen das SEREX-definierte, putative MU-RMS-40.4-Homolog MO-OVA-45 hatten zwei Kontrollpersonen IgG-Ak

Die putativen FLJ20364-Homologe der Gruppe MU-RMS-40.4 waren zum Teil durch einen inkomplett klonierten Aminoterminus charakterisiert, so dass nicht endgültig beurteilt werden kann, ob diese Antigengruppe tumorspezifische Epitope aufwies.

Darauf, dass die MU-RMS-40.4-Antigenfamilie im Tumor relativ stark exprimiert wurde, ließ die Tatsache schließen, dass insgesamt drei verschiedene Klone dieser Familie detektiert worden waren; diese Befunde geben Anlass zur Diskussion einer Immunogenität durch tumorassoziierte Überexpression.

Dafür dass es sich bei MU-RMS-40.4 wahrscheinlich doch um ein Autoantigen handelte sprach neben der breiten Gewebeexpression des cDNS-Homologs FLJ20374 das Ergebnis der differentiellen Serumanalyse gegen das mit SEREX klonierte cDNS-Homolog MO-OVA-45, gegen das eine Ak-Antwort bei zwei von 24 gesunden Probanden detektiert werden konnte.

Die SEREX-Antigene MO-OVA-45 und MU-RMS-40.4 lieferten die ersten Evidenzen dafür, dass von der FLJ20364-cDNS tatsächlich ein Protein kodiert wird, und dass *FLJ20644*-Genprodukte immunogen sind. Über die Funktion der auf Chromosom 5 kodierten *FLJ20364*-Genprodukte ist bislang noch nichts bekannt.

Gegen das SEREX-definierte, putative MU-RMS-40.11-Homolog NGO-St-128 zeigten ebenfalls zwei Kontrollpersonen IgG-Ak

Unter den putativen TTC3-Homologen der MU-RMS-40.11-Familie fand sich neben inkomplett klonierten Genprodukten eine neue carboxyterminale Spleißvariante, deren cDNS, wie in dieser Arbeit gezeigt, auch in Normalgewebe exprimiert wurde. Da gegen das Genprodukt der homologen NGO-St-128-cDNS aus Magenkarzinomgewebe zwei von 50 gesunden Kontrollen Ak entwickelt hatten, handelte es sich wohl auch bei dieser Antigenfamilie eher um Autoantigene.

Die SEREX-Antigene NGO-St-128 und MU-RMS-40.4 boten erste Evidenzen dafür, dass *TTC3*-Genprodukte vom Immunsystem erkannt werden können. Die höhere Ak-Frequenz bei Tumorpatienten könnte auch hier evtl. mit einer tumorassoziierten Überexpression erklärt werden, da drei von 49 isolierten Klonen der RMS-40-cDNS-Bibliothek zur *TTC3*-mRNS homolog waren.

Interessanterweise hatten Tsukahara et al. (1996) im Kontext des Down-Syndroms vermutet, dass eine Überexpression von *TTC3* Inbalancen von Protein-Protein-Interaktionen während des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung verursacht. Es wäre daher lohnenswert, eine mögliche tumorassoziierte Überexpression von *TTC3* durch quantitative mRNA-Analysen abzuklären und gegebenenfalls ihre pathogenetischen Bedeutung für RMS zu untersuchen.

Zu den SEREX-definierten, putativen MU-RMS-40.15-Homologen MU-OVA-195 und HCA137 lagen widersprüchliche serologische Ergebnisse vor

Vom *PIMT*-Gen wurden neben MU-RMS-40.15 auch MU-OVA-195 und HCA137 kodiert; diese drei SEREX-definierten Antigene lieferten die ersten Evidenzen für eine Immunogenität von *PIMT*-Genprodukten. MU-OVA-195 war bei 2/14 positiven Kontrollseren als Autoantigen, HCA137 bei 0/20 positiven Kontrollseren als Tumorantigen (Wang et al. 2002) charakterisiert worden, so dass eine widersprüchliche Klassifikation zu diskutieren ist. Die vorbeschriebene tumorassoziierte Überexpression der in Normalgewebe ubiquitären *PIMT*-Transkripte (Lee et al. 1999, Zhu et al. 2001) wäre durchaus mit einer tumorassoziierten Immunogenität vereinbar. Ebenso wahrscheinlich ist jedoch eine im Kontext von Tumoren lediglich verstärkte Ausprägung der normalen Autoimmunogenität von *PIMT*-Genprodukten.

Die diskrepanten Befunde zeigen, dass man besonders bei niedrigfrequenten Ak-Antworten in der Kontrollpopulation sehr vorsichtig mit der Interpretation der serologischen Befunde sein muss und manchmal keine eindeutige Klassifikation erzielen kann. Möglicherweise hat z. B. die Altersverteilung einen Einfluss auf die Ak-Frequenz bei der Kontrollgruppe; die meisten der publizierten Kontrollgruppen haben wahrscheinlich einen deutlich höheren Altersdurchschnitt als die in dieser Arbeit eingesetzte und damit ein höheres Risiko bereits an einem klinisch noch latenten Malignom erkrankt zu sein.

Gegenüber den vorbeschriebenen cDNS-Homologen fand sich in der MU-RMS-40.15 cDNS eine einzelne Baseninsertion, die einen Leserasterwechsel bewirkte. Wie bei den anderen von einer einzelnen Adenin- oder Thymin-Insertion betroffenen Antigenen (z. B. MU-RMS-40.7, -40.18 und -40.21) ist der resultierende, alternative Carboxyterminus jedoch kritisch zu hinterfragen. Eine Keimbahnmutation konnte durch genomische Analyse von autologen Fibroblasten ausgeschlossen werden. Mangels Gewebe war jedoch keine genomische DNS-Analyse des Tumors zur Unterscheidung einer tumorspezifischen molekularen Alteration von einem Klonierartefakt möglich und die *in vivo* Relevanz der Insertion muss offen bleiben.

Auch zu den putativen MU-RMS-40.18-Homologen Golgin 245 und NGO-St-67 gab es widersprüchliche serologische Vorbefunde

Während das putative Homolog NGO-St-67 aufgrund fehlender Ak bei 50 gesunden Kontrollen als Tumorantigen eingestuft worden war, ist Golgin-245 als Autoantigen bei Patienten mit Sjögren-Syndrom bekannt (Rodriguez et al. 1982, Kooy et al. 1992). Passend zu einer Expression in diversen Normalgeweben sind *Gogin245*-Genprodukte damit eher als Autoantigene einzustufen.

Casciola-Rosen et al. (1999) vermuten, dass eine Ak-Bildung bei Autoimmunerkrankungen womöglich durch Modifikationen von Autoantigenen, insbesondere durch proteolytische Spaltungen während des Zelltodes induziert wird (Andrade et al. 1998, Casciola-Rosen et al. 1999). Nozawa et al. (2002) konnten morphologische Veränderungen des Golgi-Komplexes und zudem unterschiedliche Spaltungsmuster von Golgi-Autoantigenen während des programmierten Zelltodes und der Nekrose beobachten (Nozawa et al. 2002). Diese Mechanismen könnten auch im Kontext maligner Tumoren relevant sein.

Der dargestellte mögliche alternative Carboxyterminus aufgrund einer einzelnen Adenininsertion muss wiederum kritisch betrachtet werden, und kann hier nicht sicher als *snp*, Mutation oder Artefakt interpretiert werden.

RPS18-kodierten Antigene waren als Tumor- oder Autoantigene eingestuft worden

Gegen die SEREX-definierten cDNS-Homologe des Antigens MU-RMS-40.21, NGO-St-8, NGO-St-103, HOM-TSSem-84, HOM-Mel2-1.13, NGO-Br-17 und MO-BC-237, waren bei 0/16, 1/16, 3/12, 0/19, 0/30 bzw. 3/7 Kontrollpersonen Ak-detektiert worden. Die neue und nachweislich ubiquitäre RPS18-cDNS-Spleißvariante MU-RMS-40.21 kodierte demnach ebenfalls am ehesten ein Autoantigen mit niedriger Ak-Frequenz bei Gesunden und Tumorpatienten.

Inwieweit die zahlreichen bekannten Spleißvarianten auf die Funktion des ribosomalen Proteins Einfluss haben, und welcher der möglichen ORF tatsächlich *in vivo* exprimiert wird, muss vorläufig offen bleiben.

5.5. Die Autoantigene MU-RMS-40.2, -3, -7, -8, -12, -13, -16, -19, -20, -22, -23

Gegen Antigene der Gruppen MU-RMS-40.2, -3, -7, -8, -12, -13, -16, -19, -20, -22, -23 fanden sich bei mehreren Kontrollpersonen IgG-Ak

Gegen die genannten Antigengruppen wurden in der vorliegenden Arbeit bei mindestens zwei der 30 untersuchten gesunden Probanden Serum-Ak detektiert. Sie stellten damit sehr wahrscheinlich Autoantigene dar, welche in der Regel keine guten Kandidaten für eine nebenwirkungsarme Vakzinierung darstellen.

Abhängig von Expressionsmuster und Expressionsstärke in den verschiedenen Normal- und Tumorgeweben, von der Verteilung der Ak bei verschiedenen Tumorpatienten und von evtl. tumorspezifischen molekularen Alterationen gegenüber einem Wildddtyp können SEREX-definierte Autoantigene oder ihre spezifischen Serum-Ak jedoch als klinische Marker für die Tumorthherapie hilfreich sein (Conroy et al. 1998, Ciocca et Calderwood 2005).

Autoantigene der Gruppen MU-RMS-40.2 und -40.12 trugen neue, tumorspezifische Deletionen

Die putativen Antigene der Gruppen MU-RMS-40.2 und -40.12 waren zu den ubiquitären Proteinen RALBP und Lamin C homolog und wurden durch die eigene differentielle Serumanalyse als Autoantigene charakterisiert. Lamin C war bereits als Autoantigen bei entzündlichen Erkrankungen vorbeschrieben (Schmits et al. 2002, Philipp et al. 1995, Malka et al. 1997); bei Gesunden waren für beide Antigene bislang keine Ak nachgewiesen worden.

Bemerkenswerterweise fand sich in beiden Gruppen eine neue, wahrscheinlich individuelle, tumorspezifische Variante, die durch eine Deletion charakterisiert war und so möglicherweise ein tumorspezifisches Epitop trug.

Im putativen RALBP-Homolog fand sich die Deletion in der carboxyterminalen Region, die sich mit der Ral-bindenden Region zu einer Superhelix anordnen kann und so vermutlich an Interaktionen mit anderen Proteinen beteiligt ist (Jullien-Flores 1995, Cantor et al. 1995). Ob dies von tumorpathogenetischer Bedeutung ist, müsste experimentell geprüft werden. Dafür, dass im RMS-Gewebe die Expression des nicht deletierten RALBP überwog, sprach die Tatsache, dass vier von fünf cDNS unveränderte RALBP-Sequenzen aufwiesen.

Bei dem putativen Lamin C-Homolog MU-RMS-40.12 lag der Verlust von 85 AS ebenfalls im Carboxyterminus, einer Region, die das Lamin C vom Lamin A unterscheidet und somit wahrscheinlich funktionell von Bedeutung ist. Lamin-Proteine sind Intermediärfilamente der Kernmembran, die in die Chromatinorganisation während der Interphase des Zellzyklus, in die DNS-Replikation und wahrscheinlich auch in die Genexpression eingreifen (Furukawa et Hotta 1993, Nagle 1994, Moir et al. 1995). Auch für MU-RMS-40.12 kann damit eine mögliche

pathogenetische Bedeutung diskutiert werden. Interessanterweise war das nicht-deletierte Homolog nicht aus RMS-40 kloniert worden. Dieser Befund passte zu der Tatsache, dass A-Typ Lamine vorwiegend in gut differenzierten Zellen, aber kaum oder nicht nachweisbar in undifferenzierten, schnell proliferierenden und maligne entarteten Zellen exprimiert werden (Stadelmann et al. 1990, Machiels et al. 1996 und 1997, Lin et Worman 1997, Broers et al. 1997, Moss et al. 1999).

Da beide Deletionen in keinem anderen der untersuchten Tumoren zu finden waren haben die tumorbiologisch äußerst interessanten Befunde wahrscheinlich keine allgemeine Bedeutung für die RMS-Therapie und Diagnostik.

Das Autoantigen MU-RMS-40.22 ist wahrscheinlich eine carboxyterminal trunkeerte TFIS.h/TCEA3-Splicevariante mit restriktiver mRNS-Gewebeexpression

Die MU-RMS-40.22 cDNS war eine neue Spleißvariante der TFIS.h/TCEA3-mRNS, die durch Erhalt eines Introns in der wenig konservierten Linkerregion des Wildtyps entstanden war. Das putative Antigen enthielt zwar den für die Regulation von TFIS-*in vivo*-Funktionen wichtigen Amino-terminus (Horikoshi et al. 1985), hatte aber die für gewebespezifische Funktionen wichtige Linkerregion (Umehara et al. 1995) und den für alle bekannten *in vitro* Funktionen des Proteins essentiellen und ausreichenden Carboxyterminus mit Polymerase-II-Bindedomäne und hoch-konserviertem Nukleinsäure-bindenden Zink-Fingermotif verloren (Agarwal et al. 1991, Qian et al. 1993, Reines et al. 1996). Das Phänomen der Intron-Retention war auch schon am Amino-terminus des Xenopus-TFIS.h/TCEA3 (Labhart und Morgan 1998) und im humanen TFIS.h/TCEA1 beobachtet worden (Plant et al. 1996). Allerdings ist bislang über kein von einer solchen RNS-Variante exprimierte Protein berichtet worden.

Die Ergebnisse der Expressionsanalyse sprachen dafür, dass das Vorkommen der neuen Spleißvariante ebenso wie des TFIS.h/TCEA3 normalerweise auf Organe des Urogenitaltrakts beschränkt ist, während beide Varianten in verschiedenen Tumoren auch anderen Gewebsursprungs aberrant exprimiert werden. Beide Varianten könnten damit nicht nur eine interessante tumorbiologische Rolle innehaben, sondern darüber hinaus eine mögliche Bedeutung als MRD-Marker aufweisen. Weiterhin war die Expression der neuen Spleißvariante innerhalb der untersuchten Osteosarkome und RMS heterogen. Das bedeutete eine mögliche Rolle im spezifischen Wachstumsverhalten der individuellen Tumore bzw. eine mögliche Bedeutung als prognostischer Gewebemarker. Um die mögliche klinische Bedeutung der beiden TFIS/TCEA3-Varianten für Diagnose und Prognose weiter abzuklären, sollten daher weitere Osteosarkome und RMS auf ihr Vorkommen getestet werden.

Bemerkenswerterweise reagierte das Antigen MU-RMS-40.22 mit allen getesteten Kontroll- und Tumorseren. Dieses breite Vorkommen ließ darauf schließen, dass Immunreaktionen gegen diese Antigengruppe nicht krank machen. Zusammen mit dem restriktiven Vorkommen in Normalgewebe könnte dies dafür sprechen, dass diese Antigene hilfreiche Adjuvantien für tumor-

spezifische Vakzine darstellen. Des Weiteren liefert das Antigen eine hilfreiche Positivkontrolle für serologische Analysen.

Die Antigene der Gruppen MU-RMS-40.3 zeigen serologische Charakteristika von Autoantigenen, aber Expressions-Charakteristika von Differenzierungsantigenen

Die Antigene der Gruppe MU-RMS-40.3 waren wahrscheinlich mit der Myosin-Schwerekette des embryonalen Skelettmuskels, MYH3, identisch. Eine Immunantwort gegen *MYH3*-Genprodukte wurde mit dieser Arbeit erstmals beschrieben.

Trotz der hohen Frequenz von anti-MYH3-Ak bei den Kontrollen, die Autoantigene nahe legte, muss das MYH3-Expressionsmuster Anlass zur Diskussion einer möglicherweise maskierten tumorassoziierten Immunogenität geben.

Für letztere sprach die Tatsache, dass die Expression von MYH3 wie die eines klassischen Differenzierungsantigens normalerweise auf Zellen einer bestimmten Entwicklungsstufe beschränkt ist und darüber hinaus nur in Tumoren vorkommt, deren Zellen sich von dieser Differenzierungsstufe ableiten: MYH3 wird während der Entwicklung der Skelettmuskulatur vorwiegend in der Embryonalzeit exprimiert, mit einem Höhepunkt vor der Geburt und einem Rückgang nach der Geburt (Fitzsimons et al. 1981, Whalen et al. 1981, Bandman et al. 1982, Karsch-Mizrachi et al. 1989). Eine aberrante MYH3-Expression wird als Kennzeichen muskulärer Regeneration gewertet und stellt einen charakteristischen Marker einiger genetisch bedingter Myopathien dar (Webster et al. 1988). Darüber hinaus ist eine MYH3-Expression in Tumoren muskulärer Differenzierung, wie dem RMS, beschrieben (Schiaffino et al. 1986, Karsch-Mizrachi et al. 1989, Tonin et al. 1991). Die relativ hohe Anzahl der isolierten Klone mit MYH3-cDNS-Homologie (6/49) wies außerdem auf eine starke Expression des *MYH3*-Gens im untersuchten RMS-Gewebe, was eine tumorassoziierte Immunreaktion gefördert haben könnte.

Zum Zweiten zeigt die embryonale Myosin-Schwerekette eine mehr als 70%ige Homologie mit der perinatalen Isoform sowie mit Isoformen in schnellen und langsamen Muskelfasern des Erwachsenen (Karsch-Mizrachi et al. 1989). Die verschiedenen Isoformen der Myosin-Schwerekette unterscheiden sich vorwiegend am Carboxyterminus (Mahdavi et al. 1982, Feghali et al. 1989, Karsch-Mizrachi et al. 1989). Es ist deshalb durchaus möglich, dass das T-Zell-Epitop, welches für Autoimmunreaktionen bei Gesunden verantwortlich war, innerhalb der wenig variablen aminoterminalen Region der Myosin-Schwereketten lag, wohingegen möglicherweise ein zweites, aberrant in Tumoren exprimiertes embryonales Epitop im Carboxyterminus von MYH3 zu suchen ist.

Es erscheint deshalb sehr interessant, zu untersuchen, ob sich bei Tumorpatienten T-Zellen gegen den MYH3-spezifischen, aminoterminalen Proteinabschnitt finden bzw. generieren lassen. In diesem Falle wäre eine hohe immuntherapeutische Relevanz dieses Differenzierungsantigens gegeben. Quantitative mRNA-Analysen an Muskelgewebe von Kindern verschiedenen Alters soll-

ten diesen Untersuchungen allerdings vorausgehen, um den Zeitpunkt der Herunterregulation im gesunden Kind genauer zu determinieren; falls eine MYH3-Expression bis ins Jugendalter gefunden wird, wären MYH3-spezifische Vakzine natürlich weniger sicher und wie alle anderen muskelspezifischen Ansätze mit der Gefahr von Myositiden behaftet.

Der Nutzen von MYH3-Transkripten sollten darüber hinaus für die MRD-Diagnostik in Lymphknoten und Knochenmark evaluiert werden.

Für die Autoantigene der Gruppe MU-RMS-40.7, -40.8, -40.13, -40.16, -40.19, -40.20 und -40.23 ergab sich keine signifikante klinische Relevanz im Kontext des RMS

Die MU-RMS-40.7-Antigene waren wahrscheinlich mit der β -Isoform der Myosin-Schwerekette der Herzmuskulatur, MYH7, identisch. Die *in vivo* Relevanz der Adenininsertion innerhalb des ORF ist fraglich (s.o.). Mutationen im *MYH7*-Gen kommen zwar vor, fanden sich jedoch bislang nur mit der Pathogenese und Prognose von Kardiomyopathien und sind nicht mit der Entstehung von Tumoren muskulären Ursprungs assoziiert (Cuda et al. 1993, Anan et al. 1994, Kelly and Strauss 1994, Rayment et al. 1995, Kamisago et al. 2000, Waldmüller et al. 2003). Die Klassifizierung als Autoantigen (6/30 positive Kontrollen) wurde durch die serologischen Charakteristika des cDNS-Homologs HOM-Ts-PMR1-25 untermauert (NS 3/19 positive Kontrollen). Wie für andere Auto-Ak ist für anti-MYH7-Ak zum gegenwärtigen Zeitpunkt ein prognostischer Wert im Kontext mit Tumoren nicht auszuschließen.

MU-RMS-40.8 wurde von einer Spleißvariante der FLJ13441-mRNS kodiert und lieferte zusammen mit NY-SAR-29 und HOM-Pa1-3 erste Evidenzen für die Existenz von Proteinen der FLJ13441-Familie, darüber zusammen mit NY-SAR-29 (6/33 positive Kontrollen) für deren Autoimmunerkennung. Obwohl cDNS-Homologe von MU-RMS-40.8 mit demselben Spleißmuster bislang nur aus Tumoren kloniert worden waren, konnte die eigene Arbeit, passend zur Klassifizierung als Autoantigen, eine breite mRNS-Expression der beiden FLJ13441-Spleißvarianten in Normalgeweben belegen. Widersprüchlich waren die serologischen Befunde zum cDNS-Homolog HOM-Pa1-3, das von Lee et al. (2003) als Tumorantigen vorgeschlagen worden war (0/14 positive Kontrollen). Die Befunde zur Autoimmunogenität erscheinen bei fehlendem Nachweis tumorspezifischer Epitope und größerer Anzahl untersuchter Kontrollseren überzeugender.

Das Antigen MU-RMS-40.13 war wahrscheinlich identisch mit der ubiquitären, in Muskelgewebe überexprimierten LDH-A, einer Untereinheit der bekannten gewebespezifischen Glykolyseenzyme LDH1 bis LDH5 (Markert et al. 1963 und 1975, Maekawa 1988). In Übereinstimmung mit den serologischen Daten für NY-REN-59 (1/19 positive Kontrollen) wurde das eigene LDHA-Genprodukt (2/30 positive Kontrollen) als gering immunogenes Autoantigen klassifiziert (Scanlan et al. 1999). Forti et al. (2002) postulierten dagegen LDHA-kodierte Tumorantigene (0/20 positive Kontrollen) und fanden eine hohe Repräsentation von LDHA-Klonen in einer Mammakarzinom-Zelllinie (10/23). Eine Überexpression von LDHA konnte auch in Nierenzellkarzinomen beobachtet und eine tumorpathogenetisch relevante Assoziation mit einer

Deregulation des onkogenen Transkriptionsfaktors c-myc beschrieben werden (Shim et al. 1997, Vilà et al. 2000). In Astrozytomen fand sich dagegen eher eine Herunterregulation der LDH-A (Huang et al. 2000), was zusammen mit den eigenen Befunden am RMS (nur 1/49 Klonen) gegen eine generelle tumorassoziierte Überexpression und damit möglicherweise auch gegen eine generelle pathogenetische Rolle von LDHA sprach.

Die putativen AKAP450-Homologe der Gruppe MU-RMS-40.16 wurden durch die eigene Serumanalyse erstmals als Autoantigene klassifiziert (10/30 positive Kontrollen). Erste Hinweise auf immunogene AKAP450-Genprodukte hatte das Antigen MO-REN-1 gegeben, das allerdings keiner differentiellen Serumanalyse unterzogen worden war. Krebsassoziierte Besonderheiten des ubiquitären Zentromer-Proteins AKAP450 sind bislang nicht beschrieben (Witczak et al. 1999). Wegen der inkompletten Klonierung der AKAP450-kodierten Antigene lässt sich keine sichere Aussage über mögliche tumorassoziierte molekulare Charakteristika treffen. Der beschriebene, nicht-konservative *snp* war bislang nur in Tumorgewebe vorbeschrieben, zeigte sich aber bei der untersuchten Patientin auch in Normalgewebe.

Die Antigene der Gruppe MU-RMS-40.19 waren inkomplett kloniert worden, aber soweit bekannt, identisch mit Kinectin, einem Membranprotein des Endoplasmatischen Retikulums, das dem intrazellulären Transport von Zellorganellen dient (Futterer et al. 1995, Kumar et al. 1995). Die eigene differentielle Serumanalyse klassifizierte diese Antigene als Autoantigene. Dies war im Einklang mit dem Bericht von Hirano et al. (2000), die Kinectin als Autoantigen bei Aplastischer Anämie charakterisierten, und mit den serologischen Befunden zu den cDNS-Homologen NGO-Br-1 und NGO-St-47 (je 30/100 positive Kontrollen). Im Gegensatz dazu wurde das cDNS-Homolog HOM.HCC.27.12.2 als Tumorantigen klassifiziert (0/20 positive Kontrollen) (Stenner-Liewen et al. 2000). Bei breiter Gewebeexpression ohne Anhalt für tumorspezifische molekulare Varianten erscheinen wiederum eher die oben genannten Analysen repräsentativ und Autoantigene wahrscheinlich

Das Antigen MU-RMS-40.20 war wahrscheinlich mit dem hypothetischen FL11588-Protein identisch und lieferte den ersten Hinweis auf die Existenz und Autoimmunerkenntung dieses wahrscheinlich breit exprimierten Genprodukts.

Das Antigen MU-RMS-40.23 entsprach wahrscheinlich dem DNS-Reparaturprotein RAD52 (Kanaar et al. 1998, Pastink et Lohman 1999, Paques et Haber 1999) und wurde als Autoantigen eingestuft (2/30 positive Kontrollen). Die vorliegende Arbeit lieferte die erste Evidenz für eine Immunogenität von *Rad52*-Genprodukten. Da RAD51 und RAD52 mit den Prädispositionsgenen für Brustkrebs, BRCA1 und BRCA2, assoziiert sind (Chen et al. 1999), war von anderen Gruppen gezielt nach *RAD52*-Alterationen in Mamma- und Ovarialkarzinomen gesucht, jedoch bislang keine Korrelation zwischen Mutationen und dem Auftreten von Tumoren bzw. dem Überleben der Patientinnen gefunden worden (Goode et al. 2002, Tong et al. 2003).

Wildtyp-Antigene haben eine potentielle Relevanz für Tumorstoffe

Mithilfe der SEREX-Methode waren, wie in der eigenen Arbeit, auch von anderen Arbeitsgruppen zahlreiche Wildtyp-Moleküle aus Tumoren kloniert worden (Old et Chen 1998). Soweit sie eine streng tumorassoziierte spezifische Immunogenität aufwiesen, aber ubiquitär und nicht tumorassoziiert überexprimiert worden waren, blieb der Mechanismus ihrer Immunogenität unklar.

Zu diesem Thema sollen abschließend noch zwei interessante Beobachtungen von Nishikawa et al. (2001 und 2003) vorgestellt werden. Bei einer Koimmunisierung von Mäusen mit einem Gemisch aus tumorspezifischen CTL-Epitopen und SEREX-definierten Wildtyp-Antigenen fand die Gruppe einen signifikanten Anstieg von tumorspezifischen CD8⁺-CTL. Zudem konnte durch die beschriebene Koimmunisierung die Entstehung von Lungenmetastasen bei allen Mäusen komplett verhindert werden, die vor, zeitgleich mit und sogar bis zu fünf Tage nach Tumorzellinjektion koimmunisiert worden waren. Eine entscheidende Mediator-Rolle wurde für CD4⁺-THL postuliert (Nishikawa et al. 2001). Die Immunisierung mit den Wild-Typ-Antigenen alleine bewirkte eine starke Zunahme der Anzahl pulmonaler Metastasen (im Mittel 130–170 Metastasen) im Vergleich zur Anzahl an Metastasen bei nichtimmunisierten Mäusen (im Mittel 30–60 Metastasen) (Nishikawa et al. 2003). Die Gruppe vermutete, dass die Autoantigen-spezifischen CD4⁺-THL in Abwesenheit der tumorspezifischen CTL-Aktivierung eher regulatorische Funktionen einnehmen, die zu einem immunsuppressiven Zustand und damit möglicherweise *in vivo* zu einem verstärkten Tumorwachstum führen. Die Ergebnisse zeigen auf, wie schmal der Grad zwischen protektiven und fatalen Effekten einer Vakzinierung mit Wildtyp-Antigenen ist und bestärken die Dringlichkeit, nach immundominanten Tumorantigenen zu suchen.

6. Zusammenfassung

Das RMS ist eine maligne Erkrankung mesenchymalen Ursprungs und der häufigste maligne Weichteiltumor bei Kindern. Die Inzidenz in der weißen Bevölkerung beträgt 4,4 Fälle pro 1 Million Kinder unter 15 Jahren pro Jahr. Das ereignisfreie Überleben für Kinder mit einem RMS beträgt heute 60 %–70 %. Demgegenüber ist die Prognose für Patienten mit einem metastasierten RMS trotz multimodaler Therapiekonzepte immer noch schlecht. Die Entwicklung von zusätzlichen Therapieoptionen stellt daher eine Herausforderung an die Wissenschaft dar. Tumorimmunologische Ansätze erscheinen dabei vielversprechend. Sichere und effektive Tumorzine sind aber von der Identifizierung geeigneter Tumorantigene abhängig.

Um neue Tumorantigene zu identifizieren, wurde in der vorliegenden Arbeit eine RMS-cDNA Expressionsbibliothek mithilfe von gepooltem Serum von vier an einem RMS erkrankten pädiatrischen Patienten gescreent. Auf diese Weise konnten 45 verschiedene Antigene identifiziert und diese 23 Genen zugeordnet werden. Viele dieser Antigene waren neue Genprodukte bereits bekannter Gene (*AND1*, *RALBP*, *FLJ20644*, *MYH7*, *FLJ13441*, *SMYD1*, *PMS1*, *TTC3*, *Lamin C*, *Titin*, *PIMT*, *AKAP450*, *Golgin-245*, *RPS18* und *TCEA3*), die aufgrund tumorspezifischer Mutation, *snps*, alternativen Spleißens, Deletionen oder alternativer Translation von 3' oder 5'UTR entstanden waren. Die übrigen Antigene waren zu MYH3, FLJ20364, MLH1, LDH1, RUFY-2, Kinectin, FLJ11588 und RAD52 homolog und boten z. T. erstmals eine Evidenz für die Immunogenität dieser Genprodukte.

Die Spezifität der IgG-Ak-Antwort gegen diese Antigene wurde mithilfe von Serumproben verschiedener, pädiatrisch-onkologischer Patienten und gesunder Kontrollpersonen untersucht. Sieben Antigenfamilien wurden ausschließlich von Serum-Ak der onkologischen Patienten erkannt und konnten damit als Tumorantigenfamilien klassifiziert werden (*AND-1*, *MLH1*, *FLJ20644*, *Bop*, *PMS1*, *RUFY-2*, *Titin*). Unter diesen Tumorantigenen waren neue Genprodukte des *AND-1*-Gens und des *Titin*-Gens, die von mRNA-Sequenzen translatiert wurden, die ursprünglich als 3' bzw. 5'UTR beschrieben waren. Zudem wurde eine neue *PMS1*-Variante identifiziert, die wahrscheinlich durch *trans*-Spleißens generiert worden war und in keinem Normalgewebe, aber in einigen pädiatrischen Tumorgeweben detektiert werden konnte; sie repräsentierte damit ein interessantes, neues tumorspezifisches Tumorantigen. Diese tumorspezifischen Antigene könnten von höchstem klinischem Interesse sein, nicht nur als Marker für die Detektion einer *minimal-residual disease* (MRD), sondern zudem als geeignetes Target für die Entwicklung einer pädiatrischen Tumorzinierung.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass das Immunom des RMS bei Kindern viele verschiedene Antigene einschließt, von denen einige zur Entwicklung neuer und erfolgsversprechender Therapiekonzepte nicht nur gegen RMS beitragen könnten.

7. Literaturverzeichnis

- Aarli J, Gilhus N, Hofstad H. CA-antibody: *An immunological marker of thymic neoplasia in myasthenia gravis?* Acta Neurol Scand 63 (1987) 55-57.
- Agarwal K, Baek KH, Jeon CJ, Miyamoto K, Ueno A, Yoon HS. *Stimulation of transcript elongation requires both the zinc finger and RNA polymerase II binding domains of human TFIIIS.* Biochemistry 30 (1991) 7842-7851.
- Anan R, Greve G, Thierfelder L, Watkins H, McKenna WJ, Solomon S, Vecchio C, Shono H, Nakao S, Tanaka H. *Prognostic implications of novel beta cardiac myosin heavy chain gene mutations that cause familial hypertrophic cardiomyopathy.* J Clin Invest 93 (1994) 280-285.
- Anderson J, Gordon A, Pritchard-Jones K, Shipley J. *Genes, chromosomes and rhabdomyosarcoma.* Genes Chrom Cancer. 26 (1999) 275-285.
- Andrade F, Roy S, Nicholson D, Thornberry N, Rosen A, Casciola-Rosen L. *Granzyme B directly and efficiently cleaves several downstream caspase substrates: implications for CTL-induced apoptosis.* Immunity 8 (1998) 451-460.
- Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF). www.uni-duesseldorf.de
- Bandman E, Matsuda R, Strohman R. *Developmental appearance of myosin heavy and light chain isoforms in vivo and in vitro in chicken skeletal muscle.* Dev Biol 93 (1982) 508-518.
- Behrends U, Jandl T, Golbeck A, Lechner B, Müller-Wehrich S, Schmid I, Till H, Berthold F, Voltz R, Mautner J. *Novel products of the HUD, HUC, NNP-1 and a-internexin genes identified by autologous antibody screening of a pediatric neuroblastoma library.* Int J Cancer 100 (2002) 669-677.
- Behrends U, Schneider I, Rossler S, Frauenknecht H, Golbeck A, Lechner B, Eigenstetter G, Zobywalski C, Müller-Wehrich S, Graubner U, Schmid I, Sackerer D, Spath M, Goetz C, Prantl F, Asmuss HP, Bise K, Mautner J. *Novel tumor antigens identified by autologous antibody screening of childhood medulloblastoma cDNA libraries.* Int J Cancer 106 (2003) 244-251.
- Bernasconi M, Remppis A, Fredericks WJ, Rauscher FJ, Schafer BW. *Induction of apoptosis in rhabdomyosarcoma cells through down-regulation of PAX proteins.* Proc Natl Acad Sci USA 93 (1996) 13164-13169.
- Bernhard H, Meyer zum Büschenfelde C, Kolb HJ, Peschel C. *Adoptiver Transfer von malignomreaktiven T-Zellen.* Onkologie 5 (1999) 688-694.
- Boguski M, Sikorski R, Hieter P, Goebel M. *Expanding family.* Nature 345 (1990) 114.
- Boon T. *Tumor antigens recognized by cytolytic T-lymphocytes: present perspectives for specific immunotherapy.* Int J Cancer 54 (1993) 177-180.
- Borgstrom P, Hillan KJ, Sriramarao P, Ferrara N. *Complete inhibition of angiogenesis and growth of microtumors by anti-vascular endothelial growth factor neutralizing antibody: novel concepts of angiostatic therapy from intravital videomicroscopy.* Cancer Res 56 (1996) 4032-4039.
- Bowman L, Grossmann M, Rill D, Brown M, Zhong W, Alexander B, Leimig T, Coustan-Smith E, Campana D, Jenkins J, Woods D, Kitchingman G, Vanin E, Brenner M₍₁₎. *IL-2 adenovector-transduced autologous tumor cells induce antitumor immune responses in patients with neuroblastoma.* Blood 92 (1998) 941-949.
- Bowman L, Grossmann M, Rill D, Brown M, Zhong W, Alexander B, Leimig T, Coustan-Smith E, Campana D, Jenkins J, Woods D, Brenner M₍₂₎. *Interleukin-2-gene-modified allogeneic tumor cells for treatment of relapsed neuroblastoma.* Hum Gene Ther 9 (1998) 1303-1311.
- Breitfeld PP, Meyer WH. *Rhabdomyosarcoma: new windows of opportunity.* Oncologist 10 (2005) 518-527.
- Broers J, Machiels B, Kuijpers H, Smedts F, van den Kieboom R, Raymond Y, Ramaekers F. *A- and B-type lamins are differentially expressed in normal human tissues.* Histochem Cell Biol 107 (1997) 505-517.

- Bronner E, Baker S, Morrison P, Warren G, Smith L, Lescoe M, Kane M, Earabino C, Lipford J, Lindblom A, Tannergard P, Bollag R, Godwin A, Ward D, Nordenskjold M, Fishel R, Kolodner R, Liskay M. *Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with Hereditary non-polyposis colon cancer.* Nature 368 (1994) 258-261.
- Buamah P, Skillen A. *Lactate dehydrogenase isoenzyme 1 activity in sera of patients with ovarian cancer.* Clin Chem 36 (1990) 707-708.
- Burke B, Stewart C. *Life at the edge: the nuclear envelope and human disease.* Mol Cell Biol (Nature Reviews) 3 (2002) 575-585.
- Cantor S, Urano T, Feig L. *Identification and characterisation of Ral-binding protein 1, a potential downstream target of Ral GTPases.* Mol Cell Biol 15 (1995) 4578-4584.
- Carli M, Colombatti R, Oberlin O, Bisogno G, Treuner J, Koscielniak E, Tridello G, Garaventa A, Pinkerton R, Stevens M. *High-dose melphalan with autologous stem cell rescue in metastatic rhabdomyosarcoma.* J Clin Oncol 17 (1999) 2796-2803.
- Casciola-Rosen L, Andrade F, Ulanet D, Wong W, Rosen A. *Cleavage by granzyme B is strongly predictive of autoantigen status: implications for initiation of autoimmunity.* J Exp Med 190 (1999) 815-826.
- Casciola-Rosen L, Pluta A, Plotz P, Cox A, Morris S, Wigley F, Petri M, Gelber A, Rosen A. *The DNA mismatch repair enzyme PMS1 is a myositis-specific autoantigen.* Arthritis Rheum 44 (2001) 389-396.
- Cavazzana A, Schmidt D, Ninfo V, Harms D, Tollot M, Carli M, Truener J, Betto R, Salviati G. *Spindle cell rhabdomyosarcoma. A prognostically favourable variant of rhabdomyosarcoma.* Am J Surg Pathol 16 (1992) 229-235.
- Chang HR, Cordon-Cardo C, Houghton AN, Cheung NK, Brennan MF. *Expression of disialogangliosides GD2 and GD3 on human soft tissue sarcomas.* Cancer 70 (1992) 633-638.
- Chardin P, Yeramian P, Madaule P, Tavitian A. *N-ras gene activation in the RD human rhabdomyosarcoma cell line.* Int J Cancer 35 (1985) 647-652.
- Chassin D, Bellet D, Koman A. *The human homolog of ribosomal protein S18.* Nucleic Acids Res 21 (1993) 745.
- Chatterjee TK, Fisher RA. *Novel alternative splicing and nuclear localization of human RGS12 gene products.* J Biol Chem 275 (2000) 29660-29671.
- Chen J, Silver D, Cantor S, Livingston D, Scully R. *BRCA1, BRCA2 and Rad51 operate in a common DNA damage response pathway.* Cancer Res 59 (1999) 1752-1756.
- Chen R, Kim O, Li M, Xiong X, Guan J, Kung H, Chen H, Shimizu Y, Qiu Y. *Regulation of the PH-domain-containing tyrosine kinase Etk by focal adhesion kinase through the FERM domain.* Nat Cell Biol 3 (2001) 439-444.
- Chen W, Ede NJ, Jackson DC, McCluskey J, Purcell AW. *CTL recognition of an altered peptide associated with asparagine bond rearrangement. Implications for immunity and vaccine design.* J Immunol 157 (1996) 1000-1005.
- Chen Y, Scanlan M, Sahin U, Türeci Ö, Gure A, Tsang S, Williamson B, Stockert E, Pfreundschuh M, Old L. *A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening.* Proc Natl Acad Sci USA 94 (1997) 1914-1918.
- Chen Y, Wang J, Fraig M, Henderson K, Bissada N, Watson D, Schweinfest C. *Aterations in PMS2, MSH2 and MLH1 expression in human prostate cancer.* Int J Oncol 22 (2003) 1033-1043.
- Christie K, Awrey D, Edwards A, Kane C. *Purified yeast RNA polymerase II reads through intrinsic blocks to elongation in response to the yeast TFIIS analogue, P37.* J Biol Chem 269 (1994) 936-943.
- Ciocca DR, Calderwood SK. *Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications.* Cell Stress Chaperones 10 (2005) 86-103.

- Conroy SE, Sasieni PD, Fentiman I, Latchman DS. *Autoantibodies to the 90kDa heat shock protein and poor survival in breast cancer patients*. Eur J Cancer 34 (1998) 942-943.
- Crist W, Gehan EA, Ragab AH, Dickman PS, Donaldson SS, Fryer C, Hammond D, Hays DM, Herrmann J, Heyn R. *The third intergroup rhabdomyosarcoma study*. J Clin Oncol 13 (1995) 610-630.
- Crist WM, Garnsey L, Beltangady MS, Gehan E, Ruymann F, Webber B, Hays DM, Wharam M, Maurer HM. *Prognosis in children with rhabdomyosarcoma: a report of the intergroup rhabdomyosarcoma studies I and II*. J Clin Oncol 8 (1990) 443-352.
- Cuda G, Fananapazir L, Zhu WS, Sellers JR, Epstein ND. *Skeletal muscle expression and abnormal function of beta-myosin in hypertrophic cardiomyopathy*. J Clin Invest 91 (1993) 2861-2865.
- Dagher R, Helman L. *Rhabdomyosarcoma: An overview*. Oncologist 4 (1999) 33-44.
- Dagher R, Long L, Read E, Leitman S, Carter C, Tsokos M, Goletz T, Avila N, Berzofsky J, Helman L, Crystal M. *Pilot trial of tumor-specific peptide vaccination and continuous infusion Interleukin-2 in patients with recurrent Ewing-sarcoma an alveolar rhabdomyosarcoma: An Inter-Institute NIH Study*. Med Pediatr Oncol 38 (2002) 158-164.
- Daigo Y, Isomura M, Nishiwaki T, Tamari M, Ishikawa S, Kai M, Murata Y, Takeuchi K, Yamane Y, Hayashi R, Minami M, Fujino M, Hojo Y, Uchiyama I, Takagi T, Nakamura Y. *Characterization of a 1200-kb genomic segment of chromosome 3p22-p21.3*. DNA Res 6 (1999) 37-44.
- Dalebra P, Frascella E, Macino B, Madruzzo S, Zambon A, Rosolen A, Carli M, Ninfo V, Zanovello P. *MAGE, BAGE and GAGE gene expression in human rhabdomyosarcoma*. Int J Cancer 93 (2001) 85-90.
- Dalerba P, Frascella E, Macino B, Madruzzo S, Zambon A, Rosolen A, Carli M, Ninfo V, Zanovello P. *MAGE, BAGE and GAGE gene expression in human rhabdomyosarcomas*. Int J Cancer 93 (2001) 85-90.
- Das A, Cohen P, Barford D. *The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implications for TPR-mediated protein-protein interactions*. EMBO J 17 (1998) 1192-1199.
- de Alava E, Antonescu CR, Panizo A, Leung D, Meyers PA, Huvos AG, Pardo-Mindan FJ, Healey JH, Ladanyi M. *Prognostic impact of p53 status in Ewing sarcoma*. Cancer 89 (2000) 783-792.
- De Backer O, Arden KC, Boretti M, Vantomme V, De Smet C, Czekay S, Viars CS, De Plaen E, Brasseur F, Chomez P, Van den Eynde B, Boon T, van der Bruggen P. *Characterization of the GAGE genes that are expressed in various human cancers and in normal testis*. Cancer Res 59 (1999) 3157-3165.
- De Smet C, Lurquin C, Lethe B, Martelange V, Boon T. *DNA methylation is the primary silencing mechanism for a set of germ line- and tumor-specific genes with a CpG-rich promoter*. Mol Cell Biol 19 (1999) 7327-7335.
- De Zen L, Sommaggio A, d'Amore E, Masiero L, Cordero di Montezemolo L, Linari A, Madon E, Dominaci C, Bosco S, Bisogno G, Carli M, Ninfo V, Basso G. *Clinical relevance of DNA ploidy and proliferative activity in childhood rhabdomyosarcoma: A retrospective analysis of patients enrolled onto the Italian Cooperative Rhabdomyosarcoma Study RMS88*. J Clin Oncol 15 (1997) 1198-1205.
- Dias P, Kumar P, Marsden HB, Gattamaneni HR, Heighway J, Kumar S. *N-myc gene is amplified in alveolar rhabdomyosarcomas (RMS) but not in embryonal RMS*. Int J Cancer 45 (1990) 593-596.
- Dias P, Kumar P, Marsden HB, Gattamaneni HR, Kumar S. *Prognostic relevance of DNA ploidy in rhabdomyosarcomas and other sarcomas of childhood*. Anticancer Res 12 (1992) 1173-1177.
- Diller L, Sexsmith E, Gottlieb A, Li FP, Malkin D. *Germline p53 mutations are frequently detected in young children with rhabdomyosarcoma*. J Clin Invest 95 (1995) 1606-1611.
- DiMarco S, Glover T, Miller D, Reines D, Warren S. *Transcription elongation factor SII (TCEA) maps to human chromosome 3p22-p21.3*. Genomics 36 (1996) 185-188.
- Disis ML, Calenoff E, McLaughlin G, Murphy AE, Chen W, Groner B, Jeschke M, Lydon N, McGlynn E, Livingston RB. *Existent T-cell and antibody immunity to HER-2/neu protein in patients with breast cancer*. Canc Res 54 (1993) 16-20.

- Dumontet C, Drai J, Bienvenu J, Berard E, Thieblemont C, Bouafia F, Bayle F, Moullet I, Salles G, Coiffier B. *Profiles and prognostic values of LDH isoenzymes in patients with non-Hodgkin's lymphoma*. *Leukemia* 13 (1999) 811-817.
- El-Badry OM, Minniti CP, Kohn EC, Houghton PJ, Daughaday WH, Helman LJ. *Insulin-like growth factor II acts as an autocrine growth and motility factor in human rhabdomyosarcoma tumors*. *Cell Growth Differ* 1 (1990) 325-331.
- Eller M, Stedman HH, Sylvester JE, Fertels SH, Rubinstein NA, Kelly AM, Sarkar S. *Nucleotide sequence of full length human embryonic myosin heavy chain cDNA*. *Nucleic Acids Res* 17 (1989) 3591-3592
- Falk K, Rotzschke O, Stevanovic S, Jung G, Rammensee HG. *Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules*. *Nature* 351 (1991) 290-296.
- Feghali R, Leinwand L. *Molecular genetic characterization of a developmentally regulated human perinatal myosin heavy chain*. *J Cell Biol* 108 (1989) 1791-1797.
- Ferracini R, Olivero M, Di Renzo MF, Martano M, De Giovanni C, Nanni P, Basso G, Scotlandi K, Lollini PL, Comoglio PM. *Retrogenic expression of the MET proto-oncogene correlates with the invasive phenotype of human rhabdomyosarcomas*. *Oncogene* 12 (1996) 1697-1705.
- Finck S, Giuliano A, Morton D. *LDH and melanoma*. *Cancer* 51 (1983) 840-843.
- Finta C, Zaphiropoulos PG. *Intergenic mRNA molecules resulting from trans-splicing*. *J Biol Chem* 277 (2002) 5882-5890.
- Fitzsimons R; Hoh J. *Embryonic and foetal myosins in human skeletal muscle. The presence of foetal myosins in duchenne muscular dystrophy and infantile spinale muscular atrophy*. *J Neurol Sci* 52 (1981) 367-384.
- Forti S, Scanlan M, Invernizzi A, Castiglioni F, Pupa S, Agresti R, Fontanelli R, Morelli D, Old L, Pupa S, Menard S. *Identification of breast cancer-restricted antigens by antibody screening of SKBR3 cDNA library using a preselected patient's serum*. *Breast Cancer Res Treat* 73 (2002) 245-256.
- Francke U, George D, Brown M, Riccardi V. *Gene dose effect: intraband mapping of LDHA locus using cells from four individuals with different interstitial deletions of 11p*. *Cytogenet Cell Genet* 19 (1977) 197-207.
- Fritzler M, Etherington J, Sokoluk C, Kinsella T, Valencia D. *Antibodies from patients with autoimmune disease react with a cytoplasmic antigen in the Golgi apparatus*. *J Immunol* 132 (1984) 2904-2908.
- Fritzler M, Lung C, Hamel J, Griffith K, Chan E. *Molecular characterisation of golgin-245, a novel Golgi complex protein containing a granin signature*. *J Biol Chem* 270 (1995) 31262-31268.
- Furukawa K, Hotta Y. *cDNA cloning of a germ cell specific lamin B3 from mouse spermatocytes and analysis of its function by ectopic expression in somatic cells*. *EMBO J* 12 (1993) 97-106.
- Futterer A, Kruppa G, Kramer B, Lemke H, Kronke M. *Molecular cloning and characterization of human kinectin*. *Mol Biol Cell* 6 (1995) 161-170.
- Gaspar M, Marcos M, Gutierrez C, Martin M, Bonifacino J, Sandoval I. *Presence of an autoantibody against a Golgi cisternal membrane protein in the serum and cerebrospinal fluid from a patient with idiopathic late onset cerebellar ataxia*. *J Neuromimmunol* 17 (1988) 287-299.
- Gattenlöhner S, Müller-Hermelink HK, Marx A. *Polymerase chain reaction-based diagnosis of rhabdomyosarcomas comparison of fetal type acetylcholine receptor subunits and myogenin*. *Diagn Mol Pathol (United States)* 7 (1998) 129-134.
- Genes Chromosomes Cancer 1 (1989) 23-25.
- Gentric A, Blaschek M, Julien C, Jouquan J, Pennec Y, Berthelot J, Mottier D, Casburn-Budd R, Youinou P. *Nonorgan-specific autoantibodies in individuals infected with type 1 human immunodeficiency virus*. *Clin Immunol Immunopathol* 59 (1991) 487-494.

- Gerbault AP, Esche BA, Haie CM, Castaigne D, Flamant F, Chassagne D. *Conservative treatment for lower gynecological tract malignancies in children and adolescents: the Institut Gustave-Roussy experience.* Int J Radiat Oncol Biol Phys 17 (1989) 655-658.
- Gesellschaft für pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH). Cooperative Weichteilsarkom Studie 2002.
- Gil-Benso R, Lopez-Gines C, Carda C, Lopez-Guerrero JA, Ferrer J, Pellin-Perez A, Llombart-Bosch A. *Cytogenetic and molecular findings related to rhabdomyosarcoma. An analysis of seven cases.* Cancer Genet Cytogenet 144 (2003) 125-133.
- Girnita L, Wang M, Xie Y, Nilsson G, Dricu A, Wejde J, Larsson O. *Inhibition of N-linked glycosylation down-regulates insulin-like growth factor-1 receptor at the cell surface and kills Ewing's sarcoma cells: therapeutic implications.* Anticancer Drugs Res 15 (2000) 67-72.
- Goebel M und Yanagida M. *The TPR snap helix: a novel protein repeat motif from mitosis to transcription.* Trends Biochem Sci 16 (1991) 173-177.
- Goletz TJ, Zhan S, Pendleton CD. *Cytotoxic T cell responses against the EWS/FLI-1 Ewing's sarcoma fusion protein and the PAX3/FKHR alveolar rhabdomyosarcoma fusion protein.* Proc Annu Meet Am Assoc Cancer Res 37 (1996) A3243.
- Goode E, Dunning A, Kuschel B, Healey C, Day N, Ponder B, Easton D, Pharoah P. *Effect of germ-line genetic variation on breast cancer survival in a population-based study.* Cancer Res 62 (2002) 3052-3057.
- Gordon T, McManus A, Anderson J, Min T, Swansbury J, Pritchard-Jones K, Shipley J. *Cytogenetic abnormalities in 42 Rhabdomyosarcoma: A United Kingdom Cancer Cytogenetics Group Study.* Med Pediatr Oncol 36 (2001) 259-267.
- Gottlieb I, Pierce S, Sims R, Yamagishi H, Weihe E, Harriss J, Maika S, Kuziel S. *Bop encodes a muscle-restricted protein containing MYND and SET domains and is Essential for cardiac differentiation and morphogenesis.* Nature Genet 31 (2002) 25-32.
- Graus F, Dalmau J, Rene R, Tora M, Malats N, Verschuuren JJ, Cardenal F, Vinolas N, Garcia del Muro J, Vadell C, Mason WP, 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.
- Greenberg PD. *Adoptive T cell therapy of tumors: mechanisms operative in the recognition and elimination of tumor cells.* Adv Immunol 49 (1991) 281-355.
- Grottko C, Mantwill K, Dietel M, Schadendorf D, Lage H. *Identification of differentially expressed genes in human melanoma cells with acquired resistance to various antineoplastic drugs.* Int J Cancer 88 (2000) 535-546.
- Güre A, Stockert E, Scanlan M, Keresztes R, Jäger D, Altorki N, Old L, Chen Y. *Serological identification of embryonic neural proteins as highly immunogenic tumor antigens in small cell lung cancer.* PNAS 97 (1999) 3198-4203.
- Hackman J, Vihola A, Udd A. *The role of titin in muscular disorders.* Ann Med 35 (2003) 434-441.
- Hackman P, Vihola A, Haravuori H, Marchand S, Sarparanta J, de Seze J, Labeit S, Witt C, Peltonen L, Richard I, Udd B. *Tibial muscular dystrophy is a titinopathy caused by mutations in TTN, the gene encoding the giant skeletal-muscle protein titin.* AM J Hum Genet 71 (2002) 492-500.
- Hainaut P, Soussi T, Shomer B, Hollstein M, Greenblatt M, Hovig E, Harris CC, Montesano R. *Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines: update compilation and future prospects.* Nucleic Acids Res 25 (1997) 151-157.
- Hastings KE. *SL trans-splicing: easy come or easy go?* Trends Genet 21 (2005) 240-247.
- Healey EA, Shamberger RC, Grier HE, Loeffler JS, Tarbell NJ. *A 10-year experience of pediatric brachytherapy.* Int J Radiat Oncol Biol Phys 32 (1995) 451-455.

- Heyn R, Haeberlen V, Newton WA, Ragab AH, Raney RB, Tefft M, Wharam M, Ensign LG, Maurer HM. *Second malignant neoplasms in children treated for rhabdomyosarcoma*. Intergroup Rhabdomyosarcoma Study Committee. J Clin Oncol 11 (1993) 262-270.
- Hickey WF. *Migration of hematogenous cells through the blood-brain barrier and the initiation of CNS inflammation*. Brain Pathol 1 (1991) 97-105.
- Hirano N, Butler M, von Bergwelt-Baildon M, Maecker B, Schultze J, O'Connor K, Schur P, Kojima S, Guinan E, Nadler L: Autoantibodies frequently detected in patients with aplastic anemia: Blood 102 (2003) 4567-4575.
- Hirano T, Kinoshita N, Morikawa K, Yanagida M. *Snap helix with knob and hole: essential repeats in S. pombe nuclear protein nuc2⁺*. Cell 60 (1990) 319-328.
- Hong H, Morshed S, Tanaka S, Fujiwara T, Ikehara Y, Nishioka M. *Anti-Golgi antibody in rheumatoid arthritis patients recognizes a novel antigen of 79kDa by western blot*. Scand J Immunol 36 (1992) 785-792.
- Horii A, Han H, Sasaki S, Shimada M, Nakamura Y. *Cloning, characterisation and chromosomal assignment of the human genes homologous to yeast PMS1, a member of mismatch repair genes*. Biochem Biophys Res Commun 204 (1994) 1257-1264.
- Horikoshi M, Sekimizu K, Hirashima S, Mitsuhashi Y, Natori S. *Structural relationships of the three stimulatory factors of RNA polymerase II from Ehrlich ascites tumor cells*. J Biol Chem 260 (1985) 5739-5744.
- Huang H, Colella S, Kurrer M, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. *Gene expression profiling of low-grade diffuse astrocytomas by cDNA arrays*. Cancer Res 60 (2000) 6868-6874.
- Huidbuchel E, Blaschek M, Seigneurin J, Lamour A, Berthelot J, Youinou P. *Anti-organelle and anti-cytoskeletal autoantibodies in the serum of Epstein-Barr virus-infected patients*. Ann Med Interne (Paris) 142 (1991) 343-346.
- Hum Gene Ther 13 (2002) 1711-1721.
- Hunter T, Karin M. *The regulation of transcription by phosphorylation*. Cell 70 (1992) 375-387.
- Hunter T. *Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signalling*. Cell 80 (1995) 225-236.
- Hwang I, Gottlieb P. *Bop: a new T-cell-restricted gene located upstream of and opposite to mouse CD8b*. Immunogenetics 42 (1995) 353-361.
- Jäger D, Jäger E, Knuth A, Chen Y, Old L. *Antigens recognized by autologous antibody in patients with renal-cell carcinoma*. Int J Cancer 83 (1999) 456-464.
- Jäger E, Jäger D und Knuth A₍₂₎. *CTL-defined cancer vaccines: Perspectives for active immunotherapeutic interventions in minimal residual disease*. Cancer Metastasis Reviews 18 (1999) 143-150.
- Jäger E, Knuth A₍₁₎. *Stand und Perspektiven der therapeutischen Vakzinierung mit bekannten Tumorantigenen*. Onkologe 5 (1999) 695-700.
- Jäger E, Ringhoffer M, Dienes HP, Arand M, Karbach J, Jäger D, Ilsemann C, Hagedorn M, Oesch F, Knuth A. *Granulocyte macrophage colony-stimulating factor enhances immune responses to melanoma associated peptides in vivo*. Int J Cancer 67 (1996) 54-62.
- Jandreski MA, Sole MJ, Liew CC. *Two different forms of beta myosin heavy chain are expressed in human striated muscle*. Hum Genet 77 (1987) 127-131.
- Jullien-Flores V, Dorseuil O, Romero F, Letourneur F, Saragosti S, Berger R, Tavitian A, Gacon G, Camonis J. *Bridging Ral GTPase to Rho pathway*. s J Biol Chem 270 (1995) 22473-22477.
- Kairemo KJ, Lindahl H, Merenmies J, Fohr A, Nikkinen P, Karonen SL, Makiperna A, Hockerstedt K, Goldenberg DM, Heikinheimo M. *Anti-alpha-fetoprotein imaging is useful for staging hepatoblastoma*. Transplantation 73 (2002) 1151-1154.
- Kalebic T, Tsokos M, Helman LJ. *Suppression of rhabdomyosarcoma growth by fumagillin analog TNP-470*. Int J Cancer 68 (1996) 596-599.

- Kanaar R; Hoeijmakers J, van Gent D. *Molecular mechanisms of DNA double strand break repair*. Trends Cell Biol 8 (1998) 483-489.
- Kanai A, Kuzuhara T, Sekimizu K, Natori S. *Heterogeneity and tissue-specific expression of eukaryotic transcription factor S-II-related Protein mRNA*. J Biochem (Tokyo) 109 (1991) 674-677.
- Karsch-Mizrachi I, Travis M, Blau H, Leinwand L. *Expression and DNA sequence analysis of a human embryonic skeletal muscle myosin heavy chain gene*. Nucleic Acids Res 17 (1989) 6167-6179.
- Kelly KM, Womer RB, Sorensen PHB, Xiong Q-B, Barr FG. *Common and variant gene fusions predict distinct clinical phenotypes in rhabdomyosarcoma*. J Clin Oncol 15 (1997) 1831-1836.
- Kenmochi N, Kawaguchi T, Rozen S, Davis E, Goodman N, Hudson T, Tanaka T, Page D. *A map of 75 ribosomal protein genes*. Genom Res 8 (1998) 509-523.
- Kilpatrick SE, Teot LA, Geisinger KR, Martin PL, Shumate DK, Zbieransky N, Russell GB, Fletcher CD. *Relationship of DNA ploidy to histology and prognosis in rhabdomyosarcoma*. Cancer 74 (1994) 3227-3233.
- Kingsley DM, Kozarsky KF, Segal M, Krieger M. *Three types of low density lipoprotein receptor-deficient mutant have pleiotropic defects in the synthesis of N-linked, O-linked, and lipid-linked carbohydrate chains*. J Cell Biol 102 (1986) 1576-85.
- Knuth A, Jäger D, Jäger E. *Cancer immunotherapy in clinical oncology*. Cancer Chemother Pharmacol 46 (2000) 46-51.
- Köhler A, Schmidt-Zachmann M, Franke W. *AND-1, a natural chimeric DNA-binding protein, combines an HMG-box with regulatory WK-repeats*. J Cell Sci 110 (1997) 1051-1062.
- Kooy J, Toh B, Gleeson P. *Heterogeneity of human anti-Golgi auto-antibodies: reactivity with components from 35 to 260 kDA*. Immunol Cell Biol 72 (1994) 123-127.
- Kooy J, Toh B, Pettitt J, Erlich R, Gleeson P. *Human autoantibodies reagents to conserved Golgi components: characterization of a peripheral, 230-kDA compartment-specific Golgi protein*. J Biol Chem 267 (1992) 20255-20263.
- Koscielniak E, Klingebiel TH, Peters C, Hermann J, Burdach ST, Bender-Gotze C, Müller-Wehrich ST, Treuner J. *Do patients with metastatic and recurrent rhabdomyosarcoma benefit from high-dose therapy with hematopoietic rescue: report of the German/Austrian pediatric bone marrow transplantation group*. Bone Marrow Transplant 19 (1997) 227-231.
- Koscielniak E, Morgan M, Treuner J. *Soft tissue sarcoma in children: prognosis and management*. Paediatr Drugs 4(2002) 21-28.
- Krackhardt AM, Witzens M, Harig S, Hodi FS, Zauls AJ, Chessia M, Barrett P, Gribben JG. *Identification of tumor-associated antigens in chronic lymphocytic leukemia by SEREX*. Blood 100 (2002) 2123-2131.
- Kuball J, Wölfel T. *Übersicht laufender Immuntherapiestudien*. Onkologe 5 (1999) 701-708.
- Kumar J, Yu H, Sheetz M. *Kinectin, an essential anchor for kinesin-driven vesicle motility*. Science (Washington DC) 267 (1995) 1834-1837.
- Labeit S, Barlow D, Gautel M, Gibson T, Holt J, Hsieh C, Francke U, Leonard K, Wardale J, Whiting A, Trinick J. *A regular pattern of two types of 100-residue motif in the sequence of titin*. Nature 345 (1990) 273-276.
- Labeit S, Kolmerer B. *Titins: Giant proteins in charge of muscle ultrastructure and elasticity*. Science 270 (1995) 293-296.
- Labhart P, Morgan G. *Identification of novel genes encoding transcripton elongation factor TFIIIS (TCEA) in vertebrates: conservation of three distinct TFIIIS isoforms in frog, mouse, and human*. Genomics 52 (1998) 278-288.
- Latres E, Drobnjak M, Pollack D, Oliva MR, Ramos M, Karpeh M, Woodruff JM, Cordon-Cardo C. *Chromosome 17 abnormalities and p53 mutations in adult soft tissue sarcomas*. Am J Pathol 145 (1994) 345-355.

- Leach F, Koh M, Sharma K, McWilliams G, Talifero-Smith L, Codd A, Olea R, Elbahloul O. *Mismatch repair gene mutations in renal cell carcinoma*. *Cancer Biol Ther* 1 (2002) 530-536.
- Leach F, Nicolaides N, Papadopoulos N, Liu B, Jen J, Parsons R, Peltomäki P, Sistonen P, Aaltonen L, Nystrom-Lahti M. *Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer*. *Cell* 75 (1993) 1215-1225.
- Lee A, Obata Y, Yoshida M, Stockert E, Williamson B, Jungbluth A, Chen Y, Old L, Scanlan M. *Immunomic analysis of human sarcoma*. *PNAS* 100 (2003) 2651-2656.
- Lee S, Anzick S, Choi J, Bubendorf L, Guan X, Jung Y, Kallioniemi O, Kononen J, Trent J, Azorsa D, Jhun B, Cheong J, Lee Y, Meltzer P, Lee J. *A nuclear factor, ASC-2, as a cancer-amplified transcriptional coactivator essential for ligand-dependent transactivation by nuclear receptors in vivo*. *J Biol Chem* 274 (1999) 34283-24293.
- Levine EA. *Prognostic factors in soft tissue sarcoma*. *Semin Surg Oncol* 17 (1999) 23-32.
- Li G, Miles A, Line A, Rees RC. *Identification of tumour antigens by serological analysis of cDNA expression cloning*. *Cancer Immunol Immunother* 53 (2004) 139-143.
- Li J, Yang Y, Fujie T, Baba K, Ueo H, Mori M, Akiyoshi T. *Expression of BAGE, GAGE, and MAGE genes in human gastric carcinoma*. *Clin Cancer Res* 2 (1996) 1619-1625.
- Lin F, Worman H. *Expression of nuclear Lamins in human tissues and cancer cell lines and transcription from the promoters of the Lamin A/C and B1 genes*. *Exp Cell Res* 236 (1997) 378-384.
- Lin F, Worman H. *Structural organisation of the human gene encoding nuclear lamin A and nuclear lamin C*. *J Biol Chem* 268 (1993) 16321-16326.
- Lin J, Wyszynski M, Madhavan R, Sealock R, Kim J, Sheng M. *Yotiao, a novel protein of neuromuscular junction and brain that interacts with specific splice variants of NMDA receptor subunit NR1*. *J Neurosci* 18 (1998) 2017-2027.
- Lindblom A, Tannergard P, Werelius B, Nordenskjöld M. *Genetic mapping of a second locus predisposing to hereditary non-polyposis colon cancer*. *Nat Genet* 5 (1993) 279-282.
- Linder P, Lasko PF, Ashburner M, Leroy P, Nielsen PJ, Nishi K, Schnier J, Slonimski PP. *Birth of the D-E-A-D box*. *Nature (Lond.)* 337 (1989) 121-122.
- Linehan D, Bowne W, Lewis J. *Immunotherapeutic approaches to sarcoma*. *Semin Surg Oncol* 17 (1999) 72-77.
- Lipshultz SE, Colan SD, Gelber RD, Perez-Atayde AR, Sallan SE, Sanders SP. *Late cardiac effects of doxorubicin therapy for acute lymphoblastic leukemia in childhood*. *N Engl J Med* 324 (1991) 808-15.
- Liu B, Parsons R, Papadopoulos N, Nicolaides N, Lynch H, Watson P, Watson P, Jass J, Dunlop M, Wyllie A, Peltomäki P, de la Chapelle A. *Analysis of mismatch repair genes in hereditary non-polyposis colorectal cancer patients*. *Nat Med* 2 (1996) 169-174.
- Liu T, Yan H, Kuismanen S, Percesepe A, Bisgaard ML, Pedroni M, Benatti P, Kinzler K, Vogelstein B, de Leon M, Peltomäki P, Lindblom A. *The Role of hPMS1 and hPMS2 in predisposing to colorectal cancer*. *Cancer Research* 61 (2001) 7798-7802.
- Livingston P. *Ganglioside vaccines with emphasis on GM2*. *Semin Oncol* 25 (1998) 636-645.
- Livingston PO, Natoli EJ, Calves MJ, Stockert E, Oettgen HF, Old LJ. *Vaccines containing purified GM2 ganglioside elicit GM2 antibodies in melanoma patients*. *Proc Natl Acad Sci USA* 84 (1987) 2911-2915.
- Lund A, Knudsen SM, Vissing H, Clark B, Tommerup N. *Assignment of human elongation factor 1-alpha genes: EEF1A maps to chromosome 6q14 and EEF1A2 to 20q13.3*. *Genomics* 36 (1996) 359-361.
- Machiels B, Ramaekers F, Kuijpers H, Groenewoud J, Oosterhuis J, Looijenga L. *Nuclear lamin expression in normal testis and testicular germ cell tumours of adolescents and adults*. *J Pathol.* 182 (1997) 197-204.

- Machiels B, Zorrenc A, Endert J, Kuijpers H, van Eys G, Ramaekers F, Broers J. *An alternative splicing product of the Lamin A/C gene lacks exon 10*. J Biol Chem 271 (1996) 9249-9253.
- Magrath I, Lee Y, Anderson T, Henle W, Ziegler J, Simon R, Schein P. *Prognostic factors in Burkitt's lymphoma: importance of total tumor burden*. Cancer (Phila.) 45 (1980) 1507-1515.
- Magro G, Schiappacassi M, Perissinotto D, Corsaro A, Borghese C, Belfiore A, Colombatti A, Grasso S, Botti C, Bombardieri E, Perris R. *Differential expression of mucins 1-6 in papillary thyroid carcinoma: evidence for transformation-dependent post-translational modifications of MUC1 in situ*. J Pathol (2003) 357-369.
- Mahdvi V, Periasamy M, Nadal-Ginard B. *Molecular characterization of two myosin heavy chain genes expressed in the adult heart*. Nature 297 (1982) 659-664.
- Mahvi DM, Shi FS, Yang NS, Weber S, Hank J, Albertini M, Schiller J, Schalch H, Larson M, Pharo L, Gan J, Heisey D, Warner T, Sondel PM. *Immunization by particle-mediated transfer of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene into autologous tumor cells in melanoma or sarcoma patients: report of a phase IIIB study*. Hum Gene Ther 13 (2002) 1711-1721.
- Mahvi DM, Sondel PM, Yang NS, Albertini MR, Schiller JH, Hank J, Heiner J, Gan J, Swain W, Logrono R. *Phase IIIB study of immunization with autologous tumor cells transfected with the GM-CSF gene by particle-mediated transfer in patients with melanoma or sarcoma*. Human Gene 8 (1997) 875-891.
- Malka D, Pham B, Courvalin J, Corbic M, Pessayre D, Erlinger S. *Acute hepatitis caused by alverine associated with anti-lamin A and C autoantibodies*. J Hepatol 27 (1997) 399-403.
- Martelange V, De Smet C, De Plaen, Lurquin C, Boon T. *Identification on a human sarcoma of two new genes with tumor-specific expression*. Cancer Res 60 (2001) 3848-3855.
- Marti R, Kunz C, Fleck O. *DNA mismatch repair and mutation avoidance pathways*. J Cell Physiol 191 (2002) 28-41.
- Matsuoka R, Yoshida MC, Kanda N, Kimura M, Ozasa H, Takao A. *Human cardiac myosin heavy chain gene mapped within chromosome region 14q11.2-q13*. Am J Med Genet 32 (1989) 279-284.
- Matzinger P. *Tolerance, danger, and the extended family*. Ann Rev Immunol 12 (1994) 991-1045.
- Mayet W, Hermann E, Csernok E, Knuth A, Poralla T, Gross W, Meyer zum Buschenfelde K. *A human renal cancer line as a new antigen source for the detection of antibodies to cytoplasmic and nuclear antigens in sera of patients with Wegener's granulomatosis*. J Immunol Methods 143 (1991) 57-68.
- McKeon F, Kirschner M, Caput D. *Homologies in both primary and secondary structure between nuclear envelope and intermediate filament proteins*. Nature 319 (1986) 463-468.
- Meng H, Lu C, Mabuchi H, Tanigawa N. *Prognostic significance and different properties of survivin splicing variants in gastric cancer*. Cancer Lett 216 (2004) 147-155.
- Meyer WH, Spunt SL. *Soft tissue sarcomas of childhood*. Cancer Treat Rev 30 (2004) 269-280.
- Modrich P. *Strand-specific mismatch repair in mammalian cells*. J Biol Chem 272 (1997) 24727-24730.
- Moir R, Spann T, Goldman R. *The dynamic properties and possible functions of nuclear lamins*. Int Rev Cytol 162B (1995) 141-182.
- Morison IM, Reeve AE. *Insulin-like growth factor 2 and overgrowth: molecular biology and clinical implications*. Mol Med Today 4 (1998) 110-115.
- Moss S, Krivosheyev V, de Souza A, Chin K, Gaetz H, Chaudhary N, Worman H, Holt P. *Decreased and aberrant nuclear lamin expression in gastrointestinal tract neoplasm*. Gut 45 (1999) 723-729.
- Mounkes L, Kozlov S, Burke B, Stewart C. *The laminopathies: nuclear structure meets disease*. Curr Opin Genet Dev 13 (2003) 223-230.
- Muris D, Bezzubova O, Buerstedde J, Vreeken K, Balajee A, Osgood C, Troelstra C, Hoeijmakers J, Ostermann K, Schmidt H. *Cloning of human and mouse genes homologous to RAD52, a yeast gene involved in DNA repair and recombination*. Mutat Res 315 (1994) 295-305.

- Nagle RB. *A review of intermediate filament biology and their use in pathologic diagnosis*. Mol Biol Rep 19 (1994) 3-21.
- Newton WA, Gehan EA, Webber BL, Marsden HB, van Unnik AJ, Hamoudi AB, Tsokos MG, Shimada H, Harms D, Schmid D. *Classification of rhabdomyosarcomas and related sarcomas. Pathologic aspects and proposal for a new classification- an Intergroup Rhabdomyosarcoma Study*. Cancer 76 (1995) 1073-1085.
- Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, Wei YF, Carter KC, Ruben SM, Rosen CA, Haseltine WA, Fleischmann RD, Fraser CM, Adams MC, Venter JC, Dunlop M, Hamilton SR, Petersen GM, de la Chapelle A, Vogelstein B, Kinzler KW. *Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer*. Nature 371 (1994) 75-80.
- Niggli FK, Powell JE, Parkes SE, Ward K, Raafat F, Mann JR, Stevens MC. *DNA ploidy and proliferative activity (S-phase) in childhood soft-tissue sarcomas: their value as prognostic indicators*. Br J Cancer 69 (1994) 1106-1110.
- Nishi M, Hatae Y. *Epidemiology of malignant neoplasms in soft tissue during childhood*. J Exp Clin Cancer Res 23 (2004) 437-440.
- Nishikawa H, Kato T, Tanida K, Hiasa A, Tawara I, Ikeda H, Ikarashi Y, Wakasugi H, Kronenberg M, Nakayama T, Taniguchi M, Kuribayashi K, Old L, Shiku H. *CD4⁺ CD25⁺ T cells responding to serologically defined autoantigens suppress antitumor immune responses*. Proc Natl Acad Sci 100 (2003) 10902-10906.
- Nishikawa H, Tanida K, Ikeda H, Sakakura M, Yoshihiro M, Takumi A, Mukai K, Watanabe M, Kuribayashi K, Old L, 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.
- Nozawa K, Casiano C, Hamel J, Molinaro C, Fritzler M, Chan E. *Fragmentation of Golgi complex and Golgi autoantigens during apoptosis and necrosis*. Arthritis Res 4 (2002) R3.
- Obata Y, Takahashi T, Sakamoto J, Tamaki H, Tominaga S, Hamajima N, Chen Y, Old L. *SEREX analysis of gastric cancer antigens*. Cancer Chemother Pharmacol 46 (2000) 37-42.
- Ohira M, Ootsuyama A, Suzuki E, Ichidawa H, Seki N, Nagase T, Monura N, Ohki M. *Identification of a novel human gene containing the tetratricopeptide repeat domain from the Down syndrome region of chromosome 21*. DNA Res 3 (1996) 9-16.
- Old L, Chen Y. *New paths in human cancer serology*. J Exp Med 187 (1998) 1163-1167.
- Old LJ. *Cancer immunology: the search for specificity-G.H.A. Clowes memorial lecture*. Cancer Res 41 (1981) 361-376.
- Olschwang S. *Germline mutation and genome instability*. Eur J Cancer Prev 8 (1999) 33-37.
- Olsen RJ, Tarantolo SR, Hinrichs SH. *Molecular approaches to sarcoma therapy*. Sarcoma 6 (2002) 27-42.
- Ong L, Lim A, Er C, Kuznetsov S, Yu H. *Kinectin-kinesin binding domains and their effects on organelle motility*. J Biol Chem 275 (2000) 32854-32860.
- Ortega JA, Donaldson SS, Ivy SP, Pappo A, Maurer HM. *Venoocclusive disease of the liver after chemotherapy with vincristine, actinomycin D, and cyclophosphamide for the treatment of rhabdomyosarcoma. A report of the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study Group, Children's Cancer Group, and the Pediatric Intergroup Statistical Center*. Cancer 79 (1997) 2435-2439.
- Osborn M, Hill C, Altmannsberger M, Weber K. *Monoclonal antibodies to titin in conjunction with antibodies to desmin separate rhabdomyosarcoma*. Lab Invest 55 (1986) 101-108.
- Pachler K, Karl T, Kolmann K, Mehler N, Eder M, Loeffler M, Oender K, Hochleitner EO, Lottspeich F, Bresgen N, Richter K, Breitenbach M, Koller L. *Functional interaction in establishment of ribosomal integrity between small subunit protein rpS6 and translational regulator rpL10/Grc5p*. FEMS Yeast Res 5 (2004) 271-280.
- Pandita A, Zielenska M, Thorner P, Bayani J, Godbout R, Greenberg M, Squire JA. *Application of comparative genomic hybridisation, spectral karyotyping and microarray analysis in the identification of subtype-specific patterns of genomic changes in rhabdomyosarcoma*. Neoplasia 1 (1999) 262-275.

- Papadopoulos N, Nicolaides N, Wei Y, Ruben S, Carter K, Rosen C, Haseltine W, Fleischmann R, Fraser C, Adams M, Venter J, Hamilton S, Petersen G, Watson P, Lynch H, Peltomaki, P, Mecklin J, de la Chapelle A, Kinzler K, Vogelstein B. *Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer*. Science 263 (1994) 1625-1629.
- Pappo AS, Crist WM, Kuttesch J, Rowe S, Ashmun AR, Maurer HM, Newton WA, Asmar L, Luo X, Shapiro DN. *Tumor-cell DNA content predicts outcome in children and adolescents with clinical group III embryonal rhabdomyosarcoma*. J Clin Oncol 11 (1993) 1901-1905.
- Pappo AS, Lyden E, Breneman J, Wiener E, Teot L, Meza J, Crist W, Vietti T. *Up-front window trial of topotecan in previously untreated children and adolescents with metastatic rhabdomyosarcoma: an intergroup rhabdomyosarcoma study*. J Clin Oncol 19 (2001) 213-219.
- Paques F, Haber J. *Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol Mol Biol Rev 63 (1999) 369-404.
- Parham D. *Pathologic classification of rhabdomyosarcomas and correlations with molecular studies*. Modern Pathology 14 (2001) 506-514.
- Pastink A, Lohman P. *Repair and consequences of double-strand breaks in DNA*. Mutat Res 428 (1999) 141-156.
- Peltomaki P, Vasen H. *Mutations predisposing to hereditary non-polyposis colorectal cancer: database and results of a collaborative study. The International Collaborative Group on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer*. Gastroenterology 113 (1997) 1146-1158.
- Philipp T, Obermayer-Straub P, Manns M. *Autoantibodies in hepatitis delta*. Biomed Pharmacother 49 (1995) 344-349.
- Pieper R, Christian RE, Gonzales MI, Nishimura MI, Gupta G, Settlage RE, Shabanowitz J, Rosenberg SA, Hunt DF, Topalian SL. *Biochemical identification of a mutated human melanoma antigen recognized by CD4⁺ T cells*. J Exp Med 189 (1999) 757-766.
- Print C, Morris C, Spurr N, Rooke L, Krissansen G. *The CG-1 gene, a member of the kinectin and ES/130 family, maps to human chromosome band 14q22*. Immunogenetics 43 (1996) 227-229.
- Probst-Kepper M, Stroobant V, Kridel R, Gaugler B, Landry C, Brasseur F, Cosyns J, Weynand B, Boon T, Van Den Eynde B. *An alternative open reading frame of the human macrophage colony-stimulating factor gene is independently translated and codes for an antigenic peptide of 14 amino acids recognized by tumor-infiltrating CD8 T lymphocytes*. J Exp Med 193 (2001) 1189-1198.
- Prolla TA, Abuin A, Bradley A. *DNA mismatch repair deficient mice in cancer research*. Semin Cancer Biol 7 (1996) 241-247.
- Prolla TA, Baker SM, Harris AC, Tsao JL, Yao X, Bronner CE, Zheng B, Gordon M, Reneker J, Arnheim N, Shibata D, Bradley A, Liskay RM. *Tumour susceptibility and spontaneous mutation in mice deficient in Mlh1, Pms1 and Pms2 DNA mismatch repair*. Nat Genet 18 (1998) 276-279.
- Pulciani S, Santos E, Lauver AV, Long LK, Barbacid M. *Oncogenes in solid human tumours*. Nature 300 (1982) 539-542.
- Qian X, Gozani SN, Yoon H, Jeon CJ, Agarwal K, Weiss MA. *Novel zinc finger motif in the basal transcriptional machinery: three-dimensional NMR studies of the nucleic acid binding domain of transcriptional elongation factor TFIIIS*. Biochemistry 32 (1993) 9944-9959.
- Qiu Y, Robinson D, Pretlow T, Kung H. *Etk/Bmx, a tyrosine kinase with a pleckstrin-homology domain, is an effector of phosphatidylinositol 3'-kinase and is involved in interleukin 6 induced neuroendocrine differentiation of prostate cancer cells*. Proc Natl Acad Sci USA 95 (1998) 3644-3649.
- Quin H, Kemp J, Yip M, Lam-Po-Tang P, Hoh J, Morris B. *Localization of human cardiac beta-myosin heavy chain gene (MYH7) to chromosome 14q12 by in situ hybridisation*. Cytogenet Cell Genet 54 (1990) 74-76.

- Raney B, Ensign LG, Foreman J, Khan F, Newton W, Ortega J, Ragab A, Wharam M, Wiener E, Maurer H. *Renal toxicity of ifosfamide in pilot regimens of the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study for patients with gross residual tumor.* Am J Pediatr Hematol Oncol 16 (1994) 286-295.
- Raney B, Maurer H, Anderson J, Andrassy R, Donaldson S, Qualman S, Wharam M, Wiener E, Crist W⁽¹⁾. *The Intergroup Rhabdomyosarcoma Study Group: major lessons from IRS-I through IRS-IV studies as background for the current IRS-V treatment protocols.* Sarcoma 5 (2001) 9-15.
- Raney RB, Anderson JR, Barr FG, Donaldson SS, Pappo AS, Qualman SJ, Wiener ES, Maurer HM, Crist WM⁽²⁾. *Rhabdomyosarcoma and undifferentiated sarcoma in the first two decades of life: a selective review of intergroup rhabdomyosarcoma study group experience and rationale for Intergroup Rhabdomyosarcoma Study V.* J Pediatr Hematol Oncol 23 (2001) 215-220.
- Rappaport J, Reinberg D, Zandomeni R, Weinmann R. *Purification and functional characterisation of transcription factor SII from calf thymus.* J Biol Chem 262 (1987) 5227-5232.
- Rauer S, Andreou I⁽¹⁾. *Tumor progression and serum anti-HuD antibody concentration in patients with paraneoplastic neurological syndromes.* Eur Neurol 47 (2002) 189-195.
- Rauer S, Czygan M, Kaiser R⁽²⁾. *Quantification of circulating anti-Hu antibody in serial samples from patients with paraneoplastic neurological syndromes: possible correlation of antibody concentration and course of neurological symptoms.* J Neurol 249 (2002) 285-289.
- Rauer S, Kaiser R. *Enzyme linked immunosorbent assay using recombinant HuD-autoantigen for serodiagnosis of paraneoplastic neurological syndromes.* Acta Neurol Scand 103 (2001) 248-254.
- Reinberg D, Roeder R. *Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II. transcription factor IIS stimulates elongation of RNA chains.* J Biol Chem 262 (1987) 3331-3337.
- Reines D, Chamberlin M, Kane C. *Transcription elongation factor SII (TFIIS) enables RNA polymerase II to elongate through a block to transcription in a human gene in vitro.* J Biol Chem 264 (1989) 1079-1080.
- Reines D, Conaway JW, Conaway RC. *The RNA polymerase II general elongation factors.* Trends Biochem Sci 21 (1996) 351-355.
- Richman CM, DeNardo SJ. *Systemic radiotherapy in metastatic breast cancer using 90Y-linked monoclonal MUC-1 antibodies.* Crit Rev Oncol Hematol 38 (2001) 25-35.
- Rodriguez J, Gelpi C, Thomson T, Real F, Fernandez J. *Anti-Golgi complex autoantibodies in a patient with Sjögren syndrome and lymphoma.* Clin Exp Immunol 49 (1982) 579-586.
- Roeber R, Weber K, Osborn M. *Differential timing of nuclear lamin A/C expression in the various organs of the mouse embryo and the young animal: a developmental study.* Development 105 (1989) 365-378.
- Romi F, Gilhus N, Varhaug J, Myking A, Aarli J⁽¹⁾. *Thymectomy in nonthymoma early-onset myasthenia gravis in correlation with disease severity and muscle autoantibodies.* Eur J Neurol 49 (2003) 210-217.
- Romi F, Gilhus N, Varhaug J, Myking A, Aarli J⁽²⁾. *Disease severity and outcome in thymoma myasthenia gravis: a long-term observation study.* Eur J Neurol 10 (2003) 701-706.
- Romi F, Skeie G, Aarli J, Gilhus N⁽¹⁾. *Muscle autoantibodies in subgroups of myasthenia gravis patients.* J Neurol 247 (2000) 369-375.
- Romi F, Skeie G, Aarli J, Gilhus N⁽²⁾. *The severity of myasthenia gravis correlates with the serum concentration of titin and ryanodine receptor antibodies.* Arch Neurol 57 (2000) 1596-1600.
- Rosenberg SA. *Development of cancer immunotherapies based on identification of the genes encoding cancer regression antigens.* J Natl Cancer Inst 88 (1996) 1635-1644.
- Roskrow MA, Ziber A, Souquet M, Dilloo D. *Tumor vaccines – application to childhood cancer.* Klin Pädiatr 211 (1999) 336-346.

- Sahin U, Neumann F, Tureci O, Schmits R, Perez F, Pfreundschuh M. *Hodgkin and Reed-Sternberg cell-associated autoantigen CLIP-170/restin is a marker for dendritic cells and is involved in the trafficking of macropinosomes to the cytoskeleton, supporting a function-based concept of Hodgkin and Reed-Sternberg cells.* Blood 100 (2002) 4139-4145.
- Sahin U, Türeci Ö, Pfreundschuh M. *Serological identification of human tumor antigens.* Curr Opin Immunol 9 (1997) 709-716.
- Sahin U, Türeci Ö, Pfreundschuh M. *Vom Immunsystem erkennbare Antigene auf menschlichen Malignomen.* Onkologe 5 (1999) 659-667.
- Sahin U, Türeci Ö, Schmitt H, Cochlovius B, Johannes T, Schmits R, Stenner F, Luo G, Schobert I, Pfreundschuh M. *Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host.* Proc Natl Acad Sci USA 92 (1995) 11810-11813.
- Sartelet H, Lantuejoul S, Amari-alla C, Pin I, Delattre O, Brambilla E. *Solid alveolar rhabdomyosarcoma of the thorax in a child.* Histopathology 32 (1998) 165-171.
- Satoh M, Takahashi M, Sakamoto, Hiroe M, Marumo F, Kimura A. *Structural analysis of the titin gene in hypertrophic cardiomyopathy: identification of a novel disease gene.* Biochem Biophys Res Commun 262 (1999) 411-417.
- Scanlan MJ, Gordan JD, Williamson B, Stockert E, Bander NH, Jongeneel V, Gure AO, Jager D, Jager E, Knuth A, Chen YT, Old LJ. *Antigens recognized by autologous antibody in patients with renal-cell carcinoma.* Int J Cancer 83 (1999) 456-464.
- Scanlan M, Gure A, Jungbluth A, Old L, Chen Y. *Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy.* Immunol Rev 188 (2002) 22-32.
- Scheiffele P, Fullekrug J. *Glycosylation and protein transport.* Essays Biochem 36 (2000).
- Schiaffino S, Gorza L, Sartore S, Saggin L, Carli M. *Embryonic myosin heavy chain as a differentiation marker of developing human skeletal muscle and rhabdomyosarcoma. A monoclonal antibody study.* Exp Cell Res 163 (1986) 211-220.
- Schmid BC, Rudas M, Fabjani G, Speiser P, Kaserer K, Leodolter S, Zeillinger R. *Evaluation of MUC1 splice variants as prognostic markers in patients with ductal carcinoma in situ of the breast.* Oncol Rep 10 (2003) 1981-1985.
- Schmits R, Kubuschok B, Schuster S, Preuss K, Pfreundschuh M. *Analysis of the B cell repertoire against autoantigens in patients with giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica.* Clin Exp Immunol 379 (2002) 379-385.
- Schmittgen TD, Teske S, Vessella RL, True LD, Zakrajsek BA. *Expression of prostate specific membrane antigen and three alternatively spliced variants of PSMA in prostate cancer patients.* Int J Cancer 107 (2003) 323-329.
- Scrabble H, Witte D, Shimada H, Seemayer T, Wang-Wuu S, Soukup S, Koufos A, Houghton P, Lampkin B, Cavenee W. *Molecular differential pathology in rhabdomyosarcoma.* Genes Chromosomes Cancer 1 (1989) 23-35.
- Shapiro DN, Parham DM, Douglass EC, Ashmun R, Webber BL, Newton WA, Hancock ML, Maurer HM, Look AT. *Relationship of tumor-cell ploidy to histologic subtype and treatment outcome in children and adolescents with unresectable rhabdomyosarcoma.* J Clin Oncol 9 (1991) 159-166.
- Shen Z, Denison K, Lobb R, Gatewood J, Chen D. *The human and mouse homologs of the yeast RAD52 gene: cDNA cloning, sequence analysis, assignment to human chromosome 12p12.2-p13, and mRNA expression in mouse tissues.* Genomics 25 (1995) 199-206.
- Shim H, Dolde C, Lewis BC, Wu CS, Dang G, Jungmann RA, Dalla-Favera R, Dang CV. *c-Myc transactivation of LDH-A: implications for tumor metabolism and growth.* Proc Natl Acad Sci USA 94 (1997) 6658-6663.

- Shimizu K, Fields RC, Giedlin M, Mule JJ. *Systemic administration of interleukin 2 enhances the therapeutic efficacy of dendritic cell-based tumor vaccines*. Proc Natl Acad Sci USA 96 (1999) 2268-2273.
- Sikorski R, Michaud W, Hieter P. *p62^{cdc23} of Saccharomyces cerevisiae: A nuclear tetratricopeptide repeat protein with two mutable domains*. Mol Cell Biol 13 (1993) 1212-1221.
- Sikorski R, Michaud W, Wootton J, Boguski M, Connelly C, Hieter P. *TPR proteins as essential components of the yeast cell cycle*. Quant Biol 56 (1991) 663-673.
- Simons JW, Jaffee EM, Weber CE, Levitsky HI, Nelson WG, Carducci MA, Lazenby AJ, Cohen LK, Finn CC, Clift SM, Hauda KM, Beck LA, Leiferman KM, Owens AH Jr, Piantadosi S, Dranoff G, Mulligan RC, Pardoll DM, Marshall FF. *Bioactivity of autologous irradiated renal cell carcinoma vaccines generated by ex vivo granulocyte-macrophage colony-stimulating factor generates potent antitumor immunity in patients with metastatic melanoma*. Cancer Res 57 (1997) 1537-1546.
- Skeie G, Mygland A, Aarli J, Gilhus N. *Titin antibodies in patients with late-onset myasthenia gravis: clinical correlations*. Autoimmunity 20 (1995) 99-104.
- Skeie G. *Skeletal muscle titin: physiology and pathophysiology*. Cell Mol Life Sci 57 (2000) 1570-1576.
- Skipper J, Hendrickson R, Gulden P, Brichard V, Van Pel A, Chen Y, Shabanowitz J, Wölfel T, Slingluf C, Boon T. *An HLA-A2-restricted tyrosinase antigen on melanoma cells results from posttranslational modification and suggests a novel pathway for processing of membrane proteins*. J Exp Med 183 (1996) 527-534.
- Soiffer R, Lynch T, Mihm M, Jung K, Rhuda C, Schmollinger JC, Hodi FS, Liebster L, Lam P, Mentzer S, Singer S, Tanabe KK, Cosimi AB, Duda R, Sober A, Bhan A, Daley J, Neuberger D, Parry G, Rokovich J, Richards L, Drayer J, Berns A, Clift S, Cohen LK, Mulligan RC, Dranoff G. *Vaccination with irradiated autologous melanoma cells engineered to secrete human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor generates potent anti-tumor immunity in patients with metastatic melanoma*. Proc Natl Acad Sci USA 95 (1998) 13141-13146.
- Sorensen PH, Lynch JC, Qualman SJ, Tirabosco R, Lim JF, Maurer HM, Bridge JA, Crist WM, Triche TJ, Barr FG. *PAX3-FKHR and PAX7-FKHR gene fusions are prognostic indicators in alveolar rhabdomyosarcoma: a report from the children's oncology group*. J Clin Oncol 20 (2002) 2672-2679.
- Stadelmann B, Khandjian E, Hirt A, Luthy A, Weil R, Wagner HP. *Repression of nuclear lamin A and C gene expression in human acute lymphoblastic leukaemia and non-Hodgkin's lymphoma cells*. Leuk Res 14 (1990) 815-821.
- Stenner-Liewen F, Luo G, Sahin U, Tureci O, Koslovski M, Kautz I, Liewen H, Pfreundschuh M. *Definition of tumor-associated antigens in hepatocellular carcinoma*. Cancer Epidemiology 9 (2000) 285-290
- Storkus WJ, Zeh HJ 3rd, Maeurer MJ, Salter RD, Lotze MT. *Identification of human melanoma peptides recognized by class I restricted tumor infiltrating T lymphocytes*. J Immunol 151 (1993) 3719-3727.
- Stuurman N, Heins S, Aebi U. *Nuclear lamins: their structure, assembly and interactions*. J Struct Biol 122 (1998) 42-66.
- Takahashi M, Shibata H, Shimakawa M, Miyamoto M, Mukai H, Ono Y. *Characterization of a novel giant scaffolding protein, CG-NAP, that anchors multiple signaling enzymes to centrosome and the golgi apparatus*. J Biol Chem 274 (1999) 17267-17274.
- Takahashi Y, Oda Y, Kawaguchi K, Tamiya S, Yamamoto H, Suita S, Tsuneyoshi M. *Altered expression and molecular abnormalities of cell-cycle-regulatory proteins in rhabdomyosarcoma*. Mod Pathol 17 (2004) 660-669.
- Tepper R, Mule J. *Experimental and clinical studies of cytokine gene-modified tumor cells*. Hum Gene Ther 5 (1994) 153-164.
- Tilli C, Ramaekers F, Broers J, Hutchison C, Neumann H. *Lamin expression in normal human skin, actinic keratosis, squamous cell carcinoma and Basal cell carcinoma*. Br J Dermatol 148 (2003) 102-109.

- Toguchida J, Yamaguchi T, Ritchie B, Beauchamp RL, Dayton SH, Herrera GE, Yamamuro T, Kotoura Y, Sasaki MS, Little JB. *Mutation spectrum of the p53 gene in bone and soft tissue sarcomas*. *Cancer Res* 52 (1992) 6194-6199.
- Tong D, Volm T, Eberhardt E, Krainer M, Leodolter S, Kreienberg R, Zeillinger R. *Rad52 gene mutations in breast/ovarian cancer families and sporadic ovarian carcinoma patients*. *Oncol Rep* 10 (2003) 1551-1553.
- Tonin P, Scrabble H, Shimada H, Cavenee W. *Muscle-specific gene expression in rhabdomyosarcomas and stages of human fetal skeletal muscle development*. *Cancer Res* 51 (1991) 5100-5106.
- Topalian SL, Rivoltini L, Mancini M, Markus NR, Robbins PF, Kawakami Y, Rosenberg SA. *Human CD4⁺ T cells specifically recognize a shared melanoma-associated antigen encoded by the tyrosinase gene*. *Proc Natl Acad Sci USA* 91 (1994) 9461-9465.
- Toyoshima I, Yu H, Steuer E, Sheetz M. *Kinectin, a major kinesin-binding protein on ER*. *J Cell Biol* 118 (1992) 1121-1131.
- Tsai Y, Su Y, Fang S, Huang T, Qiu Y, Jou Y, Shih H, Kung H, Chen R. *Etk, a Btk family tyrosine kinase, mediates cellular transformation by linking Src to STAT3 activation*. *Mol Cell Biol* 20 (2000) 2043-2054.
- Tskhovrebova L, Trinick J. *Titin: properties and family relationships*. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4 (2003) 679-689.
- Tsukahara F, Hattori M, Muraki T, Sakaki Y. *Identification and cloning of a novel cDNA belonging to tetratricopeptide repeat gene family from Down syndrome-critical region 21q22.2*. *J Biochem* 120 (1996) 820-827.
- Turc-Carel C, Lizard-Nacol S, Justrabo E, Favrot M, Philip T, Tabone E. *Consistent chromosomal translocation in alveolar rhabdomyosarcoma*. *Cancer Genet Cytogenet* 19 (1986) 361-362.
- Türeci Ö, Sahin U, Zwick C, Neumann F, Pfreundschuh M. *Exploitation of the antibody repertoire of cancer patients for the identification of human tumor antigens*. *Hybridoma* 18 (1999) 23-28.
- Umar A, Boyer J, Thomas D, Nguyen D, Risinger J, Boyd J, Ionov Y, Kunkel T. *Defective mismatch repair in extracts of colorectal and endometrial cancer cell lines exhibit microsatellite instability*. *J Biol Chem* 269 (1994) 14367-14370.
- Umehara T, Kida S, Yamamoto T, Horikoshi M. *Isolation and characterisation of cDNA encoding a new type of human transcription elongation factor S-II*. *Gene* 167 (1995) 297-302.
- Van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, Knuth A, Boon T. *A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma*. *Science* 254 (1991) 1643-1647.
- Vilà M, Nicolás A, Morote J, de Tores I, Meseguer A. *Increased glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase expression in renal cell carcinoma identified by RNS-based, arbitrarily primed polymerase chain reaction*. *Cancer* 89 (2000) 52-164.
- Viola A, Lanzavecchia A. *T cell activation determined by T-cell receptor number and tunable thresholds*. *Science* 273 (1996) 104-106.
- Voltz R, Albrich W, Nägele A, Schumm F, Wick M, Freiburg A, Gautel M, Thaler H, Aarli J, Kirchner T, Hohlfeld R. *Paraneoplastic myasthenia gravis: Detection of anti-MGT30 (titin) antibodies predicts thymic epithelial tumor*. *Neurology* 49 (1997) 1454-1457.
- Waldmüller S, Sakthivel S, Saadi A, Selignow C, Rakesh P, Golubenko M, Joseph K, Padmakumar R, Richard P, Schwartz K, Tharakan J, Rajamanickam C, Vosberg HP. *Novel deletions in MYH7 and MYBPC3 identified in Indian families with familial hypertrophic cardiomyopathy*. *J Mol Cell Card* 35 (2003) 623-636.
- Wang HC, Su YR, Han KJ, Pang XW, Peng JR, Liang B, Wang S, Chen WF. *Multiple variants and a differential splicing pattern of kinectin in human hepatocellular carcinoma*. *Biochem Cell Biol* 82 (2004) 321-327.
- Wang R, Rosenberg S. *Human tumor antigens recognized by T lymphocytes: implications for cancer therapy*. *J Leukoc Biol* 60 (1996) 296-309.

- Wang RF, Wang X, Rosenberg SA. Identification of a novel major histocompatibility complex class II-restricted tumor antigen resulting from a chromosomal rearrangement recognized by CD4⁺ T cells. *J Exp Med* 189 (1999) 1659-1668.
- Wang Y, Han K, Pang X, Vaughan H, Qu W, Dong X, Peng J, Zhao H, Rui J, Leng X, Cebon J, Burgess A, Chen W. *Large scale identification of human hepatocellular carcinoma-associated antigens by autoantibodies.* *J Immunol* 169 (2002) 1102-1109.
- Warrick H, Spudich J. *Myosin structure and function in cell motility.* *Ann Rev Cell Biol* 3 (1987) 379-421.
- Weaver Z, Kane C. *Genomic characterisation of a testis-specific TFIIIS (TCEA2) gene.* *Genomics* 46 (1997) 516-519.
- Webster C, Silberstein J, Hays A, Blau H. *Fast muscle fibers are preferentially affected in Duchenne muscular dystrophy.* *Cell* 52 (1988) 503-513.
- Westphal R, Tavalin S, Lin J, Alto N, Fraser I, Langeberg L, Sheng M, Scott J. *Regulation of NMDA receptors by an associated phosphatase-kinase signaling complex.* *Science* 285 (1999) 93-96.
- Whalen R, Sell S, Butler-Browne G, Schwartz K, Bouveret P, Pinset-Harstom I. *Three myosin heavy-chain isozymes appear sequentially in rat muscle development.* *Nature* 292 (1981) 805-809.
- Wilson K. *The nuclear envelope, muscular dystrophy and gene expression.* *Trends Cell Biol* 10 (2000) 125-129.
- Winkler U, Schnell R, Engert A. *Einsatz mono- und bispezifischer Antikörper in der Tumortherapie.* *Onkologe* 5 (1999) 679-687.
- Witczak O, Skalhegg B, Keryer G, Bornens M, Tasken K, Jahnsen T, Orstavik S. *Cloning and characterization of a cDNA encoding an A-kinase anchoring protein located in the centrosome, AKAP450.* *EMBO J* 18 (1999) 1858-1868.
- Wurm J, Constantinidis J, Grabenbauer GG, Iro H. *Rhabdomyosarcomas of the nose and paranasal sinuses: treatment results in 15 cases.* *Otolaryngol Head Neck Surg* 133 (2005) 42-50.
- Wydner K, McNeil J, Lin F, Worman H, Lawrence J. *Chromosomal assignment of human nuclear envelope protein genes LMNA, LMNB1, and LBR by fluorescence in situ hybridisation.* *Genomics* 32 (1996) 474-478.
- Xue L, Qiu Y, He J, Kung H, Oleinick N. *Etk/Bmx, a PH-domain containing tyrosine kinase, protects prostate cancer cells from apoptosis induced by photodynamic therapy or thapsigargin.* *Oncogene* 18 (1999) 3391-3398.
- Yamauchi-Takahara K, Sole MJ, Liew J, Ing D, Liew CC. *Characterization of human cardiac myosin heavy chain genes.* *Proc Natl Acad Sci USA* 86 (1989) 3504-3508.
- Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. *Vascular-specific growth factors and blood vessel formation.* *Nature* 407 (2000) 242-248.
- Yang J, Kim O, Wu J, Qiu Y. *Interaction between tyrosine kinase Etk and a RUN domain- and FUVY domain-containing protein RUFY1.* *J Biol Chem* 277 (2002) 30219-30226.
- Zendman A, Ruiter D, Van Muijen G. *Cancer/testis-associated genes: identification, expression profile, and putative function.* *J Cell Physiol* 194 (2003) 272-288.
- Zhu Y, Qi C, Cao W, Yeldandi A, Rao M, Reddy J. *Cloning and characterization of PIMT, a protein with a methyltransferase domain, which interacts with and enhances nuclear receptor coactivator PRIP function.* *Proc Nat Acad Sci* 98 (2001) 10380-10385.

8. Anhang

8.1. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Carola Götz
 Geburtsdatum/-ort: 04.11.1977, München
 Anschrift: Wallbergstr. 12, 82194 Gröbenzell
 Telefon: 08142/6 03 89
 Eltern: Dr. med. Herbert Götz, Kinderarzt
 Dr. med. Elisabeth Götz, Ärztin

Schulbildung:

1984 – 1988 Grundschule in Gröbenzell
 1988 – 1997 Gymnasium Puchheim
 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Universitätsausbildung:

05/1998 – 04/2000 Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
 04/2000 Ärztliche Vorprüfung
 05/2000 – 11/2004 Humanmedizin an der Technischen Universität München
 04/2001 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
 09/2003 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
 11/2004 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Dissertation:

ab 04/2001 Klinische Kooperationsgruppe „Pädiatrische Tumorimmunologie“ der Kinderklinik und Poliklinik der Technischen Universität München und des Institutes für Klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik der Gesellschaft für Umwelt und Gesundheit;
 Thema: Identifikation von Tumorantigenen des embryonalen Rhabdomyosarkoms durch serologische Analyse einer Tumor-cDNA Expressionsbibliothek (SEREX) mit Untersuchung ihrer cDNA-Sequenz, mRNA-Expression und Immunogenität

Berufliche Weiterbildung:

01/2005 – 05/2005 Wissenschaftliche Assistentin in der Klinische Kooperationsgruppe „Pädiatrische Tumorimmunologie“ der Kinderklinik und Poliklinik der Technischen Universität München; Dr. med. Uta Behrends
 Projekt: Gewebeexpressionsanalysen SEREX-definierter Osteosarkomantigene
 Seit 07/2005 Wissenschaftliche Assistentin der Arbeitsgruppe „Tumorimmunologie“ der Kinderklinik und Poliklinik der Technischen Universität München; Prof. Dr. med. S. Burdach, Dr. rer. nat. G. Richter
 Projekt: 1. Expressionsdefizienz und Spleißvarianten des GM-CSF-Rezeptors bei pädiatrischen Patienten mit AML und respiratorischer Insuffizienz
 2. Modulation des Genexpressionsprofils durch Spleißvarianten des GM-CSF-Rezeptors

8.2. Danksagung

Zu guter Letzt möchte ich mich nochmals ganz herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Uta Behrends für die exzellente Betreuung und für ihr beständiges Interesse und Engagement an dieser Arbeit. Dr. Uta Behrends stand mir zu jeder Tages- und Nachtzeit mit Rat und Tat zur Seite. Durch sie wurde meine Begeisterung für die Wissenschaft geweckt und mein wissenschaftliches Denken geschärft.

Prof. Dr. Stefan Burdach als Direktor der Kinderklinik der TU-München, Prof. Georg W. Bornkamm als Leiter des GSF-Instituts für Klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik und Prof. Dr. Stefan Müller-Weihrich als ehemaligem Leiter der Abteilung für pädiatrische Onkologie und Hämatologie der Kinderklinik der TU-München, der diese Arbeit ermöglicht und bis zu seinem viel zu frühem Tode unterstützt hat.

Dr. Josef Mautner, Colette Zobywalski und Brigitte Lechner für die Einführung in die Methodik, sowie stete Hilfsbereitschaft und Ratschläge bei Problemen.

Meiner Schwester Tini möchte ich für die Diskussionen über inhaltliche Belange dieser Arbeit sowie Korrekturvorschläge danken, meinem Vater Hubsi für das Korrekturlesen der fertiggestellten Arbeit.

Meiner Schwester Gisi danke ich für die unermüdliche Hilfe bei allen, auch noch so aussichtslos erscheinenden computertechnischen Problemen, auch wenn diese nicht immer von Erfolg gekrönt waren.

Meiner Mutter Nini danke ich dafür, dass sie während der gesamten Fertigstellung dieser Arbeit meine „Wutausbrüche“ am Computer ertragen hat und mich immer wieder zur Fertigstellung der Arbeit aufgemuntert hat.

Vielen Dank auch an Esther Durtschi, die dieser Arbeit den „letzten Schliff“ verliehen hat.

Meinen Eltern gilt mein tiefstempfundener Dank für all das, was sie mir ermöglicht haben und für das, was mir dadurch erst ermöglicht wird.

