

Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin
der Technischen Universität München
(Direktor: Univ-Prof. Dr. St. Burdach)

Serologische Identifizierung und Charakterisierung
von Tumorantigenen eines
Neuroblastoms Stadium 3 ohne *MYCN*-Genamplifikation

Thomas Jandl

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. Priv.-Doz. Dr. U. A. D. Behrends

2. Univ. Prof. Dr. Dr. R. Senekowitsch-Schmidtke

Die Dissertation wurde am 20.09.2007 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 24.10.2007 angenommen.

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS.....	I	
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV	
I	EINLEITUNG	1
I.1	Einführung in das Arbeitsthema	1
I.2	Fragestellung der Arbeit	1
I.3	Das Neuroblastom	2
I.3.1	Histopathologie.....	2
I.3.2	Molekularpathologie.....	3
I.3.3	Stadieneinteilung des Neuroblastoms	4
I.3.4	Häufigkeit	5
I.3.5	Diagnose	5
I.3.6	Prognose.....	6
I.3.7	Therapie	8
I.4	Tumorimmunologie	9
I.4.1	Tumorantigene	10
I.4.1.1	Identifikation von Tumorantigenen mit Hilfe von T-Zellen	11
I.4.1.2	Identifikation von Tumorantigenen mit Hilfe von Serum-Antikörpern	12
I.4.2	Tumorimmuntherapie	13
I.4.2.1	Aktive Tumorimmuntherapie.....	14
I.4.2.2	Passive Tumorimmuntherapie mit Antikörpern	15
I.4.2.3	Passive Tumorimmuntherapie durch adoptiven T-Zell-Transfer	15
I.4.3	Mechanismen der immunologischen Tarnung von Tumoren.....	16
I.4.4	Antigene von typischen Tumoren des Kindesalters.....	17
II	MATERIAL.....	18
II.1	Biologisches Material.....	18
II.1.1	Tumorgewebe	18
II.1.2	Gewebeschnitte.....	18
II.1.3	Gesamt-RNS aus Gewebe.....	18
II.1.4	Blutproben	18
II.1.5	Zelllinien	19
II.1.6	Bakterien.....	19
II.1.7	Bakteriophagen	20
II.1.8	Antikörper und Tierseren	20
II.2	Medien und Mediumzusätze für die Zellkultur	20
II.3	Chemikalien.....	21
II.4	Enzyme.....	22
II.5	Kits und Vektoren.....	22
II.6	Sonstiges Verbrauchsmaterial	22
II.7	Geräte.....	23
II.8	Oligonukleotide	24
II.9	Software und Datenbanken.....	26

II.10	Rezepte für Stammlösungen.....	26
III	METHODEN	29
III.1	Bakterienanzucht	29
III.1.1	Stammplatte	29
III.1.2	Flüssigkultur	29
III.1.3	Glycerolstock	29
III.2	Herstellung der Tumor-cDNS-Expressionsbibliothek in λ-Phagen.....	29
III.2.1	Isolation der Tumor-mRNS.....	30
III.2.2	mRNS-Gelelektrophorese	31
III.2.3	Reverse Transkription in cDNS	31
III.2.4	Modifikation der 5'- und 3'-Enden der cDNS	32
III.2.5	Größenauftrennung der cDNS mit CL-4B-Säulen.....	34
III.2.6	Ethidium-Bromid-Platten-Assay	34
III.2.7	Ligation der Tumor-cDNS in den „Uni-ZAP[®] XR“-Vektor	35
III.2.8	Verpackung des rekombinanten Vektors	35
III.2.9	Titerbestimmung der Phagenlösung.....	35
III.2.10	Induktion der rekombinanten Proteinexpression und Blau-Weiß-Test	36
III.2.11	Amplifikation der Phagenklone	36
III.3	Präabsorption des Patienten-Serums	37
III.3.1	Präparation von „mechanischen“ und „lytischen“ Säulen	37
III.3.2	Präparation von „lytischen“ Folien	38
III.3.3	Serum-Aufreinigung mit Säulen und Folien.....	38
III.4	SEREX.....	39
III.4.1	Screening	39
III.4.2	Isolation positiver Klone	40
III.4.3	Ausschluss von IgG-Klonen und Färbeartefarkten	41
III.4.4	Monoklonalisierung	42
III.5	Differenzielle Serumanalyse	42
III.6	Subklonierung durch „in vivo Exzision“	43
III.7	Mini-Präparation von Plasmid-DNS	44
III.8	Maxi-Präparation von Plasmid-DNS	45
III.9	Bestimmung der Konzentration von Plasmid-DNS-Lösungen	46
III.10	Restriktionsanalyse von dsDNS	46
III.11	Größen-Auftrennung der DNS im Agarose-Gel.....	46
III.12	Sequenzanalyse des cDNS-Inserts.....	46
III.13	mRNS-Expressionsanalyse mittels RT-PCR	47
III.14	Southern-Blot-Hybridisierung	48
III.15	Konstruktion von rekombinanten pCMV- und pTrcHis-Vektoren	49
III.16	Ligation von DNS-Molekülen.....	50
III.17	Herstellung elektrokompetenter Bakterien	51
III.18	Transformation von Bakterien	51
III.19	Rekombinante Proteinexpression und -aufreinigung aus Prokaryonten.....	51

III.20	SDS-Gelelektrophorese.....	52
III.21	Western-Blot-Analyse.....	52
III.22	Zellkultur.....	53
III.23	Transfektion durch Elektroporation.....	53
III.24	Immunzytologie.....	53
III.25	Immunhistologie.....	53
III.26	Klinische Evaluation des Krankheitsverlaufs	54
IV	ERGEBNISSE	55
IV.1	Kontrolle der mRNA-Qualität	55
IV.2	Durch das SEREX-Screening identifizierte Antigene	56
IV.2.1	Hu-Antigene.....	57
IV.2.1.1	HuD-Varianten.....	57
IV.2.1.2	HuC-L	62
IV.2.2	NNP3	63
IV.2.3	018INX	67
IV.2.4	018NAC.....	68
IV.2.5	018HSP.....	69
IV.3	Antigenspezifische AK-Titer im Krankheitsverlauf.....	71
IV.4	Heterologe Serumanalyse.....	73
IV.5	mRNA-Expressionsanalyse für Antigene der Hu- und NNP-Familien	75
IV.6	Intrazelluläre Lokalisation und Gewebeverteilung der HuD-Varianten	80
IV.6.1	Spezifitätsanalyse der eingesetzten anti-Hu-Antikörper	81
IV.6.2	Intrazelluläre Lokalisation von Hu-Proteinen im Zellkulturmodell	82
IV.6.3	Funktionelle Analyse des HuD4NES mit HuD-Deletionsmutanten	85
IV.6.4	Funktionelle Analyse des HuD4NES mit GNG-NLS-Konstrukten.....	86
IV.6.5	Inhibition des Kernexports mit Leptomycin-B.....	87
IV.6.6	Immunhistologie.....	89
V	DISKUSSION.....	92
V.1	Die neuen Tumorantigene der Hu-Proteinfamilie	92
V.2	Das neue Tumorantigen 018INX.....	108
V.3	Das neue Autoantigen NNP3.....	112
V.4	Das neue Autoantigen 018NAC	113
V.5	Das bekannte Autoantigen 018HSP	115
V.6	Neue Ansätze zur Identifikation von Tumorantigenen	120
VI	AUSBLICK.....	123
VII	ZUSAMMENFASSUNG	124
VIII	VEKTORKARTEN	125
IX	LITERATUR.....	127
X	DANKSAGUNG.....	140

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
ALP	Alkalische Phosphatase
Amp	Ampicillin
APC	Antigenpräsentierende Zelle (<i>antigen presenting cell</i>)
ARE	AU-reiche Elemente
AS	Aminosäure
Bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serum Albumin
CDS	Codierende Sequenz
CT-Antigen	Tumor-Testis-Antigen (<i>cancer testis-antigen</i>)
dl	Deziliter
DMF	Dimethylformamid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
cDNS	Komplementäre DNS (<i>complementary DNS</i>)
dsDNS	Doppelsträngige DNS
E	Extinktion
EBNA	EBV-Kernantigen (<i>EBV nuclear antigen</i>)
EBV	Epstein-Barr-Virus
ELAV	<i>Embryonic lethal, abnormal vision</i>
FCS	Fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
GD2	Gangliosid 2
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GPOH	Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie
GSF	Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit
h	Stunde
Her2/neu	Humaner Wachstumsfaktorrezeptor (<i>h. epidermal growth factor receptor</i>) - 2
HPV	Humanes Papilloma-Virus
HRG	Hoch-Risiko-Gruppe
Hsp90	Hitzeschockprotein 90
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalacto-Pyranosid
JNK	c-Jun-N-terminale-Kinase

J-ÜR	Jahres-Überlebensrate
Kana	Kanamycin
kB	Kilobasen
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
l	Liter
LAK	Lymphokinaktivierte Killerzellen
LDH	Laktatdehydrogenase
LMB	Leptomycin-B
LOH	Verlust des Heterozygotenstatus (<i>loss of heterozygosity</i>)
mAK	Monoklonale AK
MCS	Multiple Klonierungsstelle (<i>multiple cloning site</i>)
M-CSF	Makrophagen-Koloniestimulierender Faktor
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
MMLV	Murines Moloney Leukämievirus
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
MIBG	Metajodbenzylguanidin
min	Minute
ml	Milliliter
MRD	Minimale Resterkrankung (<i>minimal residual disease</i>)
MRG	Mittleres-Risiko-Gruppe
mRNS	Boten-RNS (<i>messenger RNA</i>)
NAC-α	<i>Nascent polypeptide-associated complex-α</i>
NB	Neuroblastom
NBT	Nitroblue-Tetrazolium-Chlorid
NES	Kernexport Signal (<i>nuclear export signal</i>)
NGF	Nervenwachstumsfaktor (<i>nerve growth factor</i>)
NLS	Kernlokalisations Signal (<i>nuclear localization signal</i>)
NNP1	Neues Nukleäres Protein 1
NSE	Neuronenspezifische Enolase
ORF	Offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
p	Plasmid
pAPC	Professionelle APC

PBMC	Periphere mononukleäre Blutzellen (<i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEN	Paraneoplastische Enzephalomyelitis
PFA	Paraformaldehyd
PKC	Protein-Kinase-C
POM	Paraneoplastischer Opso-Myoclonus
PSN	Paraneoplastische sensorische Neuropathie
RBP	RNS-Bindeprotein
RBD	RNS-Bindedomäne
RNS	Ribonukleinsäure
RRM	RNS-Erkennungsmotiv (<i>RNA recognition motif</i>)
rRNS	Ribosomale RNS
RT	Reverse Transkription
RT-PCR	RT mit nachfolgender PCR
Rt	Raumtemperatur
SEREX	Serologische Analyse einer rekombinanten cDNS- Expressionsbibliothek
SCLC	Kleinzelliges Bronchialkarzinom (<i>small cell lung cancer</i>)
TAA	Tumorassoziiertes Antigen
Tet	Tetracyclin
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor (<i>transforming growth factor</i>)
TIL	Tumorerfiltrierenden Lymphozyten
Treg	Regulatorische T-Zellen
TUM	Technische Universität München
T-Zelle	T-Lymphozyt
U	Units
ÜN	Über Nacht
3'-UTR	3'-untranslatierte Region
X-Gal	Chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid
ZS	Ziegenserum

I Einleitung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem immunologischen Aspekt einer onkologischen Erkrankung. Mit dem so genannten SEREX-Verfahren (Serologische Analyse einer REkombinanten, cDNS-EXpressionsbibliothek) wurde die humorale Immunantwort einer pädiatrischen Patientin gegen ein Neuroblastom (NB) untersucht. Das Verfahren war von der Arbeitsgruppe 1998 aus dem Labor der Erstbeschreiber (Sahin *et al.* 1995) übernommen worden und wurde hier erstmals auf ein NB angewandt.

I.1 Einführung in das Arbeitsthema

NB sind maligne Neubildungen des sympathischen Nervensystems und die häufigsten extrakraniellen soliden Tumoren des Kindesalters. Die Prognose der Erkrankung ist abhängig vom Alter des Patienten, vom Krankheitsstadium und von der Molekulargenetik des Tumors immer noch ungünstig. Es können bislang nur etwa zwei von drei betroffenen Patienten geheilt werden. So werden dringend ergänzende Therapiekonzepte gesucht. Dabei scheinen Therapieansätze auf tumorimmunologischer Basis vielversprechend zu sein. Für verschiedene Malignome des Erwachsenenalters zeichnet sich ab, dass tumorantigenspezifische Tumorimpfstoffe eine nebenwirkungsarme und möglicherweise langfristig wirksame adjuvante Behandlungsmöglichkeit darstellen könnten. Darüber hinaus haben sich Tumorantigene und tumorantigenspezifische Serumantikörper als hilfreiche klinische Parameter zur Diagnosestellung, Früherkennung, Verlaufskontrolle und Abschätzung der Prognose erwiesen. Für typisch pädiatrische Malignome war bis zum Beginn der eigenen Arbeiten keine systematische Suche nach Tumorantigenen eingeleitet worden, so dass sich bis heute nur sehr wenige tumorantigenspezifische Immuntherapie-Ansätze für an Malignomen erkrankte Kinder in klinischer Erprobung befinden. Da sich das SEREX-Verfahren bei der Tumorantigen suche in Malignomen des Erwachsenenalters als sehr effizient erwiesen hatte, war es naheliegend, dieses Verfahren auf häufige und problematische Tumorentitäten des Kindesalters anzuwenden.

I.2 Fragestellung der Arbeit

Das Promotionsthema widmete sich der systematischen Analyse von humoralen Immunreaktionen gegen ein großes, nicht metastasiertes NB ohne *MYCN*-Genamplifikation. Die Arbeit sollte zu einem verbesserten Verständnis der Tumorbiologie sowie zu einer verbesserten Diagnostik und Therapie des NB beitragen. Dem SEREX-Verfahren entsprechend sollte mit Hilfe von Patientenserum und einer in λ -Bakteriophagen verpackten komplementären DNS (cDNS)-Expressionsbibliothek aus autologem Tumorgewebe nach Antigenen gesucht werden, die hochtitrige Serum-Immunglobulin (Ig) G-Antikörper (AK) des Patienten banden.

Anschließend sollte die cDNS-Sequenz der Antigene ermittelt, mit Einträgen von DNS-Datenbanken im Internet verglichen und gegebenenfalls Homologien zu bekannten Genen aufgedeckt werden. Weiterhin sollte die Spezifität der humoralen Immunreaktion getestet werden, indem das Vorkommen der SEREX-Antigen-spezifischen Serum-AK bei gesunden Probanden und Patienten mit verschiedenen NB oder anderen pädiatrischen Tumorerkrankungen untersucht wurde. Abschließend sollte die mRNA-Expression und in ausgewählten Fällen die Proteinexpression der Antigene in gesunden und malignen Geweben untersucht und auf diese Weise ihre mögliche klinische und tumorbiologische Bedeutung näher charakterisiert werden.

I.3 Das Neuroblastom

Erstmals war das NB 1865 von R. Virchow beschrieben worden. Die Genese aus sympathischen Nervenzellen der Neuralleiste konnte 1891 von F. Marchard nachgewiesen werden. Der Begriff „Neuroblastom“ wurde erst 1910 von J. N. Wright geprägt (Nieder und Gauderer 1991).

I.3.1 Histopathologie

Das NB ist ein maligner, embryonaler Tumor und entsteht wie die benigne Variante, das Ganglioneurom, aus Zellen der Neuralleiste. Aus dieser gehen die Ganglien des sympathischen Nervensystems und das Nebennierenmark hervor, daher bezeichnet man das NB als Tumor des sympathischen Nervensystems. Eine Mischform dieser beiden Tumorvarianten wird als Ganglio-NB bezeichnet. Manifestationsorte sind überall dort, wo sich sympathische Nervenzellen finden, so vor allem in den Nebennieren und im paravertebralen Grenzstrang. Etwa die Hälfte aller NB ist bei Diagnosestellung bereits metastasiert. Die Metastasierung erfolgt direkt infiltrativ, lymphogen oder hämatogen. Metastasen werden überwiegend in regionalen und entfernten Lymphknoten, Knochenmark, Knochen, Leber und Haut beobachtet, seltener im ZNS.

Die Malignität der NB wird bis heute nach dem von Hughes erstellten Schema in drei Grade eingeteilt (Hughes *et al.* 1974). Bei Grad I sieht man ein Mischbild aus undifferenzierten Zellen und reifen Ganglienzellen (Ganglio-NB), bei Grad II unreife Zellen und einige ausreifende Ganglienzellen, und bei Grad III undifferenzierte, „kleine, blaue Zellen“ sowie manchmal Rosettenbildung. Grad III ist auf morphologischer Basis allein teilweise schwierig von anderen Tumoren mit dem histologischen Bild von „kleinen, blauen Zellen“ wie dem Rhabdomyosarkom, Ewingtumor, Wilmstumor oder Non-Hodgkin-Lymphom zu differenzieren.

I.3.2 Molekularpathologie

Für die Entstehung von embryonalen Tumoren des Kindesalters wird eine Störung des normalen, genetisch festgelegten Programms der Gewebeentwicklung verantwortlich gemacht (Maris und Denny 2002). Die Mehrheit der NB entsteht spontan, d. h. ohne prädisponierende hereditäre Faktoren. In bis zu 22 % aller Fälle tritt das NB familiär gehäuft auf. Die Prädisposition folgt einer autosomal dominanten Vererbung (Knudson und Meadows 1976). Diese NB sind mit multifokalen Primärtumoren und jüngerem Erkrankungsalter assoziiert. Kopplungsanalysen ergaben, dass ein Locus in der Chromosomenregion 16p12-p13 für die Prädisposition zum NB verantwortlich gemacht werden kann (Maris *et al.* 2002).

Ungefähr 20 % der NB gehen mit einer Amplifikation des zellulären Onkogens *MYCN* auf Chromosom 2p24 einher (Seeger *et al.* 1985; Maris *et al.* 2007). Die Vervielfachung kann mehrere hundert Kopien umfassen und ist mit einer rascheren Tumorprogression sowie einer schlechteren Prognose assoziiert (Brodeur *et al.* 1984). Die *MYCN*-Amplifikation kann zytogenetisch als *double-minutes* oder als *homogeneously staining region* sichtbar sein (Schwab 1993). Sie scheint in Zusammenhang mit der Deletion des kurzen Arms von Chromosom 1 (1p-Deletion) zu stehen, da sie fast immer mit der 1p-Deletion einher geht (Fong *et al.* 1989; Brodeur 2003). Ein Verlust des Heterozygotenstatus in der chromosomalen Region 1p36.2-1p36.3 (*loss of heterozygosity*, LOH 1p36) ist die häufigste strukturelle Aberration und findet sich in 30 - 50 % der primären NB sowie in nahezu allen fortgeschrittenen klinischen Stadien (Joshi und Tsongalis 1997). Ein LOH 1p36 ist mit einer schlechteren Prognose vergesellschaftet (White *et al.* 1995), was auf eine Inaktivierung bislang unbekannter Tumorsuppressorgene zurückgeführt wird (Maris *et al.* 1995; Brodeur *et al.* 1997). Eine aktuelle Arbeit postuliert, dass der Verlust eines Allels des *HuD* (*ELAVL4*)-Gens auf Chromosom 1p34 mit der *MYCN*-Amplifikation assoziiert sein könnte. Das Gen codiert das neuronenspezifische RNS-Bindeprotein (RBP) HuD, welches aus dem Kontext paraneoplastischer Neuropathien bekannt ist (vgl. Kapitel IV.2.1). Ob die LOH 1p36 als unabhängiger prognostischer Marker dienen kann wird kontrovers diskutiert (Maris *et al.* 2007).

In fast der Hälfte der NB liegt eine Trisomie 17q vor (Bown *et al.* 1999), die häufig durch eine unbalancierte Translokation zwischen den Chromosomen 1 und 17 verursacht wird und ebenfalls mit aggressivem Tumorwachstum assoziiert ist (Savelyeva *et al.* 1994).

Eine weitere typische zytogenetische Veränderung betrifft den DNS-Gehalt der NB-Zellen. Er kann entweder normal und damit diploid sein oder erhöht und somit hyperploid. Bei Kindern im ersten Lebensjahr kommt die Hyperploidie durch zusätzliche ganze Chromosomen zustande, bei älteren Kindern werden eher strukturelle Veränderungen der Chromosomen nachgewiesen.

Im klinischen Stadium 4S (vgl. Kapitel I.3.3) findet sich typischerweise ein triploider Chromosomensatz (Christiansen und Lampert 1989).

I.3.3 Stadieneinteilung des Neuroblastoms

Es wurden in den letzten 20 Jahren verschiedene Klassifikationssysteme zur Bestimmung des klinischen Stadiums der Erkrankung verwendet, was die Vergleichbarkeit der Studien zum NB einschränkt. Deswegen wurde das *International Neuroblastoma Staging System* (INSS) eingeführt (Brodeur *et al.* 1993) (**Tab. 1**).

Stadium 1	Der Tumor ist auf den Ursprungsort begrenzt, Resektion im Ganzen ist möglich, kein Lymphknotenbefall ipsi- oder kontralateral
Stadium 2a	Der Tumor infiltriert die Umgebung, aber überschreitet die Mittellinie nicht, Resektion im Ganzen ist nicht möglich, kein Lymphknotenbefall ipsi- oder kontralateral
Stadium 2b	Der Tumor infiltriert die Umgebung, aber überschreitet die Mittellinie nicht, Resektion im Ganzen ist möglich oder nicht möglich, Lymphknotenbefall ipsilateral, kein Lymphknotenbefall kontralateral
Stadium 3	Der Tumor überschreitet die Mittellinie, Resektion im Ganzen ist möglich oder nicht möglich, Lymphknotenbefall ipsilateral, kein Lymphknotenbefall kontralateral oder der Tumor überschreitet die Mittellinie nicht, jedoch Lymphknotenbefall kontralateral oder Mittellinientumor mit beidseitigem Lymphknotenbefall
Stadium 4	Metastasierung des Tumors in entfernte Lymphknoten, Knochenmark, Leber oder andere Organe (ausgenommen Stadium 4S)
Stadium 4S	NB des Säuglingsalters, lokalisiert wie in Stadium 1 oder 2, mit Metastasen der Leber, Haut oder Knochenmark (weniger als 10 % der Knochenmarkszellen sind Tumorzellen, keine Skelettmetastasen)

Tab. 1: Stadieneinteilung des Neuroblastoms nach Brodeur et al. (1993)

I.3.4 Häufigkeit

Das NB ist nach den Hirntumoren die zweithäufigste solide maligne Erkrankung des Kindesalters (7 - 10 %) und der häufigste extrakranielle, maligne, solide Tumor. Es ist für ca. 15 % der durch ein Malignom bedingten Todesfälle bei Kindern verantwortlich. Durchschnittlich sind in Deutschland 120 - 130 Neuerkrankungen pro Jahr zu verzeichnen. Die Inzidenz liegt bei durchschnittlich 1 pro 100.000 Kinder unter 15 Lebensjahren. Jungen sind etwas häufiger als Mädchen betroffen. NB sind embryonale Tumoren, weshalb sich ihr Auftreten auf das frühe Kindesalter konzentriert. Etwa eines von drei betroffenen Kindern erkrankt im ersten Lebensjahr. Das mittlere Alter zum Zeitpunkt der Diagnose liegt bei zwei Jahren und 90 % der Patienten sind jünger als sechs Jahre (Deutsches Kinderkrebsregister, Jahresbericht 2002).

I.3.5 Diagnose

Die klinische Symptomatik richtet sich nach dem Ursprungsort des Tumors, der Metastasierung und dem eventuellen Vorhandensein von hormonaktiven Stoffwechselprodukten. In manchen Fällen findet sich eine abdominelle Raumforderung als Zufallsbefund. Nicht selten werden unspezifische Symptome wie Gedeihstörung, Müdigkeit, Bauchschmerzen, Fieber, Anämie, intermittierende arterielle Hypertension sowie chronisch rezidivierende Diarrhoen beschrieben. Von neurologischer Seite können zerebelläre Ataxien, Nystagmen oder durch intraspinale Tumoranteile bedingt Paraplegien, ein *cauda equina*- oder ein Horner-Syndrom auftreten. Bei thorakalen NB besteht die Gefahr von Gefäßrupturen (Alexander 2000; Schwab *et al.* 2003).

Als diagnostische Marker werden Katecholaminmetaboliten (Homovanillinmandelsäure, Vanillinmandelsäure und Dopamin) in Serum oder Urin sowie die neuronenspezifische Enolase (NSE) im Serum genutzt. Diese Derivate eignen sich als Verlaufsmarker unter und nach Abschluss der Therapie (Evans *et al.* 1987).

Gesichert wird die Diagnose des NB durch die histologische Untersuchung von Tumorgewebe oder durch den Nachweis typischer Tumorzellnester im Knochenmark in Verbindung mit erhöhten Katecholaminmetaboliten in Serum oder Urin. Als bildgebende Verfahren werden Sonographie, Computertomographie und Magnetresonanztomographie eingesetzt. Zum Nachweis von Knochenmetastasen ist eine Skelettszintigraphie durchzuführen, zusätzlich steht die Szintigraphie mit Jod¹³¹-markiertem Metajodbenzylguanidin (MIBG) zur Verfügung. Der Noradrenalin-Abkömmling MIBG reichert sich in katecholaminproduzierenden Geweben an und wird von 90 % der NB-Zellen gespeichert. Mit dieser Methode können sowohl der Primärtumor als auch Metastasen spezifisch dargestellt werden (NB2004-Studienprotokoll der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH)).

I.3.6 Prognose

Der Verlauf einer NB-Erkrankung kann von der Spontanremission bis zur therapieresistenten raschen Progression reichen. Als unabhängige Marker für die Prognose des NB sind derzeit zwei klinische Kriterien und ein zytogenetischer Marker allgemein akzeptiert. Diese sind das INSS-Stadium des Tumors und das Alters des Kindes bei Diagnose sowie die Amplifikation des *MYCN*-Gens im Tumorgewebe (Schwab *et al.* 2003; Oberthuer *et al.* 2004; Maris *et al.* 2007; NB2004 Trial Protokoll) (**Abb. 1**). Ob der „1p-Status“ als unabhängiger Marker herangezogen werden kann, ist Teil aktueller Studien. Als weitere prognostisch interessante Marker wurden die Konzentrationen von Ferritin, Lactatdehydrogenase (LDH) und NSE im Serum, der Karyotyp und die Überexpression des Neurotrophin-Rezeptor-Gens *trkA* und des *Skp2* vorgeschlagen (Evans *et al.* 1987; Schwab *et al.* 2003; Westermann *et al.* 2007).

Mithilfe der aktuell empfohlenen multimodalen Therapie aus Operation, Chemotherapie und Bestrahlung beträgt die 5-Jahresüberlebensrate (5J-ÜR) für Kinder in Deutschland, die zum Zeitpunkt der Diagnose jünger als ein Jahr sind, 87 % und für Kinder, die älter als ein und jünger als 14 Jahre sind, 51 %. Dabei kommt es bei Diagnose im Säuglingsalter später als fünf Jahre nach Diagnose kaum mehr zu Todesfällen (10J-ÜR 86 %), bei initial älteren Kindern durchaus (10J-ÜR 44 %). Für alle Kinder mit NB der Stadien 1 - 3 wurde die 5J-ÜR mit 88 % und für Kinder mit NB des Stadiums 4 mit 36 % angegeben (Burkhardt-Hammer *et al.* 2002). Die beste Prognose haben die Patienten mit dem Stadium 4S (5J-ÜR 88 - 92 %) (Tonini *et al.* 1997; Nickerson *et al.* 2000; Schleiermacher *et al.* 2003). Für Säuglinge wurde inzwischen mehrfach gezeigt, dass hyperploide Tumoren mit einer besseren Prognose einhergehen als diploide Tumoren (3J-ÜR 94 % bzw. 55 %) (Look *et al.* 1984; Christiansen und Lampert 1988; Bowman *et al.* 1997; Brodeur 2003).

Bei Patienten, die älter als zwei Jahre sind, stehen die strukturellen Veränderungen der Chromosomen diagnostisch im Vordergrund (Look *et al.* 1991). Die Ploidie geht bislang nicht in die klinische Risikostratifizierung ein.

Das Neurotrophin-Rezeptor-Gen *trkA* codiert den Rezeptor des Nervenwachstumsfaktors (*nerve growth factor*, NGF), der eine wichtige Rolle in der Zelldifferenzierung spielt. Eine hohe Expression dieses Gens in Verbindung mit fehlender *MYCN*-Amplifikation, Alter kleiner einem Jahr und frühem Erkrankungsstadium, geht mit einer guten Prognose einher (Castleberry 1997; Maris *et al.* 2007).

Das *skp2*-Gen codiert für das *F-box*-Protein der SCF (Skp2) E3-Ligase und wird in NB mit hohem Risiko unabhängig von einer *MYCN*-Amplifikation stark exprimiert. Die Skp2-Expression korrelierte indirekt mit der Expression von p27, dem primären Ziel der SCF (Skp2) E3-Ligase. Es wird postuliert, dass Skp2 über die Rolle als prognostischer Marker hinaus eine

Schlüsselrolle in der Progression von NB spielt und so als Ziel für therapeutische Ansätze dienen könnte (Westermann *et al.* 2007).

Von weiteren, neuen, diagnostischen und prognostischen Markern wird eine zunehmend bessere individuelle Therapieanpassung erwartet.

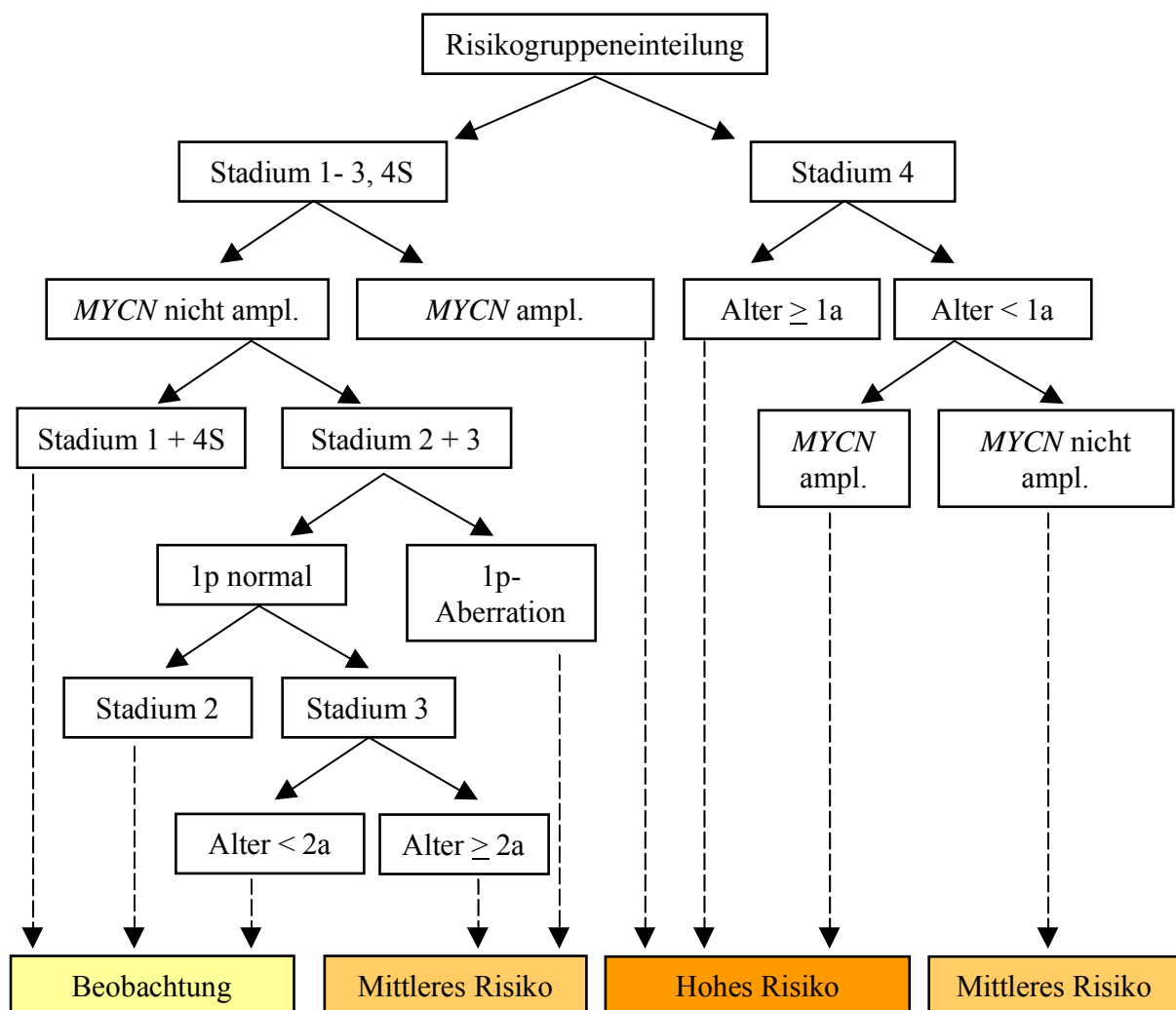


Abb. 1: Risikogruppeneinteilung entsprechend NB2004

I.3.7 Therapie

Die Behandlung muss wegen der hohen klinischen Variabilität der Erkrankung an das zu erwartende Wachstumsverhalten des Tumors angepasst werden. In Deutschland werden an einem NB erkrankte Kinder nach dem jeweils aktuellen Studienprotokoll der GPOH behandelt. Das zum Zeitpunkt dieser Arbeit aktuelle Protokoll NB97 wurde am 01.10.2004 vom Protokoll NB2004 abgelöst. Beide Protokolle teilten die Patienten in drei Risikogruppen ein, denen verschiedene Therapieregime zugeordnet sind (**Abb. 1**).

Initial wird bei jedem Patienten ein chirurgischer Eingriff zur Biopsiegewinnung durchgeführt. Die Biopsie dient der histologischen Sicherung der Diagnose und der molekulargenetischen Beurteilung des Tumors. Außerdem wird zur exakten Risikoeinteilung (*staging*) die Tumorausdehnung durch den Chirurgen beurteilt. Eine komplette Entfernung des Tumors wird initial nur dann angestrebt, wenn damit kein zusätzliches Risiko für den Patienten verbunden ist (Berthold und Hero 2000; Berthold *et al.* 2003).

Patienten mit niedrigem Risiko werden, wenn keine bedrohlichen klinischen Symptome bestehen, nach der chirurgischen Biopsieentnahme sechs bis zwölf Monate engmaschig beobachtet, um dem Tumor eine spontane Regression zu ermöglichen. Bei Tumorregression wird keine weitere Therapie durchgeführt. Patienten ohne Tumorregression erhalten eine Chemotherapie mit Doxorubicin, Vincristin und Cyclophosphamid (NB2004).

Alle Patienten der Gruppe mit mittlerem Risiko (MRG) erhalten nach der Biopsieentnahme eine Chemotherapie mit Doxorubicin, Vincristin, Cyclophosphamid, Etoposid, Vindesin, Cisplatin, Ifosfamid und Dacarbazin. Bei verbesserter Operabilität nach Chemotherapiebeginn kann eine sekundäre Tumoresektion sinnvoll sein. Bei aktivem, inoperablem Resttumor nach mehr als der Hälfte der geplanten Chemotherapie wird zusätzlich extern bestrahlt. Patienten, die auf diese Therapie nicht ansprechen, werden in die Hoch-Risiko-Gruppe (HRG) umgruppiert. Alle MRG-Patienten erhalten nach der Chemotherapie eine orale Behandlung mit dem Differenzierungs-Induktor 13-cis-Retinsäure (NB2004).

Ein Teil der Patienten der HRG erhält neben den genannten Chemotherapeutika randomisiert Topotecan. Im Verlaufe der Chemotherapie wird auch für HRG-Patienten die Tumorresektabilität wiederholt geprüft. Bei MIBG-speicherndem Resttumor am Ende der konventionellen Therapie wird eine systemische Radiotherapie mit Jod¹³¹-MIBG durchgeführt. Alle HRG-Patienten erhalten anschließend eine Hochdosischemotherapie (Melphalan, Etoposid, Carboplatin) mit autologer Stammzelltransplantation und nachfolgend eine Behandlung mit 13-cis-Retinsäure. Die externe Bestrahlung bleibt aktiven Resterkrankungen vorbehalten (NB2004).

Im dem Protokoll NB97 war für HRG-Patienten eine adjuvante immuntherapeutische Behandlung mit einem chimären monoklonalen (m)AK gegen das Zelloberflächen-Gangliosid 2-Antigen (GD2) (ch14.18) vorgesehen. Weil der anti-GD2-mAK keinen signifikanten therapeutischen Gewinn erbrachte und nicht kommerziell verfügbar war, wurde stattdessen noch während der NB97-Studie die Konsolidierung mit 13-cis-Retinsäure empfohlen (Simon *et al.* 2004). Retinoide modulieren verschiedene Zellfunktionen, inhibieren das Wachstum bestimmter Tumorzellen und induzieren deren Differenzierung. Es konnte gezeigt werden, dass die konsolidierende Behandlung mit 13-cis-Retinsäure das ereignisfreie Überleben von Patienten mit NB verlängerte (Matthay *et al.* 1999).

I.4 Tumorimmunologie

Die Wirkung des Immunsystems auf maligne Neubildungen ist schon seit Jahrzehnten Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen. Bereits 1943 fanden Gross und Kollegen erste Hinweise auf eine Immunantwort gegen Tumoren. Sie induzierten bei Mäusen chemisch Sarkome und entfernten diese dann operativ. Nach anschließender Inokulation von entsprechenden Sarkomzellen waren diese Mäuse im Gegensatz zu vorher nicht gegenüber dem Tumor exponierten Mäusen vor erneutem Tumorwachstum geschützt (Gross 1943). Darüber hinaus gab es viele direkte und indirekte Hinweise auf eine tumorunterdrückende Wirkung des Immunsystems, wie z. B. die Beobachtung einer erhöhten Inzidenz von Tumoren bei Immundefekt-Erkrankungen (Spector *et al.* 1978; Boshoff und Weiss 2002; Dunn *et al.* 2004) oder unter immunsuppressiver Therapie (Pardoll 2001; Abu-Elmagd *et al.* 2004). Weiterhin könnten Spontanremissionen von Neoplasien auf einer Abstoßung des Tumorgewebes durch das Immunsystem beruhen (Pritchard und Hickman 1994). Diese und andere Untersuchungen ließen darauf schließen, dass es Tumorproteine gibt, die auf Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*, MHC) -Molekülen präsentiert und in diesem Kontext von T-Zellen erkannt werden.

Seit die tumorunterdrückende bzw. -abstoßende Funktion des Immunsystems bekannt ist, versucht man tumorspezifische Immunreaktionen therapeutisch zu aktivieren bzw. zu verstärken. Vorteil einer tumorspezifischen Immuntherapie wäre eine geringe bis nicht vorhandene systemische Toxizität, so dass die Normalgewebe geschont würden. Darüber hinaus soll durch Aktivierung tumorspezifischer Gedächtniszellen eine dauerhafte Rezidivprophylaxe erreicht werden.

I.4.1 Tumorantigene

Als Tumorantigene werden Proteine des Tumors bezeichnet, die im Gegensatz zu Autoantigenen ausschließlich bei Tumorpatienten eine Immunreaktion auslösen. Dabei kann es sich um tumorspezifische Antigene handeln, die ausschließlich in neoplastischen Zellen und nie in normalen Zellen vorkommen. Im Gegensatz dazu kommen tumorassoziierte Antigene (TAA) in neoplastischen und unter speziellen Bedingungen auch in normalen Zellen vor bzw. sind in neoplastischen Zellen überexprimiert. Tumorantigene, die in vielen verschiedenen Entitäten gefunden werden, bezeichnet man als gemeinsame Tumorantigene (*shared tumor antigens*) (Old und Chen 1998; Chen 2000; Pfreundschuh 2000; Preuss *et al.* 2002).

Tumorspezifische Antigene können z. B. durch Genmutation oder durch alternative Transkription, Translation, mRNS- oder Proteinprozessierung generiert werden. Die Mehrzahl der heute bekannten Tumorantigene sind jedoch TAA, die auch in nicht-maligne transformierten Geweben vorkommen. Eine Untergruppe dieser Antigene, die sogenannten Tumor-Testis-Antigene (*cancer testis*, CT-Antigene), wird neben Tumorgewebe nur in den immunologisch privilegierten Gonaden exprimiert und kann in letzteren nicht vom Immunsystem erkannt werden. Vertreter der CT-Antigene sind z. B. NY-ESO-1 und die Antigene der MAGE- und GAGE-Familien. Diese Antigene werden auf dem X-Chromosom codiert und methylierungsabhängig exprimiert (Scanlan *et al.* 2002; Simpson *et al.* 2005; Gnjatic *et al.* 2006). Eine weitere Gruppe bilden in Tumorgewebe überexprimierte Antigene, wie z. B. der humane Wachstumsfaktorrezeptor (*human epidermal growth factor receptor 2*, HER2/neu). Wiederum andere TAA kommen nur in bestimmten Stadien der Zellentwicklung vor wie z. B. die Melanozyten-Differenzierungsantigene Tyrosinase, gp100 oder Melan-A/MART-1. Darüber hinaus können virale Antigene TAA darstellen, so z. B. Antigene des Epstein-Barr-Virus (EBV) oder des humanen Papilloma-Virus (HPV) (Preuss *et al.* 2002; Kawakami *et al.* 2004).

Tumorantigene können über MHC-Klasse I-Moleküle von CD8⁺ T-Lymphozyten (T-Zellen) oder über MHC-Klasse II-Moleküle von CD4⁺ T-Zellen erkannt werden (van der Bruggen *et al.* 1991; Jager *et al.* 1998; Jager 2007).

Kandidaten für eine sichere Tumorimmuntherapie sind in erster Linie diejenigen Antigene, die ausschließlich in Tumorgeweben oder zumindest nicht in lebenswichtigen Organen vorkommen und somit keine bzw. lediglich eine tolerable Autoimmunreaktionen auslösen sollten (Roskrow *et al.* 1999; Gilboa 2001; Moingeon 2001; Spiotto *et al.* 2003). Milde Autoimmunreaktionen können zum Beispiel als Vitiligo beim Einsatz von Melanomvakzinen auftreten (Dudley *et al.* 2002; Ramirez-Montagut *et al.* 2003). Um Tumorantigene zu charakterisieren, sind mehrere, vom Konzept her unterschiedliche Ansätze möglich.

I.4.1.1 Identifikation von Tumorantigenen mit Hilfe von T-Zellen

Bei den T-Zell-abhängigen Verfahren zur Suche nach Tumorantigenen können prinzipiell zwei Vorgehensweisen unterschieden werden, der „genetische“ und der „biochemische“ Ansatz.

Sie wurden zunächst im Kontext von MHC Klasse I-restringierten Antigenen etabliert, die von CD8⁺ T-Zellen erkannt werden. Bei dem so genannten „genetischen Ansatz“ werden antigennegative Zielzellen mit cDNAs von antigenpositiven Tumorzelllinien transfiziert. Die transfizierten Zellen präsentieren die Tumorzellantigene auf MHC-Klasse I und werden auf ihre Erkennung durch autologe CD8⁺ T-Zellen geprüft. Im Falle einer Antigenerkennung kann das entsprechende Gen kloniert werden. Um das verantwortliche Epitop zu kartieren, können anschließend aufgrund der abgeleiteten Aminosäure (AS)-Sequenz synthetische Oligopeptide hergestellt und deren Erkennung durch die antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen getestet werden (De Plaen *et al.* 1988; Mandelboim *et al.* 1994; Boon *et al.* 1997). Bei dem zweiten, sogenannten „biochemischen Ansatz“, werden Antigenpeptide, welche von Tumorzellen auf MHC-Klasse I präsentiert werden, aus der MHC-Molekülbindung gelöst und fraktioniert auf eine Erkennung durch CD8⁺ T-Zellen-Klone getestet (Van Bleek und Nathenson 1990; van der Bruggen *et al.* 1991).

Für eine effektive Tumorimmuntherapie ist es jedoch wünschenswert, auch CD4⁺ T-Zellen zu stimulieren, da diese bei der Aufrechterhaltung und Initiation komplexer Immunreaktionen eine Schlüsselrolle spielen (Pardoll 2002). Die Identifikation und molekulare Charakterisierung von MHC-Klasse II-restringierten Antigenen, die von CD4⁺ T-Zellen erkannt werden, ist wegen des komplexeren Antigenpräsentationsweges deutlich schwieriger als die von MHC Klasse I-restringierten Antigenen. Zu Beginn der eigenen Arbeiten waren erst wenige, aufwendige Verfahren für die Identifikation von MHC-Klasse II-restringierten Antigenen mithilfe humaner CD4⁺ T-Zellen vorgeschlagen worden (Monach *et al.* 1995; Pieper *et al.* 1999; Wang *et al.* 1999).

Mit den genannten T-Zell-Verfahren konnten mehrere MHC Klasse I- und einzelne MHC Klasse II-restringierte Tumorantigene charakterisiert werden. Allerdings sind die Verfahren nur dann anwendbar, wenn aus dem autologen Tumorgewebe Zelllinien angelegt werden können. Letztere werden für die repetitive Stimulation der T-Zellen und damit zur Generation antigenspezifischer T-Zell-Klone benötigt. Pädiatrische Tumoren sind in der Regel sehr schwer *in vitro* zu propagieren, so dass die Generation von autologen, tumorspezifischen T-Zell-Klonen meist unmöglich ist. Zudem stellt sich die Frage, ob das von Tumorzelllinien *in vitro* exprimierte Antigeneset dem *in vivo* exprimierten Antigenmuster entspricht, weshalb nach alternativen Möglichkeiten gesucht wurde, um Tumorantigene zu charakterisieren.

I.4.1.2 Identifikation von Tumorantigenen mit Hilfe von Serum-Antikörpern

In den 70er Jahren wurde von der Gruppe um Loyd Old das so genannte *autologous typing* etabliert. Dabei wurden autologe Tumorzellen bzw. autologe Tumorzelllinien mit Patientenserum inkubiert, um tumorzellbindende AK nachzuweisen. Die Tumorspezifität wurde durch fehlende AK-Bindung an autologe nicht-maligne Zellen nachgewiesen. Um zu prüfen, ob es sich um gemeinsame Tumorantigene handelte, wurde die Reaktivität des Serums auch mit heterologen Tumoren untersucht (Shiku *et al.* 1976; Pfreundschuh *et al.* 1978; Ueda *et al.* 1979).

Der Nachteil bestand wie bei den T-Zell-Verfahren darin, dass patienteneigene Tumorzelllinien *in vitro* in Kultur gehalten werden mussten, was bei vielen Tumoren problematisch war. Die molekulare Charakterisierung war nicht nur wegen der limitierenden Tumorzellmenge sondern auch deshalb schwierig, weil die Titer der AK, die zur biochemischen Aufreinigung gebraucht wurden, meist niedrig waren. Insgesamt zeigten diese Experimente, dass ein kleiner Teil der Patienten tatsächlich AK gegen membranständige Proteine von Tumoren ausbildete, jedoch konnten mit dieser Methode nur wenige Tumorantigene identifiziert werden (Old 1981).

Als Weiterentwicklung des *autologous typing* wurde von Michael Pfreundschuh und Kollegen in Homburg/Saar das SEREX-Verfahren entwickelt. Auch diese Methode nutzt die antigenspezifische humorale Immunantwort als indirektes Detektorsystem für eine Aktivierung von tumorspezifischen CD4⁺ T-Zellen. Im Gegensatz zum *autologous typing* kann jedoch die cDNS des AK-bindenden Antigens unmittelbar kloniert werden. Zunächst wird aus einer frischen oder kryokonservierten Tumorprobe eine cDNS-Expressionsbibliothek konstruiert, in Bakteriophagen kloniert und von *E. coli*-Bakterien exprimiert. Die so exprimierten Proteine werden auf Nitrozellulosemembranen übertragen und mit verdünntem, an Phagen- und Bakterienbestandteile präabsorbiertem, autologem Patientenserum inkubiert. Gebundene Serum-AK können dann durch markierte Sekundär-AK detektiert, der Antigen-exprimierende Phage auf diese Weise identifiziert und das verantwortliche Tumor-cDNS-Insert nach einfacher Umklonierung in einen Plasmid-Vektor sequenziert werden (Sahin *et al.* 1995).

Der Vorteil dieses Ansatzes ist, dass keine Tumor- oder T-Zelllinien benötigt werden. Trotzdem wird indirekt eine Erkennung durch CD4⁺ T-Zellen nachgewiesen, da die Produktion von IgG-AK einen Ig-Switch der B-Zelle und dieser eine vorhergehende Erkennung des Antigens durch CD4⁺ T-Zellen voraussetzt (Janeway *et al.* 2004). Für das mit SEREX klonierte TAA NY-ESO-1 konnte sogar nicht nur eine Erkennung durch CD4⁺ T-Zellen, sondern auch eine Reaktivität mit CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen werden (Chen *et al.* 1997). Da über die Expression von cDNS aus primärem Tumorgewebe nur Proteine gescreent werden, die von den Tumorzellen *in vivo* exprimiert wurden, werden *in vitro* Artefakte umgangen. Ein

weiterer Vorteil ist, dass die mRNA-Sequenz der Antigene unmittelbar bekannt wird und für Expressionsanalysen genutzt werden kann. Andererseits werden Proteine, die bei Expression in Bakterien eine Konformationsänderung erfahren, und glykosylierte Epitope nicht erfasst.

Bei erwachsenen Patienten konnten mit SEREX zahlreiche Tumorantigene verschiedener Karzinome identifiziert und z. T. bereits für klinische Vakzine vorgeschlagen werden. Einige der SEREX-definierten Antigene und AK erwiesen sich auch als diagnostisch wertvoll (Old und Chen 1998; Preuss *et al.* 2002; Gnjatic *et al.* 2006; Jager 2007) (vgl. SEREX-Database). Zu Beginn der eigenen Arbeit lagen noch keine Publikationen über SEREX-Analysen pädiatrischer Tumoren vor.

I.4.2 Tumorimmuntherapie

Da die Ergebnisse konventioneller Behandlungsverfahren maligner Erkrankungen bis auf wenige Ausnahmen und trotz großer Fortschritte in den letzten Dekaden immer noch unbefriedigend sind, wird nach adjuvanten Therapien gesucht. Dabei gehört der immunologische Ansatz zu den vielversprechendsten Konzepten.

Die angewandten aktiven Immuntherapie-Verfahren können wegen der Ähnlichkeit zur klassischen Impfung als Tumorstimmung bezeichnet werden. In beiden Fällen wird mit Antigenen oder Antigengemischen von pathogenen Organismen bzw. Geweben die spezifische körpereigene Immunantwort stimuliert. Im Gegensatz zu den herkömmlichen Schutzimpfungen ist die Stimulation gegen Tumore allerdings in der Regel nicht prophylaktisch, sondern therapeutisch und richtet sich gegen Antigene, mit denen das Immunsystem schon in Kontakt gekommen ist. Klassische, prophylaktische Stimmungen in Verbindung mit Tumoren sind jedoch auch bekannt. Sie wirken nicht direkt gegen zelleigene Antigene der Tumoren, sondern gegen Antigene tumorassoziiierter Viren, die das Risiko für bestimmte Tumorarten erhöhen. Beispiele sind das Hepatitis-B-Virus oder HPV, welche einen Risikofaktor für das hepatozelluläre bzw. Zervixkarzinom darstellen (Ferber *et al.* 2003; Leggatt und Frazer 2007).

Genauso wie bei der konventionellen Impfung gibt es auch bei der Tumorimmuntherapie passive Ansätze. Hier wird zwischen der Behandlung mit AK (vgl. Kapitel I.4.2.1.) und der Übertragung von T-Zellen (vgl. Kapitel I.4.2.2.) unterschieden. Die passiven Immuntherapiekonzepte erscheinen bei vortherapierten Krebspatienten viel versprechender, da sie nicht auf ein funktionstüchtiges, patienteneigenes Immunsystem angewiesen sind.

In tierexperimentellen und klinischen Studien hat sich gezeigt, dass CD4⁺ T-Zellen für eine effiziente und lang anhaltende immunologische Kontrolle maligner Zellproliferation essentiell sind (Pardoll 2002). CD4⁺ T-Zellen können multiple, zelluläre und humorale Immunreaktionen initiieren, potenzieren und prolongieren (Janeway *et al.* 2004). Es sind deshalb

Immuntherapieansätze wünschenswert, die eine signifikante Antwort von CD8+ und CD4+ T-Zellen auslösen (Pardoll 2002; Ostrand-Rosenberg 2005)

I.4.2.1 Aktive Tumorimmuntherapie

Analog zur aktiven Immunisierung gegen pathogene Keime wurde mittels Tumorzelllysaten oder anderen Tumorantigenvakzinen versucht, das patienteneigene Immunsystem gegen den Tumor zu aktivieren und so eine langfristige Immunantwort zu induzieren. Zum Beispiel wurden abgetötete NB- und andere Tumorzellen in Verbindung mit Adjuvantien geimpft (Bausero *et al.* 1996; Ehlken *et al.* 2004). Nachteile dieses Vorgehens sind mögliche Autoimmunreaktionen durch die ungesteuerte Präsentation der Antigene im Tumorgewebe (Hodge *et al.* 2003).

Die Art der antigenpräsentierenden Zelle (APC) und ihr Aktivierungsstatus sind kritisch für die Frage, ob eine Aktivierung des Immunsystems oder eine Toleranzinduktion stattfindet. Um ersteres zu fördern und letzteres zu verhindern, wurden in späteren Studien sogenannte professionelle (p)APC in die Zellvakzinierung eingesetzt (Biragyn und Kwak 2000; Berzofsky *et al.* 2001; Tatsumi und Storkus 2002). Dendritische Zellen stellen die potentesten pAPC dar (Banchereau und Steinman 1998; Proudfoot *et al.* 2007). Für therapeutische Zwecke werden sie *ex vivo* mithilfe von Zytokinen aus patienteneigenen Monozyten generiert und mit Tumorantigen aus Zelllysaten, rekombinanten Antigenen, Antigen-DNS oder -mRNS beladen bzw. transfiziert. Nach Transfusion können sie die Antigenpeptide im Kontext von kostimulatorischen Molekülen auf MHC-Klasse I- und II-Molekülen präsentieren und so die verschiedenen T-Zell-Populationen aktivieren. Über Erfolge von dendritischen Zellvakzinen im Sinne einer Lebensverlängerung bei verbesserter Lebensqualität wurde berichtet (Holzl *et al.* 2002; Banchereau und Palucka 2005).

Als unspezifische Immunstimulantien werden darüber hinaus Zytokine eingesetzt. Eine antitumorale Wirkung wird vor allem für solche Tumoren erwartet, die als besonders immunogen gelten, wie z. B. das Nierenzellkarzinom (Parton *et al.* 2006) und das maligne Melanom (Tilgen *et al.* 1997; Tuettenberg *et al.* 2007). In wie weit es gelingen wird, das patienteneigene Immunsystem im Rahmen onkologischer Erkrankungen soweit zu aktivieren, dass eine effiziente Elimination von z. B. „Minimalen Resterkrankungen“ (*minimal residual disease*, MRD) stattfinden kann, bleibt abzuwarten. Möglicherweise sind passive Immuntherapiekonzepte aussichtsreicher.

I.4.2.2 Passive Tumorimmuntherapie mit Antikörpern

Im Sinne einer passiven Immunisierung ist es möglich, z. B. tumorspezifische AK zu applizieren, welche an den Tumor binden und über den Fc-Rezeptor eine AK-vermittelte zelluläre Zytotoxizität oder eine AK-vermittelte Zytotoxizität über Komplement einleiten (Janeway *et al.* 2004).

Beispiele für den Einsatz von mAK, die gegen Tumorantigene gerichtet sind, liefern die Medikamente Rituximab, Trastuzumab und der bereits erwähnte mAK gegen das GD2 auf NB-Zellen (vgl. Kapitel I.3.7). Rituximab erkennt das Antigen CD20 auf der Oberfläche von B-Zellen und wird daher zur Behandlung von CD20-positiven B-Zell-Lymphomen eingesetzt (Rastetter *et al.* 2004). Trastuzumab ist ein mAK gegen das überexprimierte, epitheliale TAA HER2/neu und z. B. zur Behandlung von metastasiertem Brustkrebs zugelassen. Der mAK wirkt nicht nur opsonierend, sondern unterdrückt außerdem das HER2/neu-vermittelte Wachstumssignal (Hudis 2007).

Ein weiterer Ansatz setzt auf die Fähigkeit von bispezifischen AK, Zielzellen und zytotoxische T-Zellen gleichzeitig zu binden und so die T-Zell-vermittelte Lyse der Zielzellen zu verstärken. Ein Beispiel ist der anti-CD19/anti-CD3-AK, der CD19-positive B-Lymphomzellen mit CD3-positiven T-Zellen in Verbindung bringt (Hoffmann *et al.* 2005).

I.4.2.3 Passive Tumorimmuntherapie durch adoptiven T-Zell-Transfer

Neben der Gabe von AK ist auch eine passive Tumorimmuntherapie mit Effektorzellen möglich. Dabei werden dem Patienten Lymphozyten entnommen und nach *ex vivo*-Aktivierung und Expansion *per infusionem* zurückgegeben (adoptiver Transfer). Ein Vorteil gegenüber AK liegt darin, dass die zellulären Effektoren nahezu jede Gewebestruktur einschließlich der lymphatischen Metastasierungswege erreichen und Tumoren so effizienter lysieren können. Darüber hinaus persistieren sie, verglichen mit AK, über einen längeren Zeitraum *in vivo*.

Zum Einsatz kamen zum Beispiel lymphokinaktivierte Killerzellen (LAK), die durch Inkubation von peripheren Blut-Lymphozyten mit Interleukin-2 (IL-2) gewonnen wurden. Bei einem anderen Ansatz wurde mit tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL) gearbeitet, die z. T. mit Zytokinen versetzt und vor allem beim malignen Melanom erprobt wurden. Die Behandlung mit autologen LAK und TIL trat in den letzten Jahren in den Hintergrund, da die Ergebnisse kaum besser waren als mit IL-2 allein und den hohen technischen Aufwand im allgemeinen nicht rechtfertigten (Kessels *et al.* 2002; Ho *et al.* 2003).

Neue Hoffnung liegt auf dem adoptiven Transfer von tumorantigenspezifischen, *ex vivo* expandierten T-Zellklonen, allerdings befindet sich diese Therapieform noch weitgehend im tierexperimentellen Stadium. Ein Hauptproblem besteht darin, dass die *in vitro* expandierten

Zellen nach der Infusion in den Patienten, aus verschiedenen Gründen im Tumormilieu nicht proliferieren und nicht überleben. In jüngster Zeit mehren sich Hinweise darauf, dass die Wirkung des adoptiven T-Zelltransfers möglicherweise durch eine vorbereitende Immunsuppression z. B. durch Bestrahlung oder milde Chemotherapie optimiert werden kann. Wahrscheinlich wird dadurch die negative Wirkung von sogenannten regulatorischen T-Zellen (Treg) unterdrückt (Muranski *et al.* 2006; Wang und Wang 2007). Aktuelle Ansätze versuchen dieses Problem durch Manipulation der T-Zellen zu lösen (Pardoll 2002; Ho *et al.* 2003; Leen *et al.* 2007). Des Weiteren ist für eine Erfolg versprechende Anwendung die molekulare Identifikation weiterer geeigneter Antigene essentiell.

I.4.3 Mechanismen der immunologischen Tarnung von Tumoren

Die Tatsache, dass Malignome dem patienteneigenen Immunsystem in vielen Fällen entkommen (*immune escape*), wurde einerseits auf aktive, vom malignen Gewebe ausgehende Schutzmechanismen und andererseits auf eine Toleranzentwicklung gegenüber seinen Antigenen zurückgeführt (Pardoll 1998; Seliger 2005)

Bei der *immune surveillance*-Hypothese wird angenommen, dass das Immunsystem den Körper beständig auf Antigene von neu entstehenden Tumoren prüft und die Tumorzellen bei Antigen-Erkennung eliminiert. Manifeste Tumoren seien damit das Ergebnis von Vorgängen, mit denen sich der Tumor aktiv vor dem Immunsystem versteckt oder dieses inaktiviert. Dazu passend wurde gezeigt, dass fortgeschrittene Tumoren oft das Zielantigen nicht mehr exprimieren und sich somit der Erkennung und Destruktion entziehen (Urban *et al.* 1982; Dunn *et al.* 2002; Dunn *et al.* 2004). Auch durch eine Herunterregulation der für die Antigenpräsentation notwendigen MHC-Moleküle (Trowsdale *et al.* 1980; Hui *et al.* 1984) oder durch eine gestörte Antigenprozessierung (Restifo *et al.* 1991) kann eine Erkennung der Tumorzellen durch T-Zellen verhindert werden. Schließlich kann auch die Expression von inhibitorischen Molekülen wie dem Transformierenden Wachstumsfaktor β (*transforming growth factor* β , TGF- β) oder Fas-Ligand eine effektive Tumorimmunantwort unterbinden (Hahne *et al.* 1996).

Die Auslösung einer Immunantwort oder die Induktion einer Toleranz hängen neben der Präsentation des Antigens auf MHC-Molekülen von kostimulatorischen Signalen bei der T-Zell-Aktivierung ab. Die kritische Rolle kostimulatorischer Signale für die Induktion einer Immunreaktion wurde bereits im Kontext der dendritischen Zellen angedeutet (vgl. Kapitel I.4.2.3). Wird ein Antigen ohne Kostimulation präsentiert, wie z. B. bei Tumorwachstum ohne signifikanten Gewebeuntergang, so ist die Entwicklung einer Toleranz wahrscheinlich. Die Überwindung dieser immunologischen Toleranz stellt eine Herausforderung für die Entwicklung von Tumorimmuntherapien dar (Finn 2003).

Auf dem Weg zu effizienten immuntherapeutischen Ansätzen sind neben der Identifikation geeigneter Antigene sowohl die Analyse als auch die Modulation von *immune escape*-Mechanismen zentrale Schritte (Pardoll 2002; Rammensee *et al.* 2002; Yu und Restifo 2002; Rousseau und Brenner 2005).

I.4.4 Antigene von typischen Tumoren des Kindesalters

Das Antigenrepertoire pädiatrischer Malignome ist im Gegensatz zu den Antigenen häufiger Tumoren des Erwachsenenalters noch weitgehend unbekannt. In pädiatrischen Tumoren waren zu Beginn dieser Arbeit z. B. einige CT-Antigene nachgewiesen worden (Soling *et al.* 1999). Ebenfalls bekannt war das GD2, das spezifisch auf der Oberfläche neuroektodermaler Gewebe einschließlich neuroektodermaler Tumoren exprimiert wird (Ritter und Livingston 1991). Diese Antigene waren, wie die meisten pädiatrischen Tumorantigene, ursprünglich bei Tumoren des Erwachsenenalters entdeckt worden (Mackall 2001).

Entsprechend waren zu Beginn dieser Arbeit erst wenige tumorimmuntherapeutische Ansätze für Kinder beschrieben worden (Estlin 2002; Sterba 2002). Einige wenige Protokolle richteten sich gegen die wenigen bekannten Antigene, wie z. B. die Therapie mit den anti-GD2-AK, die auch gekoppelt (IL-2), zum Einsatz kamen (Cheung 2000). Die meisten Ansätze waren eher ungerichtet und arbeiteten mit Tumorzellen oder Tumorzelllysate, wodurch die fehlende Kenntnis zum Vorkommen von Tumorantigenen umgangen werden konnte. Es wurden z. B. autologe NB-Zellen mit IL-2-produzierenden Vektoren transfiziert und den Patienten zurückgegeben. Dabei konnte die Induktion einer Immunreaktion beobachtet werden (Bowman *et al.* 1998). Andere Ansätze arbeiteten mit dendritischen Zellen, die mit Tumorzelllysate gepulst waren (Geiger *et al.* 2001) oder mit der Gabe von Zytokinen (IL-2) auch in Kombination mit LAK (Negrier *et al.* 1991). Aufgrund der limitierten Kenntnisse zur Immunerkennung pädiatrischer Tumoren war die Analyse des Immunoms eines häufigen und problematischen pädiatrischen Tumors Thema dieser Arbeit.

II Material

II.1 Biologisches Material

II.1.1 Tumorgewebe

Alle Gewebeproben wurden im Rahmen von Operationen gewonnen, sofort nach Entnahme schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Bei der Patientin 018, deren Tumorgewebe in das SEREX-Screening eingesetzt wurde, handelte es sich um ein 31 Monate altes Mädchen mit Erstmanifestation eines NB Stadium 3 im Bereich der Nebenniere ohne weitere Vorerkrankungen.

II.1.2 Gewebeschnitte

Die Schnitte von humanem Frontalhirn wurden von Prof. H. A. Kretzschmar (Institut für Neuropathologie der LMU, München) und die Schnitte von NB-Geweben von Dr. F. Prantl (Institut für Pathologie, Städtisches Krankenhaus Schwabing, München) zur Verfügung gestellt. Die in Paraffin eingebetteten Gewebe waren auf Super-Frost PlusTM Objektträger aufgezogen und mit Formaldehyd fixiert worden.

II.1.3 Gesamt-RNS aus Gewebe

Gesamt-RNS aus verschiedenen normalen und malignen Geweben wurde entweder von der Firma Clontech (Palo Alto, CA) bezogen (Gehirn, Thymus, Milz, Leber, Pankreas, Dünndarm, NNR, Nieren, Prostata und Testes) oder von der Arbeitsgruppe aus Operations- bzw. Autopsiepräparaten (Tumoren, Tonsillen, Haut, Lymphknoten, Herz, Blase, Uterus, Skelett und Ovarien) und peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) mittels TRIZOL isoliert.

II.1.4 Blutproben

Voraussetzung für die Entnahme von Blutproben war die Einwilligung der betroffenen Personen bzw. ihrer Sorgeberechtigten sowie die Genehmigung durch die Ethikkommission der Technischen Universität München (TUM). Die Blutproben der Patientin 018 waren zum Zeitpunkt der Diagnosestellung vor Therapiebeginn und vor der ersten Transfusion sowie zu den angegebenen Zeitpunkten nach Therapiebeginn entnommen worden. Für die heterologe Serumanalyse wurden Serumproben von 30 onkologischen Patienten der Kinderklinik und 30 gesunden, weniger als 30 Jahre alten Probanden entnommen. Alle Serumproben onkologischer Patienten wurden zum Zeitpunkt der Erstdiagnose und vor Beginn einer zytostatischen

Therapie oder Transfusion asserviert. Die Serumproben wurden nach Abtrennen der korpuskulären Blutbestandteile durch Zentrifugation bis zur Weiterverarbeitung auf $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Absorbierte, verdünnte und in Gebrauch befindliche Seren wurden bei $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert und monatlich mit je 0,025 % NaAcid und Thiomersal versetzt, damit sie vor Keimwachstum geschützt waren (vgl. Kapitel III.3).

II.1.5 Zelllinien

Die NB-Zelllinien LA-N-5 (Sonnenfeld und Ishii 1982), SiMa (Marini *et al.* 1999) und SH-SY5Y (Biedler *et al.* 1978) wurden freundlicherweise von Prof. Burdach (Kinderklinik und Poliklinik der Technischen Universität München) zur Verfügung gestellt. Die Zelllinien 293T (Pear *et al.* 1993) und die Wi-38 (Hayflick und Moorhead 1961) wurden von der *American Type Culture Collection* bezogen. Die 293T- und die Wi-38-Zellen wurden in DMEM Medium, ergänzt durch 2 mM L-Glutamin, 50 $\mu\text{g/ml}$ Gentamicin und 10 % fetalem Kälberserum (FCS), gehalten. Die LA-N-5, SiMa und SH-SY5Y Zellen wurden in RPMI- Medium, ergänzt durch 2 mM L-Glutamin, 1 % nichtessentiellen AS, 1 mM Natriumpyruvat, 50 $\mu\text{g/ml}$ Gentamicin und 10 % FCS, kultiviert.

II.1.6 Bakterien

Im Verlauf der Arbeit kamen die *E. coli*-Stämme „XL-1 Blue MRF“[™] und „SOLR“[™] zum Einsatz. Die Bakterien wurden mit dem „ZAP-cDNA[®] Gigapack[®] III Gold Cloning Kit“ der Firma Stratagene kommerziell bezogen und als Glycerol-Stock bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Der *E. coli*-Stamm „XL-1 Blue MRF“[™] diente der rekombinanten Expression der cDNS-Bibliothek. Die Selektion von transfizierten Bakterien konnte über die auf dem F'-Episom codierte Tetracyclin-Resistenz erfolgen. Darüber hinaus codierte das F'-Episom die „ Δ M15 lacZ Domäne“ des β -Galaktosidase-Gens, welche für die Aktivität des vom „Uni-Zap[®]-XR“-Vektor codierten Enzyms essentiell war (vgl. Kapitel III.2.16). Das F'-Episom enthielt des Weiteren Gene für die Ausbildung von F'-Pili auf der Bakterienoberfläche, ohne die keine Infektion durch die filamentösen f1-Phagen erfolgen konnte (vgl. Kapitel III.6). Und schließlich codierte das F'-Episom für den lac-Repressor (*lacI^q*-Gen), welcher die Transkription vom lacZ-Promotor in Abwesenheit des Aktivators Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid (IPTG) blockierte.

Der Kanamycin-resistente *E. coli* Stamm „SOLR“[™] war für λ -Phagen resistent, so dass nach der „*in vivo* Exzision“ keine Lyse durch λ -Phagen stattfinden konnte. Außerdem zeichnete er sich durch die sogenannte *non suppressor* Eigenschaft aus, die in Kombination mit der *amber-*

Mutation im ϕ 1-Phagen-Genom zur Suppression der ebenfalls unerwünschten Vermehrung der Helfer-Phagen nach „*in vivo* Exzision“ führte (vgl. Kapitel III.6).

II.1.7 Bakteriophagen

Mithilfe des „Gigapack[®] III Gold packaging extract“ der Firma Stratagene wurde die Tumor-cDNS-Expressionsbibliothek zu einer rekombinanten λ -Phagen-Bibliothek verpackt. Der ϕ 1-Helferphage „ExAssist[™]“ war in dem „ZAP-cDNA[®] Gigapack[®] III Gold Cloning Kit“ der Firma Stratagene enthalten und kam bei der „*in vivo* Exzision“ zu Einsatz (vgl. Kapitel III.6).

II.1.8 Antikörper und Tierseren

- ALP gekoppelter anti-human-IgG-Fc-AK aus der Ziege, Dianova (Hamburg)
- Anti-ELAVL4 mAK aus der Maus, Klon 16C12, Abcam (Cambridge, UK)
- Cy[™]3 gekoppelter anti-Maus IgG aus der Ziege, #115-165-166, Dianova (Hamburg)
- Cy[™]3 gekoppelter anti-Ratte IgG aus der Ziege, #112-165-062, Dianova (Hamburg)
- mAK Hu-3C11 (anti-Hu) von Dr. E. Kremmer zur Verfügung gestellt (Institut für Molekulare Immunologie, GSF, München)
- mAK 1H4-1-4 (anti-EBNA1), von Dr. E. Kremmer zur Verfügung gestellt (Institut für Molekulare Immunologie, GSF, München)
- Meerrettichperoxidase-gekoppelter anti-Ratte-IgG- AK aus der Ziege, Dianova
- Meerrettichperoxidase-gekoppelter anti-Maus-AK aus dem Schaf, GE-Healthcare
- Ziegenserum, #16210-064, Invitrogen (CA, USA)
- Anti-Xpress AK, R910-25, Invitrogen (CA, USA)

II.2 Medien und Mediumzusätze für die Zellkultur

- Complete RPMI 1640, #21875, Gibco BRL (Eggenstein)
- DMEM high Glucose, # 41966, Gibco BRL (Eggenstein)
- Fetales Kälber Serum, FCS (Fetal Calf Serum), Biochrome 461FF, PAA (Pasching)
- Fungizone, Amphotericin 250 μ g/ml, #15290-626, Gibco BRL (Eggenstein)
- L-Glutamin, 200 mM, #25036, Gibco BRL (Eggenstein)
- Natriumpyruvat, #11360, Gibco BRL (Eggenstein)
- nichtessentiellen Aminosäuren, NEAA, #11140, Gibco BRL (Eggenstein)
- OptiMEM, # 31985, Gibco BRL (Eggenstein)

II.3 Chemikalien

- Agarose (Top-Agar), #11404, Serva (Heidelberg)
- Ampicillin, # 835269, Roche (Mannheim)
- BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate-toluidine), #02291, Biomol (Hamburg)
- DakoCytomation Fluorescent Mounting Medium, Dako (Dänemark)
- DAPI, #D8417, Sigma-Aldrich (München)
- dNTP Set, 100 mM 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 (Steinheim)
- Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder, #SM0311, MBI (Eggenstein)
- IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalacto-Pyranosid), #R0392, Fermentas (St. Leon-Rot)
- Isopropanol, # 1.00547, Merck (Darmstadt)
- Kanamycin, # K0879, Sigma (Steinheim)
- Kieselgel, Affinity Adsorbent, Glutarialdehyde activated, #669580, Roche (Mannheim)
- Maltose, #M-5885, Sigma (Steinheim)
- Methanol, #1.06009.2500, Merck (Darmstadt)
- MgSO₄-7H₂O, # M-5921, Sigma (Steinheim)
- 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 (Steinheim)
- Polyoxyethylen-Sorbitan Monolaurat (Tween 20), #P-1379, Sigma (Steinheim)
- Primer p(dT)₁₅, 8 nmol, #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)
- Sephadex-G25, #G-25-80, Sigma-Aldrich (München)
- Tetracyclin, # T7660, Sigma (Steinheim)
- Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, #1.08382.2500, Merck (Darmstadt)

- TRIZOL® Reagent, #15596, Life Technologies (Karlsruhe)
- X-Gal (5Bromo-4chloro-3indolyl-β-D-galactopyranosid), #02249, Biomol (Hamburg)
- [γ -³²P]-ATP, 370 MBq/ml, 10 mCi/ml, # AA0068, Amersham Pharmacia (NJ, USA)
- ECL-Plus-Detektionssystem, #RNP2123, GE-Healthcare (Buckinghamshire, GB)
- Rotiphorese® Gel 30,#3029.1 Carl Roth GmbH, Karlsruhe
- TEMED, #17-1312-01 GE-Healthcare (Buckinghamshire, GB)
- Ammoniumpersulfat (APS), # 101201, Merck (Darmstadt)
- Imidazol, #I10125, Sigma (Steinheim)
- TWEEN® 20, #P1379, Sigma (Steinheim)

II.4 Enzyme

- MuLV-Reverse Transkriptase, New England Biolabs (Schwalbach)
- Pfu-DNS Polymerase, #11070205, Promega (Mannheim)
- Restriktionsenzyme, New England Biolabs (Schwalbach) bzw. MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
- Taq-DNS Polymerase, #15756305, Promega (Mannheim)
- T4-DNS Ligase, New England Biolabs (Schwalbach)
- T4-Polymerase, New England Biolabs (Schwalbach)

II.5 Kits und Vektoren

- CL-4B-Säule, Sepharose Säule, #17-0150-01, Amersham Pharmacia (NJ, USA)
- Jetstar, Plasmid Mini/Maxiprep Kit/20, #220020, Genomed (Bad Oeynhausen)
- mRNA Isolation Kit #200347, Stratagene (Amsterdam, NL)
- pCMV-GNG-NLS (von der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt)
- pCMV-RevNES-GNG-NLS (von der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt)
- pCMV/myc/cyto©, #V820-20, Invitrogen (CA, USA)
- pCMV-GFP (von der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt)
- pTrcHis-Expression Kit, #V36020, Invitrogen (CA, USA)
- SizeSep® 400 Spun Columns, Amersham Pharmacia (NJ, USA)
- ZAP-cDNA® Gigapack® III Gold Cloning Kit, #200450 Stratagene (Amsterdam, NL)
- ZAP-cDNA® Synthesis Kit, Stratagene (Amsterdam, NL)
-

II.6 Sonstiges Verbrauchsmaterial

- Blotting Membran, HybondN+, 0,45 µm, #RPN203B, Amersham Pharmacia (NJ, USA)
- Falcon-Röhrchen, Becton Dickinson (Heidelberg)

- Gestopfte Pipettenspitzen, #2149P, ART Molecular Bio Produkts (San Diego, CA, USA)
- Ni-NTA Partikel, Ni-NTA Agarose, # 1018244, Quiagen (Hilden)
- Parafilm „M“, Laboratory Film, PM-996, American National Can (Chicago, IL, USA)
- Petrischalen, #639102, M&B Stricker (München)
- Polysine®, Polylysinobjekträger, #J2800AMNZ, Menzel (Braunschweig)
- PVDF-Membran, Hybond P, GE-Healthcare (Buckinghamshire, GB)
- Sartorius Membran, Porengröße 0,45 µm, # 11306-41BL, Sartorius (Göttingen)
- Sartorius minisart membrane (0,2 µm), #SA16532A, Sartorius (Göttingen)
- Super-Frost Plus™, Objekträger, Menzel-Gläser (Braunschweig)
- Zellkulturschalen, Nunclon™Δ 60x15 Polystyrene, #150270, Nunc (Dänemark)

II.7 Geräte

- Beheiztes Wasserbad, Typ WB 22, Memert (Schwabach)
- Brutschrank, Memert Modell 400, Memert (Schwabach)
- Dampfsterilisator, Varioklav 300 E, H+P (Oberschleißheim)
- Elektrophoresekammer, Mighty Small SE260, Hoefer (CA, USA)
- Elektroporationsgerät, Gene Pulser II mit Puls Controller Plus, Bio-Rad (CA, USA)
- Elektroporationsküvette 1 mm, Gene Pulser Cuvette, #165-2086, Bio-Rad (CA, USA)
- Elektroporationsküvette 4 mm, Gene Pulser Cuvette, #165-2088, Bio-Rad (CA, USA)
- Falcon-Roller, CAT-RM 5, CAT (Staufen)
- Gelelektrophoresekammer OWL, Peqlab (Erlangen)
- Hybridisierofen, Mini 10, # E6309, HyBaid (MA, USA)
- Inkubator, Series II 3110, Thermo Fisher Scientific, Inc. (Waltham, MA, USA)
- Konfokalmikroskop, Leica TCS SP2, Leica Mikrosysteme (Wetzlar)
- Kühlzentrifuge, Sigma 2K15, Sigma Laborzentrifugen (Osterode am Harz)
- Laminar Flow, UVF 6.18 S, BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH (Sonnenbühl)
- Mikroskop, Zeiss Axiovert 200, Carl Zeiss Lichtmikroskopie (Göttingen)
- ml-Pipetierhilfen, Pipetus-Akku, Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt)
- Netzgerät, Bio Rad Power PAC 300, Bio-Rad (CA, USA)
- Photometer, Uvikon-Spectrophotometer 922, Bio-Tek Kontron (Neufahrn)
- Pipetierhilfen, Pipetman, Gilson S.A.S. (Villiers le Bel, Frankreich)
- Röntgenfilm Entwicklungsgerät, Cawomat 2000IR, CAWO (Neuisenbourg)
- Rüttler beheizt, Innova 4000, New Brunswick Scientific Co. (Edison, NJ, USA)
- Rüttler, Vortex-Genie 2, Scientific Industries (Bohemia, NY, 11716, USA)
- 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)
- Transferkammer, Mighty Small TE22, Hoefer (CA, USA)
- Überkopffrotor, Reax2, Heidolph Instruments (Schwabach)
- Ultrazentrifuge, Centrikon H-401, ZK 401, Berthold Hermele (Gosheim)
- UV-Transilluminator, Bio Rad Gel Doc 2000, Bio Rad (München)
- Wasserbad, DB8, Haake, (Karlsruhe)
- Zentrifuge, Rotina 35R, Typ 1710, Hettich (Tuttlingen)

II.8 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden entsprechend den von uns vorgegebenen Sequenzen von der Firma Metabion (Martinsried) synthetisiert. In **Tab. 2** sind die Oligonukleotide A) für die RT-PCR zur mRNA-Analyse, B) für die nachfolgende Southern-Blot-Hybridisierung, C) für die Generation von PCR-Produkten für die Klonierung und D) für die direkte Klonierung gelistet.

A	Homologie	Sequenz (5' – 3')	Annealing Temperatur
HuD1se	AY033997.1, Bp 31-50	TCCTAGAATCGGGGGTTTCA	54 °C
HuD2se	S73887.1, Bp 27-46	GTTGACCTGAAGCCAAGAAG	55 °C
HuD3se	AY033995.1, Bp 21-41	CTGTTGCACGTGAATGCTCT	58 °C
HuD4se	AY033996.1, Bp 30-49	GGGGCTGACTGATATGAGAT	52 °C
NNP1se	U79775.1, Bp 39-58	ATGGTTTCGCGCGTGCAGCT	56 °C
NNP2se	AL137757.1, Bp 216-	ATCCTCATGTCCAGATCCTG	55 °C
NNP3se	AY033999.1, Bp 29-48	GCTGCCTGTCATGTTTGCTT	56 °C
HuDan	M62843.1, Bp 1000-981	GTAGACAAAGATGCACCACC	56 °C
NNPan	U79775.1, Bp 1427-	ACATCACTCCCTGCGTTTCT	56 °C
HuCse	L26405.1 Bp 756-775	AACAACCCAAGTCAGAAGAC	60 °C
HuCan	L26405.1 Bp 991-972	TTGTACACGAAGATGCACCA	60 °C

Material		
Material		
B	Homologie	Sequenz (5' – 3')
HuD1	AY033997.1, Bp 244-215	TATTGGGTCTCGCAGAGCTTCGACTCTTCT
HuD2	S73887.1, Bp 93-64	CATGTAAGTAATTTAAGTGGCTCCACTTCT
HuD3	AY033995.1, Bp 105-76	ATGGTGCTAATTATCTGTTCCATATGACTG
HuD4	AY033996.1, Bp 111-79	GCTAATTATCATAAATGAGCAGTTTCTTGACTC
3'HuD	M62843.1, Bp 811-782	GTGGTGAAGTGGACCTGGGTAGCGCCGGTT
NNP1	U79775.1, Bp 470-411	CTCGATCTGTCTTTCTTCCCAGCCTTGCATCTTCA GAACCTTCAAGGACTCGTTCAGGAC
NNP2	AL137757.1, Bp 270-241	CCAGGCCCTACCCCCAGAACTGGATCTTGC
NNP3	AY033999.1, Bp 75-45	GCTCCTCGATCTGTCTGAGGAAAGAAAAGC
HuC-L	AY034002.1, Bp 740-720	GGCGATGAGCGACAGGGGACT
C	Sequenz (5' – 3')	Annealing Temperatur
HuR(<i>EcoRI</i>)	CGCGAATTCATGTCTAATGGTTATGAAGACC	65 °C
HuR(<i>XhoI</i>)	GCGCTCGAGTTATTTGTGGGACTTGTGGTT	63°C
HuB(<i>EcoRI</i>)	CGCGAATTCATGGAACACAACACTGTCTAAT	64 °C
HuB(<i>XhoI</i>)	GCGCTCGAGTTAGGCTTTGTGCGTTTGT	68 °C
HuC(<i>EcoRI</i>)	CGCGAATTCATGACCCAGGATGAGTT	64 °C
HuC(<i>XhoI</i>)	GCGCTCGAGTCACGCCTTGTGCTGT	62°C
HuD (<i>EcoRI</i>)	CGCGAATTCATGGTTATGATAATTAGCACC	69 °C
HuD(<i>XhoI</i>)	GCGCTCGAGTCAGGACTTGTGGGCTTTGT	68 °C
HuD1-5'	GTTATGATAATTAGCACCATGG	54°C
HuD3-5'	GAACAGATAATTAGCACCATGG	54 °C
HuD4-5'	AGATTACTTCTTTTAAGGGAAA	53 °C
HuD-3'(<i>PstI</i>)	GAGCTGCAGTCAGACTTGTGGGCTTTGT	66 °C
GFP (<i>PstI</i>)	GAGCTGCAGGACTTGTGGGCTTTGTTGG	66 °C
D	Sequenz (5' – 3')	
HuDΔNES sense (<i>PmlI</i> , <i>Bsu36I</i>)	GTGGCCACCATGAATGAGTCAAGAACTGCTCA TTTATGATAATTAGTACTATGGAGCC	
HuDΔNES antisense (<i>PmlI</i> , <i>Bsu36I</i>)	TGAGGCTCCATAGTACTAATTATCATAAATGAG CAGTTTCTTGACTCATTTCATGGTGGCCAC	
HuD4NES-GNG- sense (<i>PmlI</i> , <i>AgeI</i>)	GTGGCCACCATGAGATTACTTCTTTTAAGGGAA ATTGTCATTAATGAGTCAAGAACTGCTCATTTA	
HuD4NES-GNG- antisense (<i>PmlI</i> , <i>AgeI</i>)	CCGGTAAATGAGCAGTTTCTTGACTCATTAAATGA CAATTTCCCTTAAAAGAAGTAATCTCATGGTGGC CAC	
HuD4ΔNES-GNG-sense (<i>PmlI</i> , <i>AgeI</i>)	GTGGCCACCATGAATGAGTCAAGAACTGCTCA TTTA	
HuD4NES-GNG-antisense (<i>PmlI</i> , <i>AgeI</i>)	CCGGTAAATGAGCAGTTTCTTGACTCATTTCATGG TGGCCAC	

Tab. 2: Oligonukleotide: Gelistet sind die synthetisierten Oligonukleotide für die PCR zur mRNS-Analyse (A), für die Southern-Blot-Hybridisierung (B), für die PCR vor Klonierung und (C) für die direkte Klonierung (D). Blau und Grün markiert sind enzymatische Schnittstellen.

II.9 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)
- Genvool 1.0, BioTools (Edmonton, Canada)
- NetNES 1.1 Server : <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNES/>
- PubMed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed>
- SEREX-Database: <http://www2.licr.org/CancerImmunomeDB/>
- Open Lab™, Improvision (Coventry, GB)

II.10 Rezepte für Stammlösungen

- AK-Lösung verdünnt: Stammlösung (0,3 mg AK/ml) 1:2500 in TBS mit 0,5 %, Magermilchpulver verdünnen
- Alkalische Phosphatase gekoppelter anti-human-IgG-Fc-AK aus der Ziege: AK-Pulver in 1 ml autoklaviertem ddH₂O lösen (entspricht 0,6 mg AK/ml), mit 1 ml Glycerol vermischen = 2 ml Stammlösung a 0,3 mg AK/ml
- Ampicillin-Stammlösung (10 mg/ml): 500 mg Ampicillin; ad 50 ml 70 % EtOH; lichtgeschützt bei -20 °C aufbewahren.
- BCIP-Entwicklerlösung: (pro Membran) 20 ml 1 x CDS-Puffer, je 20 µl BCIP (5 % in 100 % DMF) und NBT-Stammlösung (10 % in 70 % DMF)
- CDS-Puffer: 50 ml 2 M NaCl; 100 ml 1 M Tris, 1 g MgCl₂ x 6H₂O; ad 1 l ddH₂O, auf pH 9,5 einstellen
- Church-Puffer: 0,1 M NaH₂PO₄; 0,4 M Na₂HPO₄; 7 % SDS; 1 mM EDTA; auf pH 7,2 einstellen
- Citrat-Puffer: 8 ml 0,1 M Citronensäure (21 g/l) Endkonz: 2 mM, 36,3 ml 0,1 M Natriumcitrat (29,4 g/l) Endkonz. 9 mM; ad 400 ml H₂O
- DEPC-H₂O: 200 ml ddH₂O; 200 µl DEPC; ÜN schütteln, autoklavieren
- DNS-Glycerol-Ladepuffer: 50 mM Tris-HCl pH 7,8; 5 mM NaOAc; 1 mM EDTA
- dNTP Mix: äquimolare Mengen von dATP, dCTP, dGTP und dTTP aus dem dNTP Set vermischen
- Formaldehyd-Agarose-Gel: 1 x MOPS; 1,2 % Agarose, in der Mikrowelle kochen; 1,1 % Formaldehyd
- Elutionspuffer: 100 ml Lysispuffer; 3,4 g Imidazol
- IPTG-Stammlösung 1 M: 2 g IPTG (-20 °C) auf 8 ml mit ddH₂O

- Kanamycin-Stammlösung (7,5 mg/ml): 375 mg Kanamycin ad 50 ml 70 % EtOH, bei – 20 °C aufbewahren
- LB-Medium: 10 g NaCl; 10 g Select Peptone; 5 g Select Yeast-Extract; ad 1 l mit ddH₂O, mit 5 N NaOH auf pH 7,0 einstellen, autoklavieren
- LB-Amp-Medium (0,1 mg Amp/ml): 400 ml LB-Medium; 4 ml Ampicillin-Stammlösung (10 mg/ml)
- LB-Amp-Platten (0,1 mg Amp/ml): 400 ml LB-Medium; 8 g Select Agar, autoklavieren, abkühlen auf 55 °C im Wasserbad, 4 ml Ampicillin-Stammlösung (10 mg/ml), ausbringen in Petrischalen
- LB-Kana-Medium (49,5 µg Kana/ml): 400 ml LB-Medium; 2,64 ml Kanamycin-Stammlösung (7,5 mg/ml)
- LB-Kana-MM-Medium: 50 ml LB-Kana-Medium; 500 µl Maltose (20 %); 500 µl MgSO₄ (1 M)
- LB-Kana-Platten (49,5 µg Kana/ml): 400 ml LB-Medium; 8 g Select Agar, autoklavieren, abkühlen auf 55 °C im Wasserbad, 2,64 ml Kanamycin-Stammlösung (7,5 mg/ml), ausbringen in Petrischalen
- LB-Tet-Medium (15 µg Tet/ml): 400 ml LB-Medium; 600 µl Tetracyclin-Stammlösung (10 mg/ml)
- LB-Tet-MM-Medium: 50 ml LB-Medium; 500 µl Maltose (20 %); 500 µl MgSO₄ (1 M) 75 µl Tetracyclin-Stammlösung (10 mg/ml)
- LB-Tet-Platten (15 µg Tet/ml): 400 ml LB-Medium; 8 g Select Agar, autoklavieren, abkühlen auf 52 °C im Wasserbad, 600 µl Tetracyclin-Stammlösung (10 mg/ml); ausbringen in Petrischalen
- Lysispuffer: 480,5 g Harnstoff (8 M); 13,79 g NaH₂PO₄; 1,21 g Tris; 0,5 ml Tween 20, 1,36 g Imidazol; ad 1 l, auf pH 8 einstellen
- Magermilch (10%ige Stammlösung): 1 g Magermilch; ad 10 ml H₂O
- MOPS-Puffer (10x): 0,2 M MOPS, pH 5,5–7,0; 0,05 M Na-Acetat; 0,01 M EDTA
- NaAcid (10%ige Stammlösung): 1 g NaAcid ad 10 ml H₂O
- PBS-Puffer: 0,2 g Kaliumchlorid; 0,2 g Kaliumhydrogenphosphat; 8 g Natriumchlorid, 1,43 g Dinatriumhydrogenphosphat, auf pH 7,5 einstellen
- RNS-Lade-Puffer: 50 % Formamid; 2,2 M Formaldehyd; 1 x MOPS-Puffer; 0,2 % (w/v) Bromphenolblau, 50 mg/ml Ethidiumbromid; 10 % Ficoll; 50 µg/ml Ethidiumbromid

- SDS-PAGE-Sammelgel: 1 ml 30 % PAA; 3,75 ml 2x Tris/SDS pH 6,8, 2,7 ml ddH₂O; 45 µl 10 % APS; 5 µl TEMED
- SDS-PAGE 2x Tris/SDS pH 6,8: 7,56 g Tris-Base; 2,5 ml 20 % SDS pH 6,8; auf pH 6,8 einstellen, ad 250 ml ddH₂O
- SDS-PAGE Trenngel (10,5 %): 3,5 ml 30 % PAA; 5 ml 2x Tris/SDS pH 8,8; 1,4 ml ddH₂O, 83 µl 10 % APS; 8,5 µl TEMED
- SDS-PAGE: 2x Tris/SDS pH 8,8: 22,68 g Tris-Base; 2,5 ml 20 % SDS; auf pH 8,8 einstellen, ad 250 ml ddH₂O
- SDS-PAGE Elektrophoresepuffer: 0,125 M Tris-Base; 1,25 M Glycin; 0,5 % SDS
- SDS-PAGE-Ladepuffer: 200 mM Tris-HCl pH 6,8; 8 % SDS; 40 % Glycerin; 400 mM DTT, 0,2 mM EDTA/NaOH pH 8,0; 0,4 % Bromphenolblau
- SM-Puffer: 5,8 g NaCl; 2 g MgSO₄ 7 H₂O; 50 ml 1 M TRIS-HCl (pH 7,5), 5 ml Gelatine (2 % w/v in H₂O); ad 1 l mit autoklav. ddH₂O, sterilfiltrieren
- SOB-Medium: 20 g Trypton; 5 g Hefe-Extrakt; 0,5 g NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄; ad 1 l ddH₂O; autoklavieren; für SOC-Medium: 0,2 % Glucose sterilfiltrieren
- SSC Puffer 20x: 3 M NaCl; 300 mM Na-Citrat, auf pH 7,0 einstellen
- SSC 2 x in 1 % SDS-Puffer: 100 ml 20x SSC; 10 g SDS; ad 1 l ddH₂O
- Southern-Blot-Puffer: 87,66 g NaCl ; 100 ml 5 M NaOH ; ad 1 l ddH₂O.
- TAE-Agarose-Gel (1 %): 400 ml TAE Puffer; 4 g Seakam Agar; 30 µl 1 %iges Ethidiumbromid
- TBS(-T)-Puffer (10 x Stammlösung): 8,75 g NaCl; 6 g Tris-Base; auf pH 7,5 einstellen, ad 1 l ddH₂O, für TBS-T: 5 ml Tween 20
- TBS/Magermilchlösung: TBS-Puffer mit 0,5 % Magermilchpulver
- Top-Agar: 200 ml LB-Medium ; 1,4 g Agarose, autoklavieren, auf 52°C bis zum Ausplattieren
- TE-Puffer: 10 mM Tris pH 8,0; 1 mM EDTA, auf pH 7,5 einstellen
- Tetracyclin-Stammlösung (10 mg/ml): 500 mg Tetracyclin ; ad 50 ml 70 % EtOH, lichtgeschützt bei -20 °C aufbewahren.
- Thimerosal (10%ige Stammlösung): 1 g Thimerosal ad 10 ml H₂O
- Western-Transferpuffer: 14 g Glycin; 3 g Tris-Base; 20 % Methanol ; ad 1 l dH₂O
- Western-Blockpuffer: 5 % Magermilchpulver in PBS
- Western-Inkubations- und Waschpuffer: 3 % Magermilchpulver in PBS
- X-Gal-Lösung: 25 mg X-Gal ad 100 µl ddH₂O

III Methoden

III.1 Bakterienanzucht

III.1.1 Stammplatte

1 µl des Glycerolstocks, enthalten in dem „ZAP-cDNA[®] Gigapack[®] III Gold Cloning Kit“ der Firma Stratagene, wurde auf eine LB-Platte mit passendem Antibiotikum ausplattiert. Für den *E. coli*-Stamm „XL-1 Blue MRF“ wurden LB-Tet-Platten benötigt und für den *E. coli*-Stamm „SOLR[™]“ LB-Kana-Platten. Zur Erneuerung der Platte wurde einmal wöchentlich eine Kolonie der alten Stammplatte erneut ausgestrichen und die alte Platte verworfen.

III.1.2 Flüssigkultur

Je nach Anwendung wurde mit Volumina von 4 ml bis 400 ml gearbeitet. Als Kulturmedium wurde LB-Medium mit dem jeweils passenden Antibiotikum verwendet. Die Flüssigkultur wurde je nach Anwendung mit Kolonien einer LB-Platte oder 1 µl der Mini-Präparationskultur (vgl. Kapitel III.7) angeimpft. Die Anzucht erfolgte als Schüttelkultur z. B. über Nacht (ÜN) bei 37 °C.

III.1.3 Glycerolstock

Zur Asservierung rekombinanter Bakterien (vgl. Kapitel III.8) wurde nach Resuspendierung in Puffer E1 1 ml entnommen, abzentrifugiert und in 800 µl LB-Medium aufgenommen. Diesem Ansatz wurden 1,1 ml LB-Medium mit 20 % Glycerol zugegeben, und das Gemisch bei –80 °C eingefroren.

III.2 Herstellung der Tumor-cDNS-Expressionsbibliothek in λ-Phagen

Zunächst wurde aus Tumorgewebe der Patientin 018 mittels des „mRNA Isolation Kit“ und des „ZAP-cDNA[®] Synthesis Kit“ der Firma Stratagene mRNS isoliert, und diese in cDNS umgeschrieben. Die Tumor-cDNS wurde dann mithilfe des „ZAP-cDNA[®] Gigapack[®] III Gold Cloning Kit“ in „Uni-ZAP[®] XR“-Vektoren inkloniert, und diese weiter zu rekombinanten λ-Phagen verpackt. Diese primäre cDNS Expressionsbibliothek wurde amplifiziert, um einen Informationsverlust durch Untergang einzelner Phagen zu vermeiden.

III.2.1 Isolation der Tumor-mRNS

Die mRNS aus dem operativ gewonnen, kryokonservierten NB-Gewebe wurde mittels des „mRNA Isolation Kit“ der Firma Stratagene isoliert. Das Prinzip der Trennung zwischen mRNS und anderen Nukleotiden einschließlich transfer (t)RNS und ribosomaler (r)RNS basiert auf der Bindung des Poly-A-Schwanzes, welcher mRNS-spezifisch ist, an fixierte Oligo(dT)Primer.

Zuerst wurde die Probe unter stark denaturierenden Bedingungen lysiert und homogenisiert. Dafür wurde ca. 1 g gefrorenes Tumorgewebe in einem mittels flüssigem Stickstoff vorgekühlten Tiegel mit einem vorgekühlten Mörser zermahlen und anschließend mit 10 ml Denaturierungslösung (10 µg/ml β-Mercaptoethanol) versetzt. Das Guanidium-Isothiocyanat und β-Mercaptoethanol dienen der Inaktivierung von RNAsen. Die zunächst anfrierende Denaturierungslösung wurde durch Aufwärmen des Tiegels in einem 60 °C Wasserbad gelöst und während des Auflösenvorgangs unter kontinuierlichem Rühren mit dem Gewebematerial vermischt. Die homogenisierte Suspension wurde in ein 50 ml Falcon-Röhrchen umgefüllt, und 20 ml Elutionspuffer zugesetzt. Das Gemisch wurde in einem RNase-freien Gefäß mit 12000 g bei Raumtemperatur (Rt) für 10 min zentrifugiert, wodurch die Proteine abgetrennt wurden. Der Überstand mit der RNS wurde in ein RNase-freies 50 ml Falcon-Röhrchen überführt, mit 10 ml 0,04 g/ml Oligo(dT)-Zellulose versetzt und bei Rt 15 min sanft geschwenkt. Dabei band der mRNS-spezifische Poly-A-Schwanz an die Oligo(dT)-Zellulose. Die Zellulose-mRNS Verbindung wurde durch zentrifugieren mit 700 g bei Rt für 3 min pelletiert, und der Überstand verworfen. Das Oligo(dT)-Zellulose-Pellet wurde in 10 ml Hoch-Salz-Puffer resuspendiert und noch dreimal analog dem letzten Schritt zentrifugiert und resuspendiert. Die letzten zwei Resuspensionen wurden mit 10 ml Niedrig-Salz-Puffer durchgeführt. Von dieser Suspension wurden nacheinander je 2,5 ml auf eine der im Kit enthaltenen gestopften Säulen übertragen, und der wässrige Anteil mit dem Kolben einer Spritze durch die Säule hindurchgedrückt. Dabei verblieb die Zellulose-mRNS Verbindung in der Säule, während der Puffer die Säule passierte. Die mRNS wurde anschließend mit dreimal 400 µl auf 68 °C erwärmtem Elutions-Puffer eluiert. Um restliche rRNS zu entfernen, wurde die Säulenaufreinigung noch einmal wiederholt. Zu diesem Zweck wurden die Zellulosesäulen mit zweimal 1 ml Hoch-Salz-Puffer reäquilibriert, und die mRNS-Lösung mit 120 µl 5 M NaCl (1/10 v/v) auf die Hoch-Salz-Puffer-Molarität eingestellt. Diese mRNS-Lösung wurde protokollgetreu erneut auf die Zellulosesäule aufgebracht. Nach dreimaligem Waschen mit jeweils 1 ml Niedrig-Salz-Puffer konnte die mRNS wie oben beschrieben mit dem auf 68 °C erwärmten Elutions-Puffer aus der Säule gelöst werden.

III.2.2 mRNS-Gelelektrophorese

Die Qualität der mRNS sollte mittels Größenauftrennung durch horizontale Gelelektrophorese in einem Formaldehyd-Agarose-Gel überprüft werden. Zu diesem Zweck wurden nach photometrischer Konzentrationsbestimmung 0,25 - 0,5 µg der RNS mit 3 µl Ethidiumbromid-haltigem RNS-Ladepuffer versetzt, 45 min lang auf 65 °C erhitzt, um die RNS zu denaturieren, und nach Abkühlung mittels Eis auf das Agarose-Gel geladen. Das im Gel enthaltene Formaldehyd verhinderte eine Ausbildung von RNS-Sekundärstrukturen. Nach elektrophoretischer Auftrennung in 1x MOPS Puffer bei 80 V erfolgte die Darstellung der RNS über das interkalierende Ethidiumbromid unter UV-Licht einer Wellenlänge von 365 nm.

III.2.3 Reverse Transkription in cDNS

Um die labile mRNS in einen Expressionsvektor ligieren zu können, musste sie in cDNS umgewandelt werden. Dies wurde mit dem „ZAP-cDNA[®] Synthesis Kit“ durchgeführt (**Abb. 2**). Im ersten Schritt wurde mittels Reverser Transkription (RT) durch die Reverse Transkriptase des Murinen Moloney-Leukämievirus (MMLV-RT) von der mRNS ein erster cDNS-Strang synthetisiert. Die RT wurde mit einem Oligo(dT)-Primer, der den Poly-A-Schwanz der mRNS band, initiiert. Der eingesetzte Oligo(dT)-Linker-Primer besaß am 5'-Ende eine XhoI-Schnittstelle, so dass das RNS-DNS-Hybrid am 3'-Ende des Poly-A-Schwanzes eine XhoI-Schnittstelle trug, und letztere bei der anschließenden Ligation in den Vektor genutzt werden konnte. Bei der cDNS-Synthese wurde mit Methyl-dCTP gearbeitet, um die cDNS in den darauf folgenden Schritten vor dem Verdau durch Restriktionsenzyme zu schützen. Die Synthese wurde in einem Volumen von 50 µl durchgeführt. Im Einzelnen bestand der Ansatz aus 5 µl Erststrangpuffer (10x), 3 µl Erststrang-Methylnukleotid Mix, 2 µl Linker-Primer, 1 µl RNase Block Ribonuklease Inhibitor und x µl mRNS (entsprechend 5 µg poly(A)-RNS) und x µl DEPC-H₂O auf 50µl Gesamtvolumen. Die Probe wurde 10 min zur Primeranlagerung bei Rt belassen. Danach kamen 1,5 µl MMLV-RT hinzu. Dieser Reaktionsansatz wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert, und die Probe anschließend auf Eis gestellt. Für die Synthese des zweiten cDNS-Strangs wurde die mRNS mittels RNase H teilweise vom cDNS-Strang abgedaut. Anschließend wurde mittels DNS-Polymerase I der zweite Strang der cDNS synthetisiert. Dabei dienten die am ersten Strang verbliebenen RNS-Fragmente als Primer. Im Einzelnen wurden den 50 µl Reaktionsansatz aus der Erststrangsynthese 20 µl Zweitstrangpuffer (10x), 6 µl Zweitstrang-dNTP-Mix und 114 µl ddH₂O zugegeben. Vor dem Hinzufügen der Enzyme musste die Probe eine Temperatur von weniger als 16 °C aufweisen. Es wurden 2 µl RNase H

(1,5 U/ μ l) und 11 μ l DNS-Polymerase I (9 U/ μ l) zugegeben. Die Zweitstrang-Reaktion wurde 2,5 h bei 16 °C inkubiert und anschließend auf Eis gestellt.

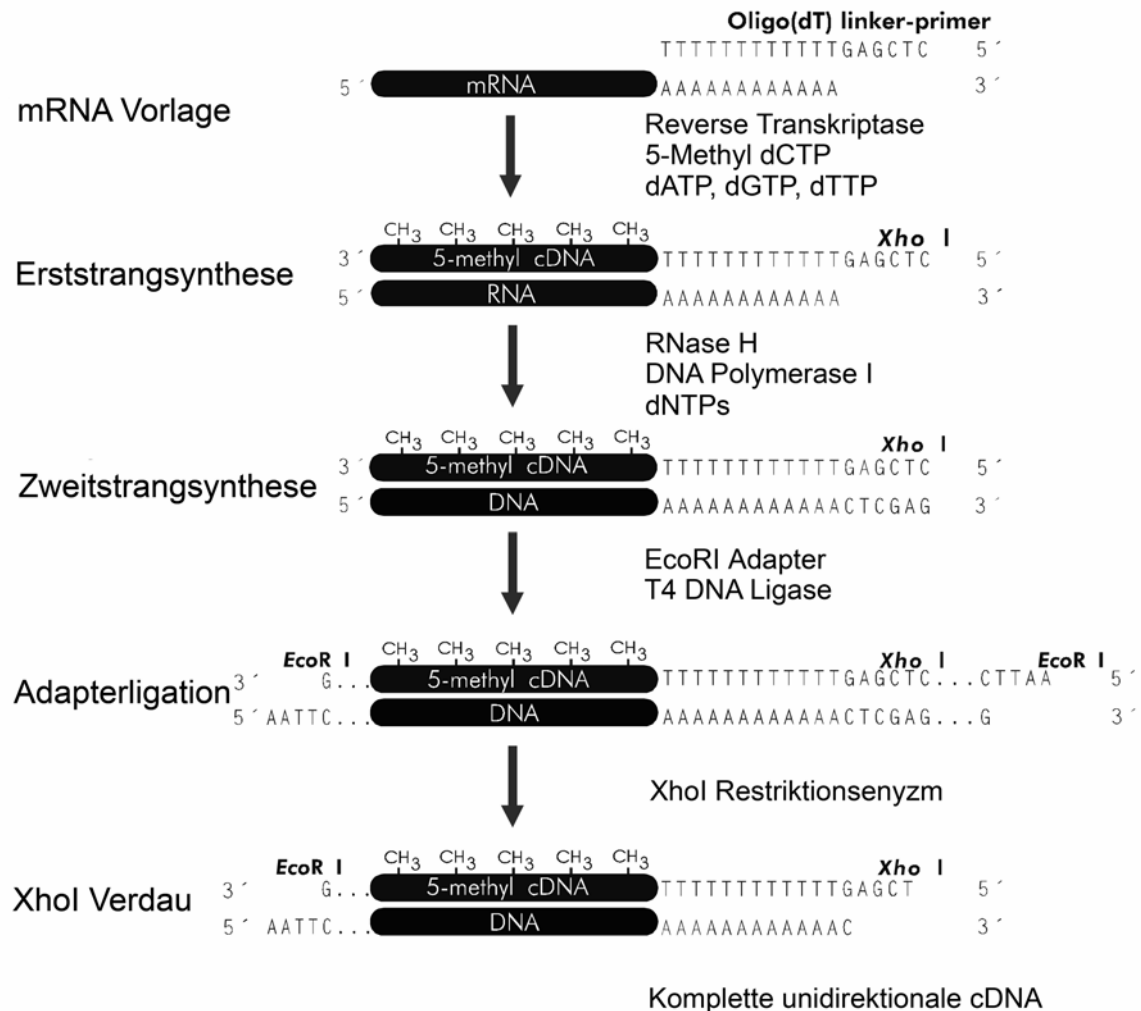


Abb. 2: cDNS-Synthese: Übersicht über die Konstruktion von doppelsträngiger cDNS mit flankierenden Restriktionssequenzen aus Gewebe-mRNS (modifiziert nach dem Manual der Firma Stratagene). Nähere Beschreibung in den entsprechenden Kapiteln.

III.2.4 Modifikation der 5'- und 3'-Enden der cDNS

Zusammenfassend wurden die Enden der doppelsträngigen cDNS zunächst mit Nukleotiden aufgefüllt, um überhängende Enden zu beseitigen (*blunting*). Nach Chloroform-Phenol-Extraktion wurden beidseitig EcoRI-Linker gebunden, und schließlich ein Verdau mit XhoI durchgeführt, so dass das endgültige cDNS-Produkt am 5'-Ende von einer überlappenden EcoRI- und am 3'-Ende von einer überlappenden XhoI-Schnittstelle flankiert wurde.

Die ungleich langen Enden der einzelnen cDNS-Stränge wurden mittels Pfu-DNS-Polymerase und Nukleotiden in glatte Enden umgewandelt, da eine Ligation an *blunt end*-Adapter nachfolgen sollte. Im Einzelnen wurden zum Produkt der cDNS-Synthese 23 μl „blunting dNTP Mix“ und 2 μl Pfu-DNS-Polymerase (2,5 U/ μl) zugegeben. Der Ansatz wurde kurz gevortext und für 30 min bei 72 °C inkubiert. Dazu kamen 200 μl Phenol-Chloroform (1:1(v/v)) und es wurde wieder gevortext und kurz zentrifugiert, um das Phenol mit allen unerwünschten Rückständen vom wässrigen Überstand mit der cDNS zu trennen. Der Überstand wurde anschließend mit 200 μl Chloroform versetzt, kurz gevortext, zentrifugiert und nach diesem Reinigungsschritt in ein neues Reaktionsgefäß überführt. In diesem wurden 20 μl 3 M Na-Acetat und 400 μl Ethanol 100 % (v/v) zugegeben, kurz gevortext, und die cDNS ÜN bei -20 °C präzipitiert. Am nächsten Tag wurde mit 17000 g für 60 min bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen, und das Pellet durch Zugabe von 500 μl Ethanol 70 % (v/v) und anschließende Zentrifugation mit 17000 g für 2 min bei Rt gewaschen. Das Ethanol wurde abpipettiert, und das Pellet luftgetrocknet. Wenn es glasig bis weißlich war, wurde das Pellet in 8 μl EcoRI-Adapterlösung für mindestens 30 min bei 4 °C resuspendiert.

Die verwendeten Adapter waren doppelsträngige Nukleotide, die eine überlappende EcoRI-Schnittstelle enthielten und ein zweites glattes Ende aufwiesen. Nur das glatte Ende war phosphoryliert, um eine Anlagerung an die cDNS zu gewährleisten. Das andere Ende war dephosphoryliert, um eine Selbstligation der Adapter zu verhindern. Zu den 8 μl cDNS in der EcoRI-Adapter-Lösung wurden 1 μl 10x Ligase-Puffer, 1 μl 10 mM rATP und 1 μl T4 DNS-Ligase (4 U/ μl) zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde bei 8 °C ÜN inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Ligase durch 30 min Erhitzen auf 70 °C inaktiviert.

Um eine Ligation in den Vektor zu ermöglichen, wurden die Enden des neuen cDNS-Produkts im nächsten Schritt phosphoryliert. Dafür mussten die 11 μl Reaktionsansatz abkühlen. Anschließend wurden 1 μl Ligase-Puffer (10x), 2 μl 10 mM rATP, 6 μl ddH₂O und 1 μl T4 Polynukleotid-Kinase (10 U/ μl) zugeben. Der Reaktionsansatz wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert. Abschließend wurden die Kinasen durch 30 min Erhitzen auf 70 °C inaktiviert.

Da sich die einzige nicht methylierte XhoI-Schnittstelle 3' des Poly-A-Schwanzes befand, wurde mithilfe des XhoI-Verdau der flankierende EcoRI-Adapter an dieser Seite abgetrennt, und eine überlappende XhoI-Schnittstelle geschaffen. Es entstand also eine cDNS, deren Enden den Resultaten eines XhoI- und eines EcoRI-Verdau entsprachen. Da der „Uni-ZAP[®] XR“-Vektors vom Hersteller mit den gleichen Restriktionsenzymen behandelt worden war, konnte die Insertion der cDNS gerichtet erfolgen.

Im Einzelnen wurde der 21 μl -Reaktionsansatz mit 28 μl XhoI-Puffer und 3 μl XhoI (40 U/ μl) versetzt und für 1,5 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 5 μl 10x STE Puffer und

125 µl Ethanol 100 % (v/v) zugegeben, und der Ansatz ÜN bei -20 °C präzipitiert. Am nächsten Tag wurde für 60 min bei 4 °C mit 17000 g zentrifugiert, und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde luftgetrocknet und in 14 µl 1x STE Puffer resuspendiert.

III.2.5 Größenauftrennung der cDNS mit CL-4B-Säulen

Um kleine cDNS Fragmente herauszufiltern, wurde die cDNS über eine Sepharose-Säule aufgereinigt. Diese wirkt wie ein Molekülsieb, bei dem die DNS der Größe nach aufgetrennt wurde. Für die Klonierung von cDNS mit einer Länge von mehr als 400 Basenpaaren (Bp) wurden nur die ersten Fraktionen verwendet. Die Sepharose Säule wurde nicht, wie im Manual der Firma Stratagene empfohlen, selbst hergestellt, sondern von der Firma Pharmacia kommerziell erworben (CL-4B-Säule).

Um die CL-4B-Säule mit STE-Puffer zu äquilibrieren, wurde sie mit 2 ml 1x STE beladen und mit 400 g für 2 min zentrifugiert. Dieser Schritt wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Danach konnte die Säule mit 100 µl cDNS beladen und anschließend mit 400 g für 2 min zentrifugiert werden. Die erste Fraktion, welche die längsten cDNS-Moleküle enthielt, wurde eluiert und in einem 15 ml Falcon-Röhrchen aufgefangen. Dann wurde noch dreimal mit jeweils 100 µl 1x STE-Puffer beladen, zentrifugiert und das Eluat in getrennten Behältern aufgefangen.

Zu diesem Eluat wurden anschließend 100 µl Phenol-Chloroform (1:1) pipettiert, um die cDNS auszuschütteln. Dann wurde mit 17000 g für 2 min zentrifugiert, und die cDNS-haltige, obere, wässrige Schicht in einen neuen Behälter übertragen. Diesem wurden 100 µl Chloroform zugegeben, und das Gemisch nach kurzem Vortexen erneut mit 17000 g für 2 min zentrifugiert, um schließlich die obere, wässrige Schicht in ein neuen Behälter zu übertragen. Anschließend wurden zu jeder Probe 200 µl 100 % Ethanol zugegeben, um die cDNS bei -20 °C ÜN zu präzipitieren. Am nächsten Tag wurde mit 17000 g bei 4 °C für 60 min zentrifugiert, und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde durch vorsichtige Zugabe von 200 µl 80 % Ethanol gewaschen und mit 17000 g für 2 min bei Rt zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet vakuumgetrocknet und in 5 µl ddH₂O resuspendiert.

III.2.6 Ethidium-Bromid-Platten-Assay

Die cDNS-Konzentration wurde semiquantitativ durch einen Ethidium-Bromid-Platten-Assay bestimmt. Dabei wurden 0,5 µl der zu messenden cDNS-Probe auf einem Ethidium-Bromid-Gel (0,8 g Agarose, 100 ml 1x TAE und 10 µl 1%iges Ethidium-Bromid) neben je 0,5 µl von Proben bekannter Konzentration aufgetragen (10, 25, 50, 75, 100, 150 und 200 ng/µl) und das

Signal unter UV-Licht verglichen. Die Proben sollten 10 - 15 min in den Agar diffundieren, bevor sie unter UV-Licht begutachtet und photographiert wurden.

III.2.7 Ligation der Tumor-cDNS in den „Uni-ZAP[®] XR“-Vektor

Die Ligation der cDNS in den „Uni-ZAP[®] XR“-Vektor erfolgte mit dem „ZAP-cDNA[®] Gigapack[®] III Gold Cloning Kit“. Es wurden x µl der resuspendierten cDNS (entsprechend 100 ng cDNS) mit 0,5 µl 10x Ligase-Puffer, 0,5 µl 10 mM rATP (pH 7,5) und 1 µl des „Uni-ZAP[®] XR“-Vektors (1 µg/µl) gemischt, mit x µl ddH₂O auf ein Volumen von 4,5 µl aufgefüllt und mit 0,5 µl T4 DNS-Ligase (4 U/µl) bei 12 °C ÜN inkubiert.

III.2.8 Verpackung des rekombinanten Vektors

Das Verpackungsextrakt aus dem „ZAP-cDNA[®] Gigapack[®] III Gold Cloning Kit“ wurde während des Auftauens vorsichtig mit 1 - 4 µl des Ligationsansatzes vermischt und bei 22 °C für genau 2 h inkubiert, da die Verpackungseffizienz zwischen 90 - 120 min am besten ist und dann rapide abfällt. Anschließend wurden 500 µl SM-Puffer und 20 µl Chloroform zugegeben, und die so gewonnene, primäre rekombinante Phagenbibliothek kurz abzentrifugiert.

III.2.9 Titerbestimmung der Phagenlösung

Zunächst wurde von einer frisch hergestellten „XL-1 Blue MRF“-Bakterienplatte eine einzelne Kolonie gepickt und 4 - 6 h lang als Schüttelkultur in LB-Tet-MM-Medium (Maltose 10 mM, MgSO₄ 0,2 %) bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 0,5 angezchtet. Die Bakterienkultur wurde mit 500 g 10 min zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet mit 10 mM MgSO₄ auf eine OD₆₀₀ von genau 0,5 resuspendiert und die Bakteriensuspension zügig weiterverarbeitet.

Zur Titerbestimmung der Phagenlösung wurden die „XL-1 Blue MRF“-Bakterien mit verschiedenen Mengen der Phagen-Bibliothek infiziert und auf LB-Tet-Platten ausplattiert. Über die Anzahl der lytischen Plaques auf diesen Platten ließ sich auf den Titer der Phagenlösung zurückrechnen. Im Einzelnen wurden 600 µl der Bakteriensuspension (OD₆₀₀ 0,5) mit je 10 µl verschiedener Verdünnungen der Phagenlösung (1:10 - 1:1.000.000 in 0,01 M MgSO₄) 15 min bei 37 °C inkubiert. Jeder dieser Transfektionsansätze wurde mit 6 ml TOP-Agar, der im Wasserbad bei 52 °C flüssig gehalten wurde, vermischt und auf eine vorgewärmte LB-Tet-Platte gegossen. Die Platten wurden bei 37 °C bebrütet, bis die lytischen Plaques einen Durchmesser von ca. 1 - 1,5 mm hatten. Wenn die Plaques groß genug waren, wurden zwei Platten, auf denen die Plaques nicht zu dicht lagen, ausgezählt und der Titer der Phagenlösung in *plaque forming units* (pfu) pro ml bestimmt. Die Gesamtzahl der Phagen in der

Primärbibliothek sollte mindestens eine Million betragen, damit der zelluläre mRNA-Pool ausreichend repräsentiert war.

III.2.10 Induktion der rekombinanten Proteinexpression und Blau-Weiß-Test

Um die Effektivität, mit der die cDNS in den Vektor inkloniert worden war, zu überprüfen, wurde der so genannte Blau-Weiß-Test durchgeführt. Die Multiple Klonierungsstelle des „Uni-ZAP[®] XR“-Vektors ist im *lacZ*-Gen lokalisiert, das für das Enzym β -Galaktosidase codiert. Die Induktion dieses Genes erfolgt durch Zugabe von IPTG, das den lac-Repressor durch Konformationsänderung vom Promotor löst. Bei Expression bewirkt das Enzym β -Galaktosidase den Abbau von Lactose und Lactoseanaloga wie z. B. dem 5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal). X-Gal wird in das dunkelblaue Reaktionsprodukt 5,5-Dibrom-4,4-dichlorindigo umgewandelt. Bei rekombinanten Klonen ist das *lacZ*-Gen durch die aus dem Tumor stammende inklonierte cDNS unterbrochen. Ihnen fehlt also die Enzymaktivität der β -Galaktosidase. Sie bilden nach Induktion weiße Plaques auf der Agarplatte, während Klone ohne Insert blau erscheinen.

Im Einzelnen wurden zu 600 μ l „XL-1 Blue MRF“ (OD₆₀₀ 0,5) ca. 3000 pfu der cDNS-Bibliothek zugegeben und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Der Transfektionsansatz wurde mit 6 ml TOP-Agar, 50 μ l X-Gal-Lösung (250 mg/ml) und 15 μ l IPTG-Lösung (1 M) vermischt, auf einer LB-Tet-Platte ausplattiert und ÜN bei 37 °C bebrütet. Am nächsten Tag wurde die Ligationseffizienz anhand der weißen Plaques im Verhältnis zur Gesamtzahl der Plaques bestimmt. War der Anteil nicht rekombinanter Klone zu groß ($> 1/10$), musste die Ligation der cDNS in den „Uni-ZAP[®] XR“-Vektor unter optimierten Bedingungen wiederholt werden.

III.2.11 Amplifikation der Phagenklone

Diese repräsentative primäre cDNS-Expressionsbibliothek, bestehend aus ca. einer Million rekombinanter λ -Phagen, wurde, um Informationsverlust durch Untergang einzelner Phagen zu vermeiden und einen titerstabilen Stock herzustellen, amplifiziert.

Dazu wurde die gesamte primäre cDNS-Bibliothek mit „XL-1 Blue MRF“ auf 20 frisch hergestellte LB-Tet-Platten ausplattiert. Die 20 Ansätze mit je 600 μ l Bakteriensuspension und ca. 50.000 pfu der cDNS-Bibliothek wurden wie in Kapitel III.2.15 beschrieben bearbeitet. Nach Generation von maximal 2 mm großen Plaques, die einander gerade berührten, wurden die Platten mit jeweils 6 - 8 ml SM-Puffer überschichtet und ÜN auf einem Horizontalschüttler inkubiert, um die Phagen aus den Plaques zu lösen. Am nächsten Tag wurden die Phagensuspensionen von den Platten abgenommen und gepoolt. Durch Hinzufügen von 5 vol%

Chloroform wurden die Bakterien in der Phagensuspension abgetötet. Nach Abzentrifugieren der Zelltrümmer bei 2000 g für 10 min wurde der Überstand, welcher die Phagen enthielt, mit 0,3 vol% Chloroform versetzt und bei 4 °C gelagert. Von der so gewonnenen Phagensuspension wurde wiederum der Titer bestimmt und ein Aliquot mit 7 vol% DMSO versetzt und bei –80 °C asserviert.

III.3 Präabsorption des Patienten-Serums

Da alle Menschen mit *E. coli*-Bakterien in Kontakt kommen, enthält jedes Serum IgG-AK, die *E. coli*-Proteine binden. Solche Ig können auch gegen Proteine des *E. coli*-Stammes „XL-1 Blue MRF“ gerichtet sein und im SEREX-Screening eine starke Hintergrundfärbung verursachen. Um diese unerwünschten Bindungen von Patienten-IgG an Bakterienbestandteile oder nicht rekombinante λ -Phagenproteine zu vermeiden, musste das verwendete Serum vor den Screening-Experimenten von IgG mit entsprechender Spezifität gereinigt werden.

Wir wendeten Präabsorptions-Säulen und -Folien an, um die unspezifischen AK gegen *E. coli* und Phagen zu binden und aus dem Serum zu entfernen. Dafür wurden Bakterien- und Phagenbestandteile an Glutaraldehyd-aktiviertes Kieselgel und an Nitrozellulosefolien gebunden. Nicht rekombinante λ -Phagen wurden für diesen Zweck im Blau-Weiß-Test (vgl. Kapitel III.2.16) als blaue Plaque monoklonal aus dem Agar ausgestochen und wie in Kapitel III.4.2 für positive Klone beschrieben aus dem Agar eluiert.

III.3.1 Präparation von „mechanischen“ und „lytischen“ Säulen

Am ersten Tag wurden pro Säule 50 ml LB-Tet-MM-Medium mit einer Kolonie „XL-1 Blue MRF“ angesetzt, und der Ansatz ÜN bei 37 °C geschüttelt. Am zweiten Tag wurde der Kulturansatz für „mechanische“ und „lytische“ Säulen getrennt pelletiert und anschließend unterschiedlich weiterverarbeitet.

Pro „lytischer“ Säule wurde ein Bakterien-Pellet in 2 ml 0,01 M MgSO₄ aufgenommen, und 1,8 ml dieser Suspension bei 4 °C aufgehoben. Zu den restlichen 200 μ l Bakteriensuspension kamen 5 ml LB-Tet-MM-Medium und 500 μ l verdünnter „blauer Phage“ (1:10 mit 0,01 M MgSO₄). Dieser Ansatz wurde 4 h bei 37 °C mit Luftzufuhr und gelegentlichem sanften Schütteln im Wasserbad inkubiert. Zu den aufgehobenen 1,8 ml Bakteriensuspension wurden 5 ml LB-Tet-MM-Medium hinzugegeben und 2 h bei 37 °C inkubiert. Diese Ansätze wurden insgesamt ca. 1 min, mit kleinen Pausen zum Abkühlen, sonifiziert. In einem 15 ml Falcon-Röhrchen wurden 2 ml Kieselgel abgefüllt und mit dem sonifizierten Bakterien-Phagen-Gemisch vermischt. Das Röhrchen wurde ÜN bei 4 °C in einen Überkopffrotor eingespannt, und

das Gemisch bis zum morgen rotiert, um eine optimale Bindung der Bakterien- und Phagenbestandteile an das Kieselgel zu ermöglichen

Pro „mechanischer“ Säule wurde ein Bakterien-Pellet in 5 ml PBS aufgenommen wie oben beschrieben sonifiziert, mit 2 ml Kieselgel vermischt und ÜN überkopfrotiert.

Am dritten Tag wurden beide Säulen mit 500 g für 3 min abzentrifugiert und dreimal mit 35 ml TBS/0,1 % NaAcid gewaschen. Dafür wurden die Säulen jeweils 30 min bei Rt in den Überkopffrotor eingespannt, dann mit 500 g für 3 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen, und neuer TBS-Puffer zugegeben. Nach dem dritten Waschschrift wurde das TBS abgenommen, wonach die Säule zur Serum-Aufreinigung bereit war. Falls keine unmittelbare Präabsorption geplant war, konnte die Säule mit 10 ml TBS/0,1 % NaAcid bei 4 °C max. drei Monate lang aufgehoben werden.

III.3.2 Präparation von „lytischen“ Folien

Am ersten Tag wurden, wie für das SEREX-Screening (vgl. Kapitel III.4.1) 50 ml Kulturmedium mit „XL-1 Blue MRF“ angeimpft. Analog den Angaben zum SEREX-Screening wurden diese Bakterien mit „blauen Phagen“ transfiziert. Damit die Folien bei der Präabsorption des Serums maximal effizient waren, wurde die Phagenmenge so gewählt, dass die Platte durchlysiert wurde.

Am zweiten Tag wurden die durchlysierten Platten mit Nitrozellulosefolien belegt, und die Folien wie in Kapitel III.4.1 beschrieben von den Platten abgezogen und von Agarüberständen gereinigt.

III.3.3 Serum-Aufreinigung mit Säulen und Folien

Um eine geeignete Verdünnung der Serumproben herzustellen, wurden zunächst zu einem 2 ml-Aliquot des Serums 17,5 ml 1x TBS, 25 µl NaAcid (10%ige Stammlösung), 25 µl Thimerosal (10%ige Stammlösung) und 400 µl Magermilch (10%ige Stammlösung) hinzugegeben.

Das auf diese Weise 1:10 verdünnte Serum wurde auf die abzentrifugierte „mechanische“ Säule gegeben und mittels Überkopffrotor ÜN bei 4 °C mit dem Kieselgel vermischt. Am zweiten Tag wurde die M-Säule mit 500 g für 3 min abzentrifugiert. Der Serumüberstand wurde abgenommen und auf die abzentrifugierte „lytische“ Säule geben, und mittels Überkopffrotor ÜN bei 4 °C mit dem Kieselgel vermischt. Am dritten Tag wurde die L-Säule mit 500 g für 3 min abzentrifugiert. Währenddessen wurde die erste „lytischen“ Folie in eine Petrischale gelegt und mit ddH₂O angefeuchtet. Das Serum wurde von der „lytische“ Säule auf die feuchte

„lytische“ Folie gegeben und 3 h bei Rt sanft geschüttelt. Dann wurde es auf eine zweite angefeuchtete „lytische“ Folie übertragen und wieder 3 h bei Rt geschüttelt. Auf der dritten „lytischen“ Folie wurde das Serum bei Rt unter Schütteln ÜN belassen. Am vierten Tag wurde das Serum über eine vierte und fünfte „lytische“ Folie gereinigt.

Das gereinigte Serum wurde auf 1:100 der ursprünglichen Menge (in der Regel 2 ml auf 200 ml) mit 1x TBS verdünnt. Zur Stabilisierung wurde zu den 200 ml verdünnten Serums 250 µl NaAcid (10 %), 250 µl Thimerosal (10 %) und 0,2 % Magermilch zugegeben. Das absorbierte Serum wurde bei Gebrauch innerhalb der nächsten drei Monate bei 4 °C aufgehoben oder bei deutlich später geplantem Gebrauch fraktioniert bei –80 °C eingefroren.

III.4 SEREX

III.4.1 Screening

Ein Zyklus der SEREX-Methode lief über drei Tage. Zusammenfassend wurden „XL-1 Blue MRF“ in exponentieller Wachstumsphase mit der λ-Phagen-Bibliothek transfiziert, nach Induktion der rekombinanten Proteinsynthese auf Agarplatten ausplattiert, Folienabzüge dieser Platten hergestellt, und die rekombinanten Proteine auf der Folie durch Inkubation mit Serum und eine nachfolgende Immunfärbung auf Serum-AK-bindende Antigene untersucht.

Am Morgen des ersten Tages wurden LB-Tet-Platten bei 37 °C und frischer Topagar bei 52 °C warmgestellt. Zudem wurden 10 Kolonien „XL-1 Blue MRF“ mit 20 ml LB-Tet-MM-Medium in einer Schüttel-Kultur bei 37 °C auf eine geschätzte OD₆₀₀ von 0,5 - 0,9 angezchtet. Bei passender OD₆₀₀ wurde mit 500 g für 10 min zentrifugiert, der Überstand verworfen, und das Pellet in sterilem 0,01 M MgSO₄ auf eine OD₆₀₀ von 0,5 resuspendiert. Durch Zugabe von Maltose und Magnesiumsulfat in das Kulturmedium wurde die Anheftung der λ-Phagen an die Bakterien erleichtert. In den Transfektionansatz wurden pro Platte ca. 3000 pfu der λ-Phagenbibliothek eingesetzt, um die Fläche der Platten optimal auszunutzen und doch gut abgrenzbare Plaques zu gewinnen. Die ca. 3000 pfu der Phagenbibliothek wurden mit 600 µl Bakteriensuspension (OD₆₀₀ 0,5) unter Luftzufuhr und leichtem Schwenken genau 15 min in einem 37 °C-Wasserbad inkubiert, um eine optimale Phagenanheftung zu gewährleisten, und dann zügig mit 30 µl IPTG-Stammlösung und 6 ml vorgewärmter Topagar auf die vorgewärmten LB-Tet-Platten ausplattiert. Die Platten wurden ÜN bei 37 °C bebrütet.

Am zweiten Tag wurde jede Platte mit einer beschrifteten Nitrozellulose-Membran belegt. Die Position der Folie wurde durch Kanülenstiche eindeutig markiert, um später positive Signale auf der Folie den entsprechenden Plaques auf dem Agar zuordnen zu können. Nach Inkubation der belegten Platten für 2 h bei 37 °C wurden sie mindestens 30 min bei 4 °C abgekühlt, um das

Ablösen der Nitrozellulose-Membranen zu erleichtern. Die vorsichtig abgelösten Membranen wurden in mindestens 20 ml TBS-T-Puffer pro Membran gesammelt und 30 min bei Rt in TBS-T-Puffer geschüttelt. Agarreste wurden mit rauen Handschuhen von den Membranen abgestriphen. Die so behandelten Folien wurden nach erneutem Schütteln für 15 min bei Rt in TBS-T-Puffer einzeln in Petrischalen gelegt und mit je 20 ml TBS/5 % Magermilch-Lösung 1 h sanft geschüttelt, um unspezifischen AK-Bindungen vorzubeugen. Anschließend wurden die Folien erneut in mindestens 20 ml TBS pro Membran gesammelt, nach dreimaligem Waschen für je 10 min in frischem TBS wieder in Petrischalen gelegt und mit je 20 ml präabsorbiertem Serum ÜN bei Rt sanft geschwenkt.

Am dritten Tag wurde das Serum von den Membranen abgenommen, über einen Faltenfilter zurück in die Serumflasche gegeben, und die Membranen dreimal 10 min in jeweils frischem TBS gewaschen. Die Immunfärbung erfolgte durch Zugabe eines Alkalische-Phosphatase (ALP)-gekoppelten Sekundär-AK aus der Ziege, der an das Fc-Fragment der humanen Serum-IgG-AK band, und einer nachfolgenden enzymatischen Farbreaktion. Von der Stammlösung des Sekundär-AK wurden pro Membran 8 µl in 20 ml TBS/0,5 % Magermilch verdünnt (1:2500), und die Membranen in Petrischalen für 1 - 2 h mit 20 ml der verdünnten AK-Lösung inkubiert. Anschließend wurden die Membranen in TBS gesammelt, 2 x 15 min in jeweils frischem TBS gewaschen, einzeln in sauberen Petrischalen gelegt und schließlich mit je 20 ml Entwicklerlösung für 1 - 2 h je nach Farbintensität bei 37 °C inkubiert. Die Entwicklerlösung bestand pro Membran aus 20 ml CDS-Puffer plus je 20 µl 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat (BCIP)- und Tetrazoliumbromid (NBT)-Stammlösung. Mithilfe der ALP wurde im alkalischen Milieu (pH 9,5 - 10,5) BCIP zu einem lila Farbstoff umgesetzt. NBT wurde zum purpurfarbenen Diformazan reduziert und fungierte als Farbverstärker. Die Färbereaktion erfolgte im Dunklen, um einen lichtinduzierten Eigenumsatz der Substrate zu vermeiden.

III.4.2 Isolation positiver Klone

Positive Klone sollten möglichst polyklonal mit umgebenden negativen Plaques aus dem Agar isoliert werden, um die Heterogenität des Phagengemisches in einer zweiten SEREX-Runde bestätigen zu können. Einzeln liegende positive Klone wurden monoklonal und zusätzlich negative Kontrollklone separat gestochen. Alle Phagenausstiche wurden mit SM-Puffer überschichtet, die Phagen so aus dem Agarstück gelöst und mithilfe einer anschließenden Chloroformextraktion von Bakterienbestandteilen gereinigt.

Bei der praktischen Durchführung wurden die positive Klone auf der Membran markiert und über die Einstichlöcher im Agar und auf der Folie den entsprechenden Plaques auf der

Agarplatte zugeordnet. Diese Plaques wurden mit einem sterilem Spatel ausgestochen und in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß mit 500 µl SM-Puffer überschichtet. Die Phagen wurden durch Inkubation ÜN bei 4 °C im SM-Puffer gelöst. Am nächsten Tag wurde kurz abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und mit 20 µl Chloroform 30 sec gevortext, das Chloroform abzentrifugiert, und der Phagen-haltige Überstand bei 4° C aufbewahrt. Die Bezeichnung der Phagenklone (z. B. PH018-180.1) enthielt die laboreigene Tumornummer bzw. den Namen der Phagen-Bibliothek (z. B. PH018), die Nummer der gescreenten Platte (z. B. 180) und im Falle mehrerer positiver Klone auf einer Platte eine weitere Nummer (z. B. .1, .2 usw.).

III.4.3 Ausschluss von IgG-Klonen und Färbeartefakten

In jedem durchbluteten Tumorgewebe finden sich B-Zellen, die IgG exprimieren. Nach RT der gesamten Tumor-mRNS in cDNS und deren Einklonierung in „Uni-ZAP[®] XR“-Vektoren trugen demnach einige Phagenklone IgG-cDNS-Inserts. Wenn diese Sequenzen für den Fc-Teil des IgG codierten, band das rekombinante Protein den sekundären AK, und der Klon erschien auf der Folie falsch positiv. Um solche falsch positiven IgG-Klone erkennen zu können, musste jeder Klon sowohl mit als auch ohne vorangehende Seruminkubation in den Immuno-Assay eingesetzt werden. Alle Proteine außer IgG waren nur nach Inkubation mit spezifischen Serum-AK sichtbar, während IgG-Klone in beiden Fällen angefärbt wurden (**Abb. 3, 4**).

Des Weiteren konnten Färbeartefakte auftreten. Der ausgestochene Klon entsprach in diesem Fall weder einem IgG noch einem Antigen, und die Färbung auf der Folie war durch Randeffekte, Luftblasen, Falten oder Verunreinigungen zustande gekommen. Artefakte waren leicht zu erkennen, weil in diesem Falle bei dem IgG-Ausschluss-Verfahren sowohl mit Serum als auch mit TBS inkubierte Membranen negativ waren.

Praktisch wurde so vorgegangen, dass die Nitrozellulose-Membran vor dem Inkubieren mit Serum in zwei Teile zerschnitten wurde, die eine Hälfte in Serum und die andere Hälfte in TBS geschwenkt wurde. Anschließend wurden die Folienhälften wieder zusammen in eine Petrischale gelegt und wie in Kapitel III.4.1 beschrieben gefärbt.

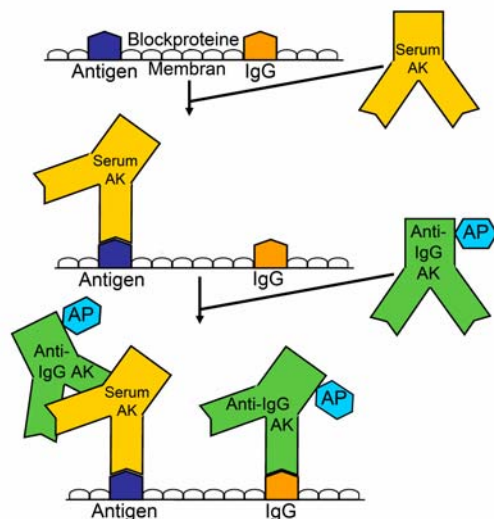


Abb. 3: Färbung von Antigenen und IgG-Klonen: Bindung des ALP-gekoppelten Anti-IgG-AK an Antigen-bindende Serum-AK oder direkt an rekombinant exprimiertes IgG.

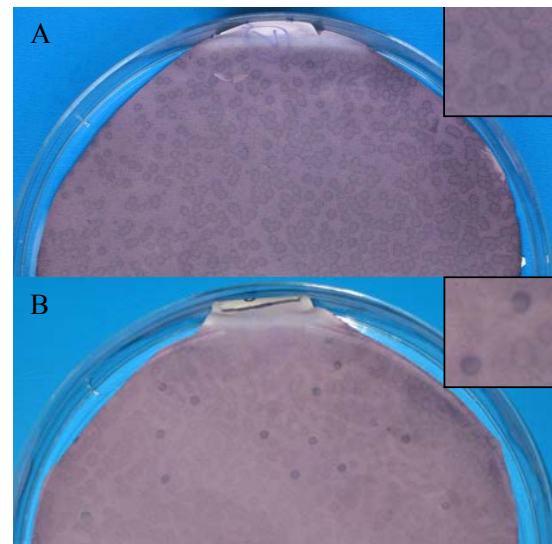


Abb. 4: Beispiel eines Antigens im IgG-Ausschluss-Verfahren: Die Folienhälfte A wurde nicht mit Serum inkubiert, weshalb ein negatives Färbergebnis zu sehen ist. Die Folienhälfte B wurde mit Serum inkubiert, so dass Antigen-codierende Klone als dunkelblaue Kreise sichtbar werden. Ausschnittsvergrößerung jeweils rechts oben.

III.4.4 Monoklonalisierung

Um einzelne positive Klone aus einem Phagengemisch zu isolieren, musste die Phagenlösung wie für das SEREX-Screening ausplattiert werden. Die Plaque-Dichte aber sollte so gewählt werden, dass einzelne Klone getrennt voneinander zu liegen kamen, d. h. z. B. 200 pfu/Platte.

III.5 Differenzielle Serumanalyse

Um die gefundenen Antigene mit weiteren Serumproben auf das Vorkommen spezifischer AK zu testen, wurde der entsprechende monoklonale Phage zusammen mit der Phagenbank als negativem Hintergrund ausplattiert. Damit man die einzelnen Klone gut erkennen konnte und trotzdem genügend positive Klone auf der Membran vorliegen hatte, wurden ca. 100 pfu des positiven Klons mit 1000 pfu der Phagen-Bibliothek ausplattiert. In der weiteren Durchführung entsprach die heterologe Serumanalyse prinzipiell dem oben beschriebenen SEREX-Screening (vgl. Kapitel III.4). Es wurden Seren von 30 pädiatrischen Tumorpatienten, 30 gesunden Kontrollpersonen und sequenziell entnommene Serumproben der Patientin mit dem NB 018 untersucht. Der Titer spezifischer Serum-AK wurde durch serielle Verdünnung der eingesetzten Seren bestimmt.

III.6 Subklonierung durch „in vivo Exzision“

Um das Antigen-Insert sequenzieren zu können, wurde der rekombinante Vektor in reiner Form benötigt. Der große λ -Vektor „Uni-ZAP[®] XR“ war zwar für die Konstruktion der cDNS-Bibliothek gut geeignet, die Aufreinigung der großen extrachromosomalen DNS-Moleküle wäre jedoch sehr aufwendig, und die Ausbeute gering. Kleinere Plasmid-Vektoren wie „pBluescript[®] SK“ lassen sich dagegen gut von bakterieller DNS trennen. Die Firma Stratagene bietet deshalb mit dem „ZAP-cDNA[®] Gigapack[®] III Gold Cloning Kit“ ein Kloniersystem an, bei dem das Fremdgen zusammen mit flankierenden „pBluescript[®] SK“-Sequenzen aus dem großen λ -Vektor ausgeschnitten werden kann, was als „in vivo Exzision“ bezeichnet wird.

Bei der „in vivo Exzision“ kamen der filamentöse f1-Helferphage „ExAssist[™]“ und der *E. coli*-Stamm „SOLR[™]“ zum Einsatz. Der λ -Vektor „Uni-ZAP[®] XR“ trug Replikations-Signale, die von Replikationsproteinen des f1-Helferphagen erkannt werden können. Der Bereich zwischen dem Start- und Stop-Signal entsprach dem vollständigen Plasmid-Vektor „pBluescript[®] SK“ mit ggf. einklonierter Fremd-cDNS. Wenn man nun Bakterien gleichzeitig mit den rekombinanten λ -Phagen und mit den f1-Bakteriophagen infizierte, erkannten die f1-Proteine die f1-typischen Start- und Stop-Signale auf dem „Uni-ZAP[®] XR“-Vektor und kopierten den dazwischen liegenden DNS-Abschnitt einschließlich der einklonierten Fremd-DNS. Diese rekombinante Plasmid-DNS wurde von den f1-Hüllproteinen verpackt und in den Überstand freigesetzt. In dem Überstand befanden sich somit rekombinante und nicht rekombinante f1-Helferphagen sowie nach Lyse des Bakterium durch die rekombinanten λ -Phagen auch diese. Um die DNS der rekombinanten Phagemide sauber aufzureinigen zu können, musste sie nun noch von der DNS des λ -Vektors und des f1-Helferphagen getrennt werden. Dies erlaubte eine Passage im *E. coli*-Stamm „SOLR[™]“. Man infizierte diese Bakterien mit dem Lysat koinfizierter „XL-1 Blue MRF“-Bakterien. Die λ -Phagen in dem Lysat konnten nicht in „SOLR[™]“ eindringen, weil diese zu den λ -resistenten *E. coli*-Stämmen gehören. Die Helfer-Phagen konnten sich nicht in „SOLR[™]“ vermehren, weil die Synthese essentieller f1-Proteine in den „SOLR[™]“-Bakterien nicht möglich war. Verantwortlich dafür war eine so genannte *amber*-Mutation im Phagen-Genom und die sog. *non suppressor*-Eigenschaft dieses Bakterienstamms. Damit wurden in den infizierten „SOLR[™]“ nur noch die rekombinanten Plasmide repliziert. Aufgrund des Ampicillin-Resistenz-Gens im Plasmid wuchsen die infizierten „SOLR[™]“-Bakterien als Kolonien auf Ampicillin-haltigen LB-Platten, von welchen die Klone einzeln für die Plasmid-Präparation gepickt werden konnten.

Das Protokoll sah am ersten Tag die Anzucht von „XL-1 Blue MRF“ in 5 ml LB-Tet-MM-Medium und „SOLR[™]“ in 5 ml LB-Kana-MM-Medium ÜN bei 30 °C wie in Kapitel III.1

beschrieben vor. Am zweiten Tag wurden die Bakterienkulturen bei 2000 g für 5 min zentrifugiert, die Überstände verworfen, und die Pellets getrennt in 0,01 M MgSO₄ auf eine OD₆₀₀ von 1,0 resuspendiert. Zur Infektion und Lyse von „XL-1 Blue MRF“ mit den Phagen wurden zu 200 µl Bakteriensuspension (OD₆₀₀ 1,0) 250 µl des positiven Phagen-Klons (mindestens 1x10⁵ pfu) und 1 µl Helfer-Phage „ExAssist™“ (mindestens 1x10⁶ pfu/µl) hinzupipettiert, und der Ansatz für 15 min bei 37 °C inkubiert. Dies ermöglichte die Anheftung der Phagen an die Bakterienwand. Danach wurden noch 3 ml LB-Tet-MM-Medium hinzugefügt, und der Ansatz bei 37 °C für 3 h inkubiert und zwischendurch leicht geschüttelt. Zur Präparation des Kulturüberstandes wurde der Infektionsansatz für 20 min auf 70 °C aufgeheizt, bei 1000 g für 15 min zentrifugiert, und der Überstand in einem sterilen Falcon-Röhrchen aufgefangen. Mit diesem Überstand wurden nun die „SOLR™“-Bakterien infiziert. Die Infektion von je 200 µl Bakterien in 0,01 M MgSO₄ erfolgte mit jeweils 10 µl und 100 µl des Überstandes, da der Phagentiter im Überstand unbekannt war, und die Dichte der Kolonien nicht zu hoch werden sollte, um noch einzelne Kolonien erkennen zu können. Die Ansätze wurden, um das Anheften der Phagen an die Bakterienwand zu ermöglichen, für 15 min auf 37 °C im Wasserbad erwärmt und anschließend auf jeweils eine kleine LB-Amp-Platte ausplattiert. Die Platten wurden bei 37 °C ÜN bebrütet. Am dritten Tag zeichnete sich das Wachstum der infizierten „SOLR™“ im Gegensatz zu nicht-infizierten Bakterien durch Koloniebildung auf den LB-Amp-Platten ab. Es wurden einzelne Kolonien mit einer sterilen Pipettenspitze aufgenommen und in LB-Amp-Medium für die Mini-Plasmid-Präparation angezüchtet.

III.7 Mini-Präparation von Plasmid-DNS

Dieses Verfahren diente der Schnellaufreinigung von Plasmid-DNS. Die DNS ist sauber genug für grobe Restriktionsanalysen, nicht jedoch für Klonierungen oder Sequenzierung.

Um das Ergebnis der Klonierung grob zu prüfen, wurde eine Kolonie der rekombinanten „SOLR™“-Bakterien von der LB-Amp-Platte gepickt und unter Luftzufuhr mit 5 ml LB-Amp-Medium ÜN bei 37 °C bebrütet. Am nächsten Tag wurden 1,5 ml der Bakterienkultur für 5 min mit 5000 g zentrifugiert, der Überstand verworfen, und die Plasmide mit dem „Jetstar Plasmid Purification System“ aus dem Pellet isoliert. Zuerst wurden dem Pellet 100 µl E1-Puffer zugesetzt (50 mM TRIS, 10 mM EDTA, pH 8, RNase 100 µg/ml E1) und nach Schütteln noch 100 µl E2-Puffer zugegeben (1 % w/v SDS, 0,2 M NaOH). Anschließend wurden mit 100 µl E3-Puffer (5 M Kaliumacetat, Eisessig auf pH 5,5) die Proteine gefällt. Die unerwünschte chromosomale Bakterien-DNS haftete den Bakterienproteinen an, und konnte, solange sie intakt war, mit diesen abzentrifugiert werden. Deshalb durfte in den vorhergehenden

Arbeitsschritten nicht gevortext werden. Nach Zentrifugation mit 17000 g für 20 min wurde der plasmidhaltige Überstand in ein neues Gefäß überführt und die Plasmid-DNS durch Zugabe von 750 µl 100%igem Ethanol präzipitiert. Der Niederschlag wurde mit 17000 g sedimentiert, in einem kopfüber gestelltem Eppendorfgefäß kurz getrocknet und in 100 µl TE-Puffer pH 7,5 wieder aufgelöst. Die DNS konnte jetzt in die Restriktionsanalyse eingesetzt werden.

Die Bezeichnung der Plasmide erfolgte in Anlehnung an die Terminologie der SEREX-definierten Antigene aus Homburg, bei der neben laborinternen Nummern der Ort der Antigenidentifizierung und das Ursprungsgewebe erkennbar sind (z. B. Hom-Mel-14 für ein Melomantigen) und New York (z. B. NY-Eso-1 für ein Antigen aus Ösophaguskarzinomgewebe). Bei der Kennzeichnung der eigenen Plasmide (z. B. pMu-Neu18/7.2) stand demnach p für Plasmid, Mu für München, Neu für NB, 18 für die laborinterne Nummer des Patienten bzw. des Tumors und die nachfolgenden Zahlen zum einen für die Platte (z. B. 7), auf der der Klon gefunden wurde, und zum anderen für die Nummer des Klons im Falle mehrerer positiver Plaque auf einer Platte (z. B. .2) .

III.8 Maxi-Präparation von Plasmid-DNS

Zur Herstellung sequenzierfähiger DNS war eine besonders saubere DNS-Präparation notwendig. Zu diesem Zweck wurden 10 µl einer „Mini-Präp“-Kultur in 400 ml LB-Amp-Medium angeimpft und ÜN bei 37 °C als Schüttelkultur inkubiert. Am nächsten Tag wurde mit 6000 g für 15 min zentrifugiert, der Überstand verworfen, und das Pellet in 10 ml E1-Puffer des „Jetstar Plasmid Purification Systems“ resuspendiert. Durch Zugabe von 10 ml E2-Puffer für 5 min bei Rt wurden die Zellen lysiert. Die Zugabe von 10 ml neutralisierendem E3-Puffer bewirkte die Ausfällung der Proteine, die durch Zentrifugation mit 17000 g für 30 min bei 4 °C und anschließende Filtration durch Gaze abgetrennt werden konnten. Der Überstand wurde nun auf eine mit 60 ml E4-Puffer (600 mM NaCl, 100 mM Natriumacetat, 0,15 % TritonX-100) äquilibrierte Säule gegeben, deren Säulenmatrix (Silica-Matrix) die Plasmid-DNS band. Nach zweimaligem Waschen der Säule mit je 30 ml E5-Puffer (800 mM NaCl, 100 mM Natriumacetat, Essigsäure auf pH 5,0) wurden die Plasmide mit 15 ml E6-Puffer zur DNS-Elution (1250 mM NaCl, 100 mM Tris, HCl auf pH 8,5) eluiert. Die Fällung der DNS erfolgte durch Zugabe von 10,5 ml Isopropanol und Zentrifugieren bei 17000 g für 30 min. Das Pellet wurde zweimal vorsichtig mit je 5 ml 70%igen Ethanol gewaschen und wieder mit bei 17000 g für 30 min abzentrifugiert. Das Ethanol wurde verworfen, das Pellet luftgetrocknet und in 400 µl ddH₂O gelöst.

III.9 Bestimmung der Konzentration von Plasmid-DNS-Lösungen

Die Konzentration wurde photometrisch durch Extinktionsmessung bei λ_{260} bestimmt, und ihr Wert geräteintern anhand von Standardkurven errechnet. Zur Messung von Verunreinigungen wurde auch die Absorption bei λ_{280} gemessen, welche bei einer sauberen Probe maximal die Hälfte der Absorption bei λ_{260} betragen sollte.

III.10 Restriktionsanalyse von dsDNS

Zur Größenbestimmung des Plasmidinserts nach „*in vivo* Exzision“, wurde mit den zur Klonierung verwendeten Enzymen XhoI und EcoRI geschnitten. Dadurch ergaben sich zwei Fragmente, eines mit der Größe des Vektors (2,9 kB) und eines mit der Größe des Inserts, welches bei zusätzlichen Schnittstellen innerhalb des Inserts weiter fragmentiert wurde. Der Ansatz für Kontrollspaltungen (für andere Klonierungen in Klammern) bestand aus 1 μ g (20 μ g) der Plasmid-DNS, je 1 μ l (3 μ l) des jeweiligen Enzyms, 2 μ l (10 μ l) des entsprechenden Puffers und ddH₂O bis zu einem Endvolumen von 20 μ l (100 μ l). Dieser Ansatz wurde für 1 - 2 h bei 37 °C inkubiert und bis zur Agarose-Gel-Elektrophorese bei -20 °C konserviert.

III.11 Größen-Auftrennung der DNS im Agarose-Gel

Die elektrophoretische Auftrennung von Plasmid-DNS erfolgte in einem 1%igen TAE-Agarose-Gel, welches zum Nachweis der DNS mit 30 μ l 1%igem Ethidiumbromid versetzt wurde. Nach Zugabe von 10 μ l Ladepuffer zu den 20 μ l des Restriktionsansatzes (vgl. Kapitel III.10), wurde dieser in eine Tasche des Gels geladen. In flankierende Geltaschen wurden je 15 μ l des Ladepuffer-haltigen Größenmarkers „Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder“ aufgetragen. Nach Auftrennung mit 120 V für 1 h konnten die DNS-Banden auf einem UV-Transilluminator begutachtet und fotografiert werden.

III.12 Sequenzanalyse des cDNS-Inserts

Die Sequenzierung von cDNS-Inserts der in der Maxi-Präparation gewonnenen Plasmide wurde von der Firma Sequiserve durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden 20 μ l einer Plasmidlösung mit einer Konzentration von mindestens 0,1 μ g/ μ l eingeschickt. Die Sequenzierung der pBluescript-Inserts erfolgte mithilfe von Oligonukleotid-Primern, die Sequenzen des T3- und T7-Promotors banden. Letztere flankierten die Multiple Klonierstelle (MCS, *multiple cloning site*) des „pBluescript® SK“-Vektors im 5'- bzw. 3'-Bereich. Bei der Sequenzierung der pCMV- und pTrcHis-Konstrukte kamen die pCMV-*forward* und -*backward* bzw. die pTrcHis-*forward* und -*backward* Primer der Firma Sequiserve, welche strom-auf bzw. -abwärts der

Multiplen Klonierungsstelle lagen (vgl. Kapitel VIII). Bei einer maximalen Leseweite von ca. 750 Bp konnten auf diese Weise cDNS-Inserts von maximal 1,5 kB Länge sequenziert werden. Für größere Inserts mussten nach der ersten Sequenzierung Oligonukleotid-Primer ausgesucht werden, die im bereits gelesenen Bereich banden.

Homologien zu bekannten cDNS oder Genen wurden mittels des im Internet verfügbaren Programms BLAST gesucht, mittels dessen alle Datenbanken der GenBank des *National Institute of Health* (NIH) gescreent werden konnten (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Außerdem wurde unter den Einträgen in der SEREX-Datenbank nach Homologien gesucht. In diese Datenbank werden regelmäßig SEREX-definierte Klone und ergänzende serologische Daten zu diesen Klonen eingespeist (<http://www.lcr.org/SEREX.html>). Die genomischen Sequenzen wurden mit den auf der „BCM Search Launcher“-Internetseite bereitgestellten Programmen FGENES, FEHX, HSPL, HEXON, TSSG, TSSW und NNP analysiert.

III.13 mRNS-Expressionsanalyse mittels RT-PCR

Gewebe-mRNS wurde zunächst in cDNS umgeschrieben. Das Vorkommen der spezifischen Transkripte wurde durch eine Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) mithilfe sequenzspezifischer Oligonukleotid-Primer untersucht (RT-PCR). Bei der RT wurde ein polyT-Primer p(dT)₁₅ eingesetzt, der an den polyA-Schwanz der mRNS-Fraktion hybridisierte und so die Synthese der cDNS initiierte. Bei der Handhabung von mRNS musste streng darauf geachtet werden, Kontaminationen mit RNAase zu vermeiden. Es wurde deshalb mit DEPC-behandeltem ddH₂O gearbeitet. DEPC modifiziert Histidinreste in Proteinen zu N-Carboxyhistidin und führt dadurch zur Hemmung von Enzymen einschließlich der RNAsen. Durch Autoklavieren wurde das zugesetzte DEPC wieder inaktiviert.

Im Einzelnen wurden in die Reaktion 3 µg RNS eingesetzt, das Volumen auf 14 µl mit DEPC-H₂O aufgefüllt und 1 µl Primer p(dT)₁₅ hinzugegeben. Dieser Ansatz wurde zur Anlagerung des Primers 10 min bei 70 °C inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. Zu diesem Ansatz wurden 2 µl 10x RT-Puffer, 2 µl dNTPs und 1 µl MMLV-RT, hinzu gegeben und 1 h bei 42 °C inkubiert. Das bei dieser Reaktion entstandene mRNS-cDNS-Hybrid wurde bei -20 °C gelagert bzw. 0,5 µl in die PCR eingesetzt. Die Menge und Qualität der cDNS wurde durch eine Kontroll-PCR mit Primern überprüft, die für β-Aktin oder GAPDH spezifisch waren. β-Aktin und GAPDH werden zu den sog. *housekeeping*-Genen gezählt, die ubiquitär und auf etwa gleichem Niveau in allen Zellen exprimiert werden.

Die aus der RT gewonnene oder käuflich erworbene cDNS der verschiedenen Gewebe wurde mit genspezifischen Primern in die PCR eingesetzt. In einem Gesamtvolumen von 30 µl wurden

0,5 µl cDNS mit 1 µl 10 µM 5'-Primer, 1 µl 10 µM 3'-Primer, 1 µl 50 mM MgCl₂, 1 µl 10 mM dNTPs, 3 µl 10x Puffer, x µl ddH₂O und 0,2 µl Taq-Polymerase gemischt. Die Probe wurde mit Paraffin überschichtet, um Flüssigkeitsverluste zu minimieren, und in den Thermocycler gesetzt, in dem die enzymatischen Reaktionen nach einem festgelegtem Programm abliefen. Nach zweiminütiger Denaturierung bei 94 °C, bei dem die beiden Stränge der cDNS voneinander getrennt wurden, folgte das *annealing*, bei dem die spezifischen Primer banden, für 1 min bei Temperaturen um 60 °C, abhängig von der Schmelztemperatur der Primer (vgl. Kapitel II.1.6). Die nachfolgende cDNS-Synthese lief für 2 min bei 72 °C, und die anschließende erneute Denaturierung bei 94 °C für 1 min. Dieser Reaktionszyklus wurde je nach Eingabe 35 - 40-mal durchlaufen. Eine abschließende Synthesereaktion über 8 min komplettierte unvollständige Produkte, bevor die Reaktion bei 4 °C beendet wurde.

Jede PCR-Runde enthielt eine Negativkontrolle ohne cDNS, um falsch positive Ergebnisse durch Verunreinigungen in gemeinsamen Zutaten auszuschließen. Die Reaktionsansätze (20 µl) wurden in 4 µl Ladepuffer und gemeinsam mit einem Längenstandard gelelektrophoretisch aufgetrennt und fotografisch dokumentiert (vgl. Kapitel III.11).

III.14 Southern-Blot-Hybridisierung

Nach elektrophoretischer Auftrennung der PCR-Produkte in einem 1%igen Agarose-Gel musste die DNS zunächst denaturiert werden, um die spätere Hybridisierung der DNS-Einzelstränge zu ermöglichen. Zur Denaturierung wurde das Gel 15 - 30 min vorsichtig in 0,2 M HCl geschwenkt bis sich der Blau-Marker des Ladepuffers gelb verfärbte. Eine längere Denaturierung sollte vermieden werden, da sonst die DNS zu stark zerhackt wurde. Dann wurde mit Aqua dest. nachgespült und das Gel in Southern-Blot-Puffer geschwenkt bis sich der Marker wieder blau verfärbte (ca. 30 min), was die Neutralisation anzeigte.

Auf das Gel wurde eine Hybond N+-Nylonmembran aufgelegt und mit einem Zellstoffaufbau bedeckt (Southern-Blot). Durch die Saugkraft des Zellstoffs wurde der Southern-Blot-Puffer durch das Gel gesogen, und die denaturierte einzelsträngige DNS aus dem Gel auf die Nylonmembran übertragen. Am darauf folgenden Tag wurde die Membran-gebundene DNS durch Erhitzen auf 80 °C für 2 h fixiert. Zur Kontrolle des DNS-Transfers auf die Nylonmembran wurde das Gel unter dem UV-Transilluminator begutachtet. Bei erfolgreichem Transfer konnten keine Ethidiumbromid-markierten Nukleinsäuren mehr im Gel detektiert werden.

Zur spezifischen Detektion der auf der Folie fixierten DNS mussten zuerst die sequenzspezifischen Oligonukleotid-Sonden mithilfe der T4 Polynukleotidkinase und [γ -³²P]-ATP an ihrem 5'-Ende radioaktiv markiert werden. Es wurden 10 µl Oligonukleotid in 25,5 µl

ddH₂O für 5 min auf 70 °C erhitzt und anschließend sofort auf Eis gestellt. Zu diesem Ansatz kamen 5 µl 10x Polynukleotidkinase-Puffer, 7,5 µl [γ -³²P]-ATP (370 MBq/ml, 10 mCi/ml) und 2 µl T4 Polynukleotidkinase. Die Reaktion wurde für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert und danach mit 1 µl 0,5 M EDTA abgebrochen.

Um die Oligonukleotide von nicht eingebauten radioaktiven Nukleotiden zu trennen, wurde der Reaktionsansatz über eine Säulenmatrix der Größe nach aufgetrennt. Zuerst wurde die Sephadex-G25 Sepharose Säule mit dreimal 1 ml TE-Puffer äquilibriert. Dann wurden zuerst 50 µl der markierten Oligonukleotid-Probe und anschließend 450 µl TE-Puffer auf die Säule gegeben, und das Eluat aufgefangen. Nach dieser ersten Fraktion wurden mit jeweils 200 µl TE-Puffer weitere Fraktionen eluiert, und jeweils die Radioaktivität gemessen. Die ersten drei stark radioaktiven Fraktionen wurden gepoolt und gingen in die Hybridisierungsreaktion ein.

Die Hybridisierung fand in einer sich drehenden Hybridisierungsröhre statt. Die Membranseite mit der fixierten DNS wurde in Richtung des Röhrenlumens platziert und mit 25 ml Church-Puffer für 30 min bei 65 °C prähybridisiert. Anschließend wurde dieser Puffer verworfen, und mit den radioaktiven Oligonukleotiden in frischem 25 ml Church-Puffer über 15 h bei 65 °C hybridisiert. Am nächsten Tag wurde die Membran mit 2x SSC-Puffer, dem 1 % SDS zugesetzt war, gewaschen, wasserdicht verpackt und gegenüber einem Röntgenfilm exponiert. Bei der Belichtung der Kodak-XR-Filme wurde mit temperaturabhängigen Verstärkerfolien gearbeitet, und die Belichtung deshalb bei –80 °C durchgeführt. Die notwendige Belichtungsdauer variierte je nach Strahlungsintensität von 1 h bis zu 7 Tagen.

III.15 Konstruktion von rekombinanten pCMV- und pTrcHis-Vektoren

Zum Zwecke der rekombinanten Antigenexpression in Bakterien wurden ihre codierenden Sequenzen (*coding sequence*, CDS) in die prokaryonten Expressionsvektoren pTrcHis (Invitrogen) bzw. pTrcEHis kloniert (vgl. Kapitel VIII). Dies erlaubte ihre Expression nach Zugabe von IPTG als Fusionsprotein mit einer AK-Erkennungsstelle für den Anti-Xpress-AK (pTrcHis) bzw. den anti-EBNA1-Epitop-AK 1H4-1-4 (pTrcEHis). Die CDS der Antigene musste zu diesem Zweck mit spezifischen Primern, die eine EcoRI(5')- bzw. eine XhoI(3')-Schnittstelle enthielten (vgl. Kapitel II.8), aus geeigneten Zelllinien oder von geeigneten Plasmiden amplifiziert werden (vgl. Kapitel IV.6). Die PCR-Produkte konnten über die MunI- und XhoI-Schnittstelle der MCS in den pTrcEHis-Vektor eingesetzt werden (vgl. Kapitel VIII). Die Sequenz von HuD1 wurde über die Schnittstellen BamHI und HindIII aus dem pBluescript-Vektor in den pTrcHisB umklontiert (HuD1).

Für die rekombinante Expression der Hu-Proteine in den eukaryonten Zelllinien wurden die beiden Basisvektoren pCMV/myc/cyto© (Invitrogen) und pCMV-GFP gewählt, die sich im

Wesentlichen durch das GFP-Gen unterschieden (vgl. Kapitel VIII). Bei beiden Vektoren wurde die in die MCS einklonierte Fremd-DNS vom starken, konstitutiven Promotor des Cytomegalievirus (CMV) gesteuert (Stenberg *et al.* 1984). Als Fremd-DNS kam die CDS von HuD1 (AY033997), HuD3 (AY033995) und HuD4 (AY033996) zum Einsatz. Um ihre gerichtete Einklonierung in die MCS des pCMV-Vektoren zu ermöglichen wurden HuD-Antigen-spezifische PCR-Primer konstruiert, welche das 3'-Ende der CDS mit einer PstI-Schnittstelle ergänzten. Die Vektoren wurden an der NcoI- und PstI-Schnittstelle geschnitten und die NcoI-Schnittstelle mittels T4-Polymerase in ein „glattes Ende“ verwandelt, um die Ligation mit dem „glatten Ende“ des PCR-Produkts zu ermöglichen. Die NcoI-Schnittstelle war Teil der die Kozak-Sequenz des Vektors, so dass das rekombinante Protein stromaufwärts nicht an Fremdsequenzen fusioniert war (vgl. Kapitel VIII). Für das Fusionsprodukt wurde der 3'-Primer ohne Stopkodon konstruiert, um einen durchgehenden Leserahmen zu ermöglichen (vgl. Kapitel II.8).

Um die biologische Aktivität des neuen Kernexport-Signals (*nuclear export signal*, NES) im Antigen HuD4 untersuchen und mit der Wirkung des bekannten Kernlokalisations-Signals (*nuclear localization signal*, NLS) PKKKRKV im SV40 *large* T-Antigen (Kalderon *et al.* 1984) vergleichen zu können, wurden die in Kapitel IV.6.3 dargestellten Konstrukte kloniert.

Der von der Arbeitsgruppe freundlicherweise zur Verfügung gestellte Basisvektor pCMV-GNG-NLS wurde mit den PmlI und AgeI geschnitten und jeweils die Oligonukleotide HuD4NES-GNG (für pCMV-HuD4NES-GNG-NLS) und HuD4ΔNES-GNG (für pCMV-HuD4ΔNES-GNG-NLS) einkloniert (vgl. Kapitel II.8 und VIII).

Der Erfolg der einzelnen Klonierungen wurde mittels Restriktionsanalyse und Sequenzierung der Plasmide bestätigt.

III.16 Ligation von DNS-Molekülen

Bei der Ligation wurden der linearisierte Vektor und das zu klonierende Restriktionsfragment in etwa äquimolaren Mengen im Volumen von 8µl gemischt. Und durch Zugabe von 1µl 10x Ligasepuffer und 1 µl T4-DNS-Ligase ÜN bei 12°C inkubiert. Dieses Enzym katalysiert die ATP-abhängige Ausbildung einer Phosphodiesterbindung zwischen der 3'-Hydroxylgruppe des einen und der 5'-Phosphatgruppe des anderen Fragments.

III.17 Herstellung elektrokompenter Bakterien

Um die klonierten Plasmide mittels Maxipräparation zu amplifizieren, musste das betreffende Plasmid mittels Elektroporation in Bakterien eingebracht werden. Dafür wurden elektrokompente Bakterien benötigt. Hierfür wurden 500 ml SOB Medium mit 10 µg/ml Tetracyclin versetzt und in einem 2 l Erlenmeyerkolben mit einer Einzelkolonie des Bakterienstamms XL-1 blue MRF' angeimpft. Die Kultur wurde bei 37°C so lange geschüttelt bis die OD₆₀₀ bei 0,5-0,7 lag. Anschließend wurde die Kultur für 15 min auf Eis abgekühlt, mit 4800 g bei 4°C für 15 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen und in 250 ml kaltem 10%igen Glycerin resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation und Resuspension in 250 ml 10%igen Glycerin, wurden die Bakterien sedimentiert, in 2 – 4 ml eiskaltem 10%igen Glycerin resuspendiert und in Aliquots von je 50 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

III.18 Transformation von Bakterien

Bei der Transformation wurden 20 µl der auf Eis aufgetauten, elektrokompenten Bakterien (vgl. Kap. III.17) mit 1 µl des Ligationsansatzes vermischt. Nach Überführung in eine gekühlte Elektroporationsküvette (1 mm Spaltbreite) erfolgte die Transformation bei 1500 Volt, 25 µF und 100 Ω. Die Bakterien wurden sofort in 1 ml SOC-Medium aufgenommen und für 1 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Danach wurden je 20 µl bzw. 200 µl der Kultur auf LB-Amp-Platten ausgebracht und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

III.19 Rekombinante Proteinexpression und -aufreinigung aus Prokaryonten

Für die Proteinexpression wurde eine Flüssigkultur der transfizierten XL1 Bakterien als ÜN Kultur angesetzt, wie im Kapitel II.8 beschrieben. Die Bakterien wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7 hochgezüchtet. Die Induktion dieser Proteinexpression erfolgte durch Zugabe von IPTG, das den lac-Repressor durch Konformationsänderung vom Promotor löst. Nach 4 h wurden die Bakterien abzentrifugiert und mit 50 ml Lysispuffer lysiert. Die Bakterienbestandteile wurden durch Zentrifugation mit 17000 g für 15 min bei 4 °C abgetrennt. Der Überstand wurde durch Lysispuffer auf 50 ml aufgefüllt und 300 µl Ni-NTA-Partikel (Qiagen) hinzugegeben und ÜN in einem Überkopfrorator bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Ni-NTA-Partikel mit 3000 g für 5 min bei 4 °C abzentrifugiert und einmal mit 10 ml Lysispuffer gewaschen. Die Ablösung der Proteine von den Partikel wurde durch die erhöhte Konzentration von Imidazol im Elutionspuffer ausgelöst. Hierfür wurden nach Zentrifugation mit 3000 g für 5 min bei 4 °C wurde der Lysispuffer abgenommen, 300 µl Elutionspuffer zugegeben, kurz gevortext, die

Partikel mit 3000 g für 5 min bei 4 °C abzentrifugiert und der Überstand der die Proteine enthielt in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt, und die Überstände gepoolt. Da die hohe Konzentration des Harnstoffs im Lysispuffer bei der Weitverarbeitung störte, wurde die Proteinlösung ÜN gegen PBS-Puffer dialysiert. Die Dialysemembran hielt Moleküle von 6000 – 8000 Dalton zurück und lies so den Harnstoff und die anderen Bestandteile des Lysispuffers passieren, nicht aber die größeren Proteine. Danach wurden die Proteine bis zum Einsatz für die Gelelektrophorese auf -20°C gelagert.

III.20 SDS-Gelelektrophorese

Zur Vorbereitung für den Western-Blot wurden die Proteine in einem SDS-Polyacrylamidgel der Größe nach aufgetrennt (Laemmli 1970). Das Acrylamidgel (0,1 % SDS) bestand aus einem 2-%igen Sammelgel, das der Fokussierung der geladenen Proteine diente, und einem 10,5-%igen Trenngel, das die Größenauftrennung der Proteine ermöglichte.

Die aufgereinigten Proteine wurden 1:1 mit dem SDS-PAGE Ladepuffer gemischt, für 5 min bei 95°C denaturiert und bis zum Auftragen auf Eis aufbewahrt. Nach dem Beladen des Gels erfolgte die Gelelektrophorese bei 20 mA pro Gel für ca. 2 h.

III.21 Western-Blot-Analyse

Zur spezifischen Detektion von Proteinen durch AK wurden die gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran (Hybond P) übertragen (Western-Blot). Dies erfolgte in einer durch ein Eisbad gekühlten Transferkammer mit Transferpuffer für 1 h bei 90 Volt. Nach dem Transfer wurde die Membran für 1 h mittels Blockpuffer abgesättigt. Danach wurde die Membran mit dem Primär-AK über Nacht bei 4°C in Inkubationspuffer auf einem Falcon-Roller inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für je 10 min im Waschpuffer wurde der Meerrettichperoxidase-gekoppelte Sekundär-AK hinzugefügt und für 1 h bei RT auf dem Falcon-Roller inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Proteine mittels ECL-Plus-Detektionssystem (GE-Healthcare) und anschließender Autoradiographie detektiert. Als Kontroll-AK für die geladene Proteinmenge wurden AK gegen den jeweiligen Protein-*tag* des chimären, rekombinanten Proteins eingesetzt. Hier kamen mAK gegen die Poly-His-Sequenz (Anti-Xpress) und gegen ein AK-Epitop aus dem EBV-Kernprotein 1 (EBV *nuclear protein 1*, EBNA1) (1H4-1-4) zum Einsatz. Sie werden im Ergebnisteil zu den Western-Blot-Analysen zusammenfassend anti-*tag*-AK genannt.

III.22 Zellkultur

Alle humanen Zellen wurden bei 37°C und 5 % CO₂ (Inkubator) in Zellkultur-Medium (vgl. Kapitel II.1.5) in sterilen Zellkulturflaschen gezüchtet und bei Konfluenz im Verhältnis 1:5 gesplittet. Hierfür wurde das Medium abgenommen, und die Zellen mit 5 ml Trypsin-EDTA für 5 min bei 37°C von der Schale gelöst. Die Zell-Trypsin-Suspension wurde in einem Falcon-Gefäß aufgenommen, bei 1000 g für 5 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen, und die Zellen im ursprünglichen Volumen frischen Mediums aufgenommen. Ein Fünftel von dieser Suspension wurde auf eine je eine Zellkulturschale der ursprünglichen Größe ausgebracht und mit frischem Medium (vgl. Kapitel II.1. 5) auf das Ausgangsvolumen pro Flasche verdünnt.

III.23 Transfektion durch Elektroporation

Pro Transfektion wurden 2×10^6 Zellen einmal in OptiMEM gewaschen und danach in 300 µl frischem OptiMEM aufgenommen. Die Zell-Suspension wurde zusammen mit 20 µg des zu transfizierenden Plasmids in einer Elektroporationsküvette vermischt und mit dem Elektroporationsgerät mit 230 V bei 1,0 mFarad elektroporiert. Sofort nach der Elektroporation wurden 1 ml FCS hinzugegeben, und die Suspension mit 5 ml Zellkultur-Medium (vgl. Kapitel II.1.5) in Zellkulturschalen bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

III.24 Immunzytologie

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden die transfizierten bzw. untransfizierten Zellen auf PolysineTM-Objektträgern angezüchtet und einmal in PBS gewaschen. Zur Fixierung auf den Objektträgern wurden die Zellen mit 2 % Paraformaldehyd (PFA) in PBS behandelt und drei mal in PBS gewaschen. Um die fixierten Zellen zu permeabilisieren, wurden die Objektträger 10 min in 0,5 % Triton X-100 inkubiert und dreimal in PBS gewaschen. Die weiteren Schritte wurden analog dem Vorgehen in Kapitel III.25 durchgeführt.

III.25 Immunhistologie

Die Permeabilisierung der Gewebe sollte ein besseres Eindringen der AK gewährleisten und durch Aufbrechen von Formalin-Quervernetzungen, die beim Fixationsprozesses entstanden waren, eine Demaskierung der Antigene bewirken. Hierzu wurden die Schnitte 15 min lang in Citrat-Puffer bei 250 W gekocht (Mikrowelle) und nach langsamem Auskühlen dreimal in PBS gewaschen. Anschließend wurden unspezifische Bindungen durch Inkubation in PBS mit 1 % BSA und 1 % normalem Ziegen Serum (ZS) bei 37°C über 30 min geblockt. Das Präparat wurde mit dem 1:200 (16C12) bzw. 1:100 (Hu-3C11) in PBS/1 % ZS verdünnten primären AK für 2 h

inkubiert, dreimal in PBS/1 % ZS gewaschen und mit dem CyTM3 gekoppelten sekundären anti-Ratte- bzw. anti-Maus-AK (1:200 in PBS/1 % ZS) 1 h lang inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS/1% ZS wurden die Zellkerne mit DAPI (2-(4-Amidinophenyl)-6-indolecarbamide)-Lösung (1µg/ml) gefärbt. Nach dreimaligen Waschen in PBS/1 % ZS wurde das Präparat mit einem Deckglas und DakoCytomation Fluorescent Mounting Medium eingedeckelt.

Die Präparate wurden mit dem konventionellen inversen Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axiovert 200 mit Standard-Filtersatz für Cy3 und GFP und Dapi. Abgebildet wurden die Zellen mit der monochrom Kamera und der Openlab Software. Das verwendete Konfokalmikroskop war das Leica TCS SP2. Alle immunhistologischen Befunde wurden durch einen in der pädiatrischen Tumorphistologie erfahrenen Pathologen mit begutachtet (Ltd. OA Dr. F. Prantl, Institut für Pathologie, Städtisches Krankenhaus Schwabing, München).

III.26 Klinische Evaluation des Krankheitsverlaufs

Die klinischen Angaben zum Krankheitsverlauf wurden freundlicherweise von der Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin der TUM, der kinderonkologischen Abteilung des Städtischen Krankenhauses Schwabing und des Dr. von Haunerschen Kinderspitals der Ludwig-Maximilians-Universität in München sowie vom Zentrums für Kinderheilkunde in Köln zur Verfügung gestellt. Die Laborparameter NSE, LDH und Gesamt-IgG zum Zeitpunkt der Diagnose und im weiteren Krankheitsverlauf wurden vom Institut für Klinische Chemie des Krankenhauses München-Schwabing erhoben. Die Tumorgröße wurde von der kinderradiologischen Abteilung des Krankenhauses München-Schwabing mit dem Ultraschall-Gerät der Firma Acuson gemessen. Die molekularbiologischen Untersuchungen zur *MYCN*-Genamplifikation wurden von Herrn PD Dr. H. Christiansen an der Universitätskinderklinik Marburg durchgeführt. Die Detektion erfolgte dort über Southern-Bot-Analysen genomischer DNS.

IV Ergebnisse

IV.1 Kontrolle der mRNS-Qualität

Die mRNS aus dem operativ gewonnen NB-Gewebe der Patientin 018 wurde mittels des „mRNA Isolation Kit“ der Firma Stratagene isoliert. Das Prinzip der Trennung zwischen mRNS und anderen Nukleotiden basierte auf der Bindung eines Poly-T-Primers an den Poly-A-Schwanz der mRNS.

Die photometrisch bestimmte Konzentration der mRNS betrug 193 µg/ml. Zur Bestimmung ihres Reinheitsgrades wurde zusätzlich die Extinktion (E) bei 280 nm gemessen und zu der bei 260 nm ins Verhältnis gesetzt. Der Quotient E_{260}/E_{280} liegt bei optimaler Reinheit zwischen 1,8 und 2,1. Der Reinheitsgrad der hier isolierten mRNS lag mit 1,69 minimal unter diesem Bereich, war jedoch für die Anwendung ausreichend.

Zur Qualitätskontrolle wurde die mRNS auf ein 1%iges Formaldehyd-Agarose-Gel aufgetragen und mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht (**Abb. 5**). Zytoplasmatische RNS eukaryontischer Zellen enthält ca. 95 % ribosomale (r)RNS, zusammengesetzt aus 28S, 18S, 5,6S und 5S rRNS. Bei Gesamt-RNS-Präparationen stellen sich die 28S und 18S rRNS als zwei Banden dar, welche bei 5,1 kB bzw. 1,9 kB laufen. Da mRNS mit einem möglichst geringen Anteil anderer RNS-Arten isoliert werden sollte, mussten sich diese rRNS-Banden so diskret wie möglich darstellen. Ebenfalls sollte der Großteil der RNS im Bereich von 0,5 - 5 kB liegen. In untergehendem Gewebe wird die RNS gespalten, und die kürzeren, für SEREX schlechter geeigneten Fragmente laufen tiefer.

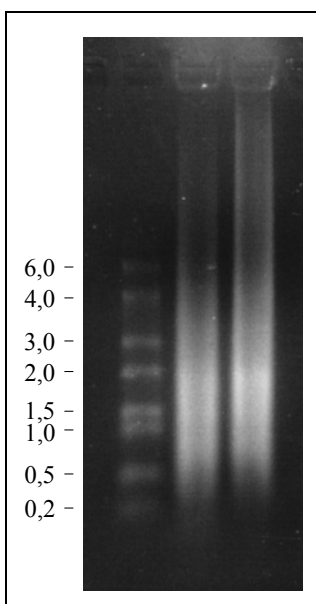


Abb. 5: RNS-Qualitätskontrolle: Die linke der beiden Spuren enthält die mRNS-Präparation des Neuroblastomgewebes 018. In der rechten Spur ist eine mRNS-Präparationen eines anderen Tumorgewebes aufgetragen. Die Größen des Markers (RNA Ladder, High Range) sind in kB angegeben. Knapp unter der 2,0 kB Marker sind noch diskret Teile der 18S rRNS zu sehen.

IV.2 Durch das SEREX-Screening identifizierte Antigene

Beim Screening der cDNS-Bank mit autologem, 1:100 verdünntem Serum wurden insgesamt 76 positive Klone detektiert, von denen 60 Klone IgG-Sequenzen enthielten. Nach Ausschluss der IgG-Klone verblieben 16 Klone, die zehn verschiedene Antigene codierten. Die jeweils längste für ein Antigen codierende cDNS wurde, soweit neu, in die GenBank aufgenommen und erhielt eine entsprechende Zugangsnummer (**Tab. 3**). Sechs der Klone codierten für neue Varianten aus der Familie der Hu-Proteine. Je ein Klon codierte für das Antigen NNP3, eine aminoterminal Variante des Autoantigens NNP1/Nop52, für 018INX, ein neues Genprodukt des *NF-66/internexin- α* -Gens, für 018NAC, das mit dem Transkriptionskofaktor α -NAC/NACA identisch war, und für 018HSP, welches einem Teil des Hsp90 α entsprach.

Antigen (GenBankNr.)	Klon-Nr.	Homologe der Genbank oder der SEREX Datenbank	Funktion der von homologen DNS codierten Proteine	Neue mRNS-Charakteristika	Neue Protein-Charakteristika
HuDpro1 (AY033998)	137	HuDpro (M62843.1) ELAV4 (XM_018255.1)	Neuronenspez. mRNS-bindendes Protein	Verlängerter 5'-untranslatierter Bereich	Keine
HuDpro1c (keine)	47	„	„	Substitution einer Base	Substitution einer AS
HuD1 (AY033997)	7.2	HuD ohne Bp 868-909 (M62843.1)	„	Verlängerter 5'-untranslatierter Bereich	Keine
HuD3 (AY033995)	195	„	„	Alternative 5'-Sequenz	Alternativer N-Terminus
HuD4 (AY033996)	168.3 227	„	„	Alternative 5'-Sequenz	Alternativer N-Terminus
HuC-L (AY034002)	168.1	HuC (L26405.1) PLE21 (D26158.1) ELAV3 (NM_001420.2)	„	Insertion von 21 Bp	Insertion von 7 AS
NNP3 (AY033999)	154	NNP1/Nop52 (U79775.1) DKFZp434C085 (AL137757.1) NGO-St-143	Pre-rRNS Processierung	Alternative 5'-Sequenz	Alternativer N-Terminus
018INX (AY034000)	72 22	α -internexin/NF66 (NM_032727.1)	Neuronenspez. intermediäres Filament	Nur 3'-UTR untranslatierter Bereich kloniert	Neues Genprodukt
018NAC (AY034001)	24	α -NAC (AF054187.1) NACA (X80909.1) NY-Co-2	Transkriptions-Koaktivator	Keine	Keine
018HSP (keine)	11	Hsp90 (NM_005348.1) NY-REN-38	Molekulares Chaperon	Keine	Keine

Tab. 3: SEREX-definierte Antigene des Neuroblastoms 018: Auflistung der gefundenen Antigene mit Namen, GenBank-Zugangsnummer, Funktion des Proteins, welches von der homologen cDNS codiert wurde, Veränderungen der Antigen-cDNS gegenüber der bekannten cDNS-Sequenz und daraus folgende Unterschiede des hypothetischen Antigens zum bekannten Produkt der homologen mRNS.

IV.2.1 Hu-Antigene

Sechs der gefundenen Antigene gehörten zur Familie der mRNS-bindenden Hu-Proteine, die in die Pathogenese des paraneoplastischen, neurologischen Anti-Hu-Syndroms involviert sind (Voltz 2002; Bataller und Dalmau 2004; Darnell und Posner 2006). Die SEREX-definierten Hu-Antigene wurden von elf Klonen codiert.

Die cDNS-Inserts von zehn Klonen waren homolog zur HuD/HuDpro-mRNS, welche durch das *ELAVL* (*embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila, like*) 4-Gen auf Chromosom 1p34 codiert wird (Szabo *et al.* 1991). Diese Inserte codierten die HuD-Varianten HuD1, HuDpro1, HuDpro1c, HuD3 und HuD4 (**Abb. 6, 7, 8, 9**) (vgl. Kapitel IV.2.1.1)

Das Insert eines weiteren Klons war homolog zur HuC-L-mRNS, welche durch das *ELAVL* 3-Gen auf Chromosom 19p13.2 codiert wird (Van Tine *et al.* 1998) (**Abb. 10, 11**). Dieses Insert codierte das Antigen HuC-L (vgl. Kapitel IV.2.1.2).

IV.2.1.1 HuD-Varianten

Die bekannten HuD-Varianten HuDpro (M62843.1) und HuD unterscheiden sich aufgrund alternativen Spleißens im letzten Exon, so dass dem kürzeren HuD 14 AS der sogenannten Linkerregion (*hinge region*) des Proteins fehlen (Szabo *et al.* 1991) (**Abb. 6, 7**).

Die in dieser Arbeit gefundenen cDNS HuDpro1 (pMu-Neu18/137) und HuD1 (pMu-Neu18/7.2, 29, 66 und 72) wiesen gegenüber den bekannten cDNS von HuDpro und HuD eine erweiterte 5'-untranslatierte Region (UTR) auf. Der neue 5'-cDNS-Abschnitt korrespondierte mit genomischen Sequenzen auf Chromosom 1 stromaufwärts der publizierten *HuD*-Gensequenzen (AL583843.5, Bp 6945-7076). Weiter stromaufwärts konnte ein Promotor mit vorgeschalteter TATA-Box identifiziert werden (AL583843.5, Bp 6943 und 6912), der wahrscheinlich für die Transkription von HuD1 und HuDpro1 verantwortlich war (**Abb. 6**).

Das in dieser Arbeit identifizierte Antigen HuDpro1c (pMu-Neu18/45) unterschied sich von HuDpro1 durch den Austausch von zwei Basen innerhalb der CDS und einer Base im 3'-UTR. Der Austausch von Cytosin durch Thymin an Position 1032 der cDNS HuDpro1c (AY033998) führte zu einem Austausch von Serin durch Prolin an Position 270 der AS-Sequenz. Dieser Austausch lag in dem 14 AS langen HuDpro-spezifischen Bereich. Der Austausch von Thymin durch Cytosin an Position 911 der cDNS HuDpro1c (AY033998), welcher auch in den Varianten HuD3 und HuD4 auftrat, war stumm (**Abb. 6, 7**).

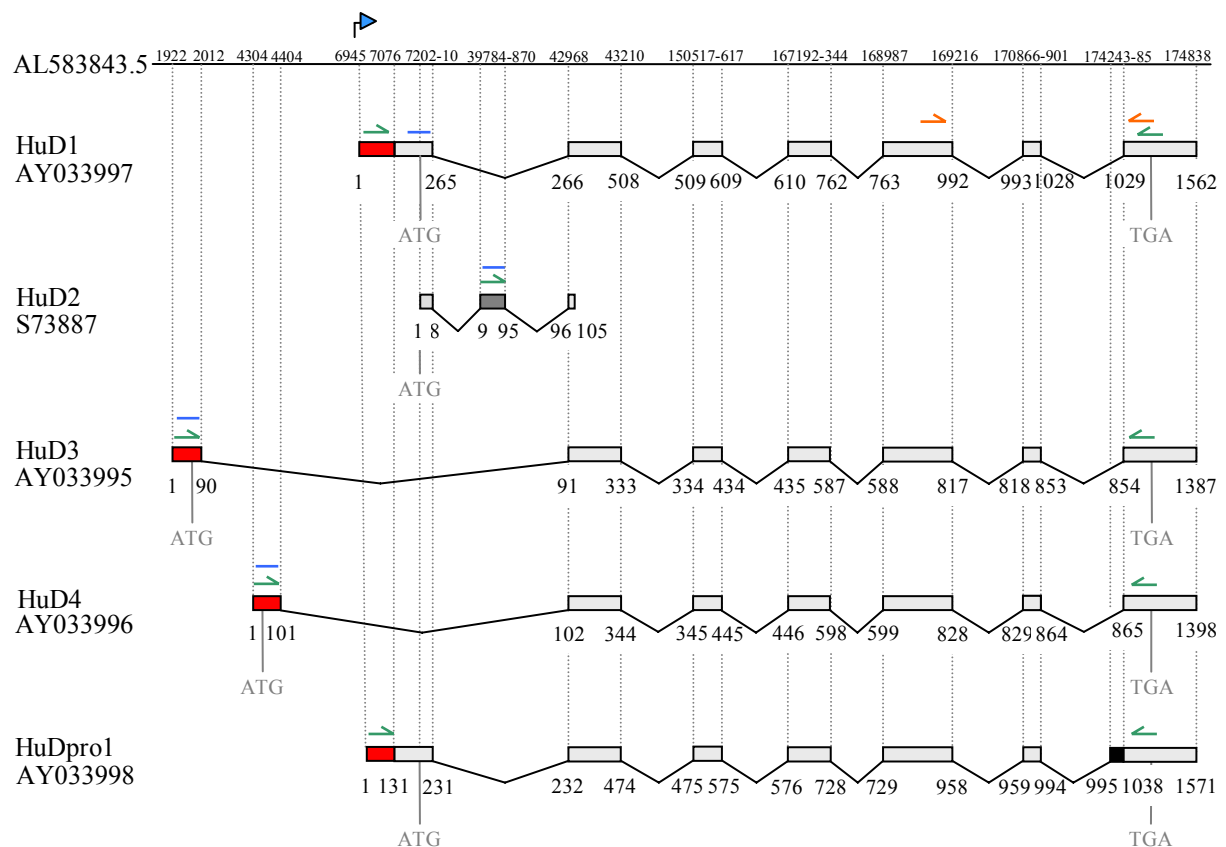


Abb. 6: Exon-Karte der bekannten und neuen HuD-mRNS-Varianten: Abgebildet ist eine Übersicht der verschiedenen bekannten und neuen Spleißvarianten der HuD-mRNS. mRNS-Sequenzen sind als Balken dargestellt, die herausgespleißten Introns als Linien. Die mittels SEREX neu klonierten mRNS-Sequenzen sind als rote, die „pro“-spezifische Sequenz der HuDpro1-mRNS als schwarze und das vorbeschriebene HuD2-spezifische Exon als dunkelgraue Box dargestellt. Die in dieser Arbeit für die differenzielle mRNS-Expressionsanalyse verwendeten PCR-Primer sind grün, die in die Southern-Blot-Hybridisierung eingesetzten Oligonukleotide blau und die von Tora und Kollegen verwendeten PCR-Primer orange eingezeichnet (M62843.1, Bp 918-934 und Bp 1066-1050, s. Kapitel V.1) (Tora *et al.* 2000). Der nicht dargestellten, bekannten Spleißvariante HuDmex fehlt gegenüber HuD1 das vorletzte Exon (AL 583843.5 Bp 170866-901). Die Position des neuen Intronpromotors ist durch einen blauen, abgewinkelten Pfeil markiert (AL583843.5, Bp 6943).

Die neuen Antigene HuD3 (pMu-Neu18/195) und HuD4 (pMu-Neu18/168.3) waren homolog zu HuD, besaßen jedoch unterschiedliche aminoternale Enden. Die 5'-Enden der entsprechenden cDNS (AY033995.1, Bp 1-91 und AY033996.1, Bp 1-102) korrespondierten mit genomischen Sequenzen, welche sich stromaufwärts des putativen *HuD1*-Promotors auf dem Chromosom 1 befanden (AL583843.5, Bp 1922-2012 und 4304-4404). Dies sprach für mindestens einen zusätzlichen HuD-Promotor. Die neuen 5'-Sequenzen wurden an das zweite Exon der HuD-mRNS gespleißt. Die entsprechende Spleißstelle war bereits als solche beschrieben worden und trug zur Generation einer vorbeschriebenen HuD-Variante bei (Sekido

et al. 1994), die hier HuD2 genannt wurde. Diese aus der Zelllinie eines kleinzelligen Bronchialkarzinoms (SCLC) klonierte HuD-Variante enthielt im 5'-Bereich ein zusätzliches 87 Bp langes Exon (**Abb. 7**). Mit Ausnahme des HuD2, welches eine Insertion von 29 AS trug (nicht abgebildet), waren alle HuD-Varianten Innerhalb der RRM's identisch (**Abb. 8**).

Die verschiedenen HuD-Genprodukte kamen also höchstwahrscheinlich durch Nutzung verschiedener Promotoren einerseits und durch alternatives Spleißen andererseits zustande. Einer der HuD-Antigen-codierenden Klone enthielt eine kurze cDNS, die im 3'-Bereich mit HuDpro identisch war, deren 5'-Bereich jedoch nicht komplett kloniert worden war und so keiner der Varianten 1, 2, 3 oder 4 zugeordnet werden konnte (pMu-Neu18/31.1, M62843.1, Bp 117-716, nicht abgebildet).

In Vorarbeiten anderer Autoren zu Proteinen der Hu-Familie konnten Regionen bestimmt werden, die für die Bindung an AU-reiche Elemente (ARE) im 3'-UTR von mRNA verantwortlich sind. Es wurden drei RNS-Erkennungsmotive (RRM, *RNA recognition motif*), auch RNS-Bindedomänen (RBD, *RNA binding domains*) genannt, definiert, welche die bekannte RRM-Proteinstruktur „ β - α - β - β - α - β “ aufweisen (Birney *et al.* 1993). Mit rekombinanten Deletionsmutanten von HuC/Ple21 konnte das erste RRM (RRM1) und die vierte β -Struktur des zweiten RRM (RRM2) als maßgeblich für die Bindung der AU-reichen 3'-Bereiche von mRNA bestimmt werden (Sakai *et al.* 1999). Außerdem konnten bei Nervenzellen nach Deletion des dritten RRM (RRM3) im Zellkulturmodell Funktionsausfälle festgestellt werden (Anderson *et al.* 2000). Der Vergleich der AS-Sequenzen, der auf verschiedenen Chromosomen codierten HuD- und HuC-Proteine, zeigte in den Bereichen der RRM eine hohe Homologie. **Abb. 8** zeigt die Position der RRM am Beispiel der bekannten Antigene HuD und HuC sowie der SEREX-definierten Antigene HuD3 und HuC-L.

Um die mögliche Funktion des neuen, langen aminoterminalen Endes von HuD4 näher zu untersuchen, wurde eine computergestützte Motivsuche unternommen. Mit einem Vorhersageprogramm für leucinreiche NES, (NetNES 1.1 Server) (la Cour *et al.* 2004) wurde die Region von AS 3-11 des HuD4 als mögliches NES identifiziert (HuD4NES) (**Abb. 9**). Leucinreiche NES wurden erstmals im Rev-Protein des humanen Immundefizienz-Virus (HIV) identifiziert (Wen *et al.* 1995) und vermitteln den Kernexport über das Kernexport-Molekül CRM1 (Exportin1/Xpo). Der CRM1-vermittelte Export lässt sich charakteristischerweise mit Leptomycin-B (LMB) inhibieren (Fornerod *et al.* 1997) (vgl. Kapitel IV.6).

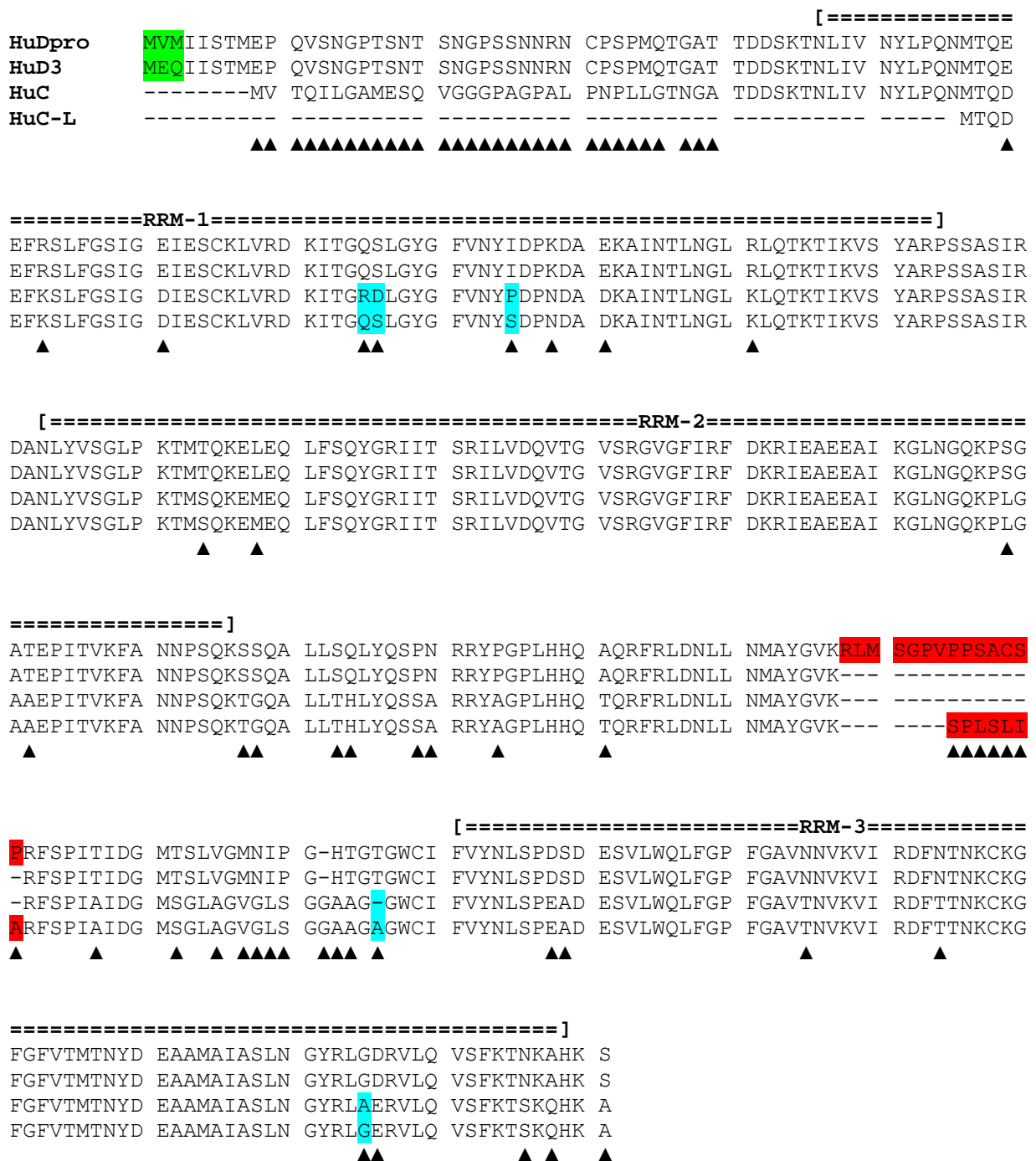


Abb. 8: Position der RRM in bekannten und neuen Hu-Antigenen: Dargestellt ist die Lage der drei RRM in den AS-Sequenzen von HuDpro (M62843.1), HuD3 (AY033995.1), HuC (L26405.1) und HuC-L (AY034002.1) (nach (Liu *et al.* 1995) und (Sakai *et al.* 1999)). HuD3 wurde stellvertretend für die aminoterminalen Varianten HuD1 und HuD4 aufgetragen. Sequenzunterschiede zwischen HuDpro und HuD3 sind grün, zwischen HuC und HuC-L blau markiert. Differenzen zwischen den beiden HuDs gegenüber den beiden HuCs sind mit einem schwarzen Dreieck gekennzeichnet. HuDpro und HuD3 sind innerhalb der RRM identisch. Zwischen HuC und HuC-L liegen in RRM1 drei und in RRM3 ein AS-Austausch vor. Die RRM-Sequenzen sind damit hoch konserviert. Die HuDpro- und HuC-L-spezifischen Sequenzen, welche an analoger Position in die Proteine eingespleißt werden, sind rot hervorgehoben.

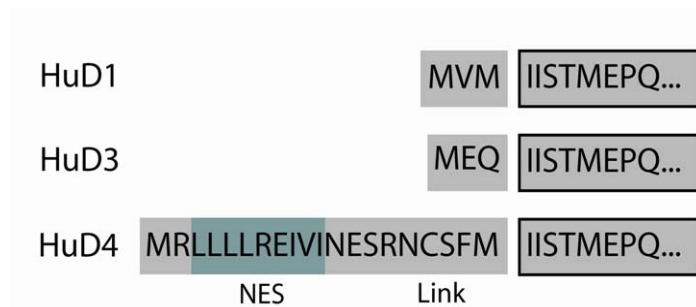


Abb. 9: Nukleäres Exportsignal im aminoterminalen Ende von HuD4: Dargestellt sind die aminoterminalen Proteinsequenzen von HuD1, HuD3 und HuD4. HuD1 und HuD3 unterscheiden sich auf Proteinebene nur durch zwei AS. Das aminoterminal Ende des längeren HuD4 enthält die vorhergesagte NES (dunkler Hintergrund) und wurde ‚HuD4NES‘, die stromabwärts anschließende HuD4-spezifische Sequenz ‚HuD4Link‘ genannt.

IV.2.1.2 HuC-L

Ein weiteres Hu-Antigen (pMu-Neu18/168.1) war homolog zu den humanen Proteinen HuC (L26405.1), PLE21 (D26158.1) und ELAVL3 (NM_001420.2) sowie zu der murinen HUC-Spleißvariante mHuC-L (U29148.1).

Neu an dem SEREX-definierten Antigen HuC-L war eine Erweiterung der Linkerregion durch die AS-Sequenz SPLSIA (**Abb. 10**), die bisher nur in der murinen HuC-Spleißvariante beschrieben worden war (**Abb. 11**). Die entsprechende HuC-L spezifische, 21 Bp lange cDNS-Sequenz (AY034002.1, Bp 720-740) war identisch mit einer genomischen Sequenz auf Chromosom 19 (AC008481.1, Bp 103767-103787), welche unmittelbar stromaufwärts des letzten der sechs beschriebenen Exons im Intronbereich des *HuC*-Gens lag (**Abb. 10**). Daher war davon auszugehen, dass HuC-L in Mensch und Maus durch alternatives Spleißen des *ELAVL3/HuC*-Gens generiert wird.

Das 5'-Ende der HuC-L-cDNS war wahrscheinlich inkomplett kloniert worden, da es um 177 Bp kürzer war als das der HuC- (L26405.1) und ELAVL3-cDNS (NM_001420.2) sowie 280 Bp kürzer als das der PLE21-cDNS (D26158.1). Die AS-Sequenz für HuC-L (AY034002.1) wurde deshalb in **Abb. 11** nicht ausgehend vom ersten ATG (Bp 61-63), sondern vom ersten Kodon (Bp 3-5) des relevanten Leserahmens aus angegeben.

Gegenüber HuC, PLE21 und mHUC-L unterschied sich das SEREX-definierte HuC-L des Weiteren durch einzelne AS-Austausche und eine AS-Deletion. Für den sechs AS- langen aminoterminalen Bereich, in dem PLE21 sich gegenüber den anderen Varianten unterschied, konnte im Bereich des HuC-Gens kein genomisches Korrelat gefunden werden (AC008481.1). Daher ist alternatives Spleißen wahrscheinlich hier nicht ursächlich.

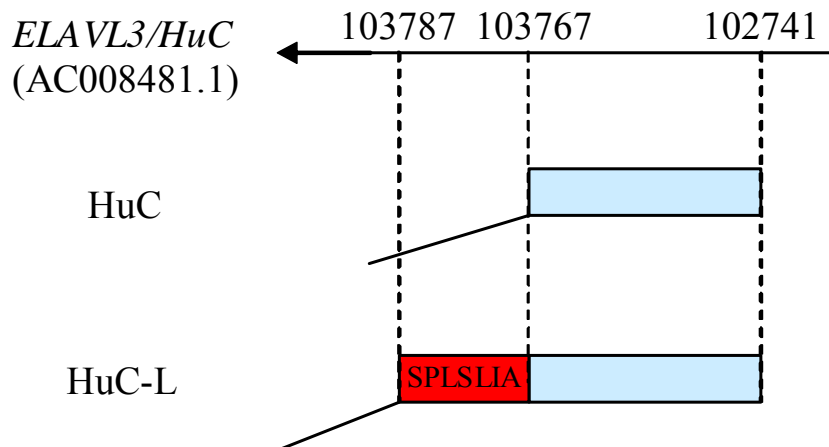


Abb. 10: Generation von HuC-L durch alternatives Spleißen: Stromaufwärts des letzten Exons des *ELAVL3/HuC*-Gens (AC008481.1) schließt die DNS-Sequenz an, welche für die HuC-L-spezifische AS-Sequenz SPLSLIA .

Das HUC-L spezifische AS-Insert ist wie die HuDpro-spezifischen AS-Sequenzen in der Linkerregion zwischen RRM2 und RRM3 lokalisiert und hat damit wahrscheinlich keinen Einfluss auf die mRNS-Bindung (Liu *et al.* 1995).

Die HuC-Varianten unterscheiden sich innerhalb des RRM1 an drei und innerhalb des RRM3 an einer Position (**Abb. 10**). Das HUC-L spezifische AS-Insert ist wie die HuDpro-spezifischen AS-Sequenzen in der Linkerregion zwischen RRM2 und RRM3 lokalisiert und hat damit wahrscheinlich keinen Einfluss auf die mRNS-Bindung (Liu *et al.* 1995).

IV.2.2 NNP3

Der längste offene Leserahmen (ORF, *open reading frame*) des Plasmids Mu-Neu18/154 codierte für ein Protein, das wir NNP3 nannten, da es eine zweite aminoterminal Variante des neuen nukleären Proteins 1 (NNP1/Nop52, U79775.1) darstellte (Jansen *et al.* 1997; Savino *et al.* 1999). Das ursprünglich aus fetalen Nieren klonierte NNP1 wurde von einer anderen SEREX-Arbeitsgruppe auch in Magenkarzinomgewebe gefunden (NGO-St-143) (Serex-Database). Die erste aminoterminal Variante des NNP1 wurde im Jahre 2000 vom Deutschen Krebs-Forschungs-Zentrum als „DKFZp434C085“ (AL137757.1) aus Hodengewebe kloniert und in dieser Arbeit NNP2 genannt.

mHUC-L	MVTQILGAMESQVGGGPAGPALPNGPLLGTNGATDDSKTNLIVNYLPQNMTQDEFKSLFG	60
HUC-L	-----QVGGGPAGPALPNGPLLGTNGATDDSKTNLIVNYLPQNMTQDEFKSLFG	49
ELAVL3	MVTQILGAMESQVGGGPAGPALPNGPLLGTNGATDDSKTNLIVNYLPQNMTQDEFKSLFG	60
HuC	MVTQILGAMESQVGGGPAGPALPNGPLLGTNGATDDSKTNLIVNYLPQNMTQDEFKSLFG	60
PLE21	-----MESQVGGGPAG-RPAQRPLLGTNGATDDSKTNLIVNYLPQNMTQDEFKSLFG	51
mHUC-L	SIGDIESCKLVRDKITGQSLGYGFVNYSDPNDADKAINLNLGLKLTQTKTIKVSYPSSA	120
HUC-L	SIGDIESCKLVRDKITGQSLGYGFVNYSDPNDADKAINLNLGLKLTQTKTIKVSYPSSA	109
ELAVL3	SIGDIESCKLVRDKITGQSLGYGFVNYSDPNDADKAINLNLGLKLTQTKTIKVSYPSSA	120
HuC	SIGDIESCKLVRDKITGRDLGYGFVNYPDPNDADKAINLNLGLKLTQTKTIKVSYPSSA	120
PLE21	SIGDIESCKLVRDKITGQSLGYGFVNYSDPNDADKAINLNLGLKLTQTKTIKVSYPSSA	111
mHUC-L	SIRDANLYVSGLPKTMSTQKEMEQLFSQYGRITSRILLDQATGVSRRGVGFIRFDKRIEAE	180
HUC-L	SIRDANLYVSGLPKTMSTQKEMEQLFSQYGRITSRILMDQVTGVSRRGVGFIRFDKRIEAE	169
ELAVL3	SIRDANLYVSGLPKTMSTQKEMEQLFSQYGRITSRILLVDQVTGVSRRGVGFIRFDKRIEAE	180
HuC	SIRDANLYVSGLPKTMSTQKEMEQLFSQYGRITSRILVDQVTGVSRRGVGFIRFDKRIEAE	180
PLE21	SIRDANLYVSGLPKTMSTQKEMEQLFSQYGRITSRILVDQVTGVSRRGVGFIRFDKRIEAE	171
mHUC-L	EAIKGLNGQKPLGAAEPITVKFANNPSQKTGQALLTHLYQSSARRYAGPLHHQTQRFRLD	240
HUC-L	EAIKGLNGQKPLGAAEPITVKFANNPSQKTGQALLTHLYQSSARRYAGPLHHQTQRFRLD	229
ELAVL3	EAIKGLNGQKPLGAAEPITVKFANNPSQKTGQALLTHLYQSSARRYAGPLHHQTQRFRLD	240
HuC	EAIKGLNGQKPLGAAEPITVKFANNPSQKTGQALLTHLYQSSARRYAGPLHHQTQRFRLD	240
PLE21	EAIKGLNGQKPLGARREPIITVKFANNPSQKTGQALLTHLYQSSARRYAGPLHHQTQRFRLD	231
mHUC-L	NLLNMAYGVKSPLSLIAARFSPIAIDGMSGLAGVGLSGGAAGAGWCIFVYNLSPEADESVL	300
HUC-L	NLLNMAYGVKSPLSLIAARFSPIAIDGMSGLAGVGLSGGAAGAGWCIFVYNLSPEADESVL	289
ELAVL3	NLLNMAYGVK-----RFSP AIDGMSGLAGVGLSGGAAGAGWCIFVYNLSPEADESVL	293
HuC	NLLNMAYGVK-----RFSP AIDGMSGLAGVGLSGGAAG-GWCIFVYNLSPEADESVL	292
PLE21	NLLNMAYAVK-----RFSP AIDGMSGLAGVGLSGGAAG-GWCIFVYNLSPEPDQSVL	283
mHUC-L	WQLFGPFGAVTNVKVIRDFTTNKCKGFGFVMTMTNYDEAAMAIASLNGYRLGERVLQVSFK	360
HUC-L	WQLFGPFGAVTNVKVIRDFTTNKCKGFGFVMTMTNYDEAAMAIASLNGYRLGERVLQVSFK	349
ELAVL3	WQLFGPFGAVTNVKVIRDFTTNKCKGFGFVMTMTNYDEAAMAIASLNGYRLGERVLQVSFK	353
HuC	WQLFGPFGAVTNVKVIRDFTTNKCKGFGFVMTMTNYDEAAMAIASLNGYRLAERVLQVSFK	352
PLE21	WQLFGPFGAVTNVKVIRDFTTNKCKGFGFM TMTMTNYDEAAMAIASLNGYRLGQRVLQVSFK	343
mHUC-L	TSKQHKA	367
HUC-L	TSKQHKA	356
ELAVL3	TSKQHKA	360
HuC	TSKQHKA	360
PLE21	TSKQHKA	350

Abb. 11: Aminosäuresequenzvergleich der HuC-L-Homologe: Dargestellt sind die AS-Sequenzen des murinen mHuC-L (U29148.1) und des humanen HuC (L26405.1), PLE21(D26158.1) und ELAVL3 (NM_001420.2). Sequenzunterschiede der anderen Varianten gegenüber HuC-L sind blau markiert. Das murine und das humane HuC-L unterschieden sich gegenüber den Homologen durch die Sequenz SPLSLIA (AS 202-208 in HuC-L, rot). Abweichungen von mHuC-L zeigt das humane HUC-L nur an Position 147 und 150 (grün).

Die im Rahmen dieser Arbeit gefundene NNP3-cDNS (AY033999) wies ein bisher unbekanntes 61 Bp langes 5'-Ende auf. Dieses cDNS-Stück korrespondierte zu genomischen Sequenzen im fünften Intron des *NNP1*-Gens (NC_000021, Bp 7812-7873) und ist dem sechsten Exon von *NNP1* direkt vorgeschaltet (**Abb. 12**). In diesem Intron konnte stromaufwärts der klonierten Sequenz der wahrscheinlich zugehörige Promotor mit vorgeschalteter TATA-Box (NC_000021, Bp 5923 bzw. Bp 5970) identifiziert werden. Durch den Translationsstart innerhalb der neuen 5'-Sequenz kam es auf Proteinebene zu einem alternativen aminoterminalen Ende.

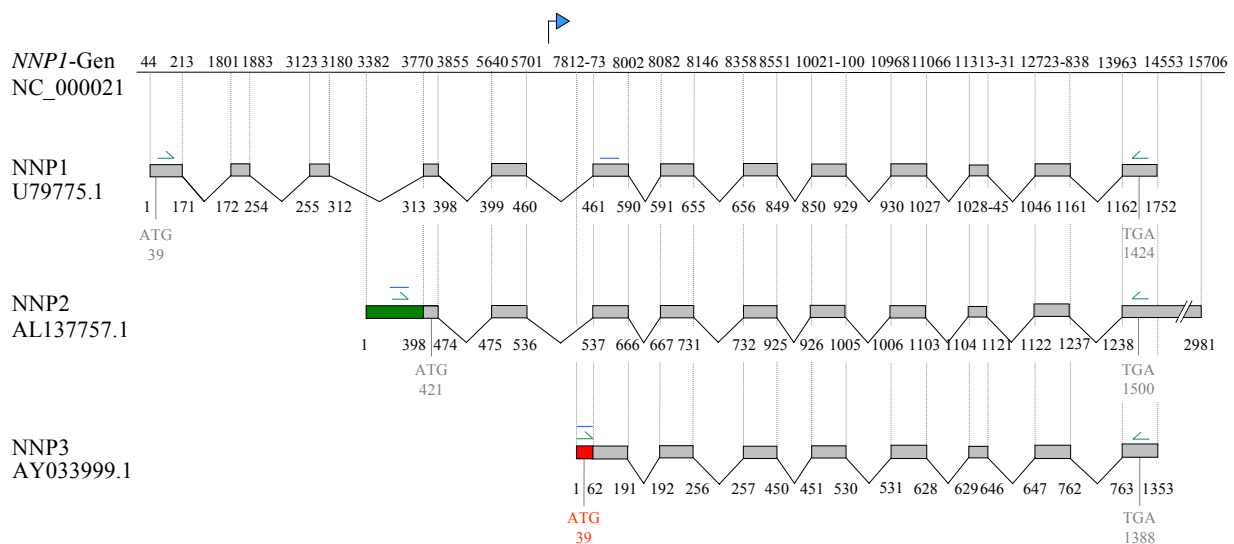


Abb. 12: Exon-Karte der NNP1-, NNP2- und NNP3-mRNAs: Schematisch aufgetragen wurden die beiden bekannten (U79775.1, AL137757.1) und die neue (AY033999.1) NNP-cDNS-Variante ohne Poly-A-Schwanz, sowie das 15744 Bp lange *NNP1*-Gen (NC_000021), welches auf Chromosome 21 liegt (AC003656.1, Bp 44065633- 44081376). Die cDNS-Sequenzen sind entsprechend den einzelnen Exons des *NNP1*-Gens als graue Balken dargestellt. Der Beginn und das Ende der CDS ist durch die Position des Start- (ATG) und Stoppcodons (TGA) markiert. Das bisher unbekannte 61 Bp lange 5'-Ende der NNP3-cDNS (AY033999) wurde als rotes Kästchen gekennzeichnet. Es korrespondierte zu genomischen Sequenzen im fünften Intron des *NNP1*-Gens (NC_000021, Bp 7812-7873) und ist dem bekannten sechsten Exon von *NNP1* direkt vorgeschaltet. In diesem Intron lag stromaufwärts der klonierten Sequenz ein Promotor (NC_000021, Bp 5923, abgewinkelter, blauer Pfeil) mit vorgeschalteter TATA-Box (NC_000021, Bp 5970), was die Vermutung nahe legte, dass die NNP3-Synthese von diesem Intron-Promotor initiiert wurde. Die NNP3-CDS begann an einem innerhalb der neuen Sequenzen gelegenen ATG (AY033999, Bp 39, rot), was die Generation eines kurzen alternativen aminoterminalen Endes bedingte. Das alternative 5'-Ende des NNP2 (grüner Balken, NC_000021, Bp 3382-3769) wird von Intronsequenzen direkt stromaufwärts des bekannten vierten Exon des *NNP1*-Gens codiert (NC_000021, Bp 3770-3855). Das lange 3'-Ende von NNP2 ist nicht komplett aufgetragen (doppelter Schrägstrich).

Im Bereich des NNP2- und NNP3-ORF fanden sich verglichen mit der NNP1-cDNS an zwei Positionen stumme Austausche von Cytosin (AL137757.1, Bp 874; 999 bzw. AY033999, Bp 398; 523) gegen Thymin (U79775.1, 797; 932). Für die Proteinsequenzen ebenso wenig relevant waren einzelne Basendifferenzen im 3'-UTR der NNP-Varianten. So fanden sich verglichen mit der NNP1-cDNS in der 3'-UTR der NNP2- und NNP3-cDNS ein deletiertes Adenin (AL137757.1, Bp 1538/9 bzw. AY033999, Bp 1063/4), eine Insertion von Cytosin (AL137757.1, Bp 1608 bzw. AY033999, Bp 1133) und ein Austausch von Adenin durch Cytosin (AL137757.1, Bp 1824 bzw. AY033999, Bp 1349) (**Abb. 13**).

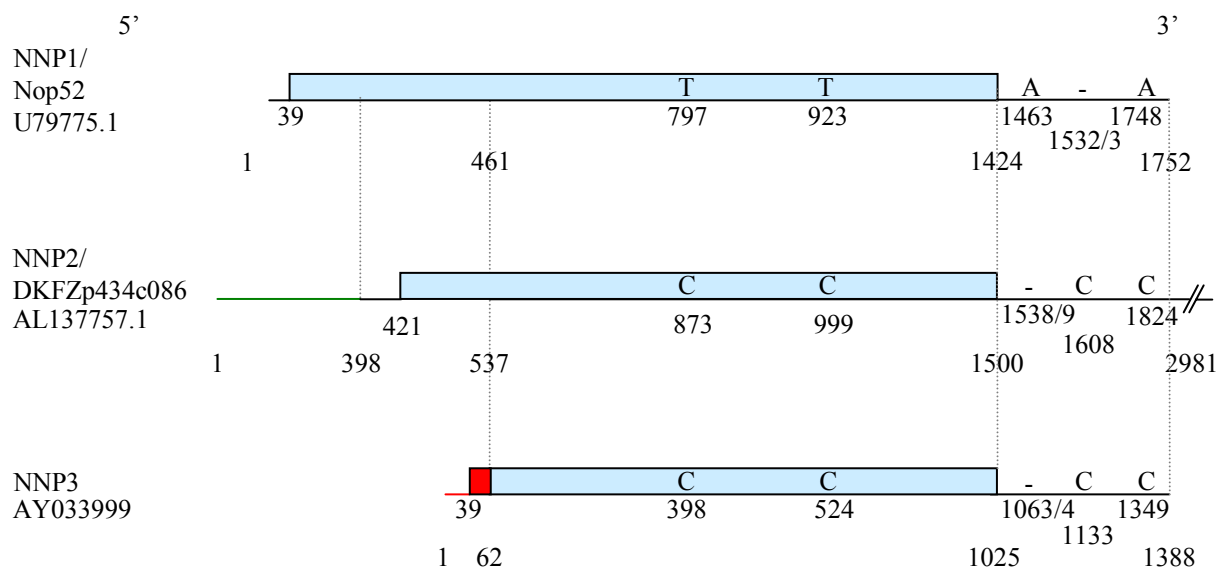


Abb. 13: cDNS-Sequenzvergleich zwischen NNP1, NNP2 und NNP3: Aufgetragen wurden die cDNS-Sequenzen ohne Poly-A-Schwanz. Die CDS ist im homologen Bereich als hellblauer Balken dargestellt. Das neue aminoternale Ende des hypothetischen Antigens NNP3 und der neue 5'-UTR der NNP3-cDNS sind rot gekennzeichnet. Der gegenüber NNP1 unterschiedliche 5'-UTR von NNP2 ist grün dargestellt. Die Basendifferenzen innerhalb der CDS ebenso wie im 3'-UTR hatten keine Auswirkung auf die Proteinsequenzen. Das lange 3'-Ende von NNP2 ist nicht komplett aufgetragen (doppelter Schrägstrich).

IV.2.3 018INX

Die 018INX codierenden cDNS-Inserts in pMu-Neu18/74 und pMu-Neu18/22 waren homolog zu cDNS-Sequenzen, die bisher als 3'-UTR der 3,2 kB großen Neurofilament-cDNS NF66/ α -internexin (NM_032727.1) beschrieben worden waren (Chiu *et al.* 1989; Chan und Chiu 1995) (**Abb. 14**).

Die 018INX-cDNS entsprach dem Ende des letzten Exons im 13 kB langen *NF66/ α -internexin*-Gen (NC_000010). Der stromaufwärts gelegene Bereich der *in vivo* mutmaßlich längeren mRNA war nicht kloniert worden. Der längste ORF der 018INX-cDNS (AY034000, Bp 165-407) codierte eine 242 AS langes Protein (**Abb. 14**). Darüber hinaus fanden sich in der 018INX-cDNS fünf weitere, kleinere ORF mit einer Mindestlänge von 48 Bp (**Abb. 15**). Ohne Auswirkung auf einen dieser sechs ORF waren zwei Basenaustausche (AY034000, Bp 4/5) und die Insertion eines Basentriplets (AY03400, Bp 757-759) in der 018INX-cDNS gegenüber der NF66/ α -internexin-cDNS. Es handelte sich dabei im 5'-Bereich um Austausch von Cytosin und Thymin gegen Adenin und Guanin und am 3'-Ende der cDNS um Insertionen von Cytosin, Adenin und Thymin.

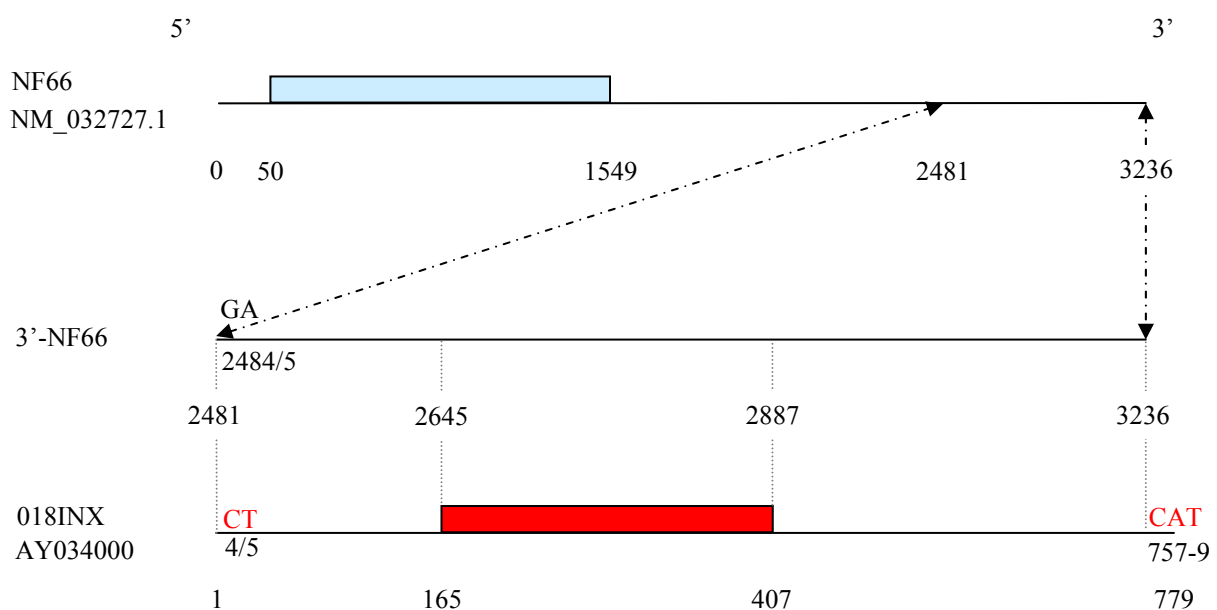


Abb. 14: cDNS-Sequenzvergleich zwischen NF66/ α -internexin und 018INX: In der ersten Zeile ist die NF66/ α -internexin-cDNS in ihrer Gesamtheit ohne Poly-A-Schwanz aufgetragen (NF66). Der hellblaue Balken entspricht der publizierten CDS (NM_032727.1, Bp 50-1549). In der zweiten Zeile (3'-NF66) ist der klonierte Abschnitt der bislang als 3'-UTR bezeichneten Region der NF66/ α -internexin-cDNS dargestellt (NM_032727.1, Bp 2481-3236). Die unterste Zeile zeigt die komplette 018INX cDNS ohne Poly-A-Schwanz. Sie unterschied sich an Position 4, 5 und der 3'-Verlängerung 757-759 von der NF66/ α -internexin-cDNS (rote Buchstaben). Die rote Box symbolisiert den längsten ORF und damit die putative CDS des klonierten Antigens (AY034000, Bp 165-407).

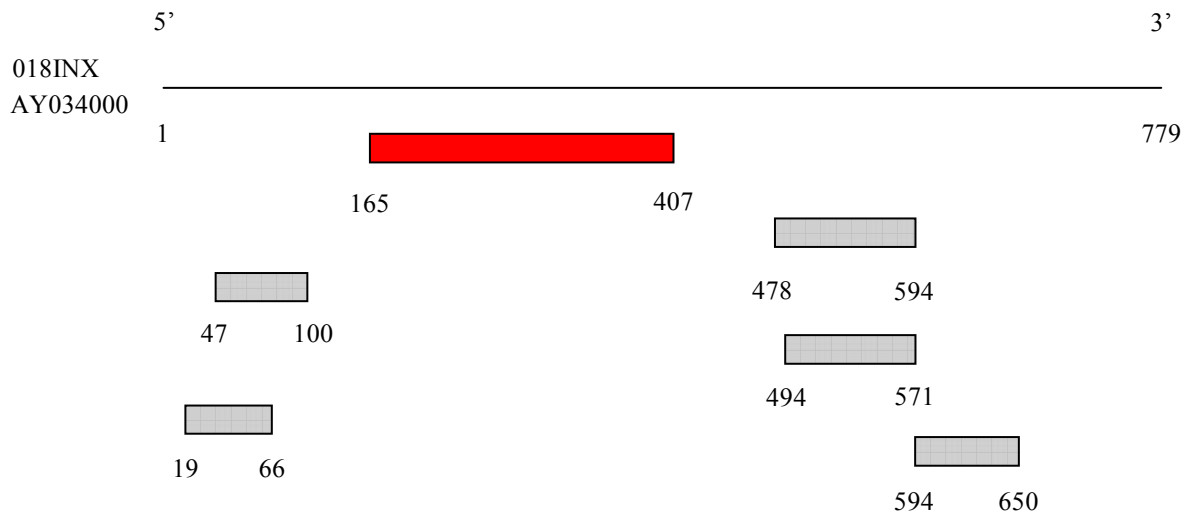


Abb. 15: Position der sechs größten ORF der 018INX-cDNS: Die hier schematisch dargestellte Insert-Sequenz des Klons 018INX (AY034000) war bisher als 3'-UTR der NF66/ α -internexin-cDNS bekannt. Es wurden die sechs größten der mit ATG beginnenden ORF mit ihrer Position innerhalb der cDNS dargestellt, und der längste von ihnen als putative CDS des Antigens rot markiert. Der am Vektor-ATG initiierte ORF wurde durch ein Stop-Kodon (AY034000, Bp 5-7) frühzeitig terminiert, so dass er für das AK-bindende Genprodukt irrelevant war (nicht dargestellt).

IV.2.4 018NAC

Die cDNS-Insert von pMu-Neu18/24 war homolog zu drei cDNS-Einträgen der GenBank (AK090650.1, AF054187.1 und X80909.1), welche für die Alphakette des Transkriptionskofaktors *nascent polypeptide-associated complex α* (α -NAC/NACA) codierten (Moreau *et al.* 1998). Die cDNS-Varianten zeigten aufgrund alternativen Spleißens zwei unterschiedliche 5'-UTR (**Abb. 16**) und innerhalb der CDS drei synonyme Basenaustausche (**Abb. 17**).

Die kurze NACA-cDNS (X80909.1) wurde 1996 aus fetalem Gehirn kloniert (Yotov und St-Arnaud 1996), zeigte 100 % Homologie zu der SEREX-definierten Kolonkarzinom-cDNS NY-CO-2 (Serex-Database) und unterschied sich von der 018NAC-cDNS innerhalb der CDS durch drei synonyme Basenaustausche. Die längere α -NAC-cDNS (AF054187.1) wurde im Rahmen der Klonierung von 300 neuen Genen aus CD34+ Stammzellen sequenziert (Zhang *et al.* 2000). Sie war im Bereich der CDS mit 018NAC identisch, zeigte aber ein gegenüber 018NAC und NACA alternatives 5'-Ende. Im Jahre 2004 ergab die Analyse von Zerebellum-cDNS im Rahmen des NEDO *human cDNS sequencing project* die cDNS-Sequenz FLJ33331 fis (AK090650.1), welche 100 % homolog zur 018NAC-Sequenz war und ein gegenüber der NACA-cDNS (X80909.1, Bp 1-23) erweitertes 5'-Ende aufwies (Ota *et al.* 2004).

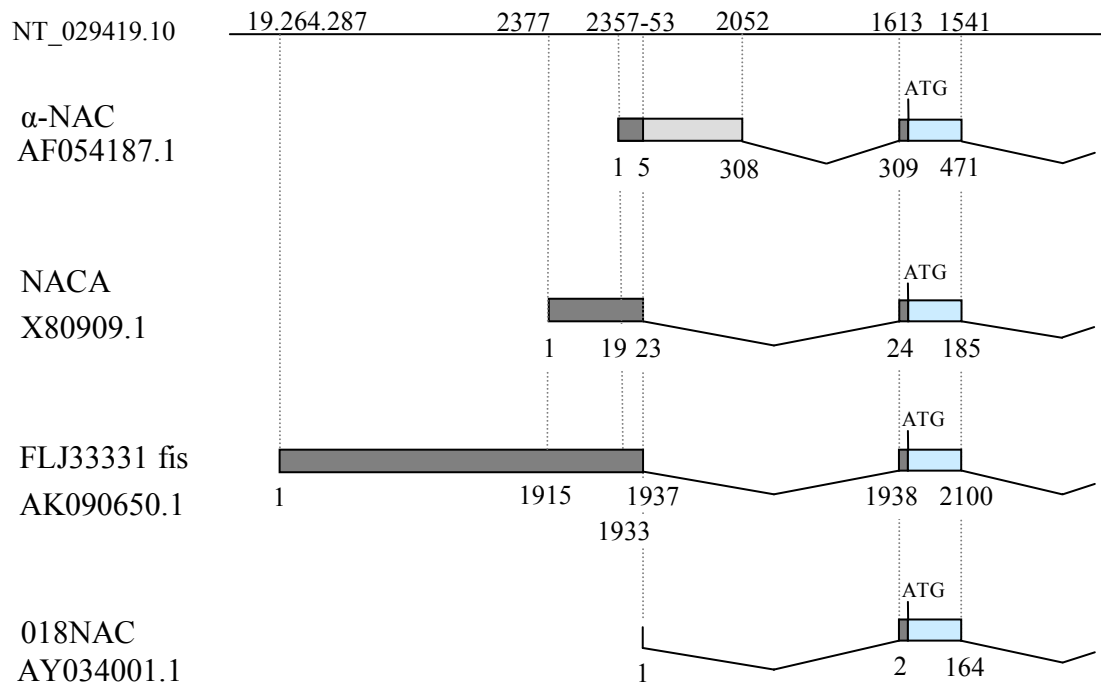


Abb. 16: Generation der α -NAC/NACA-mRNS-Varianten durch alternatives Spleißen: Aufgetragen wurde der Ausschnitt des *NACA*-Gens (NT_029419.10|Hs12_29578: 19.264.287-1.541), welcher die α -NAC/NACA-mRNS-Varianten codierte. Die ersten 5 Basen der α -NAC-mRNS, die erste Base der 018NAC-mRNS (Adenin), als auch die 5'-Enden von NACA und FLJ33331 fis wurden von Exon 1 des *NACA*-Gens codiert (dunkelgrau). Aufgrund alternativen Spleißens enthielt die α -NAC-mRNS zusätzliche Intron-Sequenzen (hellgrau). Die alternative mRNS-Prozessierung hatte keine Auswirkung auf die α -NAC/NACA-CDS (hellblau).

IV.2.5 018HSP

Das cDNS-Insert von pMu-Neu18/11 hatte ohne Poly-A-Schwanz eine Länge von 336 Bp und war homolog zur 2259 Bp langen cDNS des *heat-shock-protein α* (Hsp90 α) (NM_005348.2), welches zur Familie der molekularen Chaperone gehört (Vamvakopoulos *et al.* 1993). Das codierte Antigen wurde deshalb 018HSP genannt.

Homologe des Hsp90 α waren bereits früher mittels SEREX aus einem Nierenzellkarzinom (NY-REN-38, Serex-Database) und einem Ovarialkarzinom (Scanlan *et al.* 1999; Luo *et al.* 2002) kloniert worden.

Die 018HSP-cDNS war identisch mit einem relativ kleinen Abschnitt der Hsp90 α -cDNS (NM_005348.1, Bp 1388-1723) und lag mitten im codierenden Bereich (**Abb. 18**). Die inkomplette Klonierung des 3'-Endes ist höchstwahrscheinlich mit der unerwünschten Bindung des poly(dT)-Primers bei der RT an eine interne adeninreiche Sequenz der Hsp90 α -mRNS zu erklären (NM_005348.2, Bp 1128-1806).

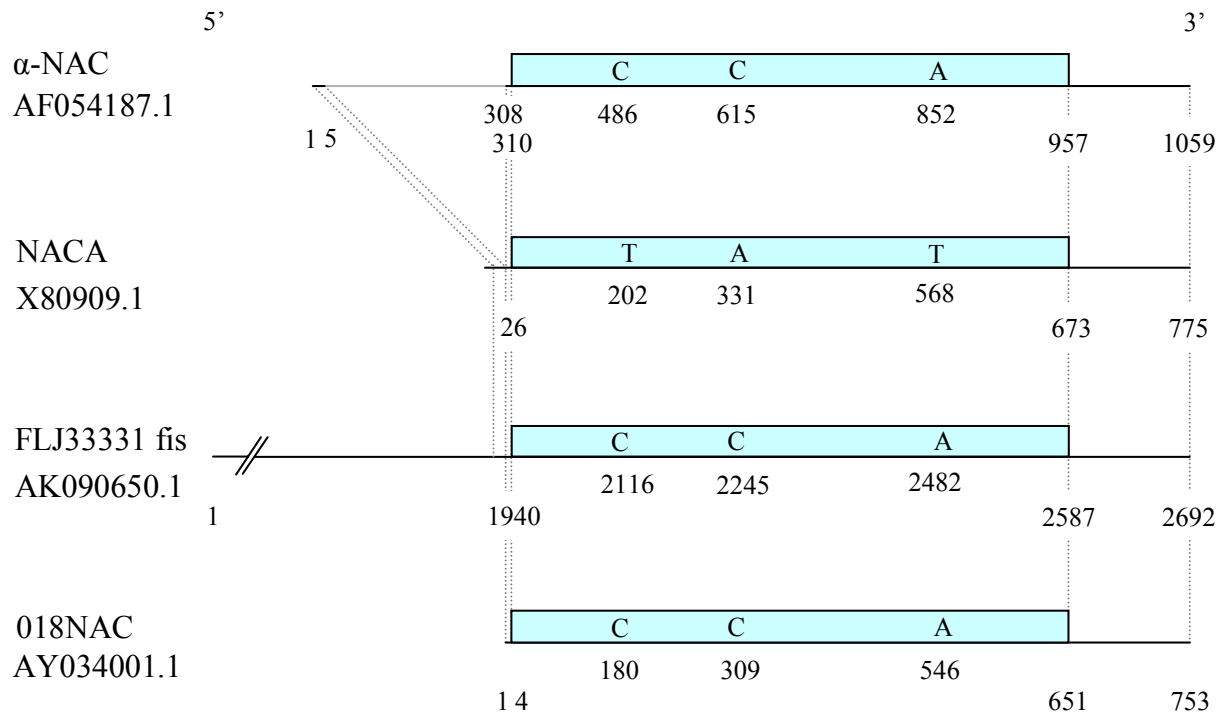


Abb. 17: cDNS-Sequenzvergleich von α -NAC, NACA, FLJ23331 fis und 018NAC: Aufgetragen wurde die komplette cDNS ohne Poly-A-Schwanz der vier Varianten. Die CDS ist jeweils als hellblauer Balken dargestellt. Das 5'-Ende von FLJ23331 fis ist verkürzt dargestellt worden. Die α -NAC-, FLJ23331 fis- und 018NAC-cDNS zeigten gegenüber der NACA-cDNS drei synonyme Basenaustausche. Die durch alternatives Spleißen generierte zusätzliche Sequenz im 5'-UTR der α -NAC-mRNS ist analog Abb. 15 hellgrau dargestellt (AF054187.1, Bp 5-308).

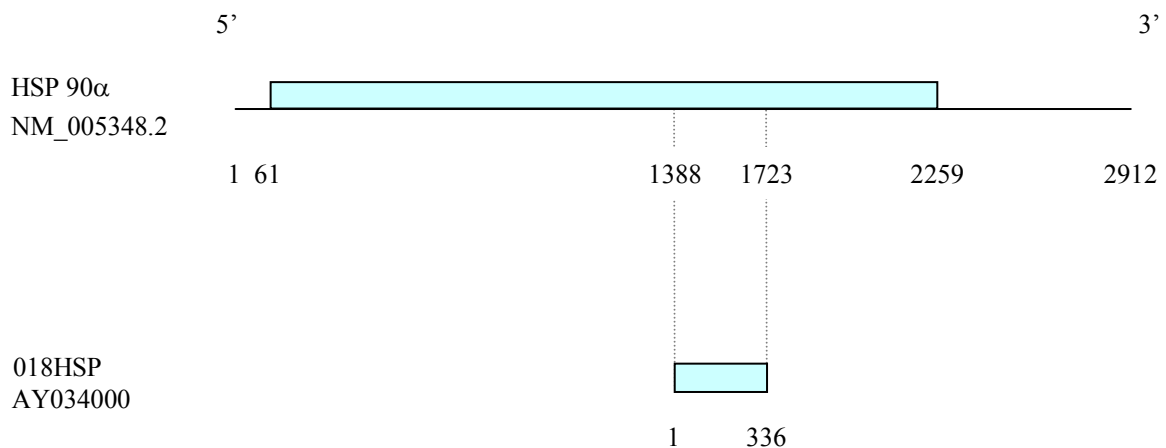


Abb. 18: cDNS-Sequenzvergleich von 018HSP und HSP90 α : Dargestellt ist die HSP90 α -cDNS in ihrer Gesamtheit ohne Poly-A-Schwanz mit CDS (hellblauer Balken). Der Bereich von Bp 1388-1723 (NM_005348.1) entspricht der cDNS-Sequenz des Antigens 018HSP.

IV.3 Antigen-spezifische Antikörper-Titer im Krankheitsverlauf

Das Serum, mit dem das Screening der cDNS-Bibliothek durchgeführt wurde, war bei Diagnosestellung vor Therapiebeginn abgenommen worden. Um die Wertigkeit der antigenspezifischen AK als Verlaufsmarker beurteilen zu können, waren ihre Titer im Verlauf der Erkrankung interessant. Sie wurden mittels Plaque-Assay und unterschiedlich verdünnten Serumproben gemessen, und der Titer, bei dem gerade noch eine Detektion der entsprechenden Antigene möglich war, angegeben. Es standen sechs verschiedene Serumproben zur Verfügung, die über einen Zeitraum von 27 Monaten gesammelt worden waren. Das Serum wurde zur Bestimmung des minimal benötigten Titers in Zehnerschritten verdünnt. Getestet wurde durch Ausplattieren der Phagen, welche die jeweils längste cDNS der Antigene HuD4, 018INX, 018NAC, 018HSP und NNP3 codierten. Die AK-Bindung der verschiedenen Hu-Antigene wurde nicht differenziell untersucht. Die Phagen wurden, um positive Plaques von negativen unterscheiden zu können, zusammen mit einem negativen Klon im Verhältnis von 1:10 mit ca. 500 pfu pro Platte ausplattiert.

Um zu prüfen, ob Änderungen der AK-Konzentrationen mit Pro- oder Regression der Krankheit korrelierten, mussten Messparameter für den Krankheitsverlauf ausgewählt werden. Die üblichen klinischen Parameter sind das radiologisch ermittelte Tumolvolumen und die Serumkonzentrationen von NSE und LDH. Bei der NSE handelte es sich um eine Enolase-Isoform, die vor allem in Neuronen und neuroendokrinen Zellen sowie in den daraus entstandenen Tumoren in hoher Konzentration vorhanden ist. Sie ist ein anerkannter Tumormarker bei NB, SCLC und anderen neuroendokrinen Neoplasien. Bei ca. 60 % aller Kinder mit NB werden Werte über 30 µg/l gefunden (Normalwert < 15 µg/l). Hämolyse kann wegen des NSE-Gehaltes von Erythrozyten und Thrombozyten zu erhöhten Werten führen, was aber in der Regel kein Problem darstellt. Die LDH (Normalwert < 300 U/l) ist in allen Geweben vorhanden und korreliert mit der Größenordnung des Zelluntergangs und somit mit der Tumorgroße. Sie ist ein einfach zu erhebender Laborwert und kann auch zur Prognoseabschätzung herangezogen werden (Berthold *et al.* 1994). Das Gesamt-IgG (Normalwert 500 - 1300 mg/dl) wurde angegeben, da eine Dynamik der spezifischen AK theoretisch auch im Rahmen einer unspezifischen Abnahme des Gesamt-IgG im Rahmen der Immunsuppression durch zytostatische Therapie zustande kommen könnte.

Bei Diagnosestellung (Monat 0) konnten für die einzelnen antigenspezifischen IgG-AK Serumentiter von 1:100 bis 1:10.000 festgestellt werden (**Tab. 4**). Zu diesem Zeitpunkt waren sonographisch ein 561 ml großer Bauchtumor und deutlich erhöhten Konzentrationen der

Zeit nach Diagnose (Monate)	Tumor- ¹ Volumen (ml)	NSE (µg/l)	LDH (U/l)	IgG (mg/dl)	HuD4 ²	018INX	018NAC	018HSP	NNP3
0	561	246	1350	1247	1:10.000	1:1.000	1:100	1:1.000	1:1.000
8	12	14	n. d.	484	1:1.000	- ³	-	1:100	1:100
10	7	15	257	497	1:100	-	-	1:100	1:1.000
20	3	18	n. d.	628	1:1.000	1:1.000	1:1.000	-	1:1.000
24	3	19	215	579	1:10.000	1:1.000	1:100	1:100	1:1.000
27	16	83	353	822	1:1.000	1:10.000	1:1.000	-	1:1.000

Tab. 4: AK-Titer gegen die neu definierten SEREX Antigene im zeitlichen Verlauf:
¹Sonographisch ermittelte Daten. ²HuD4 wurde stellvertretend für alle Hu-Antigene untersucht. ³Keine Detektion mit einer Serumverdünnung von 1:100. Nach primärer, klinisch und immunologisch messbarer, Remission stiegen die AK-Titer gegen Hu-Antigene, 018INX und 018NAC deutlich vor den klinischen Parametern der Tumorlast wieder an (rot). (n. d., nicht durchgeführt)

Tumormarker NSE (246 µg/l) und LDH (1350 U/l) festzustellen. Danach wurde das NB nahezu komplett reseziert, und histologisch ein Malignitätsgrad nach Hughes von II - III festgestellt.

In den acht Monaten nach Diagnosestellung wurden eine zytostatische Therapie, eine zweite subtotale Tumoresektion und eine Radiotherapie durchgeführt. Diesmal wurde das entnommene Tumorgewebe mit einem Malignitätsgrad nach Hughes von I - II eingestuft. Einhergehend mit dieser histologischen Ausdifferenzierung und einer partiellen klinischen Remission fielen die AK-Titer zwischen dem achten und zehnten Monat auf niedrigste Werte wobei 018INX, 018NAC und 018HSP mit 1:100 verdünntem Serum nicht mehr zu detektieren waren. Das Tumolvolumen betrug zwischen dem achten und vierundzwanzigsten Monat minimal 3 ml, die Konzentration für NSE und LDH 14 µg/l bzw. 215 U/l.

Zwischen dem zwanzigsten und vierundzwanzigsten Monat nach Diagnose stiegen die AK-Titer wieder auf das bis zu 100-fache für HuD, 018INX und 018NAC, während weder das Tumolvolumen noch die Serumwerte der Tumormarker oder das gesamt IgG signifikante Veränderungen zeigten. Die anti-018INX-AK-Titer erreichten ihren maximalen Wert 27 Monate nach Diagnose. Erst zu diesem Zeitpunkt konnte eine klinische Progression der

Krankheit mit etwa fünffacher Vergrößerung des Tumorumens und 1,6- bzw. 4-fachem Anstieg der Serumkonzentrationen für LDH bzw. NSE festgestellt werden. Nach 28 Monaten wurde bei einer weiteren subtotalen Tumorsektion wieder wie zum Zeitpunkt der Erstdiagnose ein Malignitätsgrad von Hughes II - III festgestellt.

IV.4 Heterologe Serumanalyse

Für die klinische Relevanz neuer Tumorantigene bedeutsam ist die Frage, ob die tumorantigenspezifischen AK auch bei anderen Patienten mit demselben Tumor, bei Patienten mit anderen Tumoren oder bei gesunden Probanden vorkommen. Im Sinne der klinischen Relevanz als Tumorantigen wünschenswert ist ein Nachweis von Serum-AK ausschließlich im Rahmen von Tumorerkrankungen bzw. ein fehlendes Auftreten bei gesunden Patienten.

Um die Spezifität des Vorkommens, die Häufigkeit und die Titer der AK gegen die gefundenen Antigene zu bestimmen, wurde die Reaktion von Seren von 30 pädiatrischen Patienten mit malignen Erkrankungen und 30 gesunden Kontrollpersonen mit dem jeweiligen SEREX-Antigen bzw. einem repräsentativen Vertreter der Antigengruppe untersucht (**Tab. 5, 6**).

Ausschließlich bei an Malignomen erkrankten Personen wurden AK gegen Hu-Antigene (5/30) und 018INX (1/30) gefunden, so dass es sich bei diesen Antigenen definitionsgemäß um Tumorantigene handelte.

AK gegen die Antigene 018NAC, 018HSP und NNP3 wurden sowohl bei Malignompatienten (6/30, 9/30 bzw. 7/30) als auch bei gesunden Kontrollen (3/30, 2/30 bzw. 1/30) detektiert. Die Induktion einer humoralen Immunantwort gegen diese AK wurde daher wahrscheinlich primär unabhängig von einer malignen Erkrankung ausgelöst. Diese AK wurden insgesamt häufiger und mit höheren Titern in der Gruppe der pädiatrischen Malignompatienten als in der gesunden Kontrollgruppe gefunden.

Bei den Patienten mit NB kamen am häufigsten AK gegen 018HSP (5/10) und gegen Hu-Antigene (2/10) vor. Gegen die anderen drei Antigene wurde nur jeweils eines der zehn Seren positiv getestet.

	HuD4	018INX	018NAC	018HSP	NNP3
Gesunde Probanden (n = 30)	0	0	3	7	1
Patienten mit malignen Neoplasien (n = 30)	5	1	6	9	2
Neuroblastome (n = 10)	2	1	1	5	1
Stadium 1 (n = 2)	0	0	0	1	0
Stadium 3 (n = 3)	2	1	1	3	1
Stadium 4S (n = 2)	0	0	0	0	0
Stadium 4 (n = 2)	0	0	0	1	0
Rezidiv Stadium 4 (n = 1)	0	0	0	0	0
Neuroektodermale Neoplasien (n = 10)	2	0	2	1	0
Medulloblastom (n = 4)	0	0	0	1	0
Astrozytom (n = 3)	1	0	0	0	0
Ewingtumor (n = 3)	1	0	2	0	0
Nicht neuroektodermale Neoplasien (n = 10)	1	0	3	3	1
Rhabdomyosarkom (n = 2)	0	0	0	1	0
Osteosarkom (n = 2)	0	0	0	1	0
Non-Hodgkin Lymphom (n = 2)	1	0	2	1	0
Akute lymphoblastische Leukämie (n = 2)	0	0	1	0	0

Tab. 5: Heterologe Serumanalyse: Angegeben wurde die Anzahl der Personen, bei denen durch einen Plaque-Assay mit 1:100 verdünntem Serum AK gegen die mit SEREX gefundenen NB-Antigene detektiert werden konnten. Die Gesamtzahl der untersuchten gesunden Probanden und pädiatrischen Malignompatienten betrug jeweils 30. Die Ergebnisse wurden nach Personengruppen aufgeschlüsselt dargestellt. HuD4 wurde stellvertretend für alle Hu-Antigene untersucht. Die positiven Einzelergebnisse für die Tumorantigene HuD4 und 018INX sind rot hervorgehoben.

	HuD4	018INX	018NAC	018HSP	NNP3
Gesunde Probanden (n = 30)	0	0	3	7	1
1 : 100	0 ¹	0	3	4	1
1 : 1.000	0	0	0	3	0
1 : 10.000	0	0	0	0	0
1 : 100.000	0	0	0	0	0
Patienten mit Malignomen (n = 30)	5	1	6	9	2
1 : 100	3	0	5	2	1
1 : 1.000	1	1	1	7	1
1 : 10.000	1	0	0	0	0
1 : 100.000	0	0	0	0	0

Tab. 6: AK-Titer gegen die SEREX-definierten Antigene: Angegeben wurde die Zahl der Serumproben, die bei den angegebenen Verdünnungen die SEREX-definierten Antigene noch im Plaque-Assay erkannten. HuD4 wurde stellvertretend für alle Hu-Antigene untersucht. AK gegen die Autoantigene 018NAC, 018HSP und NNP3 kamen bei Malignompatienten häufiger und mit höherem Titer als bei den gesunden Kontrollen vor (rot).

IV.5 mRNA-Expressionsanalyse für Antigene der Hu- und NNP-Familien

Das mRNA-Expressionsmuster wurde für die neuen Varianten von HuD, HuC und NNP1 untersucht. Zu diesem Zweck wurde eine RT-PCR an 23 Normalgeweben sowie an 18 pädiatrischen Tumorproben und drei NB-Zelllinien durchgeführt. Als Vertreter häufiger pädiatrischer Hirntumoren wurden vier Medulloblastome, ein Astrozytom und ein Ependymom ausgewählt. Als Vertreter häufiger nicht-neuroektodermaler Neoplasien des Kindesalters dienten zwei Osteosarkome, ein Rhabdomyosarkom, zwei Hodgkin-Lymphome und ein Non-Hodgkin-Lymphom. Als Vertreter der von NB abgeleiteten Zelllinien wurden die in der internationalen Literatur gut charakterisierten Zelllinien LA-N-5, SiMa und SH-SY5Y ausgewählt (Sonnenfeld und Ishii 1982), (Marini *et al.* 1999), (Biedler *et al.* 1978).

Um die Sensitivität und Spezifität zu erhöhen, wurde nach der RT-PCR noch eine Southern-Blot-Hybridisierung der RT-PCR-Produkte mit radioaktiv markierten, internen Oligonukleotiden durchgeführt. Die Sequenz der verwendeten Primer und Hybridisierungssonden findet sich bei der Materialbeschreibung in Kapitel II.8. Ihre Position in der entsprechenden cDNS ist schematisch in den Abbildungen der Kapitel IV eingezeichnet. Die Ergebnisse aller mRNS-Expressionsanalysen wurden tabellarisch zusammenfasst (**Tab. 7, 8**). Als Beispiel für die Original-Bilder einer RT-PCR mit nachfolgender Southern-Blot-Hybridisierung der PCR-Produkte sind die interessanten Ergebnisse der Analyse von HuD1-spezifischen mRNS-Sequenzen in Normalgewebe dargestellt (**Abb. 19**).

Von allen Hu-mRNS-Varianten wurden HuD1-Transkripte in den wenigsten Geweben gefunden. Bemerkenswerterweise fanden sich HuD1-spezifische Sequenzen normalerweise nur im Gehirn, während Spuren der anderen HuD-mRNS-Varianten, möglicherweise aufgrund eingeschlossener Zellen neuralen Ursprungs, auch in einigen peripheren Organen nachweisbar waren. Bei den Tumorgeweben fand sich die HuD1-mRNS ausschließlich in Proben von Entitäten neuroektodermalen Ursprungs. Im Gegensatz dazu wurden Transkripte von HuD2, 3 und 4 sowie HuC-L auch in einigen extrakraniellen Geweben und bis auf HuD4 auch in nicht-neuroektodermalen Tumoren detektiert.

Interessanterweise kamen darüber hinaus HuD2, 3 und 4-Transkripte in allen NB vor, während die HuD1-spezifischen Sequenzen in einem NB Stadium 4 mit *MYCN*-Amplifikation eines bereits verstorbenen Kindes nicht nachzuweisen waren. Letzteres legt eine mögliche Assoziation der Herunterregulation des neuen Intronpromotors mit einer hohen Aggressivität des NB nahe.

Innerhalb der vier Medulloblastome war die HuD1-mRNS-Expression dagegen mit einem ungünstigen klinischen Verlauf assoziiert. Die beiden betroffenen Kinder zeigten eine progrediente Erkrankung bzw. waren bereits in Folge der Krebserkrankung verstorben.

	HuD1	HuD2	HuD3	HuD4	HuC-L	NNP1	NNP2	NNP3
Gehirn	+	+	+	+	+	+	+	+
Thymus	-	+	-	-	+	+	-	+
Tonsillen	-	-	-	-	-	+	+	+
Lymphknoten	-	-	-	-	-	+	+	+
Milz	-	-	-	-	-	+	-	+
Gepoolte PBMC ¹	-	-	-	-	-	+	+	+
Herz	-	-	-	-	-	+	+	+
Lunge	-	-	-	-	-	+	-	+
Schilddrüse	-	-	-	-	-	+	-	-
Leber	-	+	-	-	-	+	+	+
Pankreas	-	+	-	+	+	+	+	+
Dünndarm	-	+	+	+	+	+	+	+
Blase	-	+	+	-	+	+	-	-
Nebennieren	-	+	-	+	-	+	+	+
Nieren	-	-	-	-	+	+	+	+
Prostata	-	+	+	+	+	+	+	+
Hoden	-	+	+	+	-	+	+	+
Brustdrüsen	-	-	-	-	-	+	-	+
Uterus	-	-	-	-	-	+	+	+
Ovarien	-	-	-	-	-	+	+	-
Plazenta	-	-	-	-	-	+	+	-
Skelettmuskel	-	-	-	-	-	+	-	+
Haut	-	-	-	+	-	+	-	-

Tab. 7: mRNS-Expressionsanalyse der Hu- und NNP-Varianten in Normalgewebe: Aufgelistet sind alle Gewebe, die mithilfe von RT-PCR und nachfolgender spezifischer Southern-Blot-Hybridisierung der PCR-Produkte auf eine mRNS-Expression der HuD- bzw. NNP-Varianten untersucht wurden. ¹PBMC: periphere mononukleäre Blutzellen. Der besseren Übersicht halber ist das differenzielle Expressionsmuster der Hu-Varianten farbig hervorgehoben. HuD1-spezifische Sequenzen waren nur im Gehirn zu detektieren.

				HuD1	HuD2	HuD3	HuD4	HuC-L	NNP1	NNP2	NNP3
Neuroblastome (n = 6)											
NB 1 ¹	KR	19 ²	n ³	+	+	+	+	+	+	+	+
NB 3	PR	37	n	+	+	+	+	+	+	+	+
NB 3	PR	31	n	+	+	+	+	+	+	+	+
NB 4S	KR	57	n	+	+	+	+	+	+	+	+
NB 4	T	-	a	+	+	+	+	+	+	-	-
NB 4	T	-	a	-	+	+	+	+	+	+	-
Andere neuroektodermale Neoplasien (n = 6)											
MB	KR	24		-	-	-	-	+	+	-	+
MB	KR	47		-	+	+	+	+	+	-	+
MB	PE	37		+	+	+	-	+	+	+	-
MB	T	-		+	+	+	+	+	+	-	-
AZ	KR	32		-	+	+	+	+	+	+	+
EP	KR	21		-	+	-	+	+	+	+	+
Nicht neuroektodermale Neoplasien (n = 6)											
OS	KR	24		-	-	-	-	-	+	+	+
OS	T	-		-	+	-	-	-	+	+	-
RMS	KR	27		-	-	+	-	+	+	+	+
HL	KR	75		-	+	-	-	-	+	+	+
HL	KR	73		-	+	-	-	-	+	+	+
NHL	KR	18		-	-	-	-	-	+	+	+
Neuroblastom-Zelllinien (n = 3)											
LA-N-5				-	-	-	-				
SiMa				+	+	+	+				
SH-SY5Y				+	+	+	+				

Tab. 8: Expressionsanalyse für Hu- und NNP-Varianten in Tumorgewebe und Neuroblastom-Zelllinien: Aufgelistet wurden alle Tumorgewebe und Zelllinien, die auf eine mRNA-Expression der HuD- und NNP-Varianten untersucht wurden. MB: Medulloblastom, AZ: Astrozytom, EP: Ependymom, OS: Osteosarkom, RMS: Rhabdomyosarkom, MH: Hodgkin Lymphom, NHL: Non-Hodgkin Lymphom, KR: komplette Remission, PR: partielle Remission, PE: progressive Erkrankung, T: Tod in Folge der Erkrankung, ¹INSS Stadium, ²Monate nach Diagnose. ³a/n: *MYCN*-Gen amplifiziert/nicht amplifiziert. Die Ergebnisse, die auf eine mögliche Assoziation einer HuD1- und NNP3-mRNA-Herunterregulierung mit einer schlechten Prognose hinweisen, sind rot markiert.

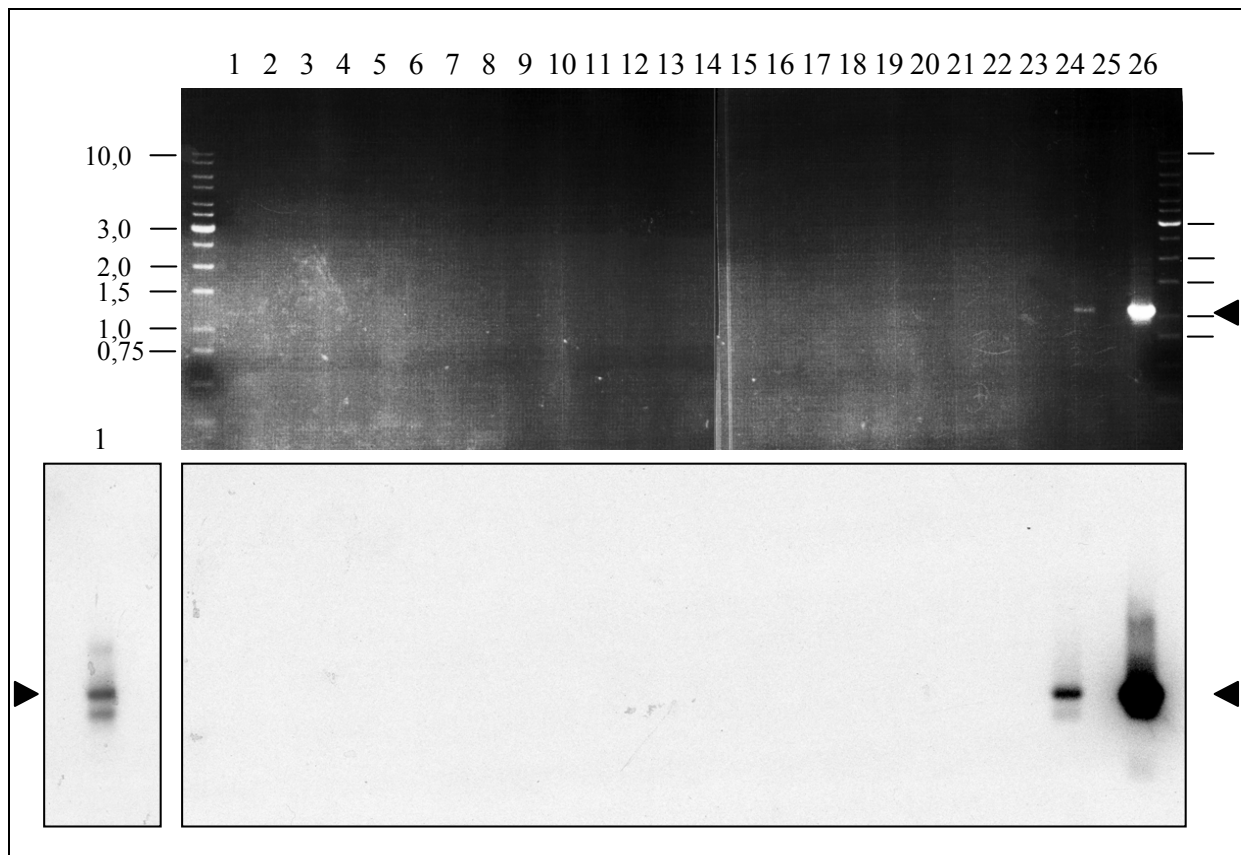


Abb. 19: Agarose-Gel-Elektrophorese und radioaktive Southern-Blot-Hybridisierung der HuD1-spezifischen PCR-Produkte von Normalgeweben: Die PCR wurde mit dem Primer HuDan und dem HuD1-spezifischen Primer HuD1se durchgeführt. Aufgetragen wurde das PCR-Produkt aus 1) Gehirn, 2) Thymus, 3) Tonsille, 4) Lymphknoten, 5) Milz, 6) Herz, 7) Lunge, 8) Leber, 9) Pankreas, 10) Dünndarm, 11) Darm, 12) Nebenniere, 13) Niere, 14) Adnexe, 16) Uterus, 17) Prostata, 18) Testis, 19) Muskel, 20) Rippe, 21) Haut und 22) Schilddrüse. Als Negativkontrolle wurde 23) ddH₂O, als Positivkontrollen 24) cDNS des NB 018 und 26) das Plasmid *pBluescript18/7.2* getrennt durch 25) eine Leerspur eingesetzt. Im oberen Bild sieht man ein Photo des Gels im UV-Transilluminator, im unteren ein Photo des Röntgenfilms nach ein- (rechts) bzw. sieben- (links) tägiger Exposition gegenüber dem radioaktiv mit dem Oligonukleotid HuD1 hybridisierten Southern-Blot der PCR-Produkte. Die Positivkontrollen sind nach eintägiger Exposition (rechts) deutlich zu erkennen und liegen im Bereich der erwarteten Größe von 1091 Bp. Von den untersuchten Geweben konnte HuD1-mRNS nur nach siebentägiger Exposition des Röntgenfilms und nur in 1) Gehirngewebe detektiert werden (links).

Weiterhin interessant war die Tatsache, dass sich in allen untersuchten NB mindestens vier der fünf verschiedenen HuD-Transkripte nachweisen ließen, während keines von ihnen in PBMC oder Lymphknoten vorkam, so dass sich das Set der verwendeten Primer möglicherweise für die MRD-Diagnostik eignen könnte.

In den Zelllinien SH-SY5Y und SiMa konnten alle HuD-Varianten detektiert werden. Im Gegensatz hierzu lies sich in der Zelllinie LA-N-5 keine der vier HuD-Varianten nachweisen. Die verfügbare LA-N-5-Zelllinie entsprach somit dem Schwann (S)- und nicht dem Neuroblastischen (N)-Zelltyp der LA-N-5-Zelllinien aus NB (Ross *et al.* 1997).

Expressionsanalysen für HuC- und NNP-Varianten wurden bei den Zelllinien nicht durchgeführt, da sie für die nachfolgenden Untersuchungen zur HuD-Proteinexpression irrelevant waren (vgl. Kapitel IV.6).

NNP1 wurde, wie bereits von anderen Autoren mithilfe von Northern-Blots gezeigt (Jansen *et al.* 1997; Savino *et al.* 1999), ubiquitär exprimiert, während NNP2 und NNP3 eine etwas eingeschränktere Expression zeigten. NNP2 und 3 kamen in der überwiegenden Mehrzahl aller gesunden und maligne transformierten Gewebe vor. Auffällig war eine Herunterregulation der NNP3-mRNS in besonders aggressivem NB-, Medulloblastom- und Osteosarkomgewebe. Die beiden betroffenen Patienten mit NB Stadium 4 und *MYCN*-Amplifikation sowie der betroffene Patient mit Osteosarkom waren bereits verstorben, die beiden betroffenen Patienten mit Medulloblastom waren ebenfalls entweder verstorbenen oder litten an einer progredienten Erkrankung, so dass auch hier eine Korrelation der Genregulation mit der Aggressivität des Tumors nahe lag.

IV.6 Intrazelluläre Lokalisation und Gewebeverteilung der HuD-Varianten

Die Identifikation des HuD4NES (vgl. Kapitel IV.2.1.1 und **Abb. 9**) gab Anlass zu der Vermutung, dass dieses Hu-Antigen, im Gegensatz zur bekannten, vornehmlich nukleär lokalisierten Hu-Reaktivität in humanem neuroektodermalen Gewebe, möglicherweise vor allem im Zytoplasma lokalisiert sein könnte.

Um diese Hypothese zu prüfen, sollte zunächst die intrazelluläre Lokalisation von Hu- bzw. HuD-Antigenen im humanen, neuroektodermalen Zellkulturmodell studiert werden (vgl. Kapitel IV.6.2). Falls sich eine zytoplasmatische Lokalisation des HuD4-Antigens nachweisen lies, sollte zum Einen die Rolle des HuD4NES mit Hilfe von Deletionsmutanten in Transfektionsexperimenten untersucht (vgl. Kapitel IV.6.3), und zum anderen die Verteilung der Hu-Antigene in verschiedenen NB-Geweben und nicht-maligne transformiertem, humanem neuroektodermalem Gewebe untersucht werden (vgl. Kapitel IV.6.6).

Eine Voraussetzung für den Nachweis von Hu-Protein war die Verfügbarkeit geeigneter AK. Da Hu-Protein-spezifische AK anfangs noch nicht kommerziell erhältlich waren, wurde freundlicherweise von Frau Dr. Elisabeth Kremmer (Institut für Immunologie, GSF, München) in Kooperation mit der eigenen Arbeitsgruppe unter Einsatz von rekombinantem, humanem HuD1 ein anti-Hu-mAK generiert (Hu-3C11). Eine Spezifitätsanalyse mit Hilfe rekombinant exprimierter Hu-Proteine identifizierte diesen anti-Hu-AK als Pan-Hu-Marker (vgl. Kapitel IV.6.1). Für spätere Untersuchungen stand außerdem ein kommerziell erhältlicher, HuD-spezifischer mAK zur Verfügung (16C12).

IV.6.1 Spezifitätsanalyse der eingesetzten anti-Hu-Antikörper

Um die Spezifität der anti-Hu-mAK in Western-Blot-Analysen untersuchen zu können, wurden vier exemplarische Vertreter der Hu-Familie rekombinant in XL1-Bakterien exprimiert und aufgereinigt. Die CDS von HuR/HuA (NM_001419.2) und HuB/Hel-N1 (BC030692.1) wurde mittels RT-PCR aus der Zelllinie SH-SY5Y amplifiziert. Die CDS von HuD1 (AY033997.1) und HuC/Ple-21 (AY034002.1) wurde von den „pBluescript® SK“-Plasmiden pMu-Neu18/7.2 und pMu-Neu18/168.1 gewonnen. Die Klonierung erfolgte wie oben beschrieben in die prokaryonten Vektoren für die bakterielle Expression. (vgl. Kapitel III.15).

Die Proteine wurden in *E. coli*-Bakterien des Stammes XL-1 exprimiert, über Ni-NTA-*beads* aufgereinigt und anschließend gegen PBS-Puffer dialysiert. Die vier Proteine der Hu-Familie wurden zur Vorbereitung der Western-Blots mit einem 10%igen SDS-Page-Gel der Größe nach aufgetrennt. Wegen ihrer Expression als Fusionsprotein waren alle rekombinanten Proteine etwas größer als der jeweilige Wildtyp. Die Western-Blots wurden mit dem eigenen mAK Hu-3C11 und mit dem kommerziell erworbenen mAK 16C12 durchgeführt. Als Kontrolle für die geladene Proteinmenge wurde analog ein Western-Blot mit anti-*tag*-AK inkubiert. In **Abb. 20** ist zu sehen, dass der eigene anti-Hu-mAK Hu-3C11 alle vier Proteine der Hu-Familie erkannte. Im Gegensatz hierzu war der kommerziell erworbene mAK 16C12 HuD-spezifisch.

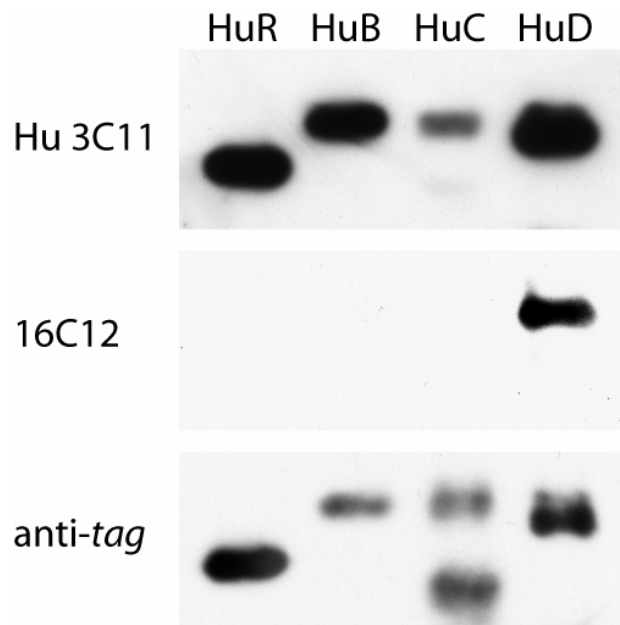


Abb. 20: Der anti-Hu-mAK Hu-3C11 detektiert alle Proteine der Hu-Familie, der mAK 16C12 nur HuD: Alle drei Western-Blot-Hybridisierungen wurden mit über His-*tag* aufgereinigten Proteinen der Hu-Familie durchgeführt (HuR, HuB, HuC und HuD1). Oben ist die Hybridisierung mit dem eigenen mAK Hu-3C11 gezeigt, der alle vier Hu Proteine erkennt. In der Mitte findet sich die Hybridisierung mit dem mAK 16C12, der HuD-spezifisch war. Unten sieht man die Kontrollhybridisierung mit dem jeweiligen anti-*tag*-mAK. Stellvertretend für die HuD-Varianten wurde hier rekombinantes HuD1 aufgetragen.

IV.6.2 Intrazelluläre Lokalisation von Hu-Proteinen im Zellkulturmodell

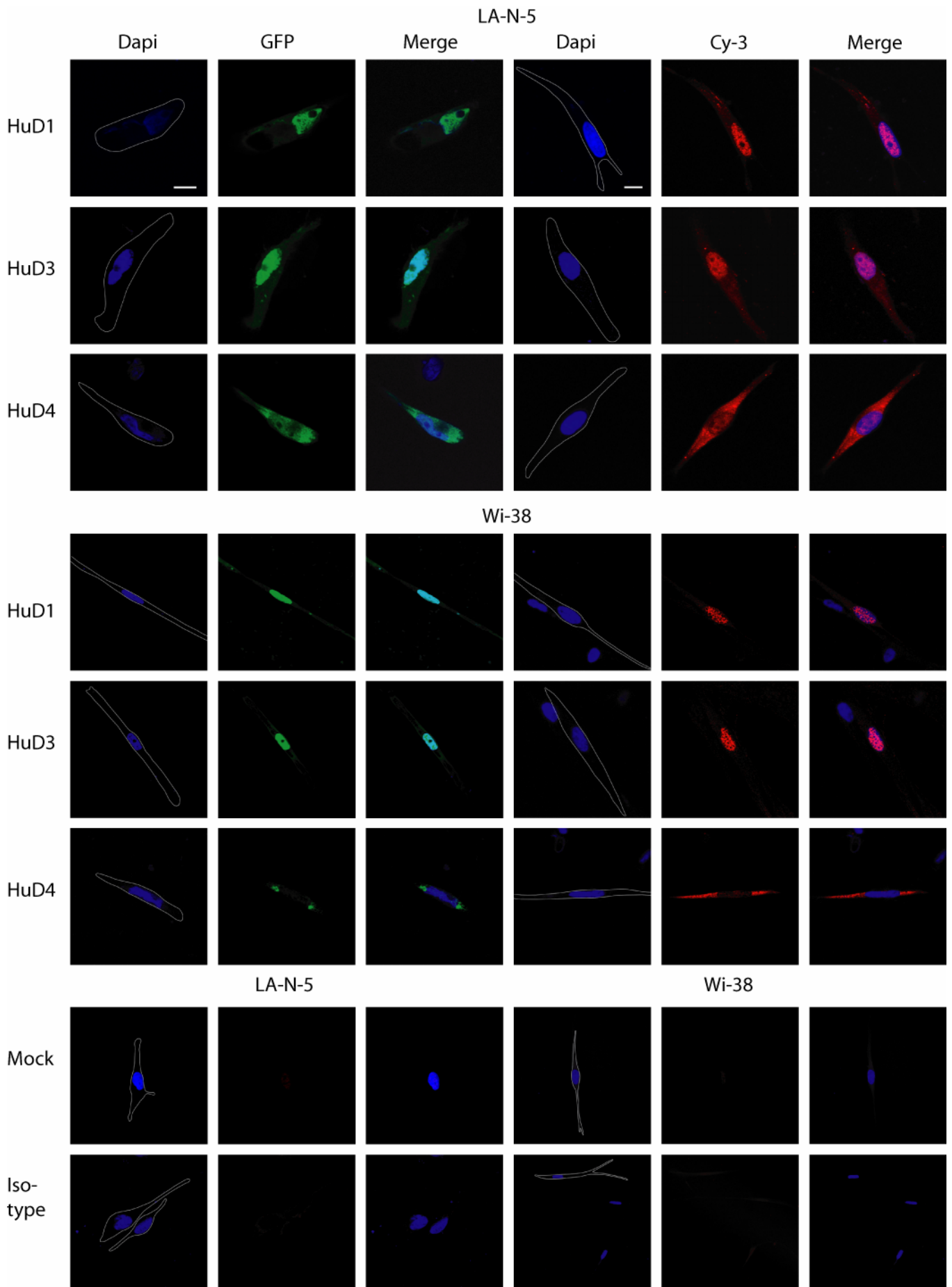
Zunächst sollte die Verteilung endogener Hu- bzw. HuD-Antigene im Zellkulturmodell studiert werden. Zu diesem Zweck wurden die drei NB-Zelllinien LA-N-5, SiMa und SH-SY5Y eingesetzt.

Mit dem HuD-spezifischen mAK 16C12 konnte in keiner der drei NB-Zelllinien eine endogene HuD-Expression nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Der fehlende Nachweis von HuD-Antigen in LA-N-5 war angesichts der fehlenden HuD-Transkripte (vgl. Kapitel III.13) nicht überraschend. Der fehlende Nachweis von HuD-Antigen in den HuD-mRNS-positiven Zelllinien SH-SY5Y und SiMa (vgl. Kapitel III.13) konnte entweder auf einer zu geringen Sensitivität des Detektionsverfahrens oder auf einer posttranskriptionellen Kontrolle der HuD-Expression beruhen. Eine Untersuchung der intrazellulären Verteilung endogener HuD-Antigene war jedenfalls mit diesem Ansatz nicht möglich.

Unter Verwendung des Pan-Hu-Markers Hu-3C11 ergab sich bei langer Belichtungszeit in allen Zelllinien eine dezente, nukleäre Färbung (nicht gezeigt), bei kürzerer Belichtungszeit war sie nicht zu erkennen (**Abb. 21**). Da sich die nukleären Signale in den HuD-mRNS-positiven NB-Zelllinien nicht wesentlich von denen in der HuD-mRNS-negativen Zelllinie LA-N-5 unterschieden, war es naheliegend anzunehmen, dass der nukleäre Hintergrund der Hu-Färbung vor allem durch andere, prominente Mitglieder der Hu-Familie wie z. B. HuR generiert wurde. Bezüglich HuD war demnach auch hier ein Sensitivitätsproblem oder alternativ eine posttranskriptionelle Kontrolle der endogenen Expression anzunehmen.

Um die intrazelluläre Verteilung der Antigene HuD1, HuD3 und HuD4 dennoch im Zellkultur-Modell darzustellen und die mögliche Rolle des HuD4NES untersuchen zu können, wurden transiente Transfektionsexperimente konzipiert (**Abb. 21**). Eingesetzt wurden die beiden gut transfizierbaren NB-Zelllinien SiMa und LA-N-5 sowie zusätzlich eine nicht-neuroektodermale Zelllinie (Wi38). In allen drei Zelllinien wurden zwei verschiedene Ansätze zur Darstellung von rekombinant exprimiertem Hu-Antigen untersucht.

Abb. 21: Intrazelluläre Verteilung der rekombinanten HuD- und HuD-GFP-Fusionsproteine in LA-N-5 und Wi-38 Zellen: Die durch Konfokalmikroskopie abgebildeten Zellen wurden zur Darstellung der fluoreszierenden HuD-GFP-Fusionsproteine im GFP-Kanal (GFP) und zur Darstellung der unfusionierten AK-gefärbten HuD-Proteine im Cy3-Kanal (Cy3) abgebildet. Die Zellkerndarstellung durch DAPI-Färbung wurde durch eine artifizielle Betonung der äußeren Zellmembran ergänzt (DAPI). In einem Mischbild (Merge) wurden die jeweils links davon gelegenen Bilder überlagert. Sowohl in den LA-N-5-Zellen (oberer Bildabschnitt) als auch in den Wi-38-Zellen (mittlerer Bildabschnitt) wurden HuD1 und HuD3 überwiegend im Kern, HuD4 überwiegend im Zytoplasma detektiert. Die unteren zwei Zeilen zeigen Kontrollexperimente mit einem nicht-relevanten, nicht GFP-exprimierenden Plasmid (Mock) bzw. einem nicht relevanten AK (Isotype). Der Größenmarker entspricht 10 µm.



Zum einen wurden die HuD-Varianten als GFP-Fusionsproteine exprimiert und die Verteilung mit einem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Dieser Ansatz wurde wegen der hohen Sensitivität des fluoreszenzmikroskopischen GFP-Nachweises gewählt. Beim zweiten Ansatz wurden die HuD-Proteine ohne Fusionspartner exprimiert und immunzytologisch nachgewiesen, wodurch ein Einfluss des GFP auf die intrazelluläre Lokalisation ausgeschlossen werden konnte. Der verwendete eukaryote Expressionsvektor und der Klonierungsweg finden sich in Kapitel III.15 beschrieben (vgl. Kapitel VIII).

Für die mikroskopische Analyse der Transfektionsergebnisse wurden die transfizierten Zellen auf PolysineTM Objektträgern angezchtet, mit PFA fixiert und mit Triton X-100 für die Kernanfärbung mit DAPI permeabilisiert. Die Autofluoreszenz des GFP konnte direkt analysiert werden, für die immunzytologischen Analysen wurden die Zellen mit dem anti-Hu-AK Hu-3C11 und einem CyTM3-gekoppelten Sekundär-AK inkubiert. Der Pan-Hu-Marker wurde wegen seiner einfacheren Verfügbarkeit gewählt. Bei kurzer Belichtungszeit war der dezente nukleäre Hintergrund durch die Anfärbung endogener Hu-Antigene zu vernachlässigen. Bei der konfokalmikroskopischen Untersuchung (**Abb. 21**) war zu erkennen, dass HuD1 und HuD3 sowie die HuD1- und HuD3-GFP-Fusionsproteine hauptsächlich im Zellkern lokalisiert waren, während das mit dem NES ausgestattete HuD4 hauptsächlich im Zytoplasma detektiert wurde.

Diese Untersuchungen lieferten die erste Evidenz dafür, dass die Verteilung der humanen HuD-Antigene abhängig vom Vorhandensein eines NES entweder überwiegend im Zellkern oder Zytoplasma lokalisiert war. Dies wies auf eine wichtige biologische Funktion des HuD4NES. Da sich die Ergebnisse für die nicht-transformierten humanen Lungenfibroblasten Wi-38 nicht von denen für die beiden NB-Zelllinien vom neuroblastischen (SH-SY5Y) und Schwannzelltyp (LA-N-5) unterschieden, war anzunehmen, dass der maligne transformierte Charakter der Tumorzelllinien ebenso wenig wie der Typ des Ursprungsgewebes einen Einfluss auf die Verteilung der rekombinanten HuD-Varianten genommen hatte.

Das Konfokalmikroskop wurde wegen der hohen Auflösung und der Möglichkeit zur schichtweisen Detail-Analyse bei den initialen Untersuchungen herangezogen. Für die späteren Untersuchungen, welche lediglich zwischen intra- und extranukleärer Verteilung unterscheiden sollten, war die konventionelle Mikroskopie ausreichend.

IV.6.3 Funktionelle Analyse des HuD4NES mit HuD-Deletionsmutanten

Um die Rolle des NES (AS 3-11) von HuD4 für den Export des Proteins in das Zytoplasma zu belegen, wurde diese Region des Proteins in zusätzlichen Experimenten entfernt bzw. in primär nukleär lokalisierte, rekombinante Proteine eingefügt. Zudem wurde die mögliche Dominanz des NES über eine bekannte NLS getestet.

Die in diesen Untersuchungen rekombinant exprimierten Proteine sind in **Abb. 22** dargestellt (vgl. Kapitel VIII). Zunächst wurden Deletionskonstrukte der Plasmide pCMV-HuD4 und pCMV-HuD4-GFP exprimiert (HuD4 Δ NES und HuD4 Δ NES-GFP). Sie wurden durch Restriktion der Plasmide mit den Enzymen PmlI und Bsu36I und anschließender Einklonierung eines Oligonukleotids generiert, das nur die HuD4Link-Sequenz und die passenden Schnittstellen, nicht aber das HuD4NES enthielt (vgl. Kapitel II.8 und VII). Die Deletionskonstrukte wurden dann parallel zu den Ausgangsplasmiden transient in die sehr gut transfizierbare, humane embryonale Nierenzellkarzinom-Zelllinie 293T eingebracht. Die intrazelluläre Lokalisation der rekombinanten Proteine in den transfizierten Zellen wurde wie oben beschrieben entweder direkt (GFP-Nachweis) oder nach AK-Färbung (Pan-Hu-Marker) mit Hilfe der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie untersucht (**Abb. 23**).

HuD4 und das HuD4-GFP-Fusionsprodukt waren, wie oben mit Hilfe der Konfokalmikroskopie bereits beschrieben, hauptsächlich im Zytoplasma gelegen, während sich das Deletionsprodukt HuD4 Δ NES und das entsprechende HuD4 Δ NES-GFP-Fusionsprotein eindeutig im Zellkern fanden. Diese Experimente untermauerten die biologische Funktionalität des HuD4NES.

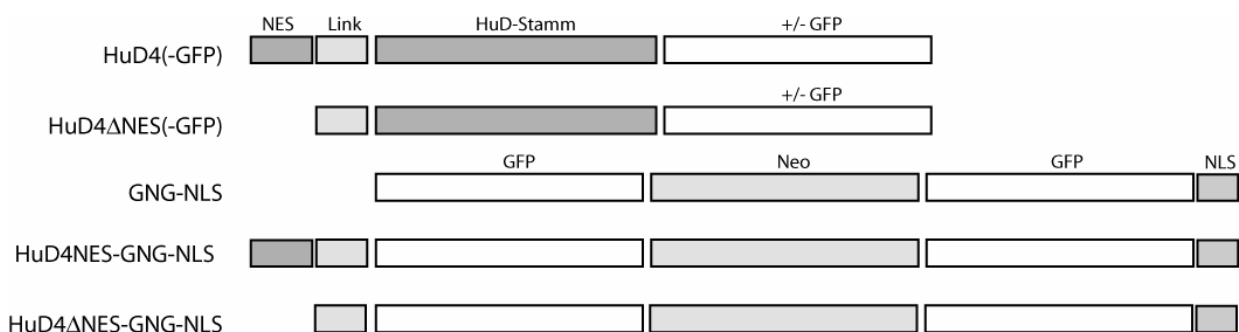


Abb. 22: Rekombinante Proteine für die funktionellen Analyse des HuD4NES: Dargestellt sind die Produkte der transfizierten pCMV-Konstrukte. HuD4(-GFP) ist das unveränderte Protein mit bzw. ohne GFP. Bei HuD4 Δ NES(-GFP) wurde die HuD4NES Sequenz entfernt. GNG-NLS besteht aus zwei GFP-Proteinen verbunden durch das *neo*^R Gen (GNG) und dem carboxyterminal fusionierten NLS von SV40. An dieses Konstrukt wurde aminoterminal das HuD4 spezifische Ende (NES+Link) fusioniert (HuD4NES-GNG-NLS). Bei dem Konstrukt HuD4 Δ NES-GNG-NLS wurde analog zu HuD4 Δ NES die HuD4NES Sequenz entfernt, wobei die originale Restsequenz (Link) des aminoterminalen HuD4-Abschnitts erhalten blieb. Nicht gezeigt ist das Kontrollprotein RevNES-GNG-NLS.

IV.6.4 Funktionelle Analyse des HuD4NES mit GNG-NLS-Konstrukten

Die in der Literatur angegebenen, etwa zehn AS-langen Konsensussequenzen von leucinreichen NES sind sehr variabel, jedoch findet sich typischerweise eine Region mit einer durchgehenden oder unterbrochenen Wiederholung von Leucinen (la Cour *et al.* 2004). Um die Bedeutung der vier Leucine im HuD4NES zu untersuchen, wurden sie in zusätzlichen Experimenten durch vier Glycine ersetzt. Hierfür wurde analog der Konstruktion des HuD4 Δ NES(-GFP) nach enzymatischer Spaltung der Plasmide ein Oligonukleotid einkloniert, bei dem in diesem Falle die vier Leucine durch vier Glycine ersetzt wurden. Diese Mutation der HuD4NES unterband den Export des rekombinanten HuD4-Proteins in fast demselben Ausmaß wie die Deletion der kompletten, neun AS-langen NES-Sequenz (Daten nicht gezeigt). Dieses Experiment untermauerte die Kernexport-Funktion des HuD4NES und belegte gleichzeitig eine essentielle Funktion der vier Leucine.

Mit den bisherigen Experimenten konnte nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass der Export von HuD4 auf einen indirekten Effekt zurückzuführen war, wie z. B. auf eine unspezifische Abschwächung möglicher NLS im HuD oder auf einen passiven Transfer (*shuttling*) durch eine veränderte Bindung an mRNS. Um die Wirkung des HuD4NES unabhängig vom restlichen HuD zu untersuchen, sollte die isolierte NES-Sequenz des HuD4 an ein neutrales nukleär lokalisiertes Protein gebunden werden (**Abb. 22**).

Ein neutrales, nukleär lokalisiertes Protein wurde durch das von der Arbeitsgruppe bereitgestellte Konstrukt pCMV-GNG-NLS codiert. Das große Basisprotein GNG enthielt zwei GFPs, die durch die Neomycinphosphotransferase (*neo^R*) getrennt wurden. Die Kombination dieser drei Proteine war gewählt worden, um ein Protein zu schaffen, das aufgrund seiner Größe nicht passiv aus dem Kern diffundieren kann. Die Verbindungen zwischen den drei Teilen bestanden aus Glycin-Serin Brücken, um eine ausreichende Flexibilität des Proteins zu gewährleisten. Um das Protein in den Kern zu führen, war es carboxyterminal an das NLS des „SV40 *large T*“-Antigens (PKKKRKV) (Kalderon *et al.* 1984) fusioniert worden (GNG-NLS). Aus dem Basisvektor pCMV-GNG-NLS wurden durch aminoterminaler Fusion des HuD4-spezifischen aminoterminalen Endes bzw. dessen Deletionsprodukts die Plasmide pCMV-HuD4NES-GNG-NLS und pCMV-HuD4 Δ NES-GNG-NLS konstruiert. Dies wurde durch Schneiden des Basisvektors mit den Enzymen PmlI und AgeI und Einklonierung des entsprechenden Oligonukleotids bewerkstelligt (Vgl. Kapitel II.8, III.15 und VIII).

Diese drei Konstrukte wurden parallel zu dem ebenfalls bereitgestellten Kontrollkonstrukt pCMV-RevNES-GNG-NLS in 293T-Zellen transfiziert. Mit Hilfe des Kontrollproteins RevNES-GNG-NLS sollte untersucht werden, ob sich die vorhandene NLS durch ein

etabliertes, starkes NES antagonisieren lies. Aminoterminal fand sich daher in diesem Protein an stelle des HuD4NES das NES des HIV-1-Proteins Rev (RevNES) (LPPLERLTL) (Fischer *et al.* 1995; Meyer *et al.* 1996).

Alle vier GNG-NLS-Konstrukte wurden in 293T-Zellen transfiziert, und die Lokalisation der rekombinanten Proteine durch Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Dabei zeigte sich, dass das Basisprotein GNG-NLS erwartungsgemäß im Kern lokalisiert war (**Abb. 23**). Demgegenüber konnte das starke RevNES des HIV-1 tatsächlich einen Export in das Zytoplasma herbeiführen (Daten nicht gezeigt). Bemerkenswerterweise war auch nach Ersatz der RevNES durch das HuD4NES mitsamt der HuD4Link-Sequenz eine zytoplasmatische Lokalisation zu beobachten (**Abb. 22**), wenn auch zu einem etwas geringeren Anteil als im Falle des RevNES-Proteins (Daten nicht gezeigt). Wurde die HuD4NES-Sequenz wieder aus dem Protein entfernt, so dass nur noch die HuD4Link-Sequenz zurückblieb, fand sich das Protein wie erwartet wieder im Kern (HuD4 Δ NES-GNG-NLS).

Zusammenfassend belegten diese Untersuchungen eine Dominanz des HuD4NES über starke Kernlokalisierungssignale und damit eine hohe biologische Potenz.

IV.6.5 Inhibition des Kernexports mit Leptomycin-B

Der Export von leucinreichen NES ist in der Regel CRM1 vermittelt und kann durch LMB inhibiert werden (Kutay und Guttinger 2005). Es gibt jedoch Evidenzen dafür, dass CRM1 nicht der einzige Exportrezeptor für leucinreiche NES sein könnte. Hinweise darauf liefert das zytoplasmatische Protein „Proteinkinase-Inhibitor“, das eine leucinreiche NES enthält und über Calreticulin exportiert wird, ohne dass sich dieser Vorgang durch LMB inhibieren lässt (Holaska *et al.* 2001). Um zu bestätigen, dass der HuD4NES-vermittelte Export CRM1-abhängig ist, wurde die Inhibierbarkeit des Exports durch LMB getestet.

Zu diesem Zweck wurden 293T Zellen mit den Plasmiden pCMV-HuD4 bzw. pCMV-HuD4NES-GNG-NLS transfiziert, und die Proteine für 48 h exprimiert. Nach einer Inkubation der transfizierten Zellen mit LMB in einer Konzentration von 2 ng/ml für 30 min wurde eine Abnahme der zytoplasmatischen Lokalisation beider Proteine beobachtet. Die nukleäre Lokalisation erreichte nach LMB-Behandlung über 2 h ihr Maximum (**Abb. 24**). Dies bestätigte, dass der NES-vermittelte Export von HuD4 über CRM1 vermittelt wurde.

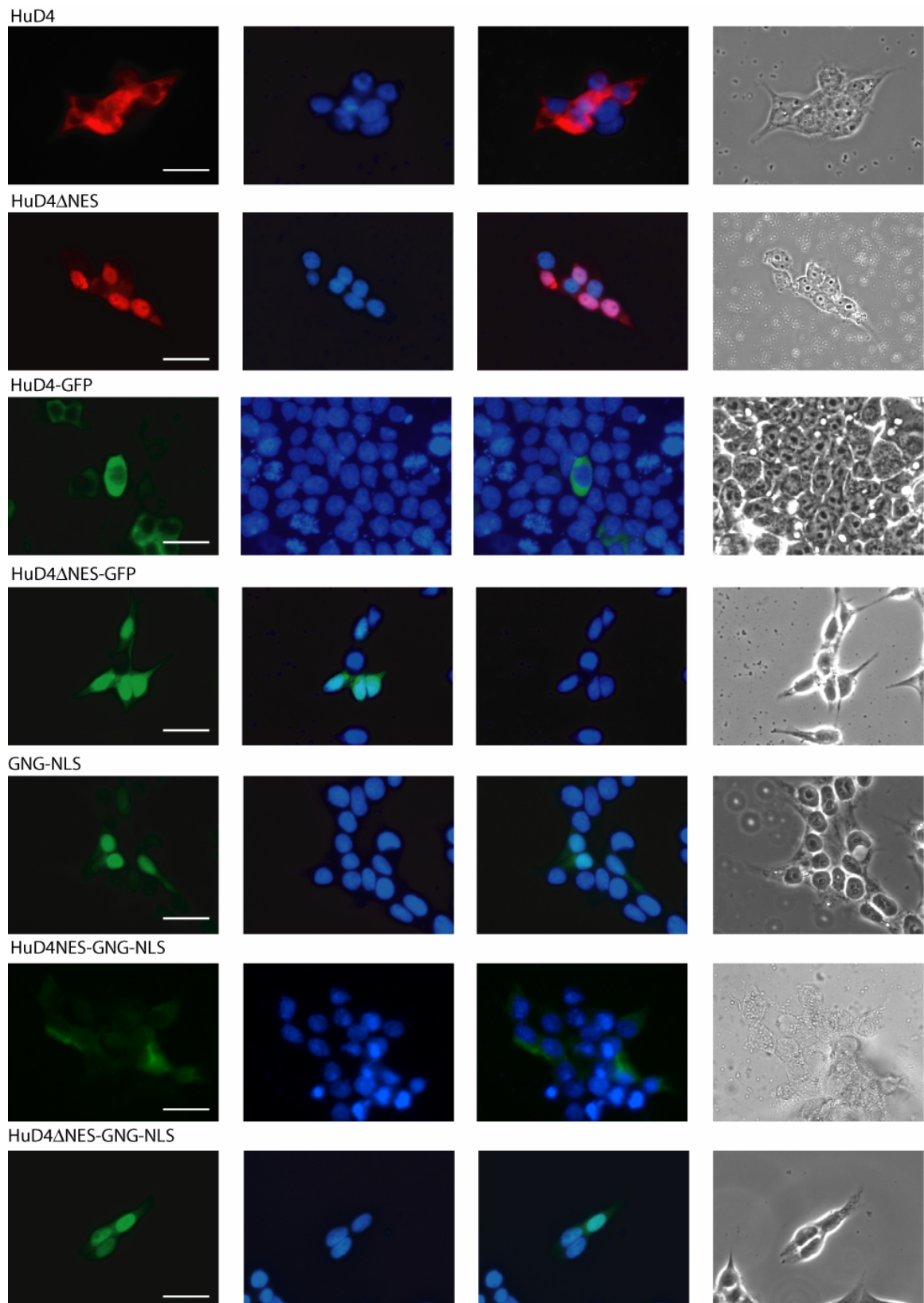


Abb. 23: Das NES in HuD4 vermittelt den nukleären Export rekombinanter Proteine: Jede Zeile zeigt das Ergebnis der Transfektionsexperimente für das genannte rekombinante Protein. Alle HuD4NES-haltigen Proteine sind zytoplasmatisch, die Proteine ohne HuD4NES (HuD4ΔNES) nukleär lokalisiert. Das große Protein GNG-NLS wurde durch das SV40-NLS in den Kern geführt, und durch Einbau von HuD4NES ins Zytoplasma exportiert. Der weiße Balken entspricht 25 μ m.

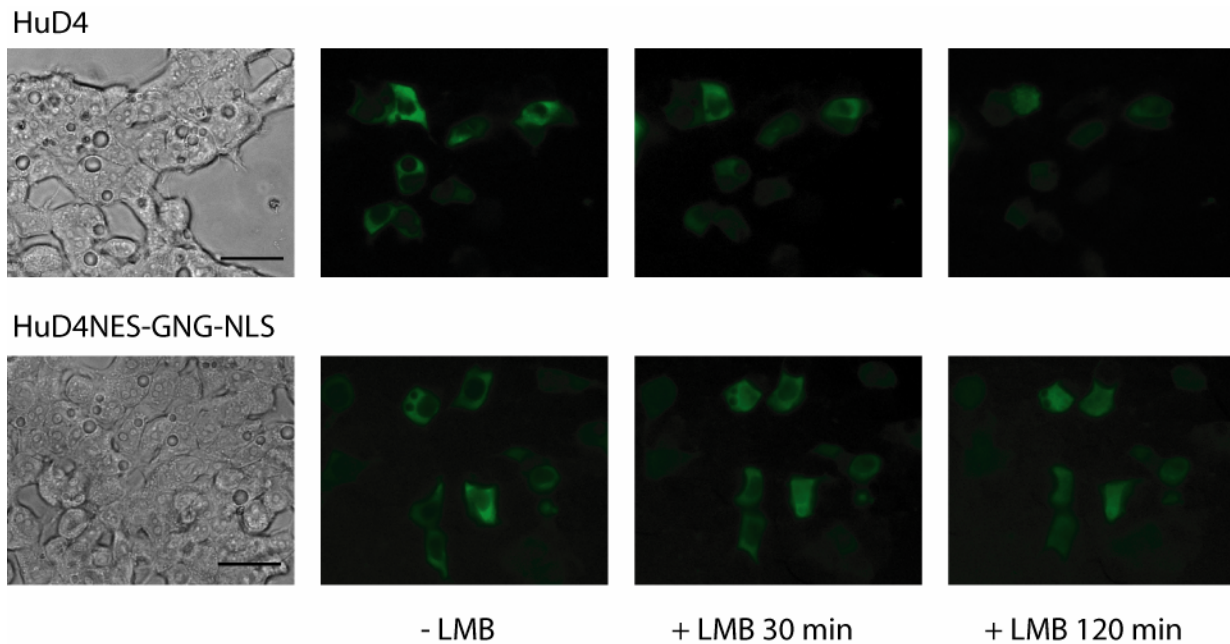


Abb. 24: Der HuD4NES-vermittelte Export kann durch Leptomycin-B inhibiert werden: Nach Zugabe von LMB (2 ng/ml) konnte ein Import von HuD4 sowie von HuD4NES-GNG-NLS in den Kern beobachtet werden. Dargestellt ist der Status vor LMB-Zugabe, der Beginn des Imports nach 30 min und der maximale Import nach 2 h. Der Größenmarker entspricht 25 μ m.

IV.6.6 Immunhistologie

Durch Analysen humaner Gewebsschnitte sollte untersucht werden, ob sich auch *in vivo* nukleär und zytoplasmatisch lokalisiertes HuD-Antigen nachweisen ließ, und ob sich auf Proteinebene ein Korrelat für die mittels RT-PCR beobachtete Herunterregulierung von HuD1 in aggressiven Tumoren fand (vgl. Kapitel IV.5).

Alle publizierten *in vivo* Analysen zur Expression von endogenem, humanem Hu-Antigen waren in Ermangelung eines HuD-spezifischen mAK bislang entweder mit Pan-Hu-Markern (Dalmau *et al.* 1992) oder mit AK durchgeführt worden, die alle drei neuronalen Hu-Antigenfamilien, erkannten (HuD, HuC/Ple-21 und HuB/Hel-N1) (Gultekin *et al.* 2000). Da die verfügbaren mRNS-Daten dafür sprachen, dass in neurektodermalen Geweben prinzipiell alle Hu-Antigene vorkommen können, lieferten die verfügbaren Proteindaten keine spezifischen Informationen zur humanen, endogenen HuD-Expression *in vivo*.

Für die Fragestellung der eigenen Arbeit wurde demnach ein HuD-spezifischer AK benötigt. Der eigens generierte mAK Hu-3C11 war leider nicht für die histologischen Analysen geeignet, da neben HuD auch andere Hu-Antigene erkannte (vgl. Kapitel IV.6.1). Erfreulicherweise wurde jedoch vor kurzem der mAK 16C12 kommerziell erhältliche, welcher nachweislich alle HuD-Varianten, jedoch nicht HuB, HuC und HuR erkannte (vgl. Kapitel IV.6.1).

Die ungefärbten histologischen Schnitte von gesundem Frontalhirn und Ganglio-NB- bzw. NB-Gewebe wurden freundlicherweise von Herrn Prof. H. A. Kretzschmar (Institut für Neuropathologie der LMU, München) und Dr. F. Prantl (Institut für Pathologie, Städtisches Krankenhaus Schwabing, München) zur Verfügung gestellt, und die eigenen Färbeergebnisse zusammen mit dem in der pädiatrischen Tumordiagnostik langjährig erfahrenen Ltd. Oberarzt der lokal zuständigen, pathologischen Einrichtung (Dr. F. Prantl) beurteilt. Das als Vertreter neuroektodermaler Normalgewebe gewählte Frontalhirn wurde gewählt, da es nachweislich Transkripte aller vier HuD-Varianten (HuD1-4) exprimiert (vgl. Kapitel IV.5).

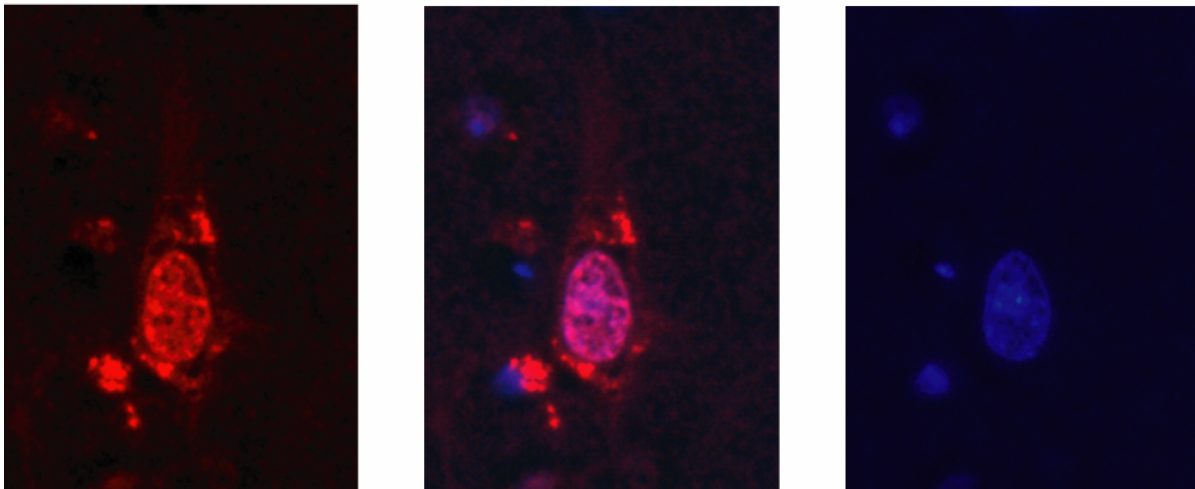
In den Schnitten von gesundem Frontalhirn fanden sich die HuD-Proteine hauptsächlich nukleär lokalisiert mit einem geringen, teils granulären zytoplasmatischen Anteil (**Abb. 25**). Dabei zeigten Pyramidenzellen die stärkste Anfärbung, während Gliazellen vom HuD-spezifischen AK nicht angefärbt wurden. Dieses Verteilungsmuster war ähnlich dem, das in gesundem Großhirn von anderen Autoren mit nicht-HuD-spezifischen anti-Hu-AK beschrieben worden war (Altermatt *et al.* 1991; Kiers *et al.* 1991; Darnell und Posner 2003). Zusammenfassend wiesen die fremden und eigenen Beobachtungen darauf hin, dass nukleär lokalisierte Hu-Antigene einschließlich HuD den histologischen Aspekt im Großhirn wesentlich prägen.

Die untersuchten Tumorproben stammten von zwei individuellen Ganglio-NB (Stadium 1, Hughes Grad I), einem NB Stadium 3 (Hughes Grad III mit MYCN-Amplifikation) und einem NB Stadium 4 (Hughes Grad II mit MYCN-Amplifikation). In den großen, reifen Ganglienzellen der beiden Ganglio-NB fand sich eine ungefähr gleichmäßige Verteilung der HuD-Proteine in Kern und Zytoplasma mit eher diffuser Verteilung im Zytoplasma, während die kleinen, unreifen Tumorzellen der beiden fortgeschrittenen NB eine relativ homogene, überwiegend zytoplasmatische Anfärbung mit Kernaussparung aufwiesen (**Abb. 25**).

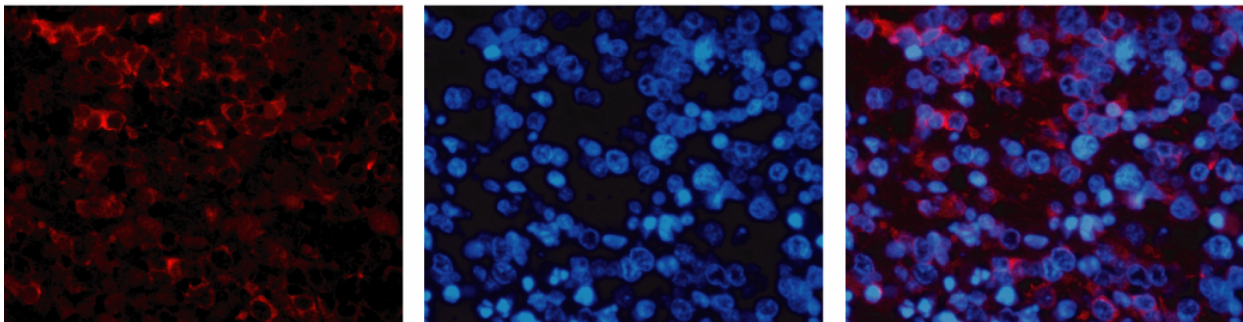
Die dargestellten Befunde sprachen insgesamt für eine mögliche Herunterregulation des nukleären und Hochregulation des zytoplasmatischen HuD im Kontext der Dedifferenzierung. Für eines der zwei Ganglio-NB und für das NB Stadium 3 lagen mRNA-Daten vor. In beiden Geweben konnte HuD1-, HuD3- sowie HuD4-mRNA nachgewiesen werden, was für eine mögliche, zusätzliche posttranskriptionelle Herunterregulation der nukleären HuD-Antigene in aggressiven Tumoren sprach.

Bei beiden Patienten mit bekanntem mRNA-Status waren auch serologische Analysen durchgeführt worden, in denen keine anti-Hu-AK nachgewiesen werden konnten. Leider standen von der initial mit SEREX untersuchten Patientin 018 keine Tumorgewebeschnitte für die immunhistologische Untersuchung zur Verfügung.

Großhirn



Neuroblastom



Ganglioneuroblastom

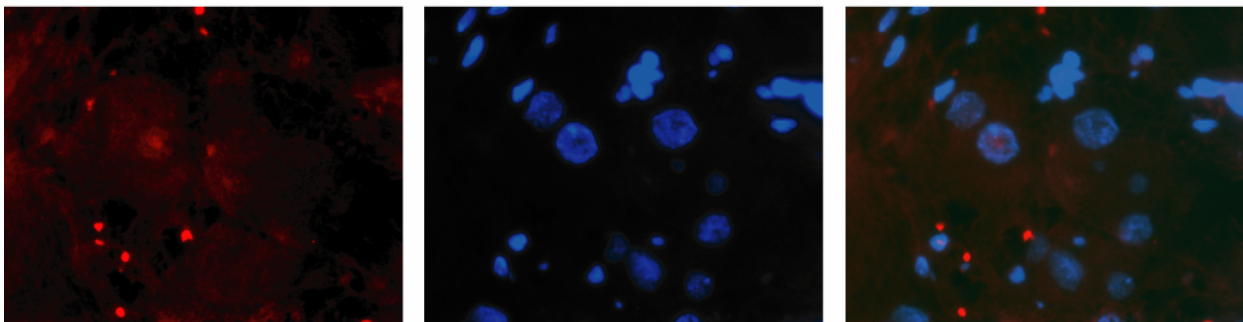


Abb. 25: Immunhistologische Analyse der HuD-Expression in Frontalhirn, Neuroblastom- und Ganglioneuroblastomgewebe: Exemplarische Befunde für normales frontales Großhirn, für die aggressiven NB (hier Stadium 3, Hughes Grad III, *MYCN*+) und die gutartigen Ganglio-NB (Stadium 1, Hughes Grad I) wurden mit dem AK 16C12 (links) und DAPI (Mitte) gefärbt, und die Färbungen einzeln oder überlagert (rechts) dargestellt. Im Gewebe des Frontalhirns zeigte sich eine überwiegend nukleäre Anfärbung der großen Pyramidenzellen mit einem geringen zytoplasmatischen Anteil, während die Gliazellen ungefärbt blieben. Im Gegensatz dazu war die nukleäre Komponente in den kleinen, unreifen Tumorzellen des gezeigten NB-Gewebes fast vollständig verschwunden und es dominierte die zytoplasmatische Anfärbung. Im abgebildeten Ganglio-NB zeigten die überwiegenden, großen, differenzierten Ganglienzellen eine in etwa gleichmäßige Verteilung der Hu-Antigene in Kern und Zytoplasma.

V **Diskussion**

In der vorliegenden Arbeit wurde die antitumorale Immunantwort einer vierjährigen Patientin mit NB untersucht. Mithilfe von SEREX konnten zehn verschiedene Antigene des Tumors identifiziert werden. Vier waren im klonierten Bereich identisch mit den bekannten Proteinen HuD, HuDpro, Hsp90 α und α -NAC; sechs waren neue Produkte des *HuD*-, *HuC*-, *NNP1*- und *NF66*/ α -*internexin*-Gens. In einer neuen HuD-Variante konnte ein funktionelles NES lokalisiert werden. Serologische und mRNA-Analysen sowie im Falle des HuD Untersuchungen der Proteinexpression gaben neue Einblicke in die klinische und tumorbiologische Bedeutung der Antigene. Ein Teil der Ergebnisse wurde bereits publiziert (Behrends *et al.* 2002), ein weiterer Teil zur Publikation eingereicht (Jandl *et al.*).

V.1 Die neuen Tumorantigene der Hu-Proteinfamilie

Die RNS-bindenden Hu-Proteine sind an der neuronalen Differenzierung beteiligt

Hu-Proteine zeigen eine hohe Homologie zu den RBP Sex-lethal und ELAV von *Drosophila melanogaster* und weisen wie diese typische RRM auf. RBP spielen eine entscheidende Rolle bei der Regulation der mRNA-Expression (Keene 2007; Lunde *et al.* 2007). Über die Bindung an AU-reiche Elemente (ARE) in der 3'-UTR sind Hu-Proteine für Stabilisierung, Prozessierung, nukleären Export und Translation zahlreicher Transkripte verantwortlich (Saito *et al.* 2004; Deschenes-Furry *et al.* 2006). Für HuD wurde unter anderem eine Bindung an die MYCN-mRNA aufgezeigt (Ross *et al.* 1997; King 2000; Manohar *et al.* 2002).

Kürzlich fanden sich erste Evidenzen für eine zentrale Rolle neuronenspezifischer Hu-Proteine im Kontext des neuronenspezifischen mRNA-Spleißens (Zhu *et al.* 2006). Hu-Proteine spielen insgesamt eine zentrale Rolle bei der Differenzierung, Interaktion, Regeneration und Aufrechterhaltung von Neuronen (Szabo *et al.* 1991; Anderson *et al.* 2003; Yano *et al.* 2005; Darnell und Posner 2006; Deschenes-Furry *et al.* 2006; Abdelmohsen *et al.* 2007). Sie sind an Lernprozessen und neuronaler Reparatur (Quattrone *et al.* 2001; Anderson *et al.* 2003; Pascale *et al.* 2004) ebenso wie an neuronaler Differenzierung und Kontrolle der proliferativen Aktivität von Neuronen beteiligt (Akamatsu *et al.* 2005).

Eine Hochregulation neuronenspezifischer Hu-Proteine *in vitro* und *in vivo* kann durch Aktivierung der Protein-Kinase-C (PKC) erreicht werden. Nach Behandlung mit PKC-Aktivatoren fand sich im Tiermodell eine zerebrale Anreicherung von Hu-Proteinen wie sie im Kontext von Lernprozessen beschrieben worden war (Pascale *et al.* 2005). Eine Arginin-Methylierung des HuD durch die Koaktivator-assoziierte Argininmethyltransferase 1 (CARM1) scheint funktionell von Bedeutung zu sein (Fujiwara *et al.* 2006).

Die molekularen Differenzen zwischen den neuen und bekannten HuD-Varianten tangieren die RRM's nicht. Es ist allerdings anzunehmen, dass die unterschiedliche intrazelluläre Verteilung und Gewebeexpression der aminoterminalen Varianten indirekt Einfluss auf die mRNS-Regulation nehmen. Naheliegender ist eine komplementäre Funktion der Hu-Proteine in diesem Kontext. Zukünftige Experimente zur variantenspezifischen mRNS-Bindungskapazität und zum spezifischen Einfluss der einzelnen Varianten auf die Stabilität interessanter Transkripte erscheinen daher lohnenswert.

Die neuen Hu-Varianten wurden durch den Gebrauch alternativer Promotoren, alternatives Spleißen und genetische Polymorphismen generiert

Interessanterweise wurden die drei Varianten HuD1, HuD3 und HuD4 von mindestens zwei verschiedenen Promotoren abgelesen. Mit der Generation der HuD-Transkripte von unterschiedlichen Promotoren war eine unterschiedliche Gewebeverteilung gut zu vereinen.

Passend zu einem alternativen Promotorgebrauch im humanen *HuD*-Gen sind für *Xenopus laevis* zwei neuronenspezifische Transkripte aus der ELAV/Hu-Familie bekannt (ELRD1 und ELRD2), die von zwei 915 Bp voneinander getrennt liegenden Promotoren des *elrD*-Gens abgelesen werden (Nassar und Wegnez 2001). Ebenso sind in der Maus drei verschiedene, alternative 5'-Enden von HuD bekannt, gebildet von den Exons 1a, 1b, 1c mit bisher undefinierten Promotoren (Abe *et al.* 1994; Inman *et al.* 1998). Auch für HuB/Hel-N1 ist eine aminoterminal Variante bekannt, die Hel-N2 genannt wurde (King 1994).

Das Antigen HuC-L wurde als erste Spleißvariante des humanen HuC identifiziert und wies wie das murine Homolog eine Insertion von 7 AS in der Linkerregion des Proteins auf. Diese Befunde lieferten weitere Indizien für die große Bedeutung alternativen Spleißens bei der Generation der komplexen Hu-Proteinfamilie.

Der beschriebene AS-Austausch in HuDpro1c konnte durch Sequenzierung der genomischen Sequenz von Lymphozyten der Patientin 018 als genetischer Polymorphismus identifiziert, und eine tumorspezifische Mutation ausgeschlossen werden (Behrends *et al.* 2002).

Die neue Variante HuD4 enthält aminoterminal ein leucinreiches, hochpotentes Kernexport-Signal, welches die zytoplasmatische Lokalisation des Proteins vermittelt

Um nach einer möglichen Funktion des neuen, langen Aminoendes von HuD4 zu suchen, war seine AS-Sequenz unter anderem mit dem Motiv-Suchprogramm NetNES1.1 analysiert und ein klassisches, leucinreiches NES identifiziert worden. Um die biologische Aktivität und mögliche CRM1-Interaktion (Cullen 2003; Kutay und Guttinger 2005) des leucinreichen HuD4NES zu belegen, wurden transiente Transfektionsexperimente mit verschiedenen HuD4NES-haltigen

und -freien Konstrukten, sowie eine Inhibition mit LMB durchgeführt. Diese Experimente zeigten eine NES- und CRM1-abhängige, zytoplasmatische Lokalisation des HuD4 und bewiesen somit die Exportkapazität des HuD4NES. Zusätzliche Experimente mit Hilfe eines starken, heterologen NLS zeigten eine Dominanz des HuD4NES über das NLS und wiesen somit auf ein hohes Kernexport-Potential des HuD4NES hin. Letzteres war bemerkenswert, da leucinreiche NES generell als eher schwache Kernexport-Signale gelten (Ladd und Cooper 2004; Kutay und Guttinger 2005).

In den stromabwärts gelegenen humanen HuD1- bzw. HuDpro1-Sequenzen wurde mit dem NetNES1.1-Suchprogramm keine NES-typische Sequenz detektiert. Es überrascht deshalb nicht, dass die aminoterminal kürzeren, humanen Varianten HuD1, HuDpro1 und HuD3 in den eigenen Transfektionsexperimenten überwiegend im Kern zu detektieren waren. Die eigene Arbeit lieferte damit die ersten *in vitro* Evidenzen dafür, dass die klassischen HuD-Varianten (HuD1/HuDpro1) des Menschen und das neue HuD3 in humanen Zellen überwiegend nukleär und eine weitere, neue Variante (HuD4) zytoplasmatisch lokalisiert sind.

Ein murines Homolog des HuD4-Aminoterminus wurde bislang nicht identifiziert. Bis *dato* sind weder humane noch murine cDNS-Sequenzen bekannt, die dem 5'-Ende des HuD4 ähnlich sind. Die drei murinen HuD-Varianten deren alternative 5'-Enden durch die Exons 1a, 1b und 1c gebildet werden, codieren für dasselbe und zum humanen HuD1/HuDpro1 homologen Protein (Inman *et al.* 1998).

In Nagetierzellen ist endogenes und transfiziertes HuD1/HuDpro1 vor allem zytoplasmatisch lokalisiert

Die publizierten Daten zur zellulären Lokalisation von endogenem und rekombinantem HuD-Antigen beziehen sich bislang entweder auf Nager-Hu-Proteine oder auf rekombinant in Nager-Zellen exprimierte, humane Hu-Proteine. Die Hu-Proteine von Nagetieren sind den humanen zwar sehr ähnlich (Steller *et al.* 1996; Inman *et al.* 1998), aber doch unterschiedlich genug, um gegebenenfalls unterschiedliche Funktionen zu erklären.

Im Gegensatz zum humanen HuDpro1 enthält das murine Homolog im Bereich der Linkerregion einen Abschnitt mit NES-Eigenschaften (Kasashima *et al.* 1999). Kasashima und Kollegen hatten das murine HuDpro1-Homolog (AS 14-385 von NM_010488.3) in eine Ratten-Pheochromozytom-Zelllinie transfiziert und dabei, im Gegensatz zu den eigenen Beobachtungen für humanes HuDpro1, eine zytoplasmatische Lokalisation des rekombinanten Proteins festgestellt. Mittels Deletionsmutanten war eine 39-AS-lange NES-Region identifiziert worden, deren amino- und carboxyterminaler Teil die HuD-Linker- bzw. RRM3-Region

überlappte (Kasashima *et al.* 1999). Die Kernexportfunktion dieser NES-Region war nicht durch LMB blockierbar, so dass es sich wahrscheinlich um einen nicht CRM1-abhängigen Exportmechanismus handelte. Die Tatsache, dass auch andere Autoren (s. u.) Evidenzen für eine zytoplasmatische Lokalisation des Nagetier-HuD fanden, sprach gegen eine funktionelle Bedeutung der Tatsache, dass Kasahima und Kollegen die HuDpro1-CDS vmtl. aus kloniertechnischen Gründen amino- und carboxyterminal um einige AS beschnitten hatten.

Bolognani und Kollegen hatten mit Hilfe des in der eigenen Arbeit verwendeten, HuD-spezifischen mAK 16C12 erstmals HuD-spezifische histologische Untersuchungen im Tiermodell durchgeführt. Sie beschrieben die zelluläre und subzelluläre Expression des endogenen, murinen HuD anhand von Hypocampus-Schnitten und fanden eine Lokalisation in Granula von Zytoplasma und Dendriten von Pyramidenzellen (Bolognani *et al.* 2004). In späteren Experimenten generierte diese Arbeitsgruppe transgene Mäuse, die humanes HuD überexprimierten. In diesen Experimenten zeigte sich auch für das rekombinante, durch einen *tag* vom endogenen murinen HuD differenzierbare, humane HuD eine zytoplasmatische Lokalisation (Bolognani *et al.* 2006). Ob eine HuD1- oder HuDpro1-Sequenz exprimiert wurde, geht nicht eindeutig aus den Angaben der Autoren hervor. Die eigenen Transfektionen von HuD1 und HuDpro1 sprechen jedoch gegen einen Einfluss der ‚pro‘-Sequenz auf die die zelluläre Verteilung von HuD-Proteinen (s. o.).

Es ist also prinzipiell nicht nur ein Einfluss von endogenem HuD-NES, sondern auch ein Einfluss der zellulären Homöostase auf die subzelluläre Lokalisation von HuD-Proteinen zu diskutieren. Die Untersuchungen belegten, dass das klassische, humane HuD1/HuDpro1 unter bestimmten Umständen auch ins Zytoplasma exportiert werden kann.

Saito und Kollegen berichteten über eine Kolo-kalisation von transfiziertem murinen HuD mit dem kotransfizierten, humanen Kernexportmolekül TAP/NXF1 im Zytoplasma von Ratten-Zellen und demonstrierten eine Bindung von rekombinantem HuD und TAP *in vitro*. Sie schlossen daraus auf eine entscheidende Rolle von TAP im Kernexport des murinen HuD (Inman *et al.* 1998). Es muss allerdings kritisch angemerkt werden, dass keine Versuche mit einem TAP-Inhibitor durchgeführt worden waren.

Von Pascale und Kollegen war eine nukleäre Lokalisation von Hu-Antigen im *plexus myentericus* des Ratten-Dünndarms demonstriert worden. Sie verwendeten einen AK, der HuD und HuC erkannte, so dass nicht zwischen diesen Proteinen differenziert werden konnte (Pascale *et al.* 2005). In der Zusammenschau aller anderen Daten zur HuD-Expression bei Menschen und Nagetieren ist es nicht unwahrscheinlich, dass hier vor allem HuC detektiert worden war.

Ratti und Kollegen detektierten im Rattengehirn nukleär sowie zytoplasmatisch lokalisiertes, neuronenspezifisches Hu-Antigen, konnten aber bei Verwendung des AK 16A11 (HuD-, HuB- und HuC-spezifisch) wiederum keine spezifischen Rückschlüsse auf die Verteilung von HuD-Antigen ziehen.

Zusammenfassend liegen diese Befunde nahe, dass die zelluläre Verteilung der murinen und humanen HuD-Varianten möglicherweise unterschiedlich ist oder sogar in verschiedenen Tiermodellen variiert, so dass Evidenzen aus einem spezifischen Tiermodell nicht unmittelbar auf die humane Situation übertragen werden können. Zukünftige Experimente sollten klären, ob TAP auch mit humanem HuD interagiert, und ob die eigenen HuD1-, HuDpro1- und HuD3-Konstrukte in Nagerzellen ebenfalls zytoplasmatisch exprimiert werden. Letzteres würde den Einfluss des zellulären Milieus eindrucksvoll belegen.

Die intrazelluläre Homöostase kann die intrazelluläre Verteilung der Hu-Proteine wahrscheinlich modulieren

Für andere RBP als HuD ist bereits belegt, dass die intrazelluläre Lokalisation nicht nur von der molekularen Proteinstruktur, sondern darüber hinaus von der intrazellulären Homeostase abhing. Beispielsweise wurde im primär nukleär lokalisierten humanen HuR die so genannte „HuR nuclear shuttling sequence“ (HNS) beschrieben, und gezeigt, dass deren NLS-Aktivität von der Aktivität der DNA-Polymerase II abhing (Fan und Steitz 1998). Fan und Steitz postulierten, dass der HuR-abhängige Transport somit an die Transkriptionsaktivität der Zelle gekoppelt war. Weiterhin wurde in einem Hu-ähnlichen, primär nukleär lokalisierten RBP des Huhns (*nuclear ELAV type RNS binding protein*, ETR-3) ein CRM1-abhängiges NES im Bereich der Linkerregion beschreiben, das unter regulären Bedingungen von zwei stromabwärts gelegenen NLS desselben Moleküls beherrscht wird (Ladd und Cooper 2004). Hier ist es prinzipiell denkbar, dass eine Veränderung in der zellulären Homöostase die Dominanz des NLS unterdrückt. Experimentell ist diese Hypothese allerdings noch nicht belegt.

Dass wichtige Funktionen der Hu-Proteine von einem erfolgreichen nukleozytoplasmatischen Transport abhängen, wurde am Beispiel des Neuritenwachstums in der Maus belegt. Dessen Induktion setzte das simultane Vorhandensein von NES und NLS im HuD-Molekül voraus (Kasashima *et al.* 1999). Weiterführende Untersuchungen zu diesem Thema erscheinen deshalb außerordentlich lohnenswert. Insbesondere erscheint auch die Frage interessant, ob nur aktive, Exportmolekül-vermittelte oder auch passive (*shuttling*) (Lim und Fahrenkrog 2006) Transportprozesse relevant sind.

Physiologischerweise ist humanes Hu-Antigen einschließlich humanen HuDs überwiegend nukleär lokalisiert

Auf dem Boden der eigenen *in vitro* Daten ergab sich die spannende Frage, welche zelluläre Verteilung die humanen HuD-Proteine *in vivo* aufweisen, und ob die zelluläre Lokalisation in gesundem und maligne entartetem, neuroektodermalen Gewebe differiert. Die verfügbaren Daten anderer Autoren zur physiologischen und tumorassoziierten Hu-Antigenexpression basierten alle auf immunhistologischen Untersuchungen mit nicht-HuD-spezifischen AK und konnten diese Frage somit bislang nicht beantworten.

Die physiologische Gewebeexpression der Hu-Proteine war erstmals 1992 von Dalmau und Kollegen mittels Serum von Patienten mit Anti-Hu-Syndrom untersucht worden. Serum-AK bindendes Hu-Antigen hatte sich nahezu ausschließlich in Neuronen des zentralen und peripheren Nervensystems sowie in Teilen des autonomen Nervensystems gefunden und zeigte eine hauptsächlich nukleäre Lokalisation. Ähnliche Befunde hatten sich bei jüngeren immunhistologischen Untersuchungen mithilfe eines rekombinanten anti-Hu-Fab-Fragments ergeben (Gultekin *et al.* 2000).

Die publizierten Befunde sprachen erstens dafür, dass die schwachen PCR-Signale für HuD3, HuD4 und HuC-L in peripheren Geweben auf Spuren von neuronalen Gewebekomponenten zurückzuführen waren, und zweitens dafür, dass die nukleäre Lokalisation von Hu-Protein sowohl im zentralen als auch im peripheren Nervensystem physiologischerweise dominiert.

In der eigenen Arbeit konnte mit dem spezifischen mAK 16C12 erstmals belegt werden, dass humanes HuD-Antigen tatsächlich auch *in vivo* nukleär vorkommt, und dass die Kernfärbung in den meisten der Hu-positiven Zellen des normalen Frontalhirn sogar etwas stärker ausgeprägt ist als die im Zytoplasma. Wie die einzelnen Varianten HuD1-4 in den Hu-positiven Zellen des Frontalhirns verteilt waren, ließ sich leider mit dem verfügbaren mAK 16C12 weder histologisch noch im Western-Blot (Daten nicht gezeigt) klären.

Dafür, dass die nukleäre Komponente möglicherweise entscheidend von HuD1/HuDpro1 geprägt wird, könnte die in der eigenen Arbeit dokumentierte, starke HuD1-mRNS-Expression in humanem Großhirn sprechen. Da auch HuD4-mRNS im Großhirn exprimiert wird, war die schwächere, zytoplasmatische Komponente wahrscheinlich durch HuD4 (mit)bedingt.

Ob sich diese zelluläre Verteilung der HuD-Antigene auch in anderen gesunden, humanen, neuroektodermalen Geweben als dem Frontalhirn wiederfindet, muss in zukünftigen Untersuchungen geprüft werden. Die historischen Daten mit den Pan-Hu-Markern sprachen für ein ähnliches Bild.

In aggressiven Neuroblastomen ist die zytoplasmatische HuD-Komponente vorherrschend, was unter anderem auf eine Herunterregulation des HuD1-Promotors zurückzuführen sein könnte

Mit Hilfe des AK 16C12 konnte gezeigt werden, dass nukleäres und zytoplasmatisches HuD-Antigen in Ganglio-NB- und NB-Gewebe vorkommt, und dass nukleäres Antigen in den differenzierten Ganglio-NB (Hughes Grad I), zytoplasmatisches Antigen hingegen in den undifferenzierten Tumorzellen der aggressiveren NB (Hughes Grad II bzw. III) dominierte.

Die publizierten Daten zur zellulären Lokalisation der Hu-Antigene in NB liefern nur Evidenzen für Reaktivitäten mit polyklonalen anti-Hu-Seren (Dalmau *et al.* 1992; Gultekin *et al.* 1998; Gultekin *et al.* 2000) oder mit AK, welche alle neuronenspezifischen Hu-Antigene (HuD, HuB und HuC) detektieren wie 16A11 (Marusich *et al.* 1994) oder Fab GLN 486 (Graus *et al.* 1998). In allen Untersuchungen wurde eine vorwiegend nukleäre Lokalisation der Hu-Proteine beschrieben.

In der eigenen Arbeit wurde interessanterweise beobachtet, dass die im Gehirn und in den meisten NB prominente HuD1-Expression selektiv in einem besonders aggressiven NB herunterreguliert war, passend zu einer möglichen Herunterregulation des neuen HuD-Intronpromotors im Rahmen der Dedifferenzierung. Dazu passend war eine Herunterregulation der Gesamt-Hu-mRNS, gemessen mit Hilfe nicht-HuD-spezifischer Primer (RT-PCR), in aggressiveren NB und SCLC bereits beschrieben worden (Ball *et al.* 1997; King 1997), so dass die differentielle Analyse der eigenen Arbeit wahrscheinlich den verantwortlichen HuD-mRNS-Subtyp identifizierte. Beide Evidenzen auf Transkriptomebene waren gut vereinbar mit der beobachteten Progress-assoziierten Herunterregulation nukleären HuDs auf Proteinebene.

Ob die differenzielle HuD1-mRNS-Expression oder intrazelluläre HuD-Verteilung möglicherweise neue, unabhängige prognostische Parameter darstellen, muss an einer größeren Patientenkohorte untersucht werden.

Die Expression von HuD wird möglicherweise auch posttranskriptionell reguliert

Die Tatsache, dass eines der beiden NB mit nahezu fehlendem Kernantigen dennoch signifikante Mengen von HuD1 mRNA exprimierte, sprach dafür, dass die Herunterregulation nukleärer HuD-Komponenten eventuell auch auf posttranskriptioneller Ebene stattgefunden hatte. Nicht auszuschließen war, dass die beobachtete Diskrepanz unter anderem auch auf eine höhere Sensitivität des mRNA- gegenüber dem Protein-Nachweis zurückzuführen war.

Eine Diskrepanz zwischen transkriptionellen und posttranskriptionellen Befunden zur Hu-Antigenexpression war auch von anderen Autoren beschrieben worden. Allerdings konnte das Expressionsniveau auf Protein- und mRNA-Ebene aufgrund der fehlenden Spezifität der AK- und DNS-Sonden nicht eindeutig den HuD-Antigenen zugeordnet werden.

So hatten Dalmau und Kollegen mittels anti-Hu-AK-positiver Seren in nur 50 - 78 % der untersuchten NB Hu-Protein detektiert (Dalmau *et al.* 1992; Dalmau *et al.* 1995), während Ball und King mittels des außerordentlich sensitiven *RNase protection assays* in 97 % der untersuchten NB und in 100 % aller untersuchten NB-Zelllinien Hu-Transkripte nachgewiesen hatten (Ball und King 1997). An einer kleinen Fallzahl belegte die eigene Arbeit, dass unter den NB-assoziierten Hu-Transkripten regelmäßig HuD-Varianten zu finden waren.

Einen weiteren Hinweis auf eine mögliche posttranskriptionelle Regulation von Hu-Proteinen lieferten Kasashima und Kollegen. In der Rattenphäochromozytom-Zelllinie PC12 konnten sie nach Behandlung mit NGF eine Verdreifachung der Hu-Proteinmenge beobachten, während die Hu-spezifischen RNS-Menge im Northern-Blot unverändert blieb (Kasashima *et al.* 1999).

HuD-Expression in anderen neuroektodermalen und nicht-neuroektodermalen Tumoren

Dafür, dass die tumorbiologische Bedeutung von HuD1/HuDpro1 im Kontext unterschiedlicher Tumorarten möglicherweise variiert, sprach die Beobachtung, dass eine Herunterregulation der HuD1-mRNS in der eigenen Arbeit außer bei aggressiven NB noch bei Medulloblastomen mit günstigem, klinischen Verlauf zu beobachten war. Die Untersuchungsergebnisse sind allerdings aufgrund der geringen Fallzahl mit Vorsicht zu interpretieren.

Publizierte immunhistologische Untersuchungen mit anti-Hu-Seren, bzw. mit dem mAK Fab GLN 495 (HuB-, HuC- und HuD-spezifisch) fanden in 26 von 30 Medulloblastomen Hu-Antigen mit hauptsächlich nukleärer Lokalisation (Gultekin *et al.* 1998). In 67 % der untersuchten Medulloblastom-Zelllinien konnte Gesamt-HuD-mRNS detektiert werden (Schramm *et al.* 1999). Eine signifikante Korrelation mit dem Krankheitsverlauf fand sich nicht. Gut vorstellbar ist auch hier, dass HuD1 das für die Herunterregulation von Gesamt-Hu-mRNS und -Protein verantwortliche Transkript darstellte.

Evidenzen zur Hu-Proteinexpression gab es darüber hinaus für SCLC, großzellige Bronchialkarzinome, Melanome, Merkel-Zell-Tumoren, medulläre Schilddrüsenkarzinome, Phäochromozytome, Paragangliome, Gangliogliome, Neurozytome, Pineoblastome Rhabdomyosarkome, Astrozytome, Ewingtumoren und Wilmstumoren. In den histologischen Untersuchungen mit anti-Hu-Seren oder den oben genannten AK mit Spezifität für alle neuronenspezifischen Hu-Antigene konnte auch hier eine überwiegend nukleäre Lokalisation der Hu-Antigene festgestellt werden (Dalmau *et al.* 1992; Gultekin *et al.* 1998; Gultekin *et al.* 2000). Rückschlüsse auf die spezifische Expression von HuD lassen die Daten nicht zu.

Die in der eigenen Arbeit erstmals beschriebene Expression von HuD2 (mit oder ohne HuD4)-mRNS in je einem Ependymom und Osteosarkom sowie zwei Hodgkin-Lymphomen war

bislang unbekannt. Die fehlende HuD1-Expression war hier gut mit dem nicht-neuroektodermalen Gewebeursprung vereinbar.

Die intrazelluläre Lokalisation von HuD-Antigen wird wahrscheinlich differenzierungsabhängig reguliert

Die beobachtete Umverteilung des HuD-Antigens in NB gegenüber differenziertem Ganglion NB oder Großhirngewebe gab Anlass zu der Vermutung, dass die Expression und intrazelluläre Verteilung der verschiedenen HuD-Varianten differenzierungsabhängig reguliert sein könnte. Früher wurde allgemein angenommen, dass HuD einen Marker für frühe postmitotische und reife Neurone darstellt (King *et al.* 1994). Die aktuellen Daten sprechen für ein komplizierteres Bild.

Dass Promotoren einzelner *Elav/Hu*-Gene abhängig vom Entwicklungsstadium alternativ aktiviert werden, war für das *Drosophila*-Gen *rbp9* beschrieben worden. Dieses Gen besitzt drei Promotoren. Zwei der drei resultierenden Transkripte werden in der Larvenperiode, das dritte in der erwachsenen Fliege am stärksten exprimiert (Kim und Baker 1993). Prinzipiell ist somit eine Regulation auf transkriptioneller Ebene im Kontext der Differenzierung vorstellbar.

Die verfügbaren Publikationen zur differenzierungsabhängigen Proteinlokalisierung beziehen sich in Ermangelung geeigneter AK nicht spezifisch auf HuD und nehmen zum Mechanismus der Umverteilung (transkriptional, posttranskriptional, posttranslational) nicht eindeutig Stellung.

Perron und Kollegen hatten vor zehn Jahren mit Hilfe von RNS-Injektion eine vom Entwicklungsstadium des Wurms *Xenopus laevis* abhängige Lokalisation des HuD-Homologs XEL-1 beobachtet. Nach Injektion von rekombinanter, *tag*-gekoppelter XEL-1- RNS in Zellen der Neuralleiste konnte das Protein mittels anti-*tag*-AK im Stadium der Neurula gemischt nukleär-zytoplasmatischen und in der späteren Schwanzknospen-Entwicklungsphase hauptsächlich zytoplasmatischen nachgewiesen werden. Über eine mögliche Bindung von XEL-1 an zytoplasmatische Proteine der späteren Phase und somit über einen posttranslationalen Mechanismus der Umverteilung wurde spekuliert (Perron *et al.* 1997).

Pascale und Kollegen hatten nach Differenzierungsinduktion mit einem PKC-Aktivator mit Hilfe des mAK 16A11 eine Umverteilung von endogenem, nukleärem, neuroektodermalem Hu-Antigen in das Zytoplasma von SH-SY5Y-Zellen beobachtet (Pascale *et al.* 2005). Die Tatsache jedoch, dass unbehandelte SH-SY5Y-Zellen in den eigenen Untersuchungen mit dem HuD-spezifischen mAK 16C12 keine signifikante Anfärbung aufwiesen, spricht dafür, dass in den zitierten Experimenten eher HuC oder HuB als HuD im Kern herunterreguliert bzw. aus dem Kern exportiert wurde.

Ratti und Kollegen demonstrierten mit dem AK 16A11 in adulten Rattengehirnen eine zelluläre Koexpression von endogenem, nukleäre sowie zytoplasmatisch verteilten Hu-Antigen mit dem Proliferationsmarker Ki67, so dass eine Hu-Antigenexpression im Kontext der Zellproliferation postuliert wurde. Rückschlüsse auf die spezifische HuD-Expression waren nicht möglich (Ratti *et al.* 2006).

Insgesamt ist über die Kontrolle der HuD-Expression, besonders von humanem HuD, viel weniger bekannt als über die HuD-vermittelte Kontrolle der Expression anderer Proteine (Deschenes-Furry *et al.* 2006). Wie sich die verschiedenen humanen HuD-Proteine in Abhängigkeit vom Differenzierungsstatus neuroektodermaler Zellen tatsächlich verteilen, und welcher Mechanismus der Verteilung zugrunde liegt, muss in zukünftigen Experimenten z. B. unter dem Einfluss von PKC-Aktivatoren, 13-cis-Retinsäure, NGF oder anderen Differenzierungsinduktoren untersucht werden. Die Ergebnisse haben nicht nur tumorbiologische, sondern möglicherweise auch klinische Relevanz z. B. im Rahmen der Krankheitsprognose bzw. Risikostratifizierung (s. o.).

Die neuen HuD-5'-Sequenzen konnten als MRD-Marker vorgeschlagen werden

Für einige Tumoren des Erwachsenen sind tumorantigenspezifische PCR-Ansätze beschrieben, mit denen eine einzelne Tumorzelle unter $10^6 - 10^8$ nichtmalignen Blutzellen detektiert werden konnte (Gerhard *et al.* 1994). Um SCLC-Zellen im peripheren Blut zu erfassen, hatten Tora *et al.* (2000) daher versucht, eine RT-PCR für neuronenspezifische HuD-Transkripte zu etablieren. Mit den gewählten Primern (vgl. **Abb. 6**) war der Ansatz jedoch nicht spezifisch genug und führte zum Nachweis ubiquitärer Hu-Varianten (Tora *et al.* 2000). Der MRD-Nachweis für NB mithilfe CT-antigenspezifischer Sonden wird diskutiert, hat sich aber bislang nicht klinisch durchgesetzt (Cheung und Cheung 2001; Oltra *et al.* 2004).

In der eigenen Arbeit konnte interessanterweise beobachtet werden, dass keine der neuen HuD-5'-UTR-Varianten in hämatopoetischen Geweben zu detektieren war, dass aber in allen untersuchten neuroektodermalen Tumorgeweben einschließlich der besonders aggressiven NB mindestens eine dieser HuD-5'-Varianten exprimiert wurde. Damit könnte eine Kombination der in dieser Arbeit eingesetzten HuD-5'-UTR-Primer für den sensitiven Nachweis von NB- und anderen neuroektodermalen Tumorzellen in peripherem Blut und Knochenmark, aber auch in Lymphknotenbiopsien hilfreich sein. Ob dieser Ansatz tatsächlich sensitiver als die derzeit üblichen immunzytologischen bzw. immunhistologischen Verfahren der MRD-Diagnostik mittels anti-GD2-AK ist (Mujoo *et al.* 1987; NB2004), muss gezielt durch Zellverdünnungsexperimente untersucht werden.

Die Identifikation und Charakterisierung von Hu-Antigenen lieferte neue Ansatzpunkte für die Diskussion zum Pathomechanismus des Anti-Hu-Syndroms

AK gegen Hu-Proteine wurden erstmals bei Patienten mit SCLC und paraneoplastischen, Autoimmunneuropathien gefunden (Graus *et al.* 1985). Das Autoimmunphänomen wurde unter Verwendung der Initialen des erstbeschriebenen Patienten als Anti-Hu-Syndrom bezeichnet. Das klinische Bild dieses Syndroms umfasst ein breites Spektrum an neurologischer Symptomatik einschließlich der klassischen paraneoplastischen Enzephalomyelitis (PEM) und der sensorischen Neuropathie (PSN) (Bataller und Dalmau 2003; Darnell und Posner 2006). Anti-Hu-AK werden daneben auch beim paraneoplastischen Opsoklonus-Myoklonus (POM) im Kontext von NB gefunden (Antunes *et al.* 2000; Voltz 2002). Bemerkenswerterweise konnte bei Patienten mit SCLC und NB ein gewisser tumorprotektiver Effekt der anti-Hu-Immunantwort im Sinne günstigerer Krankheitsverläufe gegenüber der seronegativen Vergleichsgruppe belegt werden (s. u.).

Pathogenetisch wurde zunächst eine humorale, später eher eine zelluläre Kreuzimmunität gegen Hu-Antigene in Tumoren und Neurone diskutiert (Posner und Furneaux 1990; Posner und Dalmau 1997; Benyahia *et al.* 1999; Bataller und Dalmau 2003; Darnell und Posner 2006). Man stellt sich vor, dass der Tumor eine gegen über- oder ektop exprimierte Hu-Antigene gerichtete Immunantwort auslöst, welche sich schließlich gegen Hu-Antigene in gesunden Neuronen richtet. Der genaue Mechanismus der Hu-vermittelten Immunogenität der Tumoren ist noch nicht geklärt. Dem neuronenspezifischen HuD wird eine entscheidende Rolle bei der Induktion der Immunantwort zugesprochen (Carpentier *et al.* 1998; Ohwada *et al.* 1999; Plonquet *et al.* 2003).

Die in der eigenen Arbeit beschriebenen neuen Daten zur Molekulargenetik, Expression und Immunogenität der Hu-Antigene, insbesondere des HuD, lieferten interessante, zusätzliche Ansatzpunkte für das tumorbiologische und tumorimmunologische Verständnis dieser oft fatalen, paraneoplastischen Autoimmunerkrankung (s. u.).

Die Expression von Hu-Antigen geht nicht immer mit dem Nachweis von Serum-AK einher und ist somit per se wahrscheinlich keine Erklärung für die Hu-assoziierte Immunogenität

Mit Hinblick auf den Mechanismus der Hu-Immunogenität ist die Beobachtung interessant, dass keineswegs alle Patienten, in deren Tumor Hu-Antigen detektiert werden kann, auch nachweislich anti-Hu-AK produzieren. Hu-Antigene werden wie bereits erwähnt in allen SCLC und in der Mehrheit aller NB exprimiert (Voltz *et al.* 1997; Graus *et al.* 2001). Anti-Hu-AK wurden jedoch nur bei ca. 16 - 17 % aller Patienten mit SCLC (Graus *et al.* 1997; Verschuuren *et al.* 1999) und bei ca. 4 - 16 % (Dalmau *et al.* 1995; Antunes *et al.* 2000) bzw. wie in dieser

Arbeit gezeigt bei bis zu 20 % der Patienten mit NB nachgewiesen, also bei maximal einem Viertel der Tumorantigen-positiven Patienten.

Eine Erklärungsmöglichkeit für die variable Immunantwort der Tumoren könnte vielmehr darin liegen, dass Hu-Antigene/Antigenfamilien mit unterschiedlicher Immunogenität exprimiert werden. Zwischen den verschiedenen neuronenspezifischen Hu-Proteinfamilien (HuD, HuC, HuB) konnten die bislang eingesetzten AK nicht unterscheiden. Dies wurde jetzt mit dem AK 16C12 möglich, was Anlass zu Untersuchungen an einer größeren Patientenzahl gibt. Diese sollten neben der Analyse der anti-Hu-Immunantwort auch differenzielle Analysen der mRNA-Expression mit einschließen. Es wäre durchaus möglich, dass die AK-Produktion mit einer kritischen Gesamtmenge an HuD-Antigen korreliert.

Mit Hilfe des HuD-spezifischen AK könnte darüber hinaus untersucht werden, ob die intrazelluläre Verteilung der HuD-Varianten für die Hu-assoziierte Immunogenität kritisch ist.

Dafür, dass eventuell nur HuD1 immunogen wirkt, spricht die Beobachtung, dass nur dieses Antigen normalerweise auf dem immunologisch geschützten Gehirn beschränkt ist und somit in peripheren Tumoren grundsätzlich ektopt exprimiert wird. Ein Gegenargument für die alleinige Immunogenität des HuD1 liefern die Tatsachen, dass alle möglichen Epitope des HuD1 auch in den anderen Varianten HuD2, 3, 4 enthalten sind, und dass alle HuD-Varianten von CD4⁺ T-Zellen erkannt werden (s. u.). Dass die Herunterregulation von HuD1 in aggressiven Tumoren zu einem Unterschreiten der kritischen Gesamt-Hu-Antigenmenge führen könnte, ist dagegen sehr gut vorstellbar.

Gegen eine vornehmliche Immunogenität des HuD4 bzw. von zytoplasmatischem Antigen sprechen die Tatsachen, dass zytoplasmatisches Antigen vor allem in den besonders aggressiven NB vorkommt, und dass anti-Hu-AK bei dieser Patientengruppe seltener sind als bei Patienten mit günstigerem Krankheitsverlauf (Dalmau *et al.* 1995). Es ist prinzipiell nicht auszuschließen, dass die Prozessierung und Präsentation von nukleärem *versus* zytoplasmatischem Antigen an T-Zellen effizienter ist.

Letztlich wäre auch vorstellbar, dass sich die Hu-Immunogenität aus einer Kombination des Hu-Expressionsmusters im Tumor und des HLA-Typs der Patienten ableitet. Dalmau und Kollegen hatten im Kontext von SCLC und NB, die sowohl eine Hu- als auch eine MHC-Klasse I-Expression aufwiesen, häufiger anti-Hu-AK nachgewiesen als bei MHC-Klasse I-negativen Tumoren der jeweiligen Entität. Eine genaue Vorhersage der Hu-Immunogenität allein aufgrund der MHC-Klasse I-Expression war jedoch nicht möglich (Dalmau *et al.* 1995). Untersuchungen zur Korrelation der Immunogenität mit spezifischen HLA-Typen wären außerordentlich aufwendig.

Unter physiologischen Umständen werden MHC-Klasse I-Moleküle auf fast allen Körperzellen jedoch nicht auf Neuronen, Plazenta, und Hoden exprimiert. Die Induktion von MHC-Klasse I-Molekülen in Neuronen des ZNS benötigt pro-inflammatorische Zytokine und die Blockade der elektrischen Aktivität, welche die Induktion von *MHC*-Genen suprimiert (Neumann *et al.* 1995). Der proinflammatorische Kontext des Tumorgeschehens trägt somit wahrscheinlich zumindest zur Immunogenität bei.

Letztlich muss bedacht werden, dass der Nachweis von Serum-AK möglicherweise nicht sensitiv genug ist, um alle Patienten mit zellulärer Hu-Immunogenität zu erfassen. Das bedeutet, dass die Suche nach einer Korrelation von humoraler Immunantwort und Antigenstatus keinen sicheren Weg zur Aufschlüsselung des verantwortlichen immunogenen Mechanismus darstellt. Unverzichtbar sind deshalb *in vitro* Analysen, die die zelluläre Immunogenität von Hu-Proteinen näher untersuchen.

Alle aminoterminalen HuD-Varianten wurden von patienteneigenen CD4+ T-Zellen erkannt

Wie oben erwähnt, mehrten sich Hinweise darauf, dass die Neurotoxizität im Rahmen der Anti-Hu-Syndrome zellulär und nicht humoral vermittelt wird (Sillevis Smitt *et al.* 1995; Rousseau *et al.* 2005).

Passend dazu wiesen Patienten mit PEM/PSN häufig eine Liquorpleozytose und extensive entzündliche lymphozytäre Infiltrate in den betroffenen neuronalen Regionen auf (Darnell und Posner 2006). Es wird angenommen, dass durch Aktivierung Hu-spezifischer, autoreaktiver T-Zellen, die sich der Deletion im Rahmen der zentralen Toleranz entzogen haben, ein zytotoxischer Effekt auf Neuronen und Tumorzellen generiert wird.

Benyahia und Kollegen konnten darüber hinaus durch *in vitro* Stimulation mit rekombinantem HuD eine deutlich gesteigerte Proliferation von PBMC anti-Hu-AK positiver SCLC-Patienten gegenüber PBMC seronegativer SCLC-Patienten oder gesunder Kontrollen erzielen. Die Hu-reaktiven Zellen der seropositiven Gruppe entsprachen überwiegend CD4+ Gedächtnis-T-Zellen und konnten durch das Interferon- γ /IL-4 Verhältnis dem Th1 Subtyp zugeordnet werden (Benyahia *et al.* 1999).

Tanaka und Kollegen zeigten etwa gleichzeitig, dass CD8+ T-Zellen von anti-Hu-AK-positiven Patienten autologe Fibroblasten lysierten, wenn diesen HuD injiziert worden war. Der zytotoxische Effekt konnte durch anti-CD8-AK unterbunden werden (Tanaka *et al.* 1999).

Plonquet und Kollegen wiesen später mittels eines HLA-A2-transgenen Maus-Modells in PBMC von gesunden HLA-A2-positiven Spendern Hu-spezifische CD8+ T-Zellen nach, die das Epitop SLGYGFVN (HuD AS 86-95) erkannten (Plonquet *et al.* 2003). Allerdings konnten de Beukelaar und Kollegen bei anti-Hu-AK positiven PNS-Patienten bislang keine HuD-

spezifischen CD8+ T-Zellen detektieren (de Beukelaar *et al.* 2007). Durch diesen Befund rücken CD4+ T-Zellen in den Fokus der zellulären anti-HuD-Reaktion.

In der eigenen Arbeitsgruppe konnten kürzlich mithilfe von Lymphozyten der Patientin 018 und eines rekombinanten Gemisches der drei Varianten HuD1, HuD3 und HuD4 spezifische CD4+ T-Zelllinien generiert werden, aus denen derzeit durch *limiting dilution* T-Zellklone gezogen werden. Mithilfe dieser T-Zell-Klone sollen die verantwortlichen MHC Klasse II-restringierte T-Zell-Epitope kartiert werden. Mit dem Erhalt Hu-spezifischer T-Zellklone und der Charakterisierung des jeweils verantwortlichen T-Zell-Epitops kann dann die Präsentation der verschiedenen HuD-Varianten in malignen und nicht-maligne transformierten Zellen studiert und so der Mechanismus der Hu-Immunogenität weiter aufgeklärt werden.

Da alle Hu-Proteine auch im Gehirn exprimiert werden, und aktivierte T-Zellen die Bluthirnschranke überwinden können (Archambault *et al.* 2005), sind Hu-spezifische T-Zellen trotz der beobachteten tumorprotektiven Effekte (s. u.) wahrscheinlich nicht für den immuntherapeutischen Einsatz gegen Tumoren geeignet. Von der Aufklärung der immunogenen Mechanismen können aber ein verbessertes Verständnis der Hu-Pathogenese erwartet und so eventuell doch Behandlungsmaßnahmen abgeleitet werden.

Anti-Hu-AK kommen im Kontext neuroektodermaler und nicht-neuroektodermaler Neoplasien von Kindern vor, wobei hohe AK-Titer nicht zwingend mit neurologischen Symptomen assoziiert sind

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Patienten mit neuroektodermalen Tumoren lag die Häufigkeit von anti-Hu-AK mit 20 % in einem ähnlichen Bereich wie bei erwachsenen Patienten mit SCLC (16 -17 %) (32/196 bzw. 9/17) (Graus *et al.* 1997; Verschuuren *et al.* 1999). In einer Studie zum NB-assoziierten POM wurden anti-Hu-AK bei einer Serumverdünnung von 1:500 in 16 % (10/64) der untersuchten Patienten mit NB nachgewiesen (Antunes *et al.* 2000). Eine mit 4 % (4/109) deutlich niedrigere Frequenz dokumentierten Dalmau *et al.* (1995), die mit einer Serumverdünnung von 1:1000 arbeiteten, wobei in dieser Arbeit nur Patienten mit NB des Stadiums 4 untersucht wurden.

Eine mögliche Erklärung für die in der eigenen Arbeit gefundene, höhere AK-Frequenz könnte in einer höheren Testsensitivität liegen, da das Serum deutlich weniger verdünnt eingesetzt wurde (1:100) als in den Arbeiten der anderen Autoren (1:500 - 1.000). Darüber hinaus ist wahrscheinlich aber auch ein Unterschied bezüglich der Patientenkohorten von Bedeutung.

Interessanterweise wies keiner der eigenen, seropositiven Patienten Zeichen einer paraneoplastischen Neuropathie auf. Diese Beobachtung passte zu vorangegangenen Untersuchungen, bei denen 25 - 60 % (1/4 bzw. 6/10) aller seropositiven NB-Patienten keine

paraneoplastische Erkrankung aufwiesen (Dalmau *et al.* 1995; Antunes *et al.* 2000). Bemerkenswert sind allerdings die bei unserer Patientin 018 gefundenen, besonders hohen AK-Titer (1:10.000). Bei fast allen erwachsenen Patienten mit anti-Hu-AK-Titern von mehr als 1:1.000 waren neurologische Symptome beobachtet worden (Graus *et al.* 2001).

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass das Vorkommen von anti-Hu-AK im Kindesalter nicht auf Patienten mit NB beschränkt ist, sondern dass diese AK auch im Zusammenhang mit anderen pädiatrischen neuroektodermalen (Astrozytom, Ewingtumor), sowie nicht neuroektodermalen Neoplasien (Non-Hodgkin-Lymphom) auftreten. Bei Erwachsenen waren anti-Hu-AK außer mit SCLC auch mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom, Prostata-, Mamma-, Blasen- und Pankreaskarzinom sowie gastrointestinalen Tumoren und ovarialem Dysgerminom assoziiert (Graus *et al.* 2001).

Anti-Hu-AK haben möglicherweise prognostische Bedeutung

Bei pädiatrischen Patienten mit NB-assoziiertem POM wurde bereits vor ca. 30 Jahren ein besserer Verlauf beobachtet als in der Gruppe ohne POM (Altman und Baehner 1976). Schon damals wurde eine autoimmune Genese des POM vermutet und über die Bedeutung der Autoimmunität bei der Tumorkontrolle spekuliert. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die mittlere Überlebenszeit von anti-Hu-AK-positiven Patienten mit NB im Stadium 4 höher war als die von seronegativen Patienten mit dem selben Krankheitsstadium (Dalmau *et al.* 1995). Der POM scheint allerdings nicht allein von Hu-Antigenen abhängig zu sein (Antunes *et al.* 2000).

Ob anti-Hu-AK tatsächlich zuverlässige und unabhängige prognostische Parameter bei Patienten mit NB darstellen, muss an einer größeren Anzahl von Patienten mit unterschiedlichen Krankheitsverläufen verifiziert werden. Mit dem Nachweis von anti-Hu-AK bei bis zu 20 % der Patienten mit NB in der eigenen Arbeit kommt der AK häufig genug vor, um eine diesbezügliche Studie zu motivieren.

Vielfach reproduzierte Evidenzen für eine prognostische Bedeutung der Hu-Immunogenität lieferten auch die Patienten mit SCLC (Rauer und Andreou 2002). Von 196 SCLC-Patienten ohne PEM/PSN zeigten die 32 Hu-seropositiven Patienten im Vergleich mit der anti-Hu-AK-negativen Gruppe eine limitierte Ausbreitung des Tumors, ein besseres Ansprechen auf die Therapie, eine längere Überlebensdauer und eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für eine komplette Tumorremission (Graus *et al.* 1997). Benyahia und Kollegen fanden bei SCLC-Patienten mit Anti-Hu-Syndrom ein langsames Tumorwachstum als bei Patienten ohne Anti-Hu-Syndrom (Benyahia *et al.* 1999).

Anti-Hu-AK haben eine mögliche diagnostische Bedeutung

Die Bedeutung von anti-Hu-AK als serologische Tumormarker für neuroektodermale Tumoren ist bei Erwachsenen mit neurologischer Symptomatik unklarer Ätiologie gut belegt (Voltz *et al.* 1997; Graus *et al.* 2001; Darnell und Posner 2006). Jeder neurologische Patient, bei dem anti-Hu-AK nachgewiesen werden, muss einem intensiven Tumorscreening unterzogen werden und wird bei negativem Ergebnis engmaschig nachkontrolliert. Nicht selten werden die Malignome auf diese Weise im Frühstadium erkannt (Dalmau *et al.* 1992; Graus *et al.* 2001; Voltz 2002; Darnell und Posner 2006). Bei Kindern hat die serologische Hu-Diagnostik noch keinen Einzug in die klinische Routine gefunden. Eine Ergänzung der Routinediagnostik zur Suche nach neuroektodermalen Tumoren durch anti-Hu-AK Tests erscheint bei gegebener Häufigkeit der AK durchaus sinnvoll. Ob anti-Hu-AK zu der initial oft schwierigen Differentialdiagnose zwischen NB und Wilmstumor beitragen können, müsste systematisch untersucht werden. Bislang wurde kein seropositiver Patient mit Wilmstumor beschrieben.

Anti-Hu-AK können als serologische Verlaufsmarker dienen

In dieser Arbeit konnte eine positive Korrelation der AK-Titer gegen Hu-Antigene, 018INX und 018NAC mit der Tumorlast beobachtet werden. Die initiale Tumorremission ging mit einem Abfall der AK-Titer einher, und noch vor der klinisch erkennbaren Tumorprogression waren die AK-Titer wieder angestiegen. Eine unspezifische Genese der Titerveränderungen z. B. durch die chemotherapiebedingte Immunsuppression konnte ausgeschlossen werden.

Bemerkenswerterweise waren die AK-Titer zum Zeitpunkt der klinisch manifesten Tumorprogression höher als zum Zeitpunkt der Erstdiagnose, obwohl das Tumolvolumen zu diesem Zeitpunkt kleiner war als initial. Dies könnte zum einen durch eine verstärkte Antigenexpression in den chemotherapieresistenten Tumorzellen verursacht worden sein. Zum anderen könnte die erneute Präsentation der Tumorantigene zu einem *booster*-Effekt der Immunantwort geführt haben. Eine Analyse der Antigenexpression zum Zeitpunkt der Tumorprogression war leider mangels ausreichenden Tumorgewebes nicht möglich.

Auch für einen anderen, typisch pädiatrischen Tumor konnte kürzlich eine Korrelation von Serum-AK-Titern gegen SEREX-definierte Antigene mit dem Krankheitsverlauf demonstriert werden (Jager *et al.* 1999; Behrends *et al.* 2003). Ein Wiederanstieg von anti-MU-MB-20.220-AK war drei Monate vor der klinischen Manifestation eines Medulloblastomrezidivs gefunden, und bei zwei Medulloblastompatienten war parallel zur klinischen Remission der Erkrankung ein Abfall der AK-Titer gegen SEREX-definierte Medulloblastomantigene zu beobachten. Allerdings wurde auch über eine Patientin berichtet, die trotz anhaltend niedriger AK-Titer nach initialem Abfall ein fatales Medulloblastomrezidiv entwickelte.

Jäger und Kollegen hatten die AK-Antwort gegen das SEREX-definierte CT-Antigen NY-ESO-1 bei zwölf erwachsenen Patienten mit verschiedenen NY-ESO-1 exprimierenden Tumoren im Krankheitsverlauf untersucht. Einen Anstieg der anti-NY-ESO-1-AK fanden sie bei zwei Patienten mit einer Krankheitsprogression und bei zwei Patienten mit exzessivem, therapiebedingtem Tumorzelluntergang. Ein stabiler Titer wurde bei einem Patienten mit langsamer Tumorregression, und abfallende Titer bei fünf Patienten nach kurativer Resektion, partieller Regression oder NY-ESO-1 negativem Rezidiv beobachtet.

Zusammenfassend sprechen diese Daten dafür, dass Titeranstiege hilfreiche Alarmzeichen sein können. Allerdings müssen sie nicht immer eine Progression bedeuten und erfordern daher eine erweiterte Diagnostik. Abfallende AK-Titer sind dagegen nicht aussagekräftig.

V.2 Das neue Tumorantigen 018INX

Das SEREX-definierte Antigen 018INX ist ein alternatives Translationsprodukt

Intermediärfilamente wie das NF66/ α -internexin verbinden den Zellkern mit der Zellperipherie und zählen deshalb zusammen mit Aktinfilamenten und Mikrotubuli zum Zytoskelett. Sie werden in sechs Typen unterteilt, wobei NF66/ α -internexin zusammen mit den hoch-, mittel- und niedermolekularen Neurofilamenten zum Typ IV gerechnet wird (Lariviere und Julien 2004). Jüngste Daten geben Hinweise darauf, dass NF66/ α -internexin eine vierte funktionelle Untereinheit reifer Neurofilamentfasern repräsentieren könnte. Diese waren bisher als Triplets angesehen worden (Barry *et al.* 2007). Das NF66/ α -internexin wurde 1989 als neues 66 kD-großes Neurofilament charakterisiert (Chiu *et al.* 1989), 1995 vollständig kloniert (Chan und Chiu 1995), und das codierende Gen auf Chromosom 10q24.33 lokalisiert (Chiu *et al.* 1989).

Bislang war nur eine einzige CDS der NF66/ α -internexin bekannt, die stromaufwärts einer sowohl im Menschen als auch in der Ratte ungewöhnlich langen 3'-UTR gelegen ist. Es gab Spekulationen darüber, dass diese lange 3'-UTR ähnlich der des humanen Interferon- β in die Regulation der Genexpression involviert sein könnte (Chan und Chiu 1995). In dieser Arbeit konnte nun erstmals ein Genprodukt der NF66/ α -internexin-3'-UTR nachgewiesen werden.

Um zu entscheiden, welcher der sechs ORF der langen 3'-UTR das serologisch detektierte Antigen 018INX codierte, wurde der längste von ihnen in Anschlussuntersuchungen rekombinant exprimiert und in Westernblot-Analysen mit dem 018INX-reaktiven Serum untersucht. Die Experimente identifizierten diesen ORF als CDS des SEREX-definierten Antigens (Behrends *et al.* 2002). Die biologische Funktion dieses Genprodukts einschließlich seiner möglichen Rolle in der Regulation der Genexpression kann nun an Transfektanten studiert werden.

Um der Frage nachzugehen, warum dieser alternative ORF in dem untersuchten NB benutzt wurde, wäre es interessant, zu untersuchen, ob die bekannte stromaufwärts gelegene CDS in dem Tumor mutiert war, oder ob dieser Tumor andere als die bekannten NF66/ α -internexin-mRNS-Spezies aufwies. Leider stand nicht genügend Tumorgewebe für Untersuchungen dieser Art zur Verfügung. Das Vorkommen von 018INX in anderen Geweben zu untersuchen, ist in Ermangelung eines Proteinnachweisverfahrens aktuell noch nicht möglich. Die Generation eines spezifischen mAK wird angestrebt, ist aber angesichts des kleinen Proteins nicht einfach.

018INX ist das erste Beispiel für ein 3'-UTR-codiertes Tumorantigen

018INX ist das erste Beispiel für ein Tumorantigen, welches von einem ursprünglich als 3'-UTR beschriebenen Bereich codiert wird. Inzwischen konnten aus peripheren PBMC der Patientin 018 mithilfe rekombinant exprimierten Proteins 018INX-spezifische CD4⁺ T-Zelllinien generiert und somit die zelluläre Immunerkennung des 018INX belegt werden (Behrends et al., Manuskript in Vorbereitung).

Ein zweites Beispiel für ein von 3'-UTR-Sequenzen exprimiertes Tumorantigen konnte später mittels SEREX aus Medulloblastomgewebe kloniert werden (Behrends *et al.* 2003). Dieses Antigen (MU-MB-50.63) wurde von dem Onkogen *rab18* codiert.

Die Verwendung alternativer ORF wurde in den letzten Jahren als ein wichtiger Mechanismus bei der Generierung von T-Zell-Epitopen in malignen Geweben identifiziert (Mayrand und Green 1998; Renkvist *et al.* 2001). Der erste Nachweis eines alternativ translatierten T-Zell-Epitops gelang mithilfe einer aus TIL eines Melanompatienten generierten CD8⁺ T-Zelllinie (Wang et al. 1996). Das HLA-A31-restringierte T-Zell-Epitop wurde vom *TRP1/gp75*-Gen codiert und war nicht tumorspezifisch, da auch normale Melanozyten erkannt worden waren. Allerdings führte die Infusion der autologen T-Zelllinie mit IL-2 zu einer Regression von Metastasen, was verdeutlichte, dass alternative Translationsprodukte immuntherapeutische Relevanz haben können, ohne tumorspezifisch zu sein (Wang und Rosenberg 1996).

Ebenfalls in Melanomzellen konnte ein alternativer ORF der LAGE-1/NY-ESO-1-mRNS gefunden werden, dessen Produkt CAMEL von HLA-A2-restringierten CD8⁺ T-Zellen aus Lymphknoten von Tumorpatienten erkannt wurde (Rimoldi *et al.* 2000; Slager *et al.* 2004).

Ein weiteres Beispiel ist ein HLA-B35-restringiertes Peptid aus einem alternativen ORF des Makrophagen-Koloniestimulierenden Faktors (*M-CSF*, *macrophage colony-stimulating factor*) Gens, welches von TIL aus einem Nierenzellkarzinom erkannt wurde. Dieser alternative ORF wird in verschiedenen Tumoren zusammen mit M-CSF aber auch in nicht M-CSF produzierenden Geweben wie Leber oder Nieren exprimiert (Probst-Kepper *et al.* 2001).

Darüber hinaus können durch Mutationen alternative ORFs entstehen. Bei ARTC1, isoliert aus einem Melanom, lässt eine Punktmutation ein Startcodon (AUG) entstehen, von dem das tumorspezifische Protein abgelesen wird (Wang *et al.* 2005).

Während die genannten alternativen ORF innerhalb der bekannten CDS der Gene lagen, konnte darüber hinaus ein MHC-I-restringiertes Epitop definiert werden, welches von der 5'-UTR des *c-akt* Onkogens codiert wurde (Uenaka *et al.* 1994). Inzwischen konnten auch Intronsequenzen als Ursprung von T-Zell-Epitopen ausgemacht werden (Guilloux *et al.* 1996).

Die publizierten Evidenzen und das eigene Beispiel eines 3'-UTR-codierten Tumorantigens wiesen auf eine bisher noch unterschätzte Quelle von T-Zell-Epitopen, die das Repertoire der Tumorantigene bereichern.

Mögliche Mechanismen der 018INX-Immunogenität und Bedeutung des 018INX für die Immuntherapie

Um den Nutzen von 018INX für eine Immuntherapie bewerten zu können, muss in der Zukunft geklärt werden, ob die tumorassoziierte Immunogenität auf einer tumorspezifischen Expression des alternativen Genprodukts, einer tumorassoziierten Überexpression oder z. B. einer aberranten Expression eines ZNS-Proteins in der Peripherie beruht. Nur tumorspezifische Antigene sind sichere Zielstrukturen für die aktive Immuntherapie oder die Immuntherapie mit T-Zellen. Allerdings werden auch im Tumor überexprimierte Antigene, so z. B. HER2/neu, erfolgreich bei der Tumorimmuntherapie eingesetzt (Menard *et al.* 2004), und AK können aufgrund der Bluthirnschranke selbst bei Expression des Antigenes im Gehirn segensreich sein. Im Hinblick auf eine mögliche immuntherapeutische Nutzung des 018INX wäre es von Interesse, ob die Bildung und Immunogenität von 018INX ein individuelles Ereignis war, oder ob 018INX-spezifische Immunreaktionen auch bei anderen Patienten mit NB nachzuweisen sind. Dazu sind serologische Analysen an größeren Patienten-Kohorten notwendig. Um die aufwendige Präabsorption und Plaque-Assay-Analyse der vielen Seren zu vermeiden, wird derzeit ein 018INX-spezifischer ELISA auf der Basis eines eukaryont exprimierten rekombinanten Proteins entwickelt. Nicht auszuschließen ist, dass 018INX nur im Kontext eines selteneren HLA-Typs immunogen wirkt und trotz breiter Expression in NB nur selten eine Immunerkennung erlaubt. Die Analyse der HLA-Restriktion des 018INX ist Thema laufender Experimente mithilfe der spezifischen CD4⁺ T-Zelllinie.

NF66/ α -internexin ist neuronenspezifisch und kommt in neuroektodermalen Malignomen vor

Das bekannte *NF66/ α -internexin*-Genprodukt wird in dem sich entwickelnden Nervensystem exprimiert und ist in der Entwicklung eines der ersten zentralen und peripheren Neurofilamente (Lariviere und Julien 2004; Barry *et al.* 2007). Erstmals nachgewiesen wurde *NF66/ α -internexin* in ZNS, Rückenmark und peripheren Nerven der adulten Ratte (Chiu *et al.* 1989). Foley und Kollegen detektierten *NF66/ α -internexin* in fast allen untersuchten NB, allen Ganglio-NB, Ganglioneuromen und einem Wilmstumor, der mutmaßlich neuronale Elemente enthielt. Alle untersuchten Retinoblastome, Medulloblastome, Rhabdomyosarkome, Ewing-tumoren und Lymphome waren negativ (Foley *et al.* 1994). Dafür, dass die periphere Expression des 018INX weitgehend auf NB/Ganglio-NB beschränkt ist, könnten die Ergebnisse der heterologen Serumanalyse sprechen, da sich bei keinem Patienten mit anderer Tumorentität und bei keiner Normalperson AK gegen 018INX nachweisen ließen. Für eine definitive Aussage sind jedoch Untersuchungen an einer größeren Anzahl von Patienten notwendig.

NF66/ α -internexin spielt eine entscheidende Rolle bei der Nervenzelldifferenzierung

Anhand von NB-Zellen ist gezeigt worden, dass das *NF66/ α -internexin* entscheidend an der Entwicklung der Polarität und damit Differenzierung von Nervenzellen beteiligt ist (Shea und Beermann 1999). Welche Funktion das SEREX-definierte, alternative Genprodukt hat und in welchen Geweben es vorkommt, ist bis *dato* nicht bekannt. Untersuchungen an Transfektanten und immunhistologische Untersuchungen mithilfe mAK wären weiterführend. Die Untersuchungen könnten möglicherweise einen Beitrag zu einem verbesserten tumorbiologischen Verständnis neuroektodermaler Neoplasien leisten.

018INX-spezifische AK eignen sich als Verlaufsmarker

Wie für AK gegen Hu-Antigene, Mu-MB-20.220 und NY-ESO-1 vorgeschlagen (Behrends *et al.* 2002; Behrends *et al.* 2003; Jäger *et al.* 1999) erwiesen sich auch anti-018INX-AK als mögliche serologische Parameter für den Krankheitsverlauf. Dabei gilt wie für die anderen AK, dass Titeranstiege vor Ausschluss oder Beweis einer Progression zusätzliche Diagnostik erfordern, und Titerabfälle wahrscheinlich keine klinische Signifikanz haben, da Antigenverlustvarianten ohne begleitende Immunreaktion auswachsen können.

V.3 Das neue Autoantigen NNP3

NNP3 ist eine neue aminoterninale Variante des NNP1/Nop52, welches wahrscheinlich in die rRNS-Prozessierung involviert ist

Das nukleäre Protein NNP1/Nop52 wird vom *NNP1*-Gen (D21S2056E) auf Chromosom 21 (21q22.3) codiert und ist das humane Homolog zu dem Protein RRP1 aus der Hefe, welches ribosomale RNS prozessiert und in Verbindung mit der Synthese der 28S rRNS steht. Es befindet sich während der Interphase am Nukleolus und während der Mitose an der Peripherie der Chromosomen. (Jansen *et al.* 1997; Savino *et al.* 1999).

Das SEREX-definierte Antigen NNP3 weist gegenüber dem bekannten nukleären Antigen NNP1/Nop52 neue 5'-cDNS-Sequenzen und dadurch bedingt ein neues aminoterninales Ende auf. Die Motivsuche innerhalb genomischer DNS wies auf eine Transkription der NNP3-mRNS von einem alternativen Intronpromotor. In der Genbank konnte eine weitere aminoterninale NNP1-Variante identifiziert werden, hier NNP2 genannt, welche aus Hodengewebe kloniert und durch alternatives Spleißen generiert worden war. Sie wies gegenüber NNP1 dieselben fünf stummen Basenaustausche auf wie das NNP3, so dass an diesen Positionen möglicherweise ein häufiger Polymorphismus vorliegt. Inwieweit die Funktion und zelluläre Lokalisation der NNP-Proteine durch die aminoterninale Variation moduliert wird, ist bis *dato* nicht bekannt.

NNP3 ist ebenso wie das Homolog NGO-St-143 ein Autoantigen

Über die Immunogenität eines NNP1-Genprodukts wurde bereits von Savino und Kollegen berichtet (Savino *et al.* 1999). Diese Arbeitsgruppe benutzte Serum eines männlichen Patienten nach Knochenmarktransplantation zur Detektion von NNP1/Nop52 im Western-Blot sowie in der Immunfluoreszenzfärbung von Zellkulturen. In welchem Zusammenhang die Knochenmarkstransplantation stand, ob sie allogene oder autolog war, und ob eine maligne Erkrankung vorlag, ist unbekannt. Aus der Arbeit ging damit nicht hervor, ob es sich bei dem Antigen um ein Autoantigen, ein Tumorantigen oder gar ein minor-Histokompatibilitäts-Antigen handelte, welches aufgrund eines möglichen Polymorphismus vom Spender-Immunsystem erkannt worden war. Die eigenen Daten für das Antigen NNP3 zeigten, dass das *NNP1*-Gen mindestens ein Autoantigen codierte. Wie in Kapitel IV.2.2 ausgeführt, gab es ein NNP3-Homolog, das im Rahmen eines SEREX-Screenings in Magenkarzinomgewebe (*stomach cancer*) identifiziert worden war. Es war entsprechend der SEREX-Terminologie als NGO-St-143 bezeichnet worden und zu 100 % identisch mit NNP1. Zu diesem Antigen gab es bereits eine heterologe Serumanalyse (SEREX Database). Dabei wurden AK gegen NGO-St-143 in Patienten mit malignen Magentumoren (8/31) und in Kontrollpersonen (7/50) detektiert, was die Eingruppierung der NNP-Antigen-Familie als Autoantigene untermauerte.

Die mRNA-Expression des NNP3 ist im Gegensatz zu NNP1 nicht ubiquitär, sondern wird gewebespezifisch über einen neuen Intronpromotor reguliert

In den Voruntersuchungen anderer Autoren stellte sich das humane NNP1/Nop52-Transkript in Northern-Blot-Analysen gesunder, humaner Gewebe als ubiquitär exprimierte 2,0 kB große Bande dar (Jansen *et al.* 1997; Savino *et al.* 1999). Darüber hinaus war eine Hochregulation der NNP-1-mRNS in Narbenkeloiden gegenüber gesunder Haut beschrieben worden (Na *et al.* 2004). In den eigenen Untersuchungen mittels RT-PCR konnte die ubiquitäre mRNA-Expression in Normalgeweben bestätigt und außerdem eine Expression in diversen Tumorgeweben nachgewiesen werden.

Im Gegensatz dazu wurde das neue Transkript NNP3 in den Organen Schilddrüse, Blase, Ovarien, Plazenta und Haut nicht nachgewiesen, und auch die vorbeschriebene NNP2-mRNS war in einigen Organen herunterreguliert. Dies lässt die Vermutung zu, dass der NNP3-Promotor und möglicherweise ein weiterer Intronpromotor gewebespezifisch reguliert werden.

Die NNP3-mRNS hat möglicherweise Bedeutung als neuer prognostischer Marker

Bei der mRNA-Expressionsanalyse von NNP3 in Tumorgeweben fiel eine Herunterregulierung in zwei aggressiv wachsenden NB mit *MYCN*-Genamplifikation, in zwei Medulloblastomen und einem Osteosarkom mit ebenfalls aggressivem Wachstum auf. Dies suggerierte einen Zusammenhang zwischen der Verwendung des alternativen Promotors und dem Wachstumsverhalten der Tumoren. Ob die mRNA-Expression von NNP3 als prognostischer Marker dienen kann, muss durch weitere Untersuchungen an einer größeren Anzahl von Patienten gezeigt werden. Da NNP1/Nop52 in die Prozessierung der 28S rRNS involviert ist, könnte man spekulieren, dass eine Herunterregulation der NNP3-Expression womöglich an dieser Stelle störend in die zelluläre Homöostase eingreift.

V.4 Das neue Autoantigen 018NAC

Das SEREX-definierte Antigen 018NAC ist identisch mit dem Transkriptionsfaktor α -NAC/NACA, der den tumorpathogenetisch interessanten JNK-Signaltransduktionsweg aktiviert

Bei α -NAC/NACA handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der die Aktivität des homodimeren c-Jun-Aktivators potenziert und somit in den c-Jun-N-terminale-Kinase (JNK)-Signaltransduktionsweg involviert ist. Eine Aktivierung der JNK und somit des Transkriptionsfaktors c-Jun kann durch verschiedene extrazelluläre Signale einschließlich inflammatorischer Zytokine und Wachstumsfaktoren sowie durch zellulären Stress induziert werden. Aktiviertes c-Jun schließt sich als Homo- oder Heterodimer mit c-Fos zum Aktivator-

Protein-1 (AP-1) zusammen, und reguliert auf diese Weise die Transkription verschiedener Gene (Moreau *et al.* 1998; Rospert *et al.* 2002; Weston und Davis 2007)

Als Transkriptionsfaktor mit Einfluss auf den JNK-Signaltransduktionsweg ist α -NAC/NACA eine entscheidende Schaltstelle für die Regulation verschiedenere zellulärer Funktionen (Rospert *et al.* 2002; Weston und Davis 2007). Eine Antagonisierung von α -NAC/NACA induziert beispielsweise die Proliferation, Differenzierung und zytotoxische Aktivität humaner CD8⁺ T-Zellen *in vitro* (Al-Shanti und Aldahoodi 2006). Darüber hinaus ist eine Aktivierung des JNK-Signaltransduktionsweges mit der Pathogenese von verschiedenen malignen Erkrankungen beim Menschen assoziiert (Kennedy und Davis 2003), so zum Beispiel mit der Pathogene und Progression von humanen Osteosarkomen (Papachristou *et al.* 2003). Papachristou und Kollegen detektierten α -NAC/NACA-Protein in fast allen untersuchten Osteosarkomen, nicht jedoch in gesundem Knochengewebe, und berichteten über eine Korrelation der α -NAC/NACA-Expression mit der histologischen Aggressivität der Tumoren. Es wird daher diskutiert, dass eine Überexpression von α -NAC/NACA z. B. über eine vermehrte Expression von Wachstumsfaktoren und Onkogenen zur Tumorentstehung bzw. -progression beitragen kann. Ob die α -NAC/NACA-Expression in Tumoren prognostische Bedeutung hat, ist noch nicht ausreichend untersucht.

Über die physiologische Regulation der α -NAC/NACA-Expression ist ebenfalls noch wenig bekannt. α -NAC/NACA wird in der adulten Maus in verschiedenen Geweben exprimiert und ist in der Embryonalentwicklung auf Knochen beschränkt (Yotov und St-Arnaud 1996; Moreau *et al.* 1998). Dass alternatives Spleißen prinzipiell zur gewebespezifischen Expression von α -NAC/NACA beitragen kann, ist aus dem Tiermodell bekannt. Durch Spleißen eines Prolinreichen Exons wird anstelle des ubiquitären Proteins der adulten Maus ein muskelspezifischer Transkriptionsfaktor exprimiert (Yotov und St-Arnaud 1996).

Über die Bedeutung von molekularen Modifikationen des α -NAC/NACA- ist wenig bekannt

Das α -NAC/NACA-Gen wurde auf Chromosom 12 kartiert (12q23-24.1) (Yotov und St-Arnaud 1996) und codiert verschiedene Transkripte. Das 5'-Ende der 018NAC-cDNS wurde den Homologierecherchen zu Folge entsprechend der NACA- und nicht der α -NAC-mRNS gespleißt. Welche Funktion die Intronsequenzen der 5'-UTR von α -NAC haben, welche Rolle der außergewöhnlich lange 5'-UTR der FLJ3331 fis-Variante spielt, und ob sich die unterschiedlichen 5'-UTR möglicherweise auf die Expression der verschiedenen Spleißvarianten auswirken, ist bislang unbekannt. In den letzten Jahren wurden neben der FLJ33331 fis-cDNS mehrere gegenüber der NACA-cDNS 5'-erweiterte cDNS aus

verschiedenen Geweben einschließlich des NB kloniert. An den Positionen der CDS, wo die α -NAC- von der NACA-Sequenz abwich, zeigten alle diese Transkripte dieselben Nukleotide wie α -NAC, FLJ33331 fis und 018NAC, so dass es sich bei den Abweichungen der aus fetalem Gehirn klonierten NACA-CDS möglicherweise um seltene Polymorphismen handelte. Die Genprodukte der beschriebenen humanen Spleißvarianten sind alle identisch.

Das gehäufte Vorkommen der anti-018NAC-AK bei Tumorpatienten könnte durch eine tumorassoziierte Überexpression des Antigens bedingt sein

Mit 018NAC wurde zum zweiten Mal eine Immunogenität von α -NAC/NACA-Genprodukten belegt. Zuvor war mit SEREX bereits das homologen Antigen NY-Co-2 aus Kolonkarzinomgewebe kloniert worden. Zu diesem Antigen gab es allerdings keine heterologen Serumanalysen. Die eigene Arbeit belegte somit erstmals, dass das α -NAC/NACA-Gen für Autoantigene codiert, und dass 018NAC-Homologe damit trotz Überexpression in Tumoren wahrscheinlich keine geeigneten Zielstrukturen für Tumorigenstoffe bieten.

Die anti-018NAC-AK wurden wie andere Auto-AK (Behrends et al. 2003) bei Tumorpatienten häufiger detektiert als bei gesunden Kontrollpersonen. Die verstärkte Immunogenität von 018NAC im Kontext mit Tumoren ließe sich gut mit der von anderen Autoren belegten tumorassoziierten Überexpression erklären (Magi-Galluzzi et al. 1998; Papachristou et al. 2003). Das relativ häufige Vorkommen der anti-018NAC-AK bei Tumorpatienten (20 %) erlaubt Überlegungen zur diagnostischen Anwendung. Da die anti-018NAC-AK-Titer positiv mit der Entwicklung der Tumorlast korrelierten, wäre es zum einen interessant, ihre Eignung als Verlaufsmarker zu testen. Da die humorale Immunantwort eventuell durch eine Überexpression der α -NAC/NACA-Antigene in Tumoren induziert wird, und letztere wiederum möglicherweise mit hoher Aggressivität assoziiert ist, sollte auch eine mögliche prognostische Bedeutung des AK-Vorkommens untersucht werden.

V.5 Das bekannte Autoantigen 018HSP

018HSP entspricht einem Teil des molekularen Chaperons Hsp90 α

Das Antigen 018HSP war im klonierten Bereich mit Hsp90 α identisch. Die Identifikation von mit SEREX war nicht überraschend, da humorale Immunreaktionen gegen Hsp90 bei gesunden Probanden, Krebspatienten und Patienten mit Autoimmunkrankheiten vorbeschrieben sind.

Hsp90 α gehört zur großen Protein-Familie der molekularen Chaperone, deren Hauptfunktion in der Sicherstellung der richtigen Faltung anderer Proteine liegt. Besonders wichtig wird ihre Funktion bei zellulärem Stress, jedoch spielen sie auch in der normalen Homöostase der Zelle eine entscheidende Rolle (Csermely et al. 1998; Whitesell und Lindquist 2005). Über den

Schutz von Konformation und Stabilität beeinflusst Hsp90 die Aktivität, den Abbau und den weiteren Weg anderer Proteine in der Zelle. Unter den zahlreichen Zielproteinen befinden sich viele mit Funktionen im Bereich der Signaltransduktion und Regulation der Transkription, darunter sich viele „onkogene“ Proteine wie z. B. c-Raf-1, ErbB2 oder mutiertes p53 (Workman 2004; Tsutsumi und Neckers 2007; Xu und Neckers 2007). Deshalb stellt Hsp90 einen vielversprechenden Angriffspunkt für neue Tumorthérapien dar (s. u.)

Hsp90 α ist im Gegensatz zur konstitutiven Variante Hsp90 β in vielen Geweben induzierbar

Hsp90 α wird von genomischen Sequenzen auf Chromosom 14q32.3 codiert und stellt neben dem Hsp90 β , dessen Gen auf Chromosom 6p21 liegt, eine Isoform des Hsp90 dar (Vamvakopoulos *et al.* 1993). Es wurden auch auf anderen Chromosomen Kopien der beiden Hsp90 Formen gefunden, bei denen es sich jedoch um Pseudogene handeln könnte (Sreedhar *et al.* 2004). Die Expression der α -Variante ist in den meisten Zellen niedriger jedoch stark induzierbar, wohingegen die β -Variante konstitutiv vorkommt und weniger stark induzierbar ist. Hsp90 α wird vor allem in Gehirn und Testes exprimiert (Csermely *et al.* 1998). Mit Hsp90N konnte eine dritte Variante identifiziert werden, die in Verbindung mit maligner Transformation steht (Grammatikakis *et al.* 2002). Kürzlich wurde gezeigt, dass die Aktivität des Hsp90 α -Promtors durch NF κ B-Transkriptionsfaktoren reguliert wird (Ammirante *et al.* 2007). Als Induktoren der Hsp sind verschiedene Stressfaktoren einschließlich der namengebenden Temperaturerhöhung bekannt (Sreedhar *et al.* 2004)

Da sich die beiden Hsp-90-Varianten α und β in ihren molekularen Charakteristika und ihrer Funktion nicht wesentlich unterscheiden, wird in vielen Untersuchungen nicht zwischen den beiden Formen differenziert und nur von Hsp90 gesprochen.

Zellmembranständiges HsP90 spielt wahrscheinlich eine wichtige Rolle in der Tumormetastasierung, aber auch bei der physiologischen Zellmigration

Die Hsp90-Proteine sind normalerweise zytosolische Proteine, wurden jedoch auch auf der Oberfläche von Tumorzellen nachgewiesen (Tsuboi *et al.* 1994; Multhoff *et al.* 1995). Kürzlich wurde eine Korrelation der membranständigen Expression von Hsp90 mit der Progression von Melanomen beschrieben (Becker *et al.* 2004). Eine Inhibition der Zelloberflächenexpression von Hsp90 mit AK oder nicht-zellpermeablen Hsp90-Inhibitoren blockiert die Zellmotilität und Invasion *in vitro* und die Tumormetastasierung *in vivo* (Stellas *et al.* 2007). Deshalb spielt membranständiges Hsp90 wahrscheinlich eine einzigartige Rolle in der Disseminierung maligner Erkrankungen, die möglicherweise die intrazellulären Funktionen des Proteins

komplementiert (Tsutsumi und Neckers 2007). Interessant sind in diesem Zusammenhang auch tierexperimentelle Evidenzen dafür, dass membranständiges Hsp90 in die physiologische Migration von Zellen, z. B. bei der neuronalen Entwicklung des Gehirns involviert ist (Sidera *et al.* 2004).

Hsp90 α ist an der Induktion von Immunreaktionen gegen maligne Tumoren beteiligt

Hsp wird eine wichtige Rolle bei der Induktion von Immunreaktionen im Kontext von Malignomen, Autoimmunerkrankungen und Infektionen zugeschrieben. Sie tragen zur Induktion der Immunantwort bei, indem sie die gebundene Peptide zu APC dirigieren und in diesen einen Reifungsprozess auslösen (Csermely *et al.* 1998; Castelli *et al.* 2004).

Zunächst war Hsp90 α als tumorspezifisches Antigen auf der Oberfläche verschiedener Tumorzellen angesehen und damit seine tumorassoziierte Immunogenität begründet worden (Srivastava *et al.* 1986; Ullrich *et al.* 1986). Später zeichnete sich ab, dass die tumorassoziierte Induktion von humoralen Immunantworten gegen Hsp eher durch Proteine, die im Tumor überexprimiert oder tumorspezifisch waren und an Hsp hafteten, vermittelt wurde als durch die Hsp selbst (Csermely *et al.* 1998). Passend dazu wurden im Kontext von humoralen Immunantworten gegen Hsp eindrucksvolle tumorprotektive Effekte beobachtet. So erfuhren z. B. Mäuse mit Sarkomen bei der Immunisierung mit aus Sarkomgewebe isolierten Hsp70 eine Krankheitsremission nicht jedoch mit Hsp70, das aus gesundem Gewebe isoliert oder von gebundenen Proteinen gereinigt worden war (Udono und Srivastava 1993).

Bezüglich der rezeptorvermittelten Aufnahme von an Hsp gebundenen Peptiden durch dendritische Zellen, konnte eine Hsp-vermittelte Kreuzpräsentation nachgewiesen werden, welche eine CD8⁺ T-Zell Antwort induzierte (Kurotaki *et al.* 2007). Diese Beobachtungen legten eine hohe therapeutische Relevanz von Hsp-Extrakten aus Tumoren nahe (s. u.).

Die Expression von Hsp90 α und die Hsp90-spezifische AK-Antwort könnten im Kontext von malignen Erkrankungen von prognostischer Bedeutung sein

Dass Serum-AK gegen Hsp90 bei Krebspatienten ebenso wie die Hsp90-Expression im Tumor von prognostischer Bedeutung sein könnten, zeichnete sich bereits vor mehr als zehn Jahren ab. Bei Patientinnen mit Mammakarzinom war sowohl die Hochregulation der anti-Hsp90-AK-Produktion als auch eine Hsp90 α -Überexpression mit einer schlechteren Prognose vergesellschaftet (Conroy und Latchman 1996; Pick *et al.* 2007). Darüber hinaus fand sich eine Assoziation der Hsp90-Überexpression mit Pankreaskarzinomen, nicht aber mit benignen Pankreastumorvarianten (Ogata *et al.* 2000) sowie mit prognostisch ungünstigen Formen des

Ovarialkarzinoms (Luo *et al.* 2002), Nierenzellkarzinoms (Cardillo und Ippoliti 2007) und Hochrisikoleukämien (Sreedhar *et al.* 2004). Eine erhöhte Expression von Hsp90 ist darüber hinaus bei hochgradigen NHL beschrieben, ohne dass sich prognostische Parameter aus dieser Beobachtung ableiten ließen. Das Vorkommen der Antigene ist hier möglicherweise weniger diagnostisch als therapeutisch relevant (Valbuena *et al.* 2005).

Eine mögliche Erklärung für die Assoziation der Hsp90-Expression mit aggressivem Tumorphänotyp ist wahrscheinlich eine Stabilisierung von Proteinen, die in Wachstum, Zellzyklus oder Zellmigration (s. o.) involviert sind (Stellas *et al.* 2007). In Fibroblasen der Ratte führte eine Überexpression von Hsp90N über eine vermehrte Raf/Ras-Aktivität zur Transformation der Zellen (Grammatikakis *et al.* 2002).

Überraschenderweise zeigte sich in der Untersuchung von Yang und Kollegen im Kontext des pädiatrischen Wilmstumors eine erhöhte Hsp90-Expression mit einer besseren Prognose vergesellschaftet (Yang *et al.* 2006), die klinische Bedeutung dieses Befundes ist jedoch noch umstritten (Hauser *et al.* 2006). Bei Patienten mit Osteosarkom war der Nachweis von anti-Hsp90-AK mit einem besseren Ansprechen auf die Chemotherapie und mit fehlender Metastasierung assoziiert (Csermely *et al.* 1998; Trieb *et al.* 2000).

Die Tatsache, dass es diverse Evidenzen für eine diagnostische Potenz von anti-Hsp90-AK und Hsp90-Expression gab, ermutigt zu zukünftigen Untersuchungen dieser Parameter bei einer größeren Kohorte pädiatrischer Patienten. Die in der eigenen Arbeit ermittelte, relativ hohe Gesamtinzidenz von anti-Hsp90-AK bei Kindern mit malignen Erkrankungen (30 %) läßt eine solche serologische Reihenuntersuchung besonders lohnenswert erscheinen.

Im Kontext rheumatischer Erkrankungen haben Hsp90-AK möglicherweise sowohl pathogenetische als auch diagnostische und Bedeutung

Anti-Hsp90-AK wurden im Kontext verschiedener Autoimmunerkrankungen nachgewiesen. Schon länger bekannt sind anti-Hsp90-AK beim systemischen Lupus erythemathodes (Minota *et al.* 1988). Bei den betroffenen Patienten konnte eine Induktion von Hsp90 durch das erhöhte IL-10 nachgewiesen werden (Ripley *et al.* 1999).

Auch bei einem großen Teil der Patienten mit Multiple Sklerose und Guillain-Barré Syndrom wurden anti-Hsp90-AK detektiert (Yonekura *et al.* 2004). Pathogenetisch interessant bei der Multiple Sklerose ist, dass die AK in der Zellkultur Oligodendrozyten- Vorläufer lysierten, was *in vivo* zu einer verminderten Remyelinisierung im Bereich der krankheitstypischen neuronalen Läsionen führen könnte (Ripley *et al.* 1999). Für Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises wurde auch eine prognostische Bedeutung von anti-Hsp90-AK vorgeschlagen. Die Tatsache, dass sich IgG-AK gegen Hsp90 besonders häufig bei Patienten mit lange

bestehender Rheumatoider Arthritis und Gelenkerosionen fanden, legte nahe, dass die humorale Immunantwort gegen Hsp90 auf eine schlechtere Gelenkprognose weisen könnte (Hayem *et al.* 1999), wobei darüber kontroverse Daten vorliegen (Gossec *et al.* 2004).

Probleme beim Vergleich der serologischen Daten verschiedener klinischer Studien

Die zitierten klinischen Analysen sind bezüglich ihrer Definition eines seropositiven Individuums nicht einheitlich. Der Grenze zwischen Kontroll- und pathologischen Werten wurde entweder oberhalb der maximalen anti-Hsp90-AK-Titer von Normalpersonen oder an der Nachweisgrenze des serologischen Verfahrens angesetzt (Yonekura *et al.* 2004). Die Inzidenz pathologischer Werte ist im letzteren Falle stark von der Sensitivität des Nachweises abhängig. Es verwundert somit nicht, dass die Angaben zur Häufigkeit von anti-Hsp90-AK bei der Normalbevölkerung in den publizierten Untersuchungen stark schwankten. Bei der Analyse von 48 gesunden Probanden mittels ELISA und 1:50 verdünntem Serum fanden z. B. Hayem und Kollegen 2,7 % seropositive Individuen (Hayem *et al.* 1999). In den eigenen Analysen mit 1:100 verdünntem Serum waren dagegen bei ca. 23 % der jungen Probanden anti-Hsp90-AK nachweisbar. Bis zur Umsetzung der oben zitierten, vielversprechenden experimentellen Evidenzen in prediktive diagnostische Tests ist somit noch ein Stück Weg zu gehen.

Hsp90 ist ein vielversprechender Angriffspunkt für neue Formen der Tumorthherapie

Als gut etabliertes Prinzip der Tumorummuntherapie wurde auch im Kontext von Hsp90 zunächst der Einsatz von AK diskutiert. Die Idee der AK-Therapie rührte von dem Befund, dass Hsp90 auf der Zelloberfläche von Tumorzellen, und nur in geringem Maß auf immunologisch zugänglichen, gesunden Körperzellen gefunden wurde (Ullrich *et al.* 1986; Ferrarini *et al.* 1992; Tsutsumi und Neckers 2007). Im Melanom-Mausmodell konnte der therapeutisch einsetzbare anti-Hsp90-AK Zellmigration inhibieren und Melanometastasen unterdrücken (Stellas *et al.* 2007).

Eine weitere Form der therapeutischen Targetierung von Tumoren über Hsp90 besteht in der aktiven Vakzinierung mit Hsp. Grundlage für diesen Ansatz waren die Beobachtung, dass aus autologem Tumor isoliertes Hsp in Mäusen eine T-Zellantwort gegen weitere Proteine aus den Ursprungstumoren auslöste (Schild *et al.* 1999). Die Hsp vermittelten dabei eine rezeptorabhängige Endozytose der Proteine durch pAPC und leiteten die Peptide zu den Kompartimenten für die weitere Präsentation auf MHC-Molekülen. Die rezeptorvermittelte Endozytose führte außerdem zur Reifung der pAPC (Castelli *et al.* 2004). Analog dazu wurden in zwei klinischen Studien Melanom- bzw. Kolonkarzinompatienten mit gp96 vakziniert, welches aus autologem Tumor isoliert worden war und ein Homolog des Hsp90 im

Endoplasmatischen Retikulum ist. In beiden Studien konnte in einem großen Teil der Patienten eine Induktion bzw. Verstärkung der tumorspezifischen T-Zellantwort erreicht werden (Belli *et al.* 2002; Mazzaferro *et al.* 2003).

Eine interessante therapeutische Idee war die molekulare Antagonisierung des Hsp und damit die Inhibition Hsp-abhängiger, onkogener Prozesse. In jüngerer Zeit wurden diverse Substanzen verfügbar, mit denen die Wirkung von Hsp90 *in vitro* und *in vivo* unterdrückt werden konnte. Der Einsatz dieser Antagonisten führte zu einem schnelleren proteolytischen Abbau von verschiedenen Onkoproteinen und somit zu einer Inhibition onkogener Signalwege (Powers und Workman 2007; Xu und Neckers 2007). Mit dem Ansamycin-basierten Geldanamycin wurde ein Inhibitor gefunden der *in vitro* und *in vivo* eine vielversprechende antitumoröse Wirkung, jedoch auch eine unakzeptable Hepatotoxizität aufwies (Supko *et al.* 1995). Mit dem Derivat 17-AAG wurde ein Medikament verfügbar, welches in klinischen Phase I/II Studien eine tolerable Toxizität aufwies und bei Melanompatienten eine antitumoröse Wirkung zeigte (Banerji *et al.* 2005). Aktuell werden weitere Hsp-Inhibitoren getestet.

Zusammenfassend stellt Hsp90 als Vertreter der großen Gruppe molekularer Chaperone somit ein vielversprechendes Zielprotein für die zukünftige Tumortherapie und -diagnostik dar.

V.6 Neue Ansätze zur Identifikation von Tumorantigenen

Für die Fortentwicklung der tumorantigenspezifischen Therapie und Diagnostik ist die Identifikation weiterer Tumorantigene weiterhin unabdingbar. Innovative serologische und T-Zell-basierte Methoden erscheinen hier vielversprechend.

Innovationen bei den serologischen Suchverfahren

Zur gezielten Identifikation von CT-Antigenen wurde eine erste Variation des serologischen Ansatzes eingeführt. Hier wurde die cDNS-Bibliothek mit Hilfe von Testisgewebe generiert. Um die Suche auf tumorspezifische Antigene einzuschränken, wurden manche Testis-cDNS-Bibliotheken nach Subtraktion von cDNS, die auch in anderen Normalgeweben vorkamen, zum Einsatz. Dieser Ansatz führte zur Entdeckung verschiedener CT-Antigene wie z. B. Vertretern der SSX Familie (Gure *et al.* 1997), SCP-1 (Tureci *et al.* 1998), HOM-TES-85/CT8 (Tureci *et al.* 2002) und CAGE-1 (Park *et al.* 2003).

Alternativ zu Tumorgewebe wurden bei manchen SEREX-Analysen auch Tumorzelllinien als cDNS-Quelle eingesetzt. Obwohl damit der Vorteil der *ex vivo*-Situation verloren geht, hat auch dieser Ansatz zur Identifikation neuer Antigene beigetragen. So z. B. mit Hilfe der Melanom-Zelllinie SK-MEL-37 und Serum eines Patienten mit AK gegen bekannte CT-Antigene ein neuer Vertreter der CT-Familie, das CT7-Antigen, gefunden (Chen *et al.* 1998).

In anderen Untersuchungen wurde die repräsentative Differenzanalyse (RDA, *representational difference analysis*) mit der SEREX-Methode kombiniert. So wurde beispielsweise das CT-Antigen CT10 durch RDA als eine mRNA identifiziert, die in SK-MEL-37 stark, jedoch nicht in normalem Hautgewebe exprimiert wird. CT10 wurde deshalb in Phagen kloniert und seine Immunogenität mithilfe von Plaque-Assays im Sinne der heterologen Serumanalyse mit Proben von Tumorpatienten getestet (Gure *et al.* 2000).

Durch den Einsatz gepoolter Seren konnte eine Verbesserung der Sucheffizienz erreicht werden. So wurde mittels eines Pools aus fünf Seren von Patienten mit Magenkarzinom eine cDNS-Bibliothek aus einer Magenkarzinom-Zelllinie untersucht und dabei das Antigen CAGE identifiziert (Cho *et al.* 2002). Bei der Suche nach Autoantigenen wurde Serum von zwölf gesunden Spendern erfolgreich gegen eine cDNS-Bibliothek eines Meningioms getestet und 15 Autoantigene identifiziert (Comtesse *et al.* 2000). In der eigenen Arbeitsgruppe wurden mithilfe von Serumpools inzwischen bis zu 30 verschiedene Antigene aus einer einzigen Tumor-cDNS-Bibliothek kloniert (Götz 2006).

Als alternative zum Serum von Tumorpatienten wird auch nach neuen AK-Sonden gesucht. Z. B. wurden humane IgG-AK aus B-Zellen des peripheren Blutes, aus Tumorgewebe oder Lymphknoten von Tumorpatienten generiert. Auch IgA von Myelom-Patienten wurde in SEREX-Analysen eingesetzt (Xie *et al.* 2001). Interessant war die Beobachtung, dass anti-NY-ESO-1-AK bei Patienten mit hohen Serumtitern auch im Urin nachzuweisen waren, so dass auch Urin als AK-Sonde für das SEREX-Screening untersucht wurde (Jager *et al.* 2002).

Das klassische Expressionssystem des SEREX-Verfahrens basiert auf dem „Uni-ZAP[®] XR“-Vektor der Firma Stratagene. Alternativ können die rekombinanten Proteine aber auch auf der Oberfläche des filamentösen M13-Phagen exprimiert, und so ein höherer Durchsatz von Klonen erzielt werden (Fossa *et al.* 2004). Durch Einsatz eukaryonter Expressionssysteme wurden auch postranskriptionelle Aspekte der Antigenexpression berücksichtigt. In Hefezellen können z. B. Veränderungen durch Glykolysierung erfasst werden, die bei der Expression in Prokaryonten verloren gehen (Mischo *et al.* 2003).

Als Alternative zum Ausschluss von IgG-Klonen durch eine parallele Pufferinkubation wurde die Vorabinkubation und Färbung derselben Membran mit einem Merrettichperoxidasegekoppelten anti-IgG-AK vorgeschlagen (Tureci *et al.* 1997). Diese Strategie kann bei der Analyse von IgG-reichen cDNS-Bibliotheken eine signifikante Arbeitserleichterung darstellen.

Als Alternative zur serologischen Antigen suche auf cDNS-Ebene wurde das sogenannte AMIDA-Verfahren etabliert (*autoantibody-mediated identification of antigens*). Hier werden Tumorslysate in zwei Parallelansätzen mit Serum betroffener Patienten und Serum gesunder Kontrollen immunpräzipitiert, jeweils durch zweidimensionale Gelelektrophorese aufgetrennt,

und die tumorassoziierten Antigene massenspektroskopisch analysiert (Gires *et al.* 2004). Vorteil des Verfahrens ist der direkte Weg zur Proteinsequenz, die bei SEREX sekundär ermittelt werden muss. Entscheidende Nachteile dieses Verfahrens sind die anspruchsvollen technischen Voraussetzungen und der große Bedarf an Tumorgewebe.

Neue Ansätze zur direkten Antigenidentifikation mit tumorspezifischen CD4+ T-Zellen

CD4+ T-Zellen sind in den letzten Jahren aus dem Schatten der CD8+ T-Zellen herausgetreten, da ihre zentrale Rolle bei der Initiation und Aufrechterhaltung der Tumorimmunantwort immer deutlicher wurde (Pardoll 2002; Shiku 2003). Damit gewannen auch MHC-Klasse II-restringierte Tumorantigene zunehmend an Interesse. Da die Erkennung serologisch identifizierter Antigene durch CD4+ T-Zellen immer sekundär mit Hilfe rekombinanten Antigens untersucht werden muss, wurden dringend zuverlässige, direkte Verfahren zur Identifikation von MHC Klasse II-restringierter Tumorantigene gesucht.

Der technisch außerordentlich aufwendige „biochemische“ Ansatz konnte inzwischen auch für MHC Klasse II-restringierte Antigene etabliert werden (vgl. Kapitel I.4.1.1.). Das Verfahren ist jedoch weltweit bislang nur in wenigen, spezialisierten Labors etabliert (Pieper *et al.* 1999; Dengjel *et al.* 2004). Wegen der unterschiedlichen biochemischen Eigenschaften von verschiedenen Proteinen, müssen die Aufreinigungsschritte hier für jedes Antigen neu optimiert werden, und der Bedarf an Ausgangsgewebe ist außerordentlich hoch. Wenn es sich um gering exprimierte Antigene handelt, ist dieser Ansatz wenig aussichtsreich.

In der eigenen Arbeitsgruppe wurde kürzlich ein neuer, „genetischen“ Ansatz zur direkten Antigenidentifikation (DANI) mit CD4+ T-Zellen entwickelt. Bei DANI wird eine cDNS-Bibliothek des Tumors mit mehrfach schneidenden Enzymen vorbehandelt, und die einzelnen kleinen Fragmente in prokaryonte Expressionsvektoren inkliniert. Pools rekombinanter Bakterien wurden dann mit pAPC inkubiert, und die beladenen APC in mit vorcharakterisierten, autologen CD4+ T-Zelllinien auf eine Antigenerkennung getestet. Jeder erkannte Bakterienpool wird subkloniert, und schließlich die cDNS des verantwortlichen Bakterienklons isoliert und sequenziert. Diese Strategie erscheint derzeit außerordentlich vielversprechend (Milosevic *et al.* 2006).

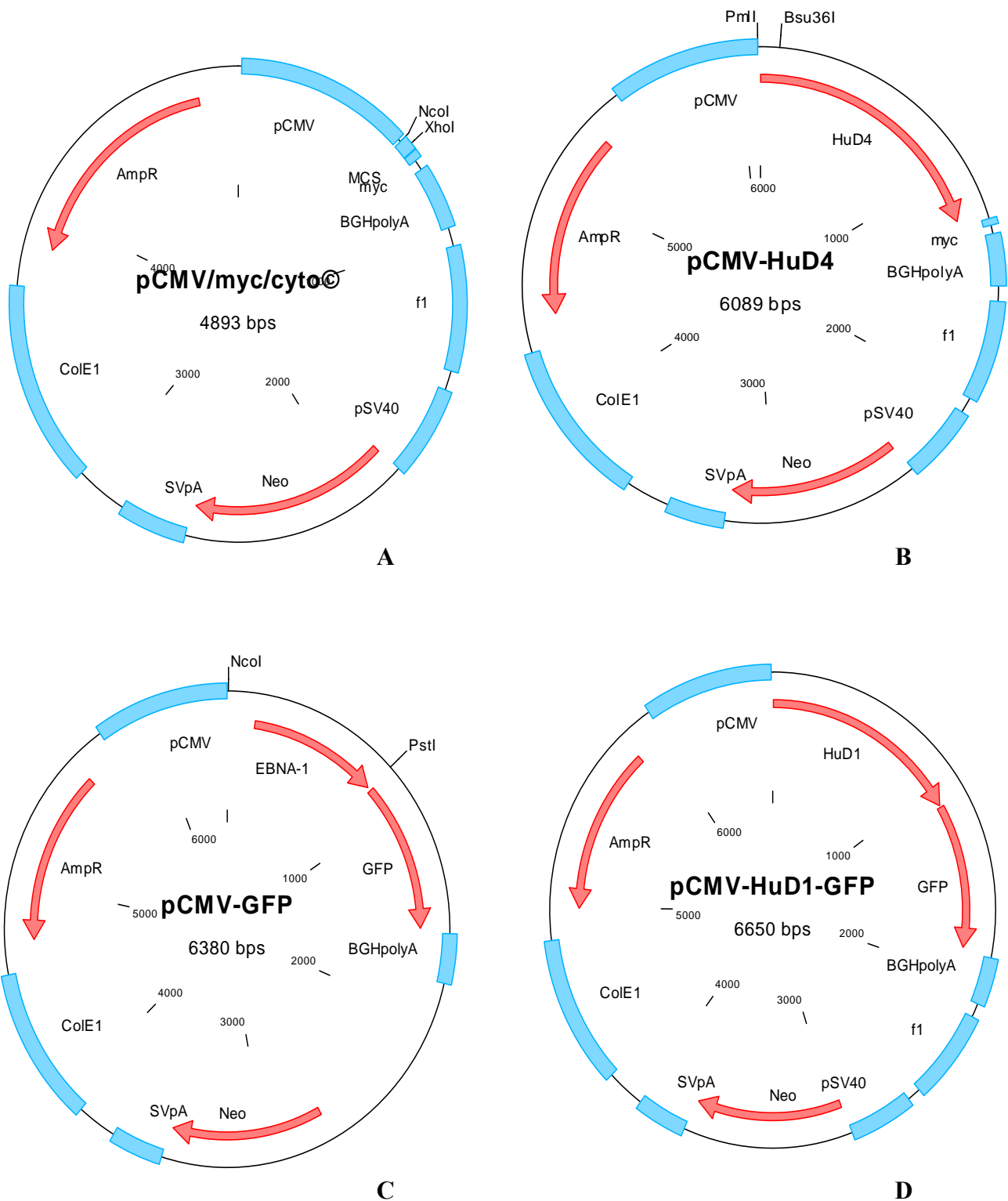
Entscheidender Nachteil aller direkten T-Zell-Verfahren bleibt die Unabdingbarkeit einer vorcharakterisierten tumorspezifischen T-Zelllinie, die nur durch repetitive Stimulation mit Zelllinien aus dem ursprünglichen Tumor generiert werden kann. Für alle Tumorentitäten, deren Zellen sich nicht *ex vivo* expandieren lassen, bleibt der serologische Ansatz somit trotz Innovationen bei den T-Zell-Verfahren die Methode der Wahl.

VI Ausblick

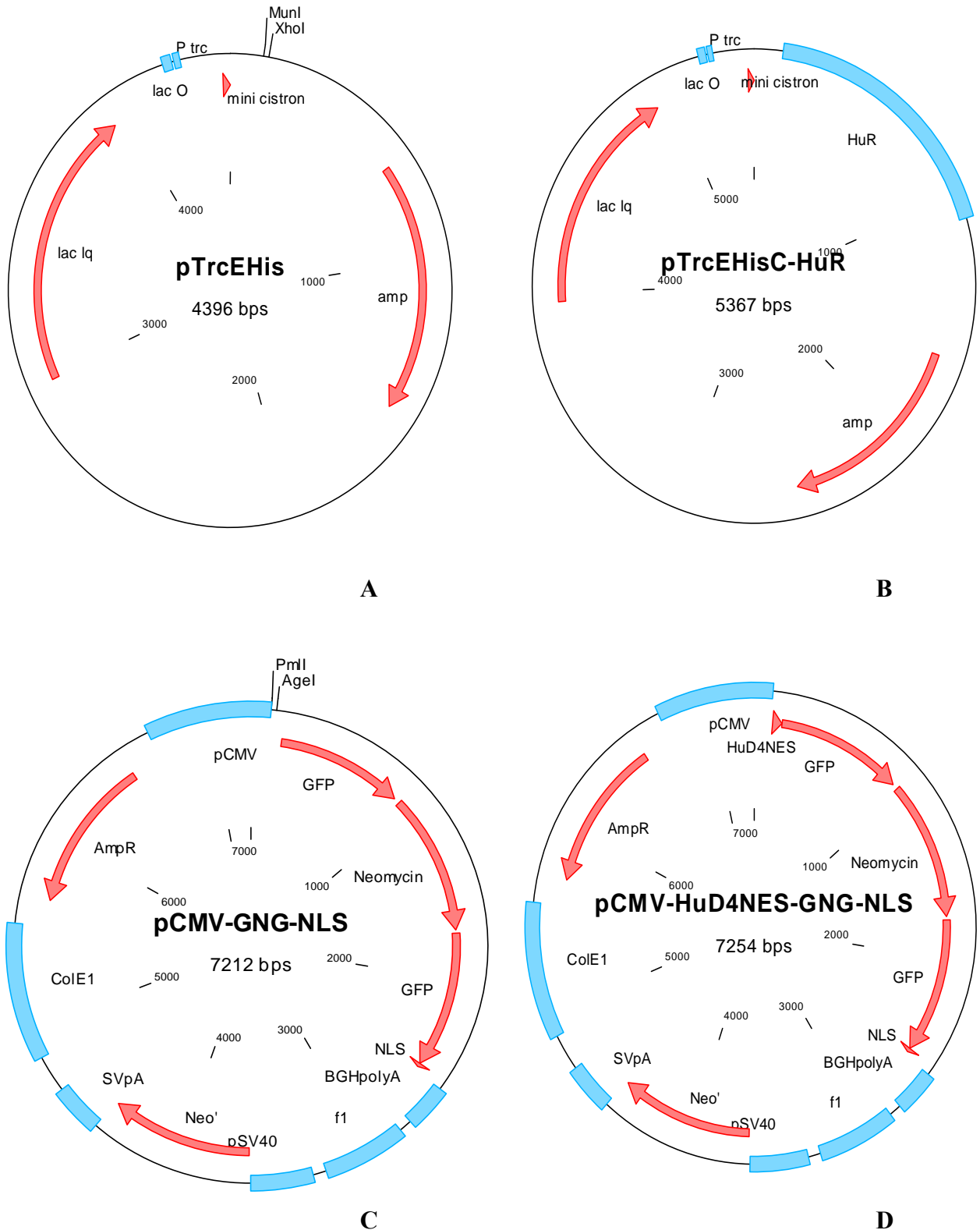
Das in dieser Arbeit erstmals auf ein NB angewandte SEREX-Verfahren erwies sich auch in diesem Kontext als ein zuverlässiges und effizientes Verfahren zur Identifizierung von Tumorantigenen. Die gewonnenen Ergebnisse lieferten eine vielversprechende Basis für breit angelegte SEREX-Analysen verschiedener pädiatrischer Malignome. Die Einführung von in dieser Arbeit diskutierten, methodischen Modifikationen waren bei jüngeren Untersuchungen bereits hilfreich. Mit den identifizierten NB-Antigenen konnten sowohl immuntherapeutisch interessante Moleküle als auch neue diagnostische Marker vorgeschlagen werden. Ihre klinische Relevanz wird derzeit je nach Anwendungsziel mithilfe von Serum- und Gewebeproben größerer Patientenkohorten und zusätzlichen immunologischen Assays genauer evaluiert. Mit der Charakterisierung neuer Hu-Antigenvarianten und der Identifizierung eines neuen Kernexportsignals in einer dieser Varianten bot die Arbeit darüber hinaus neue Einblicke in die molekulare Basis der aggressiven Tumorentität und assoziierter paraneoplastischer Immunreaktionen. Zusammenfassend gaben die Ergebnisse dieser Arbeit Anlass zu klinisch und grundlagenwissenschaftlich orientierten Anschlussuntersuchungen, die das Verständnis der Tumorumerkennung bei Kindern erweitern und somit Ausgangspunkte für ergänzende Therapieansätze liefern sollen.

VII Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden durch serologische Analyse einer Tumor-cDNA-Expressionsbibliothek (SEREX) neue Tumorantigene des Neuroblastoms identifiziert. Die Antigene wurden einer cDNA-Sequenzanalyse und -Homologiereche zugeführt, ihre mRNA-Expression mithilfe der RT-PCR in gesunden und maligne transformierten Geweben studiert, das spezifische Antikörpervorkommen durch autologe und heterologe serologische Analysen charakterisiert, und in besonderen Fällen die Antigenexpression am Zellkulturmodell und in Gewebeschnitten studiert. Sechs der zehn Antigene waren neue Produkte bekannter Gene. Die Antigene HuD3, HuD4 und HuC-L wurden als Spleißvarianten bekannter Hu-Tumorantigene identifiziert, die für paraneoplastische Neuropathien verantwortlich gemacht werden. Die Klonierung neuer 5'-mRNA-Sequenzen des bekannten Antigens HuD1 erlaubte darüber hinaus die Charakterisierung eines neuen, in aggressiven Neuroblastomen herunterregulierten *HuD*-Intronpromoters. Aufgrund ihrer Gewebeverteilung wurden die neuen HuD-mRNA-Sequenzen als prognostische- bzw. MRD-Marker vorgeschlagen. Die serologischen Analysen der Hu-Antigene belegten erstmals das Vorkommen von anti-Hu-Antikörpern bei verschiedenen pädiatrischen Tumorerkrankungen und wiesen auf eine mögliche Bedeutung von anti-Hu-Antikörpern als Verlaufsmarker hin. Im aminoterminalen Ende der neuen Variante HuD4 konnte ein leucinreiches, hochpotentes Kernexportsignal identifiziert werden, welches HuD4 CRM1-abhängig in das Zytosol exportierte. Immunhistologische Untersuchungen von normalem Gehirn- und verschiedenen Neuroblastomgeweben deuteten auf eine tumorbiologische Relevanz der intrazellulären HuD-Antigenverteilung hin. Das neue Tumorantigen 018INX war das Produkt eines Abschnitts der α -Internexin-mRNA, der bisher als 3'-UTR beschrieben worden war, und repräsentierte damit einen neuen Typ von Tumorantigenen. Die Serumtiter der anti-018INX-AK korrelierten ebenfalls mit der Tumorlast und hatten somit Relevanz für die Verlaufskontrolle. Das Autoantigen NNP3 stellte eine neue aminoterminal Variante des nukleären Proteins NNP1/Nop52 dar, welches in die rRNA-Prozessierung involviert ist. Im Gegensatz zum ubiquitären Homolog wurde NNP3 gewebespezifisch von einem neuen Intronpromotor exprimiert, dessen Aktivität im Kontext aggressiver Tumoren ebenfalls herunterreguliert war. Das Antigen 018NAC war identisch mit dem Transkriptionsfaktor α -NAC/NACA, welcher in die Pathogenese verschiedener maligner Erkrankungen involviert ist. Das inkomplett klonierte Antigen 018HSP war mit Hsp90 α identisch, welches im Kontext von Tumoren diagnostische und therapeutische Bedeutung hat. Zusammenfassend konnte die Arbeit Beiträge zu neuen diagnostischen und therapeutischen Ansätzen liefern und neue Einblicke in die Biologie und Immunerkennung eines besonders aggressiven, pädiatrischen Tumors gewähren.

VIII Vektorkarten

Dargestellt sind A) der Basisvektor pCMV/myc/ cyto©, B) stellvertretend für die pCMV-Hu-Vektoren der pCMV-HuD4, C) der Basisvektor pCMV-GFP, D) stellvertretend für die pCMV-Hu-GFP-Vektoren der pCMV-HuD1-GFP. Die Schnittstellen der in Kapitel III.15 beschriebenen Klonierung sind eingezeichnet.



Dargestellt sind A) der Basisvektor pTrcEHis, B) stellvertretend für die pTrcEHis-Hu-Vektoren der pTrcEHisC-HuR, C) der Basisvektor pCMV-GNG-NLS, D) stellvertretend für die pCMV-NES-GNG-NLS der HuD4NES-GNG-NLS. Die Schnittstellen der in Kapitel III.15 beschriebenen Klonierung sind eingezeichnet.

IX Literatur

- Abdelmohsen, K., A. Lal, H. H. Kim and M. Gorospe (2007). "Posttranscriptional orchestration of an anti-apoptotic program by HuR." *Cell Cycle* **6**(11): 1288-92.
- Abe, R., Y. Uyeno, K. Yamamoto and H. Sakamoto (1994). "Tissue-specific expression of the gene encoding a mouse RNA binding protein homologous to human HuD antigen." *DNA Res* **1**(4): 175-80.
- Abu-Elmagd, K. M., M. Zak, J. M. Stamos, G. J. Bond, A. Jain, A. O. Youk, M. Ezzelarab, G. Costa, T. Wu, M. A. Nalesnik, G. V. Mazariegos, R. K. Sindhi, A. Marcos, A. J. Demetris, J. J. Fung and J. D. Reyes (2004). "De novo malignancies after intestinal and multivisceral transplantation." *Transplantation* **77**(11): 1719-25.
- Akamatsu, W., H. Fujihara, T. Mitsushashi, M. Yano, S. Shibata, Y. Hayakawa, H. J. Okano, S. Sakakibara, H. Takano, T. Takano, T. Takahashi, T. Noda and H. Okano (2005). "The RNA-binding protein HuD regulates neuronal cell identity and maturation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(12): 4625-30.
- Al-Shanti, N. and Z. Aldahoodi (2006). "Inhibition of alpha nascent polypeptide associated complex protein may induce proliferation, differentiation and enhance the cytotoxic activity of human CD8+ T cells." *J Clin Immunol* **26**(5): 457-64.
- Alexander, F. (2000). "Neuroblastoma." *Urol Clin North Am* **27**(3): 383-92, VII.
- Altermatt, H. J., M. Rodriguez, B. W. Scheithauer and V. A. Lennon (1991). "Paraneoplastic anti-Purkinje and type I anti-neuronal nuclear autoantibodies bind selectively to central, peripheral, and autonomic nervous system cells." *Lab Invest* **65**(4): 412-20.
- Altman, A. J. and R. L. Baehner (1976). "Favorable prognosis for survival in children with coincident opsomyoclonus and neuroblastoma." *Cancer* **37**(2): 846-52.
- Ammirante, M., A. Rosati, A. Gentilella, M. Festa, A. Petrella, L. Marzullo, M. Poscale, M. A. Belisaria, A. Leone and M. C. Turco (2007). "The activity of hsp90alpha promoter is regulated by NF-kappaB transcription factors." *Oncogene*.
- Anderson, K. D., M. A. Merhege, M. Morin, F. Bolognani and N. I. Perrone-Bizzozero (2003). "Increased expression and localization of the RNA-binding protein HuD and GAP-43 mRNA to cytoplasmic granules in DRG neurons during nerve regeneration." *Exp Neurol* **183**(1): 100-8.
- Anderson, K. D., M. A. Morin, A. Beckel-Mitchener, C. D. Mobarak, R. L. Neve, H. M. Furneaux, R. Burry and N. I. Perrone-Bizzozero (2000). "Overexpression of HuD, but not of its truncated form HuD I-II, promotes GAP-43 gene expression and neurite outgrowth in PC12 cells in the absence of nerve growth factor." *J Neurochem* **75**(3): 1103-14.
- Antunes, N. L., Y. Khakoo, K. K. Matthay, R. C. Seeger, D. O. Stram, E. Gerstner, L. E. Abrey and J. Dalmau (2000). "Antineuronal antibodies in patients with neuroblastoma and paraneoplastic opsoclonus-myoclonus." *J Pediatr Hematol Oncol* **22**(4): 315-20.
- Archambault, A. S., J. Sim, M. A. Gimenez and J. H. Russell (2005). "Defining antigen-dependent stages of T cell migration from the blood to the central nervous system parenchyma." *Eur J Immunol* **35**(4): 1076-85.
- Ball, N. S. and P. H. King (1997). "Neuron-specific hel-N1 and HuD as novel molecular markers of neuroblastoma: a correlation of HuD messenger RNA levels with favorable prognostic features." *Clin Cancer Res* **3**(10): 1859-65.
- Banchereau, J. and A. K. Palucka (2005). "Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer." *Nat Rev Immunol* **5**(4): 296-306.
- Banchereau, J. and R. M. Steinman (1998). "Dendritic cells and the control of immunity." *Nature* **392**(6673): 245-52.
- Banerji, U., A. O'Donnell, M. Scurr, S. Pacey, S. Stapleton, Y. Asad, L. Simmons, A. Maloney, F. Raynaud, M. Campbell, M. Walton, S. Lakhani, S. Kaye, P. Workman and I. Judson (2005). "Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of 17-allylamino, 17-demethoxygeldanamycin in patients with advanced malignancies." *J Clin Oncol* **23**(18): 4152-61.
- Barry, D. M., S. Millicamps, J. P. Julien and M. L. Garcia (2007). "New movements in neurofilament transport, turnover and disease." *Exp Cell Res* **313**(10): 2110-20.
- Bataller, L. and J. Dalmau (2003). "Paraneoplastic neurologic syndromes." *Neurol Clin* **21**(1): 221-47, ix.
- Bataller, L. and J. O. Dalmau (2004). "Paraneoplastic disorders of the central nervous system: update on diagnostic criteria and treatment." *Semin Neurol* **24**(4): 461-71.
- Bausero, M. A., A. Panoskaltzis-Mortari, B. R. Blazar and E. Katsanis (1996). "Effective immunization against neuroblastoma using double-transduced tumor cells secreting GM-CSF and interferon-gamma." *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* **19**(2): 113-24.
- Becker, B., G. Multhoff, B. Farkas, P. J. Wild, M. Landthaler, W. Stolz and T. Vogt (2004). "Induction of Hsp90 protein expression in malignant melanomas and melanoma metastases." *Exp Dermatol* **13**(1): 27-32.
- Behrends, U., T. Jandl, A. Golbeck, B. Lechner, S. Muller-Weihrich, I. Schmid, H. Till, F. Berthold, R. Voltz and J. M. Mautner (2002). "Novel products of the HUD, HUC, NNP-1 and alpha-internexin genes identified by autologous antibody screening of a pediatric neuroblastoma library." *Int J Cancer* **100**(6): 669-77.

- Behrends, U., I. Schneider, S. Rossler, H. Frauenknecht, A. Golbeck, B. Lechner, G. Eigenstetter, C. Zobywalski, S. Muller-Weihrich, U. Graubner, I. Schmid, D. Sackerer, M. Spath, C. Goetz, F. Prantl, H. P. Asmuss, K. Bise and J. Mautner (2003). "Novel tumor antigens identified by autologous antibody screening of childhood medulloblastoma cDNA libraries." *Int J Cancer* **106**(2): 244-51.
- Belli, F., A. Testori, L. Rivoltini, M. Maio, G. Andreola, M. R. Sertoli, G. Gallino, A. Piris, A. Cattelan, I. Lazzari, M. Carrabba, G. Scita, C. Santantonio, L. Pilla, G. Tragni, C. Lombardo, F. Arienti, A. Marchiano, P. Queirolo, F. Bertolini, A. Cova, E. Lamaj, L. Ascani, R. Camerini, M. Corsi, N. Cascinelli, J. J. Lewis, P. Srivastava and G. Parmiani (2002). "Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous tumor-derived heat shock protein gp96-peptide complexes: clinical and immunologic findings." *J Clin Oncol* **20**(20): 4169-80.
- Benyahia, B., R. Liblau, H. Merle-Beral, J. M. Tourani, J. Dalmau and J. Y. Delattre (1999). "Cell-mediated autoimmunity in paraneoplastic neurological syndromes with anti-Hu antibodies." *Ann Neurol* **45**(2): 162-7.
- Berthold, F. and B. Hero (2000). "Neuroblastoma: current drug therapy recommendations as part of the total treatment approach." *Drugs* **59**(6): 1261-77.
- Berthold, F., B. Hero, B. Kremens, R. Handgretinger, G. Henze, F. H. Schilling, M. Schrappe, T. Simon and C. Spix (2003). "Long-term results and risk profiles of patients in five consecutive trials (1979-1997) with stage 4 neuroblastoma over 1 year of age." *Cancer Lett* **197**(1-2): 11-7.
- Berthold, F., R. Kassenbohmer and J. Zieschang (1994). "Multivariate evaluation of prognostic factors in localized neuroblastoma." *Am J Pediatr Hematol Oncol* **16**(2): 107-15.
- Berzofsky, J. A., J. D. Ahlers and I. M. Belyakov (2001). "Strategies for designing and optimizing new generation vaccines." *Nat Rev Immunol* **1**(3): 209-19.
- Biedler, J. L., S. Roffler-Tarlov, M. Schachner and L. S. Freedman (1978). "Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones." *Cancer Res* **38**(11 Pt 1): 3751-7.
- Biragyn, A. and L. W. Kwak (2000). "Designer cancer vaccines are still in fashion." *Nat Med* **6**(9): 966-8.
- Birney, E., S. Kumar and A. R. Krainer (1993). "Analysis of the RNA-recognition motif and RS and RGG domains: conservation in metazoan pre-mRNA splicing factors." *Nucleic Acids Res* **21**(25): 5803-16.
- Bolognani, F., M. A. Merhege, J. Twiss and N. I. Perrone-Bizzozero (2004). "Dendritic localization of the RNA-binding protein HuD in hippocampal neurons: association with polysomes and upregulation during contextual learning." *Neurosci Lett* **371**(2-3): 152-7.
- Bolognani, F., D. C. Tanner, M. Merhege, J. Deschenes-Furry, B. Jasmin and N. I. Perrone-Bizzozero (2006). "In vivo post-transcriptional regulation of GAP-43 mRNA by overexpression of the RNA-binding protein HuD." *J Neurochem* **96**(3): 790-801.
- Boon, T., P. G. Coulie and B. Van den Eynde (1997). "Tumor antigens recognized by T cells." *Immunol Today* **18**(6): 267-8.
- Boshoff, C. and R. Weiss (2002). "AIDS-related malignancies." *Nat Rev Cancer* **2**(5): 373-82.
- Bowman, L., M. Grossmann, D. Rill, M. Brown, W. Y. Zhong, B. Alexander, T. Leimig, E. Coustan-Smith, D. Campana, J. Jenkins, D. Woods, G. Kitchingman, E. Vanin and M. Brenner (1998). "IL-2 adenovector-transduced autologous tumor cells induce antitumor immune responses in patients with neuroblastoma." *Blood* **92**(6): 1941-9.
- Bowman, L. C., R. P. Castleberry, A. Cantor, V. Joshi, S. L. Cohn, E. I. Smith, A. Yu, G. M. Brodeur, F. A. Hayes and A. T. Look (1997). "Genetic staging of unresectable or metastatic neuroblastoma in infants: a Pediatric Oncology Group study." *J Natl Cancer Inst* **89**(5): 373-80.
- Bown, N., S. Cotterill, M. Lastowska, S. O'Neill, A. D. Pearson, D. Plantaz, M. Meddeb, G. Danglot, C. Brinkschmidt, H. Christiansen, G. Laureys, F. Speleman, J. Nicholson, A. Bernheim, D. R. Betts, J. Vandesompele and N. Van Roy (1999). "Gain of chromosome arm 17q and adverse outcome in patients with neuroblastoma." *N Engl J Med* **340**(25): 1954-61.
- Brodeur, G. M. (2003). "Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma." *Nat Rev Cancer* **3**(3): 203-16.
- Brodeur, G. M., J. M. Maris, D. J. Yamashiro, M. D. Hogarty and P. S. White (1997). "Biology and genetics of human neuroblastomas." *J Pediatr Hematol Oncol* **19**(2): 93-101.
- Brodeur, G. M., J. Pritchard, F. Berthold, N. L. Carlsen, V. Castel, R. P. Castelberry, B. De Bernardi, A. E. Evans, M. Favrot, F. Hedborg. (1993). "Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment." *J Clin Oncol* **11**(8): 1466-77.
- Brodeur, G. M., R. C. Seeger, M. Schwab, H. E. Varmus and J. M. Bishop (1984). "Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage." *Science* **224**(4653): 1121-4.
- Burkhardt-Hammer, T., C. Spix, H. Brenner, P. Kaatsch, F. Berthold, B. Hero and J. Michaelis (2002). "Long-term survival of children with neuroblastoma prior to the neuroblastoma screening project in Germany." *Med Pediatr Oncol* **39**(3): 156-62.
- Cardillo, M. R. and F. Ippoliti (2007). "Interleukin-6, interleukin-10 and heat shock protein-90 expression in renal epithelial neoplasias and surrounding normal-appearing renal parenchyma." *Int J Immunopathol Pharmacol* **20**(1): 37-46.
- Carpentier, A. F., R. Voltz, T. DesChamps, J. B. Posner, J. Dalmau and M. R. Rosenfeld (1998). "Absence of HuD gene mutations in paraneoplastic small cell lung cancer tissue." *Neurology* **50**(6): 1919.

- Castelli, C., L. Rivoltini, F. Rini, F. Belli, A. Testori, M. Maio, V. Mazzaferro, J. Coppa, P. K. Srivastava and G. Parmiani (2004). "Heat shock proteins: biological functions and clinical application as personalized vaccines for human cancer." *Cancer Immunol Immunother* **53**(3): 227-33.
- Castleberry, R. P. (1997). "Neuroblastoma." *Eur J Cancer* **33**(9): 1430-7; discussion 1437-8.
- Chan, S. O. and F. C. Chiu (1995). "Cloning and developmental expression of human 66 kd neurofilament protein." *Brain Res Mol Brain Res* **29**(1): 177-84.
- Chen, Y. T. (2000). "Cancer vaccine: identification of human tumor antigens by SEREX." *Cancer J* **6 Suppl 3**: S208-17.
- Chen, Y. T., A. O. Gure, S. Tsang, E. Stockert, E. Jager, A. Knuth and L. J. Old (1998). "Identification of multiple cancer/testis antigens by allogeneic antibody screening of a melanoma cell line library." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(12): 6919-23.
- Chen, Y. T., M. J. Scanlan, U. Sahin, O. Tureci, A. O. Gure, S. Tsang, B. Williamson, E. Stockert, M. Pfreundschuh and L. J. Old (1997). "A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(5): 1914-8.
- Cheung, I. Y. and N. K. Cheung (2001). "Detection of microscopic disease: comparing histology, immunocytology, and RT-PCR of tyrosine hydroxylase, GAGE, and MAGE." *Med Pediatr Oncol* **36**(1): 210-2.
- Cheung, N. K. (2000). "Monoclonal antibody-based therapy for neuroblastoma." *Curr Oncol Rep* **2**(6): 547-53.
- Chiu, F. C., E. A. Barnes, K. Das, J. Haley, P. Socolow, F. P. Macaluso and J. Fant (1989). "Characterization of a novel 66 kd subunit of mammalian neurofilaments." *Neuron* **2**(5): 1435-45.
- Cho, B., Y. Lim, D. Y. Lee, S. Y. Park, H. Lee, W. H. Kim, H. Yang, Y. J. Bang and D. I. Jeoung (2002). "Identification and characterization of a novel cancer/testis antigen gene CAGE." *Biochem Biophys Res Commun* **292**(3): 715-26.
- Christiansen, H. and F. Lampert (1988). "Tumour karyotype discriminates between good and bad prognostic outcome in neuroblastoma." *Br J Cancer* **57**(1): 121-6.
- Christiansen, H. and F. Lampert (1989). "[Tumor cytogenetics and prognosis in neuroblastoma]." *Monatsschr Kinderheilkd* **137**(10): 666-71.
- Comtesse, N., D. Heckel, E. Maldener, B. Glass and E. Meese (2000). "Probing the human natural autoantibody repertoire using an immunoscreening approach." *Clin Exp Immunol* **121**(3): 430-6.
- Conroy, S. E. and D. S. Latchman (1996). "Do heat shock proteins have a role in breast cancer?" *Br J Cancer* **74**(5): 717-21.
- Csermely, P., T. Schnaider, C. Soti, Z. Prohaszka and G. Nardai (1998). "The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review." *Pharmacol Ther* **79**(2): 129-68.
- Cullen, B. R. (2003). "Nuclear mRNA export: insights from virology." *Trends Biochem Sci* **28**(8): 419-24.
- Dalmau, J., H. M. Furneaux, C. Cordon-Cardo and J. B. Posner (1992). "The expression of the Hu (paraneoplastic encephalomyelitis/sensory neuronopathy) antigen in human normal and tumor tissues." *Am J Pathol* **141**(4): 881-6.
- Dalmau, J., F. Graus, N. K. Cheung, M. K. Rosenblum, A. Ho, A. Canete, J. Y. Delattre, S. J. Thompson and J. B. Posner (1995). "Major histocompatibility proteins, anti-Hu antibodies, and paraneoplastic encephalomyelitis in neuroblastoma and small cell lung cancer." *Cancer* **75**(1): 99-109.
- Darnell, R. B. and J. B. Posner (2003). "Paraneoplastic syndromes involving the nervous system." *N Engl J Med* **349**(16): 1543-54.
- Darnell, R. B. and J. B. Posner (2006). "Paraneoplastic syndromes affecting the nervous system." *Semin Oncol* **33**(3): 270-98.
- de Beukelaar, J. W., G. M. Verjans, Y. van Norden, J. C. Milikan, J. Kraan, H. Hooijkaas, K. Sintnicolaas, J. W. Gratama and P. A. Sillevius Smitt (2007). "No evidence for circulating HuD-specific CD8+ T cells in patients with paraneoplastic neurological syndromes and Hu antibodies." *Cancer Immunol Immunother* **56**(9): 1501-6.
- De Plaen, E., C. Lurquin, A. Van Pel, B. Mariame, J. P. Szikora, T. Wolfel, C. Sibille, P. Chomez and T. Boon (1988). "Immunogenic (tum-) variants of mouse tumor P815: cloning of the gene of tum- antigen P91A and identification of the tum- mutation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(7): 2274-8.
- Dengjel, J., P. Decker, O. Schoor, F. Altenberend, T. Weinschenk, H. G. Rammensee and S. Stevanovic (2004). "Identification of a naturally processed cyclin D1 T-helper epitope by a novel combination of HLA class II targeting and differential mass spectrometry." *Eur J Immunol* **34**(12): 3644-51.
- Deschenes-Furry, J., N. Perrone-Bizzozero and B. J. Jasmin (2006). "The RNA-binding protein HuD: a regulator of neuronal differentiation, maintenance and plasticity." *Bioessays* **28**(8): 822-33.
- Dudley, M. E., J. R. Wunderlich, P. F. Robbins, J. C. Yang, P. Hwu, D. J. Schwartzentruber, S. L. Topalian, R. Sherry, N. P. Restifo, A. M. Hubicki, M. R. Robinson, M. Raffeld, P. Duray, C. A. Seipp, L. Rogers-Freezer, K. E. Morton, S. A. Mavroukakis, D. E. White and S. A. Rosenberg (2002). "Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes." *Science* **298**(5594): 850-4.
- Dunn, G. P., A. T. Bruce, H. Ikeda, L. J. Old and R. D. Schreiber (2002). "Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape." *Nat Immunol* **3**(11): 991-8.

- Dunn, G. P., L. J. Old and R. D. Schreiber (2004). "The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting." *Immunity* **21**(2): 137-48.
- Ehlken, H., D. Schadendorf and S. Eichmüller (2004). "Humoral immune response against melanoma antigens induced by vaccination with cytokine gene-modified autologous tumor cells." *Int J Cancer* **108**(2): 307-13.
- Estlin, E. J. (2002). "Novel targets for therapy in paediatric oncology." *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* **2**(2): 141-50.
- Evans, A. E., G. J. D'Angio, K. Propert, J. Anderson and H. W. Hann (1987). "Prognostic factor in neuroblastoma." *Cancer* **59**(11): 1853-9.
- Fan, X. C. and J. A. Steitz (1998). "HNS, a nuclear-cytoplasmic shuttling sequence in HuR." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(26): 15293-8.
- Ferber, M. J., D. P. Montoya, C. Yu, I. Aderca, A. McGee, E. C. Thorland, D. M. Nagorney, B. S. Gostout, L. J. Burgart, L. Boix, J. Bruix, B. J. McMahon, T. H. Cheung, T. K. Chung, Y. F. Wong, D. I. Smith and L. R. Roberts (2003). "Integrations of the hepatitis B virus (HBV) and human papillomavirus (HPV) into the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene in liver and cervical cancers." *Oncogene* **22**(24): 3813-20.
- Ferrarini, M., S. Heltai, M. R. Zocchi and C. Rugarli (1992). "Unusual expression and localization of heat-shock proteins in human tumor cells." *Int J Cancer* **51**(4): 613-9.
- Finn, O. J. (2003). "Cancer vaccines: between the idea and the reality." *Nat Rev Immunol* **3**(8): 630-41.
- Fischer, U., J. Huber, W. C. Boelens, I. W. Mattaj and R. Luhrmann (1995). "The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs." *Cell* **82**(3): 475-83.
- Foley, J., D. Witte, F. C. Chiu and L. M. Parysek (1994). "Expression of the neural intermediate filament proteins peripherin and neurofilament-66/alpha-internexin in neuroblastoma." *Lab Invest* **71**(2): 193-9.
- Fong, C. T., N. C. Dracopoli, P. S. White, P. T. Merrill, R. C. Griffith, D. E. Housman and G. M. Brodeur (1989). "Loss of heterozygosity for the short arm of chromosome 1 in human neuroblastomas: correlation with N-myc amplification." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(10): 3753-7.
- Fornerod, M., M. Ohno, M. Yoshida and I. W. Mattaj (1997). "CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals." *Cell* **90**(6): 1051-60.
- Fossa, A., L. Alsoe, R. Cramer, S. Funderud, G. Gaudernack and E. B. Smeland (2004). "Serological cloning of cancer/testis antigens expressed in prostate cancer using cDNA phage surface display." *Cancer Immunol Immunother* **53**(5): 431-8.
- Fujiwara, T., Y. Mori, D. L. Chu, Y. Koyama, S. Miyata, H. Tanaka, K. Yachi, T. Kubo, H. Yoshikawa and M. Tohyama (2006). "CARM1 regulates proliferation of PC12 cells by methylating HuD." *Mol Cell Biol* **26**(6): 2273-85.
- Geiger, J. D., R. J. Hutchinson, L. F. Hohenkirk, E. A. McKenna, G. A. Yanik, J. E. Levine, A. E. Chang, T. M. Braun and J. J. Mule (2001). "Vaccination of pediatric solid tumor patients with tumor lysate-pulsed dendritic cells can expand specific T cells and mediate tumor regression." *Cancer Res* **61**(23): 8513-9.
- Gerhard, M., H. Juhl, H. Kalthoff, H. W. Schreiber, C. Wagener and M. Neumaier (1994). "Specific detection of carcinoembryonic antigen-expressing tumor cells in bone marrow aspirates by polymerase chain reaction." *J Clin Oncol* **12**(4): 725-9.
- Gilboa, E. (2001). "The risk of autoimmunity associated with tumor immunotherapy." *Nat Immunol* **2**(9): 789-92.
- Gires, O., M. Munz, M. Schaffrik, C. Kieu, J. Rauch, M. Ahlemann, D. Eberle, B. Mack, B. Wollenberg, S. Lang, T. Hofmann, W. Hammerschmidt and R. Zeidler (2004). "Profile identification of disease-associated humoral antigens using AMIDA, a novel proteomics-based technology." *Cell Mol Life Sci* **61**(10): 1198-207.
- Gnjatic, S., H. Nishikawa, A. A. Jungbluth, A. O. Gure, G. Ritter, E. Jäger, A. Knuth, Y. T. Chen and L. J. Old (2006). "NY-ESO-1: review of an immunogenic tumor antigen." *Adv Cancer Res* **95**: 1-30.
- Gossec, L., M. Dougados, P. Goupille, A. Cantagrel, J. Sibilia, O. Meyer, J. Sany, J. P. Daures and B. Combe (2004). "Prognostic factors for remission in early rheumatoid arthritis: a multiparameter prospective study." *Ann Rheum Dis* **63**(6): 675-80.
- Götz, C. (2006). Identifikation von Tumorantigenen des embryonalen Rhabdomyosarkoms durch serologische Analyse einer Tumor-cDNS Expressionsbibliothek (SEREX) mit Untersuchung ihrer cDNS-Sequenz, mRNS-Expression und Immunogenität. *Dissertation an der Medizinischen Fakultät der TUM*.
- Grammatikakis, N., A. Vultur, C. V. Ramana, A. Sigano, C. W. Schweinfest, D. K. Watson and L. Raptis (2002). "The role of Hsp90N, a new member of the Hsp90 family, in signal transduction and neoplastic transformation." *J Biol Chem* **277**(10): 8312-20.
- Graus, F., C. Cordon-Cardo and J. B. Posner (1985). "Neuronal antinuclear antibody in sensory neuronopathy from lung cancer." *Neurology* **35**(4): 538-43.
- Graus, F., J. Dalmou, R. Rene, M. Tora, N. Malats, J. J. Verschuuren, F. Cardenal, N. Vinolas, J. Garcia del Muro, C. Vadell, W. P. Mason, R. Rosell, J. B. Posner and F. X. Real (1997). "Anti-Hu antibodies in patients with small-cell lung cancer: association with complete response to therapy and improved survival." *J Clin Oncol* **15**(8): 2866-72.

- Graus, F., F. Keime-Guibert, R. Rene, B. Benyahia, T. Ribalta, C. Ascaso, G. Escaramis and J. Y. Delattre (2001). "Anti-Hu-associated paraneoplastic encephalomyelitis: analysis of 200 patients." *Brain* **124**(Pt 6): 1138-48.
- Graus, Y. F., J. J. Verschuuren, A. Degenhardt, P. J. van Breda Vriesman, M. H. De Baets, J. B. Posner, D. R. Burton and J. Dalmau (1998). "Selection of recombinant anti-HuD Fab fragments from a phage display antibody library of a lung cancer patient with paraneoplastic encephalomyelitis." *J Neuroimmunol* **82**(2): 200-9.
- Gross, L. (1943). "Intradermal immunization of C3H mice against a sarcoma that originated in an animal of the same line." *Cancer Res.* **3**: 326.
- Guilloux, Y., S. Lucas, V. G. Brichard, A. Van Pel, C. Viret, E. De Plaen, F. Brasseur, B. Lethe, F. Jotereau and T. Boon (1996). "A peptide recognized by human cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas is encoded by an intron sequence of the N-acetylglucosaminyltransferase V gene." *J Exp Med* **183**(3): 1173-83.
- Gultekin, S. H., J. Dalmau, Y. Graus, J. B. Posner and M. K. Rosenblum (1998). "Anti-Hu immunolabeling as an index of neuronal differentiation in human brain tumors: a study of 112 central neuroepithelial neoplasms." *Am J Surg Pathol* **22**(2): 195-200.
- Gultekin, S. H., J. Rosai, A. Demopoulos, Y. F. Graus, J. B. Posner, J. Dalmau and M. K. Rosenblum (2000). "Hu Immunolabeling as a Marker of Neural and Neuroendocrine Differentiation in Normal and Neoplastic Human Tissues: Assessment Using a Recombinant Anti-Hu Fab Fragment." *Int J Surg Pathol* **8**(2): 109-117.
- Gure, A. O., E. Stockert, K. C. Arden, A. D. Boyer, C. S. Viars, M. J. Scanlan, L. J. Old and Y. T. Chen (2000). "CT10: a new cancer-testis (CT) antigen homologous to CT7 and the MAGE family, identified by representational-difference analysis." *Int J Cancer* **85**(5): 726-32.
- Gure, A. O., O. Tureci, U. Sahin, S. Tsang, M. J. Scanlan, E. Jager, A. Knuth, M. Pfreundschuh, L. J. Old and Y. T. Chen (1997). "SSX: a multigene family with several members transcribed in normal testis and human cancer." *Int J Cancer* **72**(6): 965-71.
- Hahne, M., D. Rimoldi, M. Schroter, P. Romero, M. Schreier, L. E. French, P. Schneider, T. Bornand, A. Fontana, D. Lienard, J. Cerottini and J. Tschopp (1996). "Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape." *Science* **274**(5291): 1363-6.
- Hauser, P., Z. Hanzely, Z. Jakab, L. Olah, E. Szabo, A. Jeney, D. Schuler, G. Fekete, L. Bogner and M. Garami (2006). "Expression and prognostic examination of heat shock proteins (HSP 27, HSP 70, and HSP 90) in medulloblastoma." *J Pediatr Hematol Oncol* **28**(7): 461-6.
- Hayem, G., M. De Bandt, E. Palazzo, S. Roux, B. Combe, J. F. Eliaou, J. Sany, M. F. Kahn and O. Meyer (1999). "Anti-heat shock protein 70 kDa and 90 kDa antibodies in serum of patients with rheumatoid arthritis." *Ann Rheum Dis* **58**(5): 291-6.
- Hayflick, L. and P. S. Moorhead (1961). "The serial cultivation of human diploid cell strains." *Experimental Cell Research* **25**(3): 585-621.
- Ho, W. Y., J. N. Blattman, M. L. Dossett, C. Yee and P. D. Greenberg (2003). "Adoptive immunotherapy: engineering T cell responses as biologic weapons for tumor mass destruction." *Cancer Cell* **3**(5): 431-7.
- Hodge, J. W., D. W. Grosenbach, W. M. Aarts, D. J. Poole and J. Schlom (2003). "Vaccine therapy of established tumors in the absence of autoimmunity." *Clin Cancer Res* **9**(5): 1837-49.
- Hoffmann, P., R. Hofmeister, K. Brischwein, C. Brandl, S. Crommer, R. Bargou, C. Itin, N. Prang and P. A. Baeuerle (2005). "Serial killing of tumor cells by cytotoxic T cells redirected with a CD19-/CD3-bispecific single-chain antibody construct." *Int J Cancer* **115**(1): 98-104.
- Holaska, J. M., B. E. Black, D. C. Love, J. A. Hanover, J. Leszyk and B. M. Paschal (2001). "Calreticulin Is a receptor for nuclear export." *J Cell Biol* **152**(1): 127-40.
- Hottl, L., C. Zelle-Rieser, H. Gander, C. Papesch, R. Ramoner, G. Bartsch, H. Rogatsch, A. L. Barsoum, J. H. Coggin, Jr. and M. Thurnher (2002). "Immunotherapy of metastatic renal cell carcinoma with tumor lysate-pulsed autologous dendritic cells." *Clin Cancer Res* **8**(11): 3369-76.
- Hudis, C. A. (2007). "Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice." *N Engl J Med* **357**(1): 39-51.
- Hughes, M., H. B. Marsden and M. K. Palmer (1974). "Histologic patterns of neuroblastoma related to prognosis and clinical staging." *Cancer* **34**(5): 1706-11.
- Hui, K., F. Grosveld and H. Festenstein (1984). "Rejection of transplantable AKR leukaemia cells following MHC DNA-mediated cell transformation." *Nature* **311**(5988): 750-2.
- Inman, M. V., S. Levy, B. A. Mock and G. C. Owens (1998). "Gene organization and chromosome location of the neural-specific RNA binding protein Elavl4." *Gene* **208**(2): 139-45.
- Jager, D. (2007). "Potential target antigens for immunotherapy identified by serological expression cloning (SEREX)." *Methods Mol Biol* **360**: 319-26.
- Jager, D., E. Stockert, J. Karbach, K. Herrlinger, A. Atmaca, M. Arand, Y. T. Chen, S. Gnjatich, L. J. Old, A. Knuth and E. Jager (2002). "Urine antibody against human cancer antigen NY-ESO-1." *Cancer Immun* **2**: 10.
- Jager, E., Y. T. Chen, J. W. Drijfhout, J. Karbach, M. Ringhoffer, D. Jager, M. Arand, H. Wada, Y. Noguchi, E. Stockert, L. J. Old and A. Knuth (1998). "Simultaneous humoral and cellular immune response against

- cancer-testis antigen NY-ESO-1: definition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2-binding peptide epitopes." *J Exp Med* **187**(2): 265-70.
- Jager, E., E. Stockert, Z. Zidianakis, Y. T. Chen, J. Karbach, D. Jager, M. Arand, G. Ritter, L. J. Old and A. Knuth (1999). "Humoral immune responses of cancer patients against "Cancer-Testis" antigen NY-ESO-1: correlation with clinical events." *Int J Cancer* **84**(5): 506-10.
- Janeway, C., P. Travers, M. Walport and M. Shlomchik (2004). *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease - Sixth Edition*. New York, London, Garland Science Textbooks.
- Jansen, E., S. M. Meulemans, I. C. Orlans and W. J. Van de Ven (1997). "The NNP-1 gene (D21S2056E), which encodes a novel nuclear protein, maps in close proximity to the cystatin B gene within the EPM1 and APECED critical region on 21q22.3." *Genomics* **42**(2): 336-41.
- Joshi, V. V. and G. J. Tsongalis (1997). "Correlation between morphologic and nonmorphologic prognostic markers of neuroblastoma." *Ann N Y Acad Sci* **824**: 71-83.
- Kalderon, D., B. L. Roberts, W. D. Richardson and A. E. Smith (1984). "A short amino acid sequence able to specify nuclear location." *Cell* **39**(3 Pt 2): 499-509.
- Kasashima, K., K. Terashima, K. Yamamoto, E. Sakashita and H. Sakamoto (1999). "Cytoplasmic localization is required for the mammalian ELAV-like protein HuD to induce neuronal differentiation." *Genes Cells* **4**(11): 667-83.
- Kawakami, Y., T. Fujita, Y. Matsuzaki, T. Sakurai, M. Tsukamoto, M. Toda and H. Sumimoto (2004). "Identification of human tumor antigens and its implications for diagnosis and treatment of cancer." *Cancer Sci* **95**(10): 784-91.
- Keene, J. D. (2007). "RNA regulons: coordination of post-transcriptional events." *Nat Rev Genet* **8**(7): 533-43.
- Kennedy, N. J. and R. J. Davis (2003). "Role of JNK in tumor development." *Cell Cycle* **2**(3): 199-201.
- Kessels, H. W., M. C. Wolkers and T. N. Schumacher (2002). "Adoptive transfer of T-cell immunity." *Trends Immunol* **23**(5): 264-9.
- Kiers, L., H. J. Altermatt and V. A. Lennon (1991). "Paraneoplastic anti-neuronal nuclear IgG autoantibodies (type I) localize antigen in small cell lung carcinoma." *Mayo Clin Proc* **66**(12): 1209-16.
- Kim, Y. J. and B. S. Baker (1993). "The Drosophila gene rbp9 encodes a protein that is a member of a conserved group of putative RNA binding proteins that are nervous system-specific in both flies and humans." *J Neurosci* **13**(3): 1045-56.
- King, P. H. (1994). "Hel-N2: a novel isoform of Hel-N1 which is conserved in rat neural tissue and produced in early embryogenesis." *Gene* **151**(1-2): 261-5.
- King, P. H. (2000). "RNA-binding analyses of HuC and HuD with the VEGF and c-myc 3'-untranslated regions using a novel ELISA-based assay." *Nucleic Acids Res* **28**(7): E20.
- King, P. H., T. D. Levine, R. T. Fremeau, Jr. and J. D. Keene (1994). "Mammalian homologs of Drosophila ELAV localized to a neuronal subset can bind in vitro to the 3' UTR of mRNA encoding the Id transcriptional repressor." *J Neurosci* **14**(4): 1943-52.
- Knudson, A. G., Jr. and A. T. Meadows (1976). "Developmental genetics of neuroblastoma." *J Natl Cancer Inst* **57**(3): 675-82.
- Kurotaki, T., Y. Tamura, G. Ueda, J. Oura, G. Kutomi, Y. Hirohashi, H. Sahara, T. Torigoe, H. Hiratsuka, H. Sunakawa, K. Hirata and N. Sato (2007). "Efficient cross-presentation by heat shock protein 90-peptide complex-loaded dendritic cells via an endosomal pathway." *J Immunol* **179**(3): 1803-13.
- Kutay, U. and S. Guttinger (2005). "Leucine-rich nuclear-export signals: born to be weak." *Trends Cell Biol* **15**(3): 121-4.
- la Cour, T., L. Kiemer, A. Molgaard, R. Gupta, K. Skriver and S. Brunak (2004). "Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals." *Protein Eng Des Sel* **17**(6): 527-36.
- Ladd, A. N. and T. A. Cooper (2004). "Multiple domains control the subcellular localization and activity of ETR-3, a regulator of nuclear and cytoplasmic RNA processing events." *J Cell Sci* **117**(Pt 16): 3519-29.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-5.
- Lariviere, R. C. and J. P. Julien (2004). "Functions of intermediate filaments in neuronal development and disease." *J Neurobiol* **58**(1): 131-48.
- Leen, A. M., C. M. Rooney and A. E. Foster (2007). "Improving T cell therapy for cancer." *Annu Rev Immunol* **25**: 243-65.
- Leggatt, G. R. and I. H. Frazer (2007). "HPV vaccines: the beginning of the end for cervical cancer." *Curr Opin Immunol* **19**(2): 232-8.
- Lim, R. Y. and B. Fahrenkrog (2006). "The nuclear pore complex up close." *Curr Opin Cell Biol* **18**(3): 342-7.
- Liu, J., J. Dalmau, A. Szabo, M. Rosenfeld, J. Huber and H. Furneaux (1995). "Paraneoplastic encephalomyelitis antigens bind to the AU-rich elements of mRNA." *Neurology* **45**(3 Pt 1): 544-50.
- Look, A. T., F. A. Hayes, R. Nitschke, N. B. McWilliams and A. A. Green (1984). "Cellular DNA content as a predictor of response to chemotherapy in infants with unresectable neuroblastoma." *N Engl J Med* **311**(4): 231-5.

- Look, A. T., F. A. Hayes, J. J. Shuster, E. C. Douglass, R. P. Castleberry, L. C. Bowman, E. I. Smith and G. M. Brodeur (1991). "Clinical relevance of tumor cell ploidy and N-myc gene amplification in childhood neuroblastoma: a Pediatric Oncology Group study." *J Clin Oncol* **9**(4): 581-91.
- Lunde, B. M., C. Moore and G. Varani (2007). "RNA-binding proteins: modular design for efficient function." *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(6): 479-90.
- Luo, L. Y., I. Herrera, A. Soosaipillai and E. P. Diamandis (2002). "Identification of heat shock protein 90 and other proteins as tumour antigens by serological screening of an ovarian carcinoma expression library." *Br J Cancer* **87**(3): 339-43.
- Mackall, C. L. (2001). "Spreading the wealth: antigen discovery in adult tumors can help hone the search for pediatric tumor antigens." *J Immunother* (1997) **24**(4): 281-2.
- Magi-Galluzzi, C., R. Montironi, M. G. Cangi, K. Wishnow and M. Loda (1998). "Mitogen-activated protein kinases and apoptosis in PIN." *Virchows Arch* **432**(5): 407-13.
- Mandelboim, O., G. Berke, M. Fridkin, M. Feldman, M. Eisenstein and L. Eisenbach (1994). "CTL induction by a tumour-associated antigen octapeptide derived from a murine lung carcinoma." *Nature* **369**(6475): 67-71.
- Manohar, C. F., M. L. Short, A. Nguyen, N. N. Nguyen, D. Chagnovich, Q. Yang and S. L. Cohn (2002). "HuD, a neuronal-specific RNA-binding protein, increases the in vivo stability of MYCN RNA." *J Biol Chem* **277**(3): 1967-73.
- Marini, P., R. A. MacLeod, C. Treuner, G. Bruchelt, W. Bohm, H. Wolburg, P. Schweizer and R. Girgert (1999). "SiMa, a new neuroblastoma cell line combining poor prognostic cytogenetic markers with high adrenergic differentiation." *Cancer Genet Cytogenet* **112**(2): 161-4.
- Maris, J. M. and C. T. Denny (2002). "Focus on embryonal malignancies." *Cancer Cell* **2**(6): 447-50.
- Maris, J. M., M. D. Hogarty, R. Bagatell and S. L. Cohn (2007). "Neuroblastoma." *Lancet* **369**(9579): 2106-20.
- Maris, J. M., M. J. Weiss, Y. Mosse, G. Hii, C. Guo, P. S. White, M. D. Hogarty, T. Mirensky, G. M. Brodeur, T. R. Rebbeck, M. Urbanek and S. Shusterman (2002). "Evidence for a hereditary neuroblastoma predisposition locus at chromosome 16p12-13." *Cancer Res* **62**(22): 6651-8.
- Maris, J. M., P. S. White, C. P. Beltinger, E. P. Sulman, R. P. Castleberry, J. J. Shuster, A. T. Look and G. M. Brodeur (1995). "Significance of chromosome 1p loss of heterozygosity in neuroblastoma." *Cancer Res* **55**(20): 4664-9.
- Marusich, M. F., H. M. Furneaux, P. D. Henion and J. A. Weston (1994). "Hu neuronal proteins are expressed in proliferating neurogenic cells." *J Neurobiol* **25**(2): 143-55.
- Matthay, K. K., J. G. Villablanca, R. C. Seeger, D. O. Stram, R. E. Harris, N. K. Ramsay, P. Swift, H. Shimada, C. T. Black, G. M. Brodeur, R. B. Gerbing and C. P. Reynolds (1999). "Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. Children's Cancer Group." *N Engl J Med* **341**(16): 1165-73.
- Mayrand, S. M. and W. R. Green (1998). "Non-traditionally derived CTL epitopes: exceptions that prove the rules?" *Immunol Today* **19**(12): 551-6.
- Mazzaferro, V., J. Coppa, M. G. Carrabba, L. Rivoltini, M. Schiavo, E. Regalia, L. Mariani, T. Camerini, A. Marchiano, S. Andreola, R. Camerini, M. Corsi, J. J. Lewis, P. K. Srivastava and G. Parmiani (2003). "Vaccination with autologous tumor-derived heat-shock protein gp96 after liver resection for metastatic colorectal cancer." *Clin Cancer Res* **9**(9): 3235-45.
- Menard, S., P. Casalini, M. Campiglio, S. M. Pupa and E. Tagliabue (2004). "Role of HER2/neu in tumor progression and therapy." *Cell Mol Life Sci* **61**(23): 2965-78.
- Meyer, B. E., J. L. Meinkoth and M. H. Malim (1996). "Nuclear transport of human immunodeficiency virus type 1, visna virus, and equine infectious anemia virus Rev proteins: identification of a family of transferable nuclear export signals." *J Virol* **70**(4): 2350-9.
- Milosevic, S., U. Behrends, D. Adhikary and J. Mautner (2006). "Identification of major histocompatibility complex class II-restricted antigens and epitopes of the Epstein-Barr virus by a novel bacterial expression cloning approach." *J Virol* **80**(21): 10357-64.
- Minota, S., S. Koyasu, I. Yahara and J. Winfield (1988). "Autoantibodies to the heat-shock protein hsp90 in systemic lupus erythematosus." *J Clin Invest* **81**(1): 106-9.
- Mischo, A., A. Wadle, K. Watzig, D. Jager, E. Stockert, D. Santiago, G. Ritter, E. Regitz, E. Jager, A. Knuth, L. Old, M. Pfreundschuh and C. Renner (2003). "Recombinant antigen expression on yeast surface (RAYS) for the detection of serological immune responses in cancer patients." *Cancer Immun* **3**: 5.
- Moingeon, P. (2001). "Cancer vaccines." *Vaccine* **19**(11-12): 1305-26.
- Monach, P. A., S. C. Meredith, C. T. Siegel and H. Schreiber (1995). "A unique tumor antigen produced by a single amino acid substitution." *Immunity* **2**(1): 45-59.
- Moreau, A., W. V. Yotov, F. H. Glorieux and R. St-Arnaud (1998). "Bone-specific expression of the alpha chain of the nascent polypeptide-associated complex, a coactivator potentiating c-Jun-mediated transcription." *Mol Cell Biol* **18**(3): 1312-21.
- Mujoo, K., D. A. Cheresch, H. M. Yang and R. A. Reisfeld (1987). "Disialoganglioside GD2 on human neuroblastoma cells: target antigen for monoclonal antibody-mediated cytotoxicity and suppression of tumor growth." *Cancer Res* **47**(4): 1098-104.

- Multhoff, G., C. Botzler, M. Wiesnet, E. Muller, T. Meier, W. Wilmanns and R. D. Issels (1995). "A stress-inducible 72-kDa heat-shock protein (HSP72) is expressed on the surface of human tumor cells, but not on normal cells." *Int J Cancer* **61**(2): 272-9.
- Muranski, P., A. Boni, C. Wrzesinski, D. E. Citrin, S. A. Rosenberg, R. Childs and N. P. Restifo (2006). "Increased intensity lymphodepletion and adoptive immunotherapy--how far can we go?" *Nat Clin Pract Oncol* **3**(12): 668-81.
- Na, G. Y., S. K. Seo, S. J. Lee, D. W. Kim, M. K. Kim and J. C. Kim (2004). "Upregulation of the NNP-1 (novel nuclear protein-1, D21S2056E) gene in keloid tissue determined by cDNA microarray and in situ hybridization." *Br J Dermatol* **151**(6): 1143-9.
- Nassar, F. and M. Wegnez (2001). "Characterization of two promoters of the *Xenopus laevis* elrD gene." *Biochem Biophys Res Commun* **283**(2): 392-8.
- NB2004 (Trial Protokoll). "NB2004 Trial Protokoll for Risk Adapted Treatment of Children with Neuroblastoma, final Status, Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie." NB_2004_1.00.
- Negrier, S., J. Michon, D. Floret, E. Bouffet, J. C. Gentet, I. Philip, P. Cochat, D. Stamm, J. Costil, M. Gaspard. (1991). "Interleukin-2 and lymphokine-activated killer cells in 15 children with advanced metastatic neuroblastoma." *J Clin Oncol* **9**(8): 1363-70.
- Neumann, H., A. Cavalie, D. E. Jenne and H. Wekerle (1995). "Induction of MHC class I genes in neurons." *Science* **269**(5223): 549-52.
- Nickerson, H. J., K. K. Matthay, R. C. Seeger, G. M. Brodeur, H. Shimada, C. Perez, J. B. Atkinson, M. Selch, R. B. Gerbing, D. O. Stram and J. Lukens (2000). "Favorable biology and outcome of stage IV-S neuroblastoma with supportive care or minimal therapy: a Children's Cancer Group study." *J Clin Oncol* **18**(3): 477-86.
- Nieder, M. L. and M. W. Gauderer (1991). "Recent developments in the management of neuroblastoma." *Prog Pediatr Surg* **26**: 124-36.
- Oberthuer, A., B. Hero, R. Spitz, F. Berthold and M. Fischer (2004). "The tumor-associated antigen PRAME is universally expressed in high-stage neuroblastoma and associated with poor outcome." *Clin Cancer Res* **10**(13): 4307-13.
- Ogata, M., Z. Naito, S. Tanaka, Y. Moriyama and G. Asano (2000). "Overexpression and localization of heat shock proteins mRNA in pancreatic carcinoma." *J Nippon Med Sch* **67**(3): 177-85.
- Ohwada, A., I. Nagaoka, F. Takahashi, S. Tominaga and Y. Fukuchi (1999). "DNA vaccination against HuD antigen elicits antitumor activity in a small-cell lung cancer murine model." *Am J Respir Cell Mol Biol* **21**(1): 37-43.
- Old, L. J. (1981). "Cancer immunology: the search for specificity--G. H. A. Clowes Memorial lecture." *Cancer Res* **41**(2): 361-75.
- Old, L. J. and Y. T. Chen (1998). "New paths in human cancer serology." *J Exp Med* **187**(8): 1163-7.
- Oltra, S., F. Martinez, C. Orellana, E. Grau, J. M. Fernandez, A. Canete and V. Castel (2004). "Minimal residual disease in neuroblastoma: to GAGE or not to GAGE." *Oncol Res* **14**(6): 291-5.
- Ostrand-Rosenberg, S. (2005). "CD4+ T lymphocytes: a critical component of antitumor immunity." *Cancer Invest* **23**(5): 413-9.
- Ota, T., Y. Suzuki, T. Nishikawa, T. Otsuki, T. Sugiyama, R. Irie, A. Wakamatsu, K. Hayashi, H. Sato, K. Nagai, and S. Sugano (2004). "Complete sequencing and characterization of 21,243 full-length human cDNAs." *Nat Genet* **36**(1): 40-5.
- Papachristou, D. J., A. Batistatou, G. P. Sykiotis, I. Varakis and A. G. Papavassiliou (2003). "Activation of the JNK-AP-1 signal transduction pathway is associated with pathogenesis and progression of human osteosarcomas." *Bone* **32**(4): 364-71.
- Pardoll, D. (2001). "T cells and tumours." *Nature* **411**(6841): 1010-2.
- Pardoll, D. (2002). "T cells take aim at cancer." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(25): 15840-2.
- Pardoll, D. M. (1998). "Cancer vaccines." *Nat Med* **4**(5 Suppl): 525-31.
- Park, S., Y. Lim, D. Lee, B. Cho, Y. J. Bang, S. Sung, H. Y. Kim, D. K. Kim, Y. S. Lee, Y. Song and D. I. Jeoung (2003). "Identification and characterization of a novel cancer/testis antigen gene CAGE-1." *Biochim Biophys Acta* **1625**(2): 173-82.
- Parton, M., M. Gore and T. Eisen (2006). "Role of cytokine therapy in 2006 and beyond for metastatic renal cell cancer." *J Clin Oncol* **24**(35): 5584-92.
- Pascale, A., M. Amadio, G. Scapagnini, C. Lanni, M. Racchi, A. Provenzani, S. Govoni, D. L. Alkon and A. Quattrone (2005). "Neuronal ELAV proteins enhance mRNA stability by a PKCalpha-dependent pathway." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(34): 12065-70.
- Pascale, A., P. A. Gusev, M. Amadio, T. Dottorini, S. Govoni, D. L. Alkon and A. Quattrone (2004). "Increase of the RNA-binding protein HuD and posttranscriptional up-regulation of the GAP-43 gene during spatial memory." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(5): 1217-22.
- Pear, W. S., G. P. Nolan, M. L. Scott and D. Baltimore (1993). "Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(18): 8392-6.

- Perron, M., P. Bourlitois, M. Wegnez and L. Theodore (1997). "Subcellular distribution of Xenopus XEL-1 protein, a member of the neuron-specific ELAV/Hu family, revealed by epitope tagging." *DNA Cell Biol* **16**(5): 579-87.
- Pfreundschuh, M. (2000). "Exploitation of the B cell repertoire for the identification of human tumor antigens." *Cancer Chemother Pharmacol* **46** Suppl: S3-7.
- Pfreundschuh, M., H. Shiku, T. Takahashi, R. Ueda, J. Ransohoff, H. F. Oettgen and L. J. Old (1978). "Serological analysis of cell surface antigens of malignant human brain tumors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**(10): 5122-6.
- Pick, E., Y. Kluger, J. M. Giltneane, C. Moeder, R. L. Camp, D. L. Rimm and H. M. Kluger (2007). "High HSP90 expression is associated with decreased survival in breast cancer." *Cancer Res* **67**(7): 2932-7.
- Pieper, R., R. E. Christian, M. I. Gonzales, M. I. Nishimura, G. Gupta, R. E. Settlage, J. Shabanowitz, S. A. Rosenberg, D. F. Hunt and S. L. Topalian (1999). "Biochemical identification of a mutated human melanoma antigen recognized by CD4(+) T cells." *J Exp Med* **189**(5): 757-66.
- Plonquet, A., F. Garcia-Pons, E. Fernandez, C. Philippe, J. Marquet, H. Rouard, M. H. Delfau-Larue, K. Kosmatopoulos, F. Lemonnier, J. P. Farcet, R. K. Gherardi and P. Langlade-Demoyen (2003). "Peptides derived from the onconeural HuD protein can elicit cytotoxic responses in HHD mouse and human." *J Neuroimmunol* **142**(1-2): 93-100.
- Posner, J. B. and J. Dalmau (1997). "Paraneoplastic syndromes." *Curr Opin Immunol* **9**(5): 723-9.
- Posner, J. B. and H. M. Furneaux (1990). "Paraneoplastic syndromes." *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis* **68**: 187-219.
- Powers, M. V. and P. Workman (2007). "Inhibitors of the heat shock response: biology and pharmacology." *FEBS Lett* **581**(19): 3758-69.
- Preuss, K. D., C. Zwick, C. Bormann, F. Neumann and M. Pfreundschuh (2002). "Analysis of the B-cell repertoire against antigens expressed by human neoplasms." *Immunol Rev* **188**: 43-50.
- Pritchard, J. and J. A. Hickman (1994). "Why does stage 4s neuroblastoma regress spontaneously?" *Lancet* **344**(8926): 869-70.
- Probst-Kepper, M., V. Stroobant, R. Kridel, B. Gaugler, C. Landry, F. Brasseur, J. P. Cosyns, B. Weynand, T. Boon and B. J. Van Den Eynde (2001). "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**(10): 1189-98.
- Proudfoot, O., D. Pouniotis, K. C. Sheng, B. E. Loveland and G. A. Pietersz (2007). "Dendritic cell vaccination." *Expert Rev Vaccines* **6**(4): 617-33.
- Quattrone, A., A. Pascale, X. Nogues, W. Zhao, P. Gusev, A. Pacini and D. L. Alkon (2001). "Posttranscriptional regulation of gene expression in learning by the neuronal ELAV-like mRNA-stabilizing proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(20): 11668-73.
- Ramirez-Montagut, T., M. J. Turk, J. D. Wolchok, J. A. Guevara-Patino and A. N. Houghton (2003). "Immunity to melanoma: unraveling the relation of tumor immunity and autoimmunity." *Oncogene* **22**(20): 3180-7.
- Rammensee, H. G., T. Weischenk, C. Gouttefangeas and S. Stevanovic (2002). "Towards patient-specific tumor antigen selection for vaccination." *Immunol Rev* **188**: 164-76.
- Rastetter, W., A. Molina and C. A. White (2004). "Rituximab: expanding role in therapy for lymphomas and autoimmune diseases." *Annu Rev Med* **55**: 477-503.
- Ratti, A., C. Fallini, L. Cova, R. Fantozzi, C. Calzarossa, E. Zennaro, A. Pascale, A. Quattrone and V. Silani (2006). "A role for the ELAV RNA-binding proteins in neural stem cells: stabilization of Msi1 mRNA." *J Cell Sci* **119**(Pt 7): 1442-52.
- Rauer, S. and I. Andreou (2002). "Tumor progression and serum anti-HuD antibody concentration in patients with paraneoplastic neurological syndromes." *Eur Neurol* **47**(4): 189-95.
- Renkvist, N., C. Castelli, P. F. Robbins and G. Parmiani (2001). "A listing of human tumor antigens recognized by T cells." *Cancer Immunol Immunother* **50**(1): 3-15.
- Restifo, N. P., F. Esquivel, A. L. Asher, H. Stotter, R. J. Barth, J. R. Bennink, J. J. Mule, J. W. Yewdell and S. A. Rosenberg (1991). "Defective presentation of endogenous antigens by a murine sarcoma. Implications for the failure of an anti-tumor immune response." *J Immunol* **147**(4): 1453-9.
- Rimoldi, D., V. Rubio-Godoy, V. Dutoit, D. Lienard, S. Salvi, P. Guillaume, D. Speiser, E. Stockert, G. Spagnoli, C. Servis, J. C. Cerottini, F. Lejeune, P. Romero and D. Valmori (2000). "Efficient simultaneous presentation of NY-ESO-1/LAGE-1 primary and nonprimary open reading frame-derived CTL epitopes in melanoma." *J Immunol* **165**(12): 7253-61.
- Ripley, B. J., A. Stephanou, D. A. Isenberg and D. S. Latchman (1999). "Interleukin-10 activates heat-shock protein 90beta gene expression." *Immunology* **97**(2): 226-31.
- Ritter, G. and P. O. Livingston (1991). "Ganglioside antigens expressed by human cancer cells." *Semin Cancer Biol* **2**(6): 401-9.
- Roskrow, M. A., A. Zibert, M. Souquet and D. Dilloo (1999). "Tumor vaccines--application to childhood cancer." *Klin Padiatr* **211**(4): 336-46.
- Rospert, S., Y. Dubaquié and M. Gautschi (2002). "Nascent-polypeptide-associated complex." *Cell Mol Life Sci* **59**(10): 1632-9.

- Ross, R. A., D. L. Lazarova, G. T. Manley, P. S. Smitt, B. A. Spengler, J. B. Posner and J. L. Biedler (1997). "HuD, a neuronal-specific RNA-binding protein, is a potential regulator of MYCN expression in human neuroblastoma cells." *Eur J Cancer* **33**(12): 2071-4.
- Rousseau, A., B. Benyahia, J. Dalmau, F. Connan, J. G. Guillet, J. Y. Delattre and J. Choppin (2005). "T cell response to Hu-D peptides in patients with anti-Hu syndrome." *J Neurooncol* **71**(3): 231-6.
- Rousseau, R. F. and M. K. Brenner (2005). "Vaccine therapies for pediatric malignancies." *Cancer J* **11**(4): 331-9.
- Sahin, U., O. Tureci, H. Schmitt, B. Cochlovius, T. Johannes, R. Schmits, F. Stenner, G. Luo, I. Schobert and M. Pfreundschuh (1995). "Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(25): 11810-3.
- Saito, K., T. Fujiwara, J. Katahira, K. Inoue and H. Sakamoto (2004). "TAP/NXF1, the primary mRNA export receptor, specifically interacts with a neuronal RNA-binding protein HuD." *Biochem Biophys Res Commun* **321**(2): 291-7.
- Sakai, K., Y. Kitagawa and G. Hirose (1999). "Analysis of the RNA recognition motifs of human neuronal ELAV-like proteins in binding to a cytokine mRNA." *Biochem Biophys Res Commun* **256**(2): 263-8.
- Savelyeva, L., R. Corvi and M. Schwab (1994). "Translocation involving 1p and 17q is a recurrent genetic alteration of human neuroblastoma cells." *Am J Hum Genet* **55**(2): 334-40.
- Savino, T. M., R. Bastos, E. Jansen and D. Hernandez-Verdun (1999). "The nucleolar antigen Nop52, the human homologue of the yeast ribosomal RNA processing RRP1, is recruited at late stages of nucleologenesis." *J Cell Sci* **112** (Pt 12): 1889-900.
- Scanlan, M. J., J. D. Gordan, B. Williamson, E. Stockert, N. H. Bander, V. Jongeneel, A. O. Gure, D. Jager, E. Jager, A. Knuth, Y. T. Chen and L. J. Old (1999). "Antigens recognized by autologous antibody in patients with renal-cell carcinoma." *Int J Cancer* **83**(4): 456-64.
- Scanlan, M. J., A. O. Gure, A. A. Jungbluth, L. J. Old and Y. T. Chen (2002). "Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy." *Immunol Rev* **188**: 22-32.
- Schild, H., D. Arnold-Schild, E. Lammert and H. G. Rammensee (1999). "Stress proteins and immunity mediated by cytotoxic T lymphocytes." *Curr Opin Immunol* **11**(1): 109-13.
- Schleiermacher, G., H. Rubie, O. Hartmann, C. Bergeron, P. Chastagner, F. Mechinaud and J. Michon (2003). "Treatment of stage 4s neuroblastoma--report of 10 years' experience of the French Society of Paediatric Oncology (SFOP)." *Br J Cancer* **89**(3): 470-6.
- Schramm, M., P. Falkai, T. Pietsch, I. Neidt, R. Egensperger and T. A. Bayer (1999). "Neural expression profile of Elav-like genes in human brain." *Clin Neuropathol* **18**(1): 17-22.
- Schwab, M. (1993). "Amplification of N-myc as a prognostic marker for patients with neuroblastoma." *Semin Cancer Biol* **4**(1): 13-8.
- Schwab, M., F. Westermann, B. Hero and F. Berthold (2003). "Neuroblastoma: biology and molecular and chromosomal pathology." *Lancet Oncol* **4**(8): 472-80.
- Seeger, R. C., G. M. Brodeur, H. Sather, A. Dalton, S. E. Siegel, K. Y. Wong and D. Hammond (1985). "Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas." *N Engl J Med* **313**(18): 1111-6.
- Sekido, Y., S. A. Bader, D. P. Carbone, B. E. Johnson and J. D. Minna (1994). "Molecular analysis of the HuD gene encoding a paraneoplastic encephalomyelitis antigen in human lung cancer cell lines." *Cancer Res* **54**(18): 4988-92.
- Seliger, B. (2005). "Strategies of tumor immune evasion." *BioDrugs* **19**(6): 347-54.
- Shea, T. B. and M. L. Beermann (1999). "Neuronal intermediate filament protein alpha-internexin facilitates axonal neurite elongation in neuroblastoma cells." *Cell Motil Cytoskeleton* **43**(4): 322-33.
- Shiku, H. (2003). "Importance of CD4+ helper T-cells in antitumor immunity." *Int J Hematol* **77**(5): 435-8.
- Shiku, H., T. Takahashi and H. F. Oettgen (1976). "Cell surface antigens of human malignant melanoma. II. Serological typing with immune adherence assays and definition of two new surface antigens." *J Exp Med* **144**(4): 873-81.
- Sidera, K., M. Samiotaki, E. Yfanti, G. Panayotou and E. Patsavoudi (2004). "Involvement of cell surface HSP90 in cell migration reveals a novel role in the developing nervous system." *J Biol Chem* **279**(44): 45379-88.
- Sillevis Smitt, P. A., G. T. Manley and J. B. Posner (1995). "Immunization with the paraneoplastic encephalomyelitis antigen HuD does not cause neurologic disease in mice." *Neurology* **45**(10): 1873-8.
- Simon, T., B. Hero, A. Faldum, R. Handgretinger, M. Schrappe, D. Niethammer and F. Berthold (2004). "Consolidation treatment with chimeric anti-GD2-antibody ch14.18 in children older than 1 year with metastatic neuroblastoma." *J Clin Oncol* **22**(17): 3549-57.
- Simpson, A. J., O. L. Caballero, A. Jungbluth, Y. T. Chen and L. J. Old (2005). "Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer." *Nat Rev Cancer* **5**(8): 615-25.
- Slager, E. H., C. E. van der Minne, M. Kruse, D. D. Krueger, M. Griffioen and S. Osanto (2004). "Identification of multiple HLA-DR-restricted epitopes of the tumor-associated antigen CAMEL by CD4+ Th1/Th2 lymphocytes." *J Immunol* **172**(8): 5095-102.
- Soling, A., P. Schurr and F. Berthold (1999). "Expression and clinical relevance of NY-ESO-1, MAGE-1 and MAGE-3 in neuroblastoma." *Anticancer Res* **19**(3B): 2205-9.

- Sonnenfeld, K. H. and D. N. Ishii (1982). "Nerve growth factor effects and receptors in cultured human neuroblastoma cell lines." *J Neurosci Res* **8**(2-3): 375-91.
- Spector, B. D., G. S. Perry, 3rd and J. H. Kersey (1978). "Genetically determined immunodeficiency diseases (GDID) and malignancy: report from the immunodeficiency--cancer registry." *Clin Immunol Immunopathol* **11**(1): 12-29.
- Spiotto, M. T., Y. X. Fu and H. Schreiber (2003). "Tumor immunity meets autoimmunity: antigen levels and dendritic cell maturation." *Curr Opin Immunol* **15**(6): 725-30.
- Sreedhar, A. S., E. Kalmar, P. Csermely and Y. F. Shen (2004). "Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance." *FEBS Lett* **562**(1-3): 11-5.
- Srivastava, P. K., A. B. DeLeo and L. J. Old (1986). "Tumor rejection antigens of chemically induced sarcomas of inbred mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(10): 3407-11.
- Stellas, D., A. Karameris and E. Patsavoudi (2007). "Monoclonal antibody 4C5 immunostains human melanomas and inhibits melanoma cell invasion and metastasis." *Clin Cancer Res* **13**(6): 1831-8.
- Steller, U., S. Kohls, B. Muller, R. Soller, R. Muller, J. Schlender and D. H. Blohm (1996). "The RNA binding protein HuD: rat cDNA and analysis of the alternative spliced mRNA in neuronal differentiating cell lines P19 and PC12." *Brain Res Mol Brain Res* **35**(1-2): 285-96.
- Stenberg, R. M., D. R. Thomsen and M. F. Stinski (1984). "Structural analysis of the major immediate early gene of human cytomegalovirus." *J Virol* **49**(1): 190-9.
- Sterba, J. (2002). "Contemporary therapeutic options for children with high risk neuroblastoma." *Neoplasma* **49**(3): 133-40.
- Supko, J. G., R. L. Hickman, M. R. Grever and L. Malspeis (1995). "Preclinical pharmacologic evaluation of geldanamycin as an antitumor agent." *Cancer Chemother Pharmacol* **36**(4): 305-15.
- Szabo, A., J. Dalmau, G. Manley, M. Rosenfeld, E. Wong, J. Henson, J. B. Posner and H. M. Furneaux (1991). "HuD, a paraneoplastic encephalomyelitis antigen, contains RNA-binding domains and is homologous to Elav and Sex-lethal." *Cell* **67**(2): 325-33.
- Tanaka, K., M. Tanaka, T. Inuzuka, R. Nakano and S. Tsuji (1999). "Cytotoxic T lymphocyte-mediated cell death in paraneoplastic sensory neuronopathy with anti-Hu antibody." *J Neurol Sci* **163**(2): 159-62.
- Tatsumi, T. and W. J. Storkus (2002). "Dendritic cell-based vaccines and therapies for cancer." *Expert Opin Biol Ther* **2**(8): 919-28.
- Tilgen, W., S. Seiter and K. Uhl (1997). "Current therapy strategies for malignant melanoma with special regard to immunotherapy with cytokines." In: C. Aul, W. Schneider (eds) *Interferons. Biological activities and clinical efficacy*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York: 165-195.
- Tonini, G. P., L. Boni, A. Pession, D. Rogers, A. Iolascon, G. Basso, L. Cordero di Montezemolo, F. Casale, A. Pession, P. Perri, K. Mazzocco, P. Scaruffi, C. Lo Cunsolo, N. Marchese, C. Milanaccio, M. Conte, P. Bruzzi and B. De Bernardi (1997). "MYCN oncogene amplification in neuroblastoma is associated with worse prognosis, except in stage 4s: the Italian experience with 295 children." *J Clin Oncol* **15**(1): 85-93.
- Tora, M., V. M. Barbera and F. X. Real (2000). "Detection of HuD transcripts by means of reverse transcriptase and polymerase chain reaction: implications for the detection of minimal residual disease in patients with small cell lung cancer." *Cancer Lett* **161**(2): 157-64.
- Trieb, K., R. Gerth, G. Holzer, J. G. Grohs, P. Berger and R. Kotz (2000). "Antibodies to heat shock protein 90 in osteosarcoma patients correlate with response to neoadjuvant chemotherapy." *Br J Cancer* **82**(1): 85-7.
- Trowsdale, J., P. Travers, W. F. Bodmer and R. A. Patillo (1980). "Expression of HLA-A, -B, and -C and beta 2-microglobulin antigens in human choriocarcinoma cell lines." *J Exp Med* **152**(2 Pt 2): 11s-17s.
- Tsuboi, N., M. Ishikawa, Y. Tamura, S. Takayama, H. Tobioka, A. Matsuura, K. Hirayoshi, K. Nagata, N. Sato and K. Kikuchi (1994). "Monoclonal antibody specifically reacting against 73-kilodalton heat shock cognate protein: possible expression on mammalian cell surface." *Hybridoma* **13**(5): 373-81.
- Tsutsumi, S. and L. Neckers (2007). "Extracellular heat shock protein 90: A role for a molecular chaperone in cell motility and cancer metastasis." *Cancer Sci* **98**(10): 1536-9.
- Tuettenberg, A., E. Schmitt, J. Knop and H. Jonuleit (2007). "Dendritic cell-based immunotherapy of malignant melanoma: success and limitations." *J Dtsch Dermatol Ges* **5**(3): 190-6.
- Tureci, O., U. Sahin, M. Koslowski, B. Buss, C. Bell, P. Ballweber, C. Zwick, T. Eberle, M. Zuber, C. Villena-Heinsen, G. Seitz and M. Pfreundschuh (2002). "A novel tumour associated leucine zipper protein targeting to sites of gene transcription and splicing." *Oncogene* **21**(24): 3879-88.
- Tureci, O., U. Sahin, C. Zwick, M. Koslowski, G. Seitz and M. Pfreundschuh (1998). "Identification of a meiosis-specific protein as a member of the class of cancer/testis antigens." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(9): 5211-6.
- Tureci, O., H. Schmitt, N. Fadle, M. Pfreundschuh and U. Sahin (1997). "Molecular definition of a novel human galectin which is immunogenic in patients with Hodgkin's disease." *J Biol Chem* **272**(10): 6416-22.
- Udono, H. and P. K. Srivastava (1993). "Heat shock protein 70-associated peptides elicit specific cancer immunity." *J Exp Med* **178**(4): 1391-6.
- Ueda, R., H. Shiku, M. Pfreundschuh, T. Takahashi, L. T. Li, W. F. Whitmore, H. F. Oettgen and L. J. Old (1979). "Cell surface antigens of human renal cancer defined by autologous typing." *J Exp Med* **150**(3): 564-79.

- Uenaka, A., T. Ono, T. Akisawa, H. Wada, T. Yasuda and E. Nakayama (1994). "Identification of a unique antigen peptide pRL1 on BALB/c RL male 1 leukemia recognized by cytotoxic T lymphocytes and its relation to the Akt oncogene." *J Exp Med* **180**(5): 1599-607.
- Ullrich, S. J., E. A. Robinson, L. W. Law, M. Willingham and E. Appella (1986). "A mouse tumor-specific transplantation antigen is a heat shock-related protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(10): 3121-5.
- Urban, J. L., R. C. Burton, J. M. Holland, M. L. Kripke and H. Schreiber (1982). "Mechanisms of syngeneic tumor rejection. Susceptibility of host-selected progressor variants to various immunological effector cells." *J Exp Med* **155**(2): 557-73.
- Valbuena, J. R., G. Z. Rassidakis, P. Lin, C. Atwell, G. V. Georgakis, A. Younes, D. Jones and L. J. Medeiros (2005). "Expression of heat-shock protein-90 in non-Hodgkin's lymphomas." *Mod Pathol* **18**(10): 1343-9.
- Vamvakopoulos, N. C., C. A. Griffin, A. L. Hawkins, C. Lee, G. P. Chrousos and E. W. Jabs (1993). "Mapping the intron-containing human hsp90 alpha (HSPCAL4) gene to chromosome band 14q32." *Cytogenet Cell Genet* **64**(3-4): 224-6.
- Van Bleek, G. M. and S. G. Nathenson (1990). "Isolation of an endogenously processed immunodominant viral peptide from the class I H-2Kb molecule." *Nature* **348**(6298): 213-6.
- van der Bruggen, P., C. Traversari, P. Chomez, C. Lurquin, E. De Plaen, B. Van den Eynde, A. Knuth and T. Boon (1991). "A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma." *Science* **254**(5038): 1643-7.
- Van Tine, B. A., J. F. Knops, A. Butler, P. Deloukas, G. M. Shaw and P. H. King (1998). "Localization of HuC (ELAVL3) to chromosome 19p13.2 by fluorescence in situ hybridization utilizing a novel tyramide labeling technique." *Genomics* **53**(3): 296-9.
- Verschuuren, J. J., M. Perquin, G. ten Velde, M. De Baets, P. B. Vriesman and A. Twijnstra (1999). "Anti-Hu antibody titre and brain metastases before and after treatment for small cell lung cancer." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **67**(3): 353-7.
- Voltz, R. (2002). "Paraneoplastic neurological syndromes: an update on diagnosis, pathogenesis, and therapy." *Lancet Neurol* **1**(5): 294-305.
- Voltz, R. D., J. B. Posner, J. Dalmau and F. Graus (1997). "Paraneoplastic encephalomyelitis: an update of the effects of the anti-Hu immune response on the nervous system and tumour." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **63**(2): 133-6.
- Wang, H. Y., G. Peng, Z. Guo, E. M. Shevach and R. F. Wang (2005). "Recognition of a new ARTC1 peptide ligand uniquely expressed in tumor cells by antigen-specific CD4+ regulatory T cells." *J Immunol* **174**(5): 2661-70.
- Wang, H. Y. and R. F. Wang (2007). "Regulatory T cells and cancer." *Curr Opin Immunol* **19**(2): 217-23.
- Wang, R. F. and S. A. Rosenberg (1996). "Human tumor antigens recognized by T lymphocytes: implications for cancer therapy." *J Leukoc Biol* **60**(3): 296-309.
- Wang, R. F., X. Wang, A. C. Atwood, S. L. Topalian and S. A. Rosenberg (1999). "Cloning genes encoding MHC class II-restricted antigens: mutated CDC27 as a tumor antigen." *Science* **284**(5418): 1351-4.
- Wen, W., J. L. Meinkoth, R. Y. Tsien and S. S. Taylor (1995). "Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus." *Cell* **82**(3): 463-73.
- Westermann, F., K. O. Henrich, J. S. Wei, W. Lutz, M. Fischer, R. Konig, R. Wiedemeyer, V. Ehemann, B. Brors, K. Ernestus, I. Leuschner, A. Benner, J. Khan and M. Schwab (2007). "High Skp2 Expression Characterizes High-Risk Neuroblastomas Independent of MYCN Status." *Clin Cancer Res* **13**(16): 4695-703.
- Weston, C. R. and R. J. Davis (2007). "The JNK signal transduction pathway." *Curr Opin Cell Biol* **19**(2): 142-9.
- White, P. S., J. M. Maris, C. Beltinger, E. Sulman, H. N. Marshall, M. Fujimori, B. A. Kaufman, J. A. Biegel, C. Allen, C. Hilliard. (1995). "A region of consistent deletion in neuroblastoma maps within human chromosome 1p36.2-36.3." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(12): 5520-4.
- Whitesell, L. and S. L. Lindquist (2005). "HSP90 and the chaperoning of cancer." *Nat Rev Cancer* **5**(10): 761-72.
- Workman, P. (2004). "Combinatorial attack on multistep oncogenesis by inhibiting the Hsp90 molecular chaperone." *Cancer Lett* **206**(2): 149-57.
- Xie, X., R. Schmits, C. Renner, D. Preuss, B. Kubuschok and M. Pfreundschuh (2001). "Systematic search and molecular characterization of the antigenic targets of myeloma immunoglobulins: a monoclonal IgA from a female patient targeting sperm-specific cylicin II." *Cancer Immun* **1**: 11.
- Xu, W. and L. Neckers (2007). "Targeting the molecular chaperone heat shock protein 90 provides a multifaceted effect on diverse cell signaling pathways of cancer cells." *Clin Cancer Res* **13**(6): 1625-9.
- Yang, Y., Z. B. Niu, Y. Hou and C. L. Wang (2006). "The expression of HSP70 and HSP90alpha in children with Wilms tumor." *J Pediatr Surg* **41**(6): 1062-6.
- Yano, M., H. J. Okano and H. Okano (2005). "Involvement of Hu and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K in neuronal differentiation through p21 mRNA post-transcriptional regulation." *J Biol Chem* **280**(13): 12690-9.
- Yonekura, K., S. Yokota, S. Tanaka, H. Kubota, N. Fujii, H. Matsumoto and S. Chiba (2004). "Prevalence of anti-heat shock protein antibodies in cerebrospinal fluids of patients with Guillain-Barre syndrome." *J Neuroimmunol* **156**(1-2): 204-9.

-
- Yotov, W. V. and R. St-Arnaud (1996). "Differential splicing-in of a proline-rich exon converts alphaNAC into a muscle-specific transcription factor." Genes Dev **10**(14): 1763-72.
- Yotov, W. V. and R. St-Arnaud (1996). "Mapping of the human gene for the alpha-NAC/1.9.2 (NACA/1.9.2) transcriptional coactivator to Chromosome 12q23-24.1." Mamm Genome **7**(2): 163-4.
- Yu, Z. and N. P. Restifo (2002). "Cancer vaccines: progress reveals new complexities." J Clin Invest **110**(3): 289-94.
- Zhang, Q. H., M. Ye, X. Y. Wu, S. X. Ren, M. Zhao, C. J. Zhao, G. Fu, Y. Shen, H. Y. Fan, G. Lu, M. Zhong, X. R. Xu, Z. G. Han, J. W. Zhang, J. Tao, Q. H. Huang, J. Zhou, G. X. Hu, J. Gu, S. J. Chen and Z. Chen (2000). "Cloning and functional analysis of cDNAs with open reading frames for 300 previously undefined genes expressed in CD34+ hematopoietic stem/progenitor cells." Genome Res **10**(10): 1546-60.
- Zhu, H., R. A. Hasman, V. A. Barron, G. Luo and H. Lou (2006). "A nuclear function of Hu proteins as neuron-specific alternative RNA processing regulators." Mol Biol Cell **17**(12): 5105-14.

X Danksagung

Schlussendlich bedanke ich mich bei all denen, die das Zustandekommen dieser Arbeit ermöglichten und mich während dieser Zeit unterstützt haben.

Ganz besonders bedanke ich mich bei meinen Betreuern PD Dr. Uta Behrends und Dr. Josef Mautner, Leiter der Klinischen Kooperationsgruppe der Kinderklinik der TUM und des Instituts für Klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik der GSF, für die ausgezeichnete Einweisung in das wissenschaftliche Arbeiten und die molekularbiologische Methodik. Die Zusammenarbeit war immer freundschaftlich und motivierend, keine meiner Fragen blieb je unbeantwortet, und ihre Erfahrung und ihr Wissen beeindruckte mich immer wieder aufs Neue. Für das nicht zu unterschätzende, kritische Korrekturlesen der Arbeit bin ich darüber hinaus sehr dankbar. Nicht unerwähnt bleiben sollte auch die Bereitstellung der laboreigenen Musikanlage samt guter Musik, die manch einen Arbeitstag verschönert hat.

Weiterhin bedanke ich mich bei Prof. Dr. Stefan Burdach als Leiter der Kinderklinik der TUM und Prof. Dr. Georg W. Bornkamm als Leiter des GSF-Instituts für Klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik sowie bei Prof. Dr. Stephan Müller-Wehrich als ehemaligem Leiter der Abteilung für pädiatrische Onkologie und Hämatologie des Krankenhauses München Schwabing, welcher diese Arbeit ermöglicht und bis zu seinem zu frühen Tode mitbetreut hat.

Ausdrücklich bedanke ich mich bei meiner gesamten Familie, meinen Großeltern, meinen Eltern, meiner Tante und meinem Bruder für die Unterstützung während dieser Arbeit sowie meines gesamten Studiums der Medizin.

Allen Mitarbeitern im Labor danke ich für das angenehme Arbeitsklima.