

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

Identifizierung und Charakterisierung von Tumorantigenen
eines Osteosarkoms
mittels autologer serologischer Analyse einer
Tumor-cDNA-Expressionsbibliothek

Milena Bornkamm

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. St. Burdach

Die Dissertation wurde am 12.06.2008 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 22.10.2008
angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	V-VIII
I. EINLEITUNG.....	1
I.1. Einführung in das Arbeitsthema.....	1
I.2. Fragestellung der Arbeit.....	2
I.3. Das Osteosarkom.....	3
I.3.1. Histopathologie.....	3
I.3.2. Molekularpathologie.....	4
I.3.3. Klinische Stadieneinteilung.....	8
I.3.4. Häufigkeit und Verteilung.....	9
I.3.5. Prognose.....	10
I.3.5.1. Klassische prognostische Parameter.....	10
I.3.5.2. Neue prognostische Parameter.....	11
I.3.6. Therapie.....	11
I.3.6.1. Konventionelle Behandlungsverfahren.....	11
I.3.6.2. Experimentelle Behandlungsverfahren.....	15
I.4. Tumorimmuntherapie.....	16
I.4.1. Nicht-antigenspezifische Tumorimmuntherapie.....	16
I.4.2. Antigen-spezifische Tumorimmuntherapie.....	18
I.4.2.1. Passive Immunisierung.....	18
I.4.2.2. Aktive Immunisierung.....	19
I.4.3. Immunologische Maskierung von Tumoren.....	19
I.4.4. Tumorantigene.....	20
I.4.4.1. Definition und molekulare Charakteristika.....	20
I.4.4.2. Methoden zur Identifizierung von Tumorantigenen.....	22
I.4.4.2.1. T-Zell-Verfahren.....	22
I.4.4.2.1.1. Genetische Methoden.....	22
I.4.4.2.1.2. Biochemische Methoden.....	23
I.4.4.2.2. SEREX-Methode.....	23
I.4.5. Immuntherapie des Osteosarkoms.....	24
I.4.5.1. Historische Entwicklung.....	24
I.4.5.2. Aktuelle, nicht-antigenspezifische Ansätze.....	25
I.4.5.3. Zielstrukturen für antigenspezifische Ansätze.....	26

II.	MATERIAL	28
II.1.	Biologisches Material	28
II.1.1.	Tumor cDNA-Expressionsbibliothek.....	28
II.1.2.	Bakterien.....	28
II.1.3.	Phagen.....	29
II.1.4.	Serumproben.....	29
II.1.5.	Sekundärantikörper.....	30
II.1.6.	Gesamtzelluläre RNA und cDNA aus Gewebe.....	30
II.2.	Oligonukleotide	30
II.3.	Chemikalien	31
II.4.	Enzyme	32
II.5.	Kits	32
II.6.	Verbrauchsmaterial	32
II.7.	Software und Datenbanken	32
II.8.	Geräte	33
III.	METHODEN	34
III.1.	Serex	34
III.1.1.	Bakterienanzucht.....	34
III.1.1.1.	<i>E.coli</i> -Bakterien des Stammes XL-1 Blue MRF'.....	34
III.1.1.2.	<i>E.coli</i> -Bakterien des Stammes SOLR.....	35
III.1.2.	Transfektion der XL-1 Bakterien mit λ -Phagen.....	36
III.1.3.	Kultur der transfizierten Bakterien auf Agarplatten.....	36
III.1.4.	Titerbestimmung der Phagenlösung.....	36
III.1.5.	Blue-White-Test.....	37
III.1.6.	Amplifikation der cDNA-Expressions-Bibliothek.....	37
III.1.7.	Übertragung der Proteine auf Nitrozellulose-Folien.....	38
III.1.8.	Inkubation der Folien mit Patientenserum.....	39
III.1.9.	Inkubation der Folien mit ALP-markiertem Zweitantikörper.....	39
III.1.10.	Alkalische Phosphatase-Färbung.....	40
III.1.11.	Isolation positiver Klone.....	40
III.1.12.	Ausschluss von IgG-Klonen und Färbeartefakten.....	41
III.1.13	Vereinzelung positiver Klone.....	41
III.1.14.	Vermehrung positiver Phagenklone.....	42

III.1.15.	Bestimmung des Titers positiver Phagenklone.....	42
III.2.	Differentielle serologische Analyse SEREX-definierter Antigene.....	43
III.3.	DNA-Präparation.....	43
III.3.1.	Subklonierung durch „in vivo Exzision“.....	43
III.3.2.	Mini-Präparation von Plasmid-DNA.....	47
III.3.3.	Maxi-Präparation von Plasmid-DNA.....	48
III.4.	DNA-Analyse.....	49
III.4.1.	Bestimmung der Länge der cDNA-Inserts.....	49
III.4.1.1.	DNA-Verdau mit Restriktionsenzymen.....	49
III.4.1.2.	Agarose-Gelelektrophorese.....	49
III.4.1.3.	Sequenzanalyse.....	50
III.5.	mRNA Expressionsanalyse.....	51
III.5.1.	RT-PCR.....	51
III.5.1.1.	Reverse Transkription (RT).....	51
III.5.1.2.	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	51
III.5.1.3.	Isolation von PCR-Produkten aus dem Agarose-Gel.....	52
IV.	ERGEBNISSE.....	53
IV.1.	Serologische Identifizierung und molekulare Charakterisierung von Osteosarkomantigenen.....	53
IV.2.	Untersuchungen zur Immunogenität der SEREX-definierten OS-Antigene.....	86
IV.2.1.	Differentielle Serumanalyse.....	87
IV.2.2.	SEREX-Datenbank- und Literaturrecherche zur Immunogenität der mit SEREX identifizierten Antigene.....	90
IV.3.	Untersuchungen zur Expression der Osteosarkomantigene.....	93
IV.3.1.	Literatur und Datenbankrecherche zur Expression.....	93
IV.3.2.	mRNA-Expressionsanalyse mittels RT-PCR.....	97
V.	DISKUSSION.....	99
V.1.	Dominante Rolle von Autoantigenen bei der Immun- erkennung des Osteosarkoms.....	100
V.2.	Neue molekulare Aspekte der identifizierten Autoantigene.....	101

V.3.	Evidenzen für eine pathogenetische, diagnostische und/oder therapeutische Bedeutung der identifizierten Autoantigene Im Kontext von malignen Tumoren.....	102
V.4.	Methodische Anmerkungen zur Klassifizierung von SEREX- Antigenen.....	110
V.5.	Biologische und klinische Bedeutung der humoralen Immun- antwort im Kontext von Tumoren.....	111
V.6.	Seit Beginn der Arbeit neu beschriebene OS-Antigene.....	114
V.7.	Tumor- und Autoantigene als mögliche Zielstrukturen der Immuntherapie.....	114
V.8.	Ausblick.....	116
VI.	ZUSAMMENFASSUNG.....	118
VII.	LITERATUR.....	120
VIII.	DANKSAGUNG.....	145

Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
ACT	Adoptiver Zelltransfer (<i>adoptive cell transfer</i>)
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
ALP	Alkalische Phosphatase
Amp	Ampicillin
APC	antigenpräsentierende Zellen (<i>antigen presenting cells</i>)
ARF	<i>alternative reading frame</i>
AS	Aminosäure
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate-toluidine
bp	Basenpaar
°C	Grad Celsius
Ca	Karzinom
CDK4	<i>cyclin-dependent kinase-4</i>
cDNA	komplementäre DNA
CDS	Kodierende Sequenz (<i>coding sequence</i>)
c-erbB-2	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
CGH	<i>comparative genome hybridisation</i>
CML	Chronische myeloische Leukämie
COG	<i>North American Children's Oncology Group</i>
COSS	deutsch-österreichisch-schweizerische Cooperative Osteosarkom-Studie
CTA	<i>Cancer testis</i> -Antigen
CTL	Zytotoxische T-Lymphozyten
DCC	<i>deleted in colon cancer</i>
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethylenpyrocarbonat
DHFR	Dihydrofolat-Reduktase
dl	Deziliter
DLI	Spenderlymphozyten-Infusion (<i>donor lymphocyte infusion</i>)
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure

DMSO	Dimethylsulfoxid
dsDNA	doppelsträngige DNA
DZ	Dendritische Zellen
E	Extinktion
EBV	Epstein-Barr-Virus
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
EOI	<i>European Osteosarcoma Intergroup</i>
EURAMOS	europäisch-amerikanische Osteosarkomstudie
E. coli	Escherichia coli
EmT	Embryonaler Tumor
ET	Ewing Tumor
g	Gramm
GD2	Disialogangliosid-2
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony stimulating factor</i>
GPOH	Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie
GvHD	Spender-gegen-Empfänger-Erkrankung (<i>graft-versus-host disease</i>)
GvT	Spender gegen Tumor (<i>graft versus tumor</i>)
HDM2	<i>human double minute-2</i>
HD	Hochdosis
HER2/neu	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i>
HLA	<i>human leucocyte antigen</i>
HNPCC	Familiäres nicht-polypöses Kolonkarzinom
HPLC	<i>high pressure liquid chromatography</i>
HSP	Hitzeschockprotein (<i>heat shock protein</i>)
IFN	Interferon
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalacto-Pyranosid
kB	Kilobasen
kg	Kilogramm
KIR	<i>Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor</i>

l	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase
L-MTP-PE	liposomal verpacktes Muramyl-Tripeptid-Phosphatidyl-Ethanolamin
LOH	Verlust des Heterozygotenstatus (<i>loss of heterozygosity</i>)
M	molar
mM	millimolar
mAK	Monoklonale AK
MAP	Methotrexat, Adriamycin (Doxorubicin), Cisplatin
MAPIE	MAP + Ifosfamid, Etoposid
MB	Medulloblastom
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MDM2	<i>murine double minute-2</i>
MDR	<i>multidrug resistance</i>
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
MHC	Major Histokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
min	Minute
ml	Milliliter
MRD	Minimale Resterkrankung (<i>minimal residual disease</i>)
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
MTX	Methotrexat
NB	Neuroblastom
NBT	Tetrazoliumbromid (<i>Nitroblue-Tetrazolium-chloride</i>)
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
OD	Optische Dichte
ORF	offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
OS	Osteosarkom
p	Plasmid
pDNA	Plasmid-DNA
PBL	Periphere Bluteukozyten
PBMC	Periphere mononukleäre Blutzellen (<i>peripheral blood mononuclear cells</i>)

PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEG	pegilyniert
pfu	Plaque bildende Einheiten (<i>plaque forming units</i>)
PTLD	<i>posttransplant lymphoproliferative disease</i>
RB	Retinoblastom
RFC	<i>reduced folate carrier</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	Reverse Transkription
RT-PCR	RT mit nachfolgender PCR
SAS	<i>sarcoma amplified sequence</i>
SCLC	Kleinzelliges Bronchialkarzinom (<i>small cell lung cancer</i>)
SEREX	<i>serological analysis of recombinant cDNA-expression libraries</i>
Sm-153-EDTMP	Samarium-153-Ethylen-Diamin-Tetramethylen-Phosphonat
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
SOLR	E.coli Bakterienstamm SOLR
SSG	<i>Scandinavian Sarcoma Group</i>
TAA	Tumorassoziertes Antigen
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Tab	Tabelle
Tet	Tetracyclin
TGF	Transforming growth factor
TH	T-Helfer-Lymphozyt
TIL	tumorinfiltrierende T-Zellen
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	Regulatorische T-Zellen
TUM	Technische Universität München
U	Einheiten (<i>units</i>)
ÜLR	Überlebensrate
3'UTR	3'-untranslatierte Region
WHO	Welt-Gesundheits-Organisation (<i>World Health Organisation</i>)
WT	Nephroblastom (Wilms-Tumor)
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indlyl-beta-D-galactopyranoside
XL-1	E. coli Bakterienstamm XL-1 Blue MRF'

I. EINLEITUNG

I.1. Einführung in das Arbeitsthema

Osteosarkome (OS) sind gefolgt von den Ewingtumoren die häufigsten malignen Knochentumoren des Kindes- und Jugendalters. Während vor 30 Jahren kaum ein Betroffener langfristig überlebte, liegt die 3-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit bei Patienten mit OS nach einer polychemotherapeutisch-chirurgischen Kombinationstherapie heute in den meisten Studien bei 60-70 % (EURAMOS, 2005). In den letzten Jahren wurde nach ergänzenden Therapiemöglichkeiten gesucht, um die Heilungschancen weiter zu verbessern und die durch die aggressive Chemotherapie bedingte Morbidität zu reduzieren.

Dass das Immunsystem prinzipiell in der Lage ist, Tumorzellen spezifisch zu eliminieren oder unter Kontrolle zu halten, wurde erstmals von Burnet und Kollegen postuliert (Burnet, 1970; Burnet, 1971). Das Konzept der sogenannten Immunosurveillance-Theorie ist auf folgenden Beobachtungen aufgebaut: Zum einen wurden -wenn auch selten- bei verschiedenen malignen Tumoren, u.a. beim malignen Melanom, spontane Regressionen beobachtet (Printz, 2001), zum anderen erhöhen verschiedene Formen der angeborenen oder medikamentös bedingten Immundefizienz das Risiko zur Ausbildung bestimmter bösartiger Tumoren (Thomas, 1982; Boshoff and Weiss, 2002; Abu-Elmagd et al., 2004). Nach heutiger Vorstellung entstehen im Rahmen vieler maligner Erkrankungen immunologische Effektor- und Gedächtniszellen, die jedoch nicht ausreichend aktiviert werden, um eine tumorkontrollierende Immunantwort zu gewährleisten. Die Identifizierung tumorassoziierter oder tumorspezifischer Antigene ist Voraussetzung für die Entwicklung antigenspezifischer, sicherer und effizienter Immuntherapiestrategien.

Die Standardverfahren zur Identifizierung von Tumorantigenen mit biochemischen (Cox et al., 1994; Singh-Jasuja et al., 2004) oder molekularbiologischen Methoden (van der Bruggen et al., 1991; Wolfel et al., 1995; van der Bruggen et al., 2007) setzen die Verfügbarkeit antigenspezifischer T-Zellklone voraus. Die Isolierung solcher T-Zellklone gelingt nur nach wiederholter Restimulation von T-Zellen durch Tumorzellen, die in Form von Zelllinien verfügbar sein müssen. Die Etablierung von Zelllinien aus soliden Tumoren des Kindesalters gelingt jedoch nur in seltenen Fällen, was die klinische Nutzbarkeit des Verfahrens stark einschränkt. Zur Überwindung dieser Engpässe entwickelten Michael Pfreundschuh und seine Kollegen Ugur Sahin und Özlem Türeci ein serologisches Screeningverfahren (SEREX, *serological analysis of recombinant cDNA expression libraries*), das auf den frühen Arbeiten von Lloyd Old und Michael Pfreundschuh aufbaute und gleichzeitig die Möglichkeiten der modernen Molekularbiologie nutzte (Sahin et al., 1995). Old und Pfreundschuh hatten

gezeigt, dass nach Vorabsorption von Patientenserum mit autologen, normalen Zellen Antikörper im Patientenserum verblieben, die Tumorzellen, nicht aber normale Zellen erkannten. Die Spezifität der Antikörper konnte jedoch aus methodischen Gründen nicht aufgeschlüsselt werden (Pfreundschuh et al., 1980; Old, 1981). Beim SEREX-Verfahren werden hochtitrige Immunglobulin G (IgG)-Antikörper von Tumorpatienten zur Suche nach Antigenen in cDNA-Expressionsbibliotheken aus autologem oder allogem Tumormaterial eingesetzt. Das Vorliegen von IgG-Antikörpern im Serum von Tumorpatienten wird dabei als indirekter Hinweis auf die stattgefundene, antigenspezifische T-Zell-Hilfe an die verantwortlichen B-Zellen gewertet. Voraussetzung für die Anwendung des Verfahrens ist lediglich die Verfügbarkeit je einer kleinen Probe von Patientenserum und Tumorgewebe. Ziel ist die Identifizierung von Tumorantigenen, die definitionsgemäß von IgG-Antikörpern im Serum von Tumorpatienten, nicht jedoch von IgG-Antikörpern im Serum gesunder Probanden erkannt werden.

An der Identifizierung von Tumorantigenen und Entwicklung von Immuntherapiestrategien wird seit ca. zwei Jahrzehnten weltweit fieberhaft gearbeitet. Darüber hinaus spielen tumorassoziierte Antigene und Tumorantigen-spezifische Serumantikörper eine wichtige Rolle als Tumormarker in der Diagnostik und prognostischen Bewertung. Auch in der pädiatrischen Onkologie werden erste Konzepte zur therapeutischen Aktivierung tumorspezifischer Effektorzellen klinisch erprobt (Rooney et al., 1995; Heslop et al., 1996; Rooney et al., 1998).

I.2. Fragestellung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, neue immunogene Zielstrukturen im OS einer pädiatrischen Patientin mit Hilfe der SEREX-Technologie zu identifizieren.

Aus der Biopsie des OS eines 8-jährigen Mädchens sollte mit Hilfe des Lambda-Phagenvektors ZAP eine cDNA-Expressionsbank erstellt und in *E. coli*-Bakterien exprimiert werden. Die rekombinant exprimierten Proteine sollten anschließend in ein Immunscreening eingesetzt, und über Hybridisierung mit Patientenserum IgG-Antikörper-bindende Antigene nachgewiesen werden. Um die Effizienz der Methode zu steigern, sollten die Tumorproteine mit gepoolten Serumproben von fünf Patienten mit OS untersucht werden, darunter auch das autologe Serum. Die molekulare Struktur der Antigene sollte durch Sequenzierung der cDNAs aufgeklärt und durch eine computerbasierte Homologierecherche untersucht werden, ob es sich bei den gefundenen Antigenen um bekannte, molekular veränderte oder neue Genprodukte handelte. Außerdem sollte eine differentielle Serumanalyse der Antigene mit

Proben von gesunden Probanden und weiteren, pädiatrischen Tumorpatienten durchgeführt werden, um Autoantigene von Tumorantigenen zu unterscheiden und die Frage zu beantworten, ob antigenspezifische Antikörper auch bei anderen Patienten mit OS zu finden sind. Die Gewebespezifität der Antigenexpression interessanter Kandidaten sollte durch Datenbank- und Literaturrecherchen sowie in ausgewählten Fällen durch RT-PCR-Analysen verschiedener gesunder und maligner Gewebe untersucht werden.

I.3. Das Osteosarkom

I.3.1. Histopathologie

Das OS ist ein hochaggressiver maligner Knochentumor, dessen proliferierende, neoplastische Spindelzellen Osteoid oder unreife Knochenmatrix produzieren. Die Bildung von Osteoid grenzt das OS von anderen Tumoren des Binde- und Stützgewebes ab. Sie kann unterschiedlich ausgeprägt sein, so dass neben rein osteoblastischen Formen auch eher chondroblastische, fibroblastische und andere Subtypen sowie Mischformen auftreten, die die mesenchymale Herkunft der malignen Zellen und ihre Fähigkeit, in verschiedene Zelltypen zu differenzieren, widerspiegeln. Das sogenannte konventionelle OS, das etwa 75 % aller OS repräsentiert, ist ein primär intramedulläres (zentrales) hochmalignes (*high grade*) Sarkom. Der Tumor kann sich in seiner Ausdehnung auf den Knochen und den Markraum beschränken, infiltriert aber häufig mehr oder weniger auch die angrenzenden Weichgewebe. OS des Kindes- und Jugendalters sind meist an den Metaphysen der langen Röhrenknochen lokalisiert. In mehr als zwei Dritteln aller Fälle ist dabei die Knieregion (distaler Femur, proximale Tibia und Fibula) betroffen. Eine weitere Häufung betrifft den proximalen Oberarm. Weitere mögliche Lokalisationen sind in absteigender Häufigkeit Becken, Kiefer und Rippen. 15-20 % der Patienten weisen bereits zum Zeitpunkt der Diagnosestellung manifeste Metastasen auf. Allerdings liegt auch bei Patienten, die zum Zeitpunkt der Diagnosestellung scheinbar metastasenfrei sind, in 80-90 % der Fälle bereits eine okkulte Mikrometastasierung vor (Marina et al., 2004). In etwa 80 % der Fälle mit Metastasierung sind nur die Lungen betroffen, in den übrigen Fällen ausschließlich oder zusätzlich das Skelett, und sehr selten auch andere Organe. Als *skip lesions* bezeichnet man regionale Metastasen ohne Kontinuität zum Primärtumor in dem Knochen, der vom Primärtumor befallen ist, und in Knochen, die durch ein Gelenk von diesem getrennt sind. Beim multifokalen OS, das mit einer äußerst schlechten Prognose einhergeht, sind mehrere Knochen gleichzeitig befallen. OS werden nach der fünften Auflage der WHO-Klassifikation in verschiedene histologische Typen unterteilt (vgl. **Tab. I.1**, WHO-Klassifikation der

Osteosarkome) (Zoubek, 2006). Neben dem konventionellen, osteoblastischen, chondroblastischen und fibroblastischen OS, das im Kindesalter mit ca. 75 % deutlich überwiegt (Ragland et al., 2002; Sandberg and Bridge, 2003), werden die histologischen Varianten des teleangiektatischen und des kleinzelligen OS sowie des *high grade* Oberflächen-OS unterschieden. Das niedrig maligne (*low grade*) intraossäre OS und parosteale OS sind im Kindesalter extrem selten. Sie haben eine deutlich bessere Prognose und können häufig allein durch Operation geheilt werden. Weitere seltene Formen wie z.B. das sklerosierende osteoblastische OS und das maligne fibröse Sarkom- und Chondroblastom-ähnliche OS werden den konventionellen OS zugeordnet (COSS-96, ; Bielack, 2003; Gutjahr, 2004; EURAMOS, 2005; Zoubek, 2006).

WHO-Klassifikation der Osteosarkome (2002)
Konventionelles OS (chondroblastisch, fibroblastisch, osteoblastisch): hoch-maligne
Teleangiektatisches OS: hoch-maligne
Kleinzelliges OS: hoch-maligne
Niedrig-malignes, zentrales OS: niedrig-maligne
Sekundäres OS: i.d.R. hoch-maligne
Parosteales OS : i.d. R. niedrig-maligne
Periosteales OS: intermediäre Malignität
Hochmalignes Oberflächen-OS: hoch-maligne

Tabelle I.1. Aktuelle WHO-Klassifikation der Osteosarkome.

Die Tabelle zeigt die WHO-Klassifikation aus dem Jahre 2002 (Zoubek, 2006).

I.3.2. Molekularpathologie

Die Mehrzahl der OS entsteht spontan. Neben den sporadischen Fällen treten OS gehäuft auf bei Patienten mit genetischer Prädisposition für das Retinoblastom (RB), mit Li-Fraumeni-Syndrom (Mutationen im Tumorsuppressor p53) oder Rothmund-Thomsen-Syndrom. Daneben beobachtet man OS selten (< 7 %) als Sekundärmalignom nach Bestrahlung (besonders nach Ewingtumor) und im höheren Lebensalter beim Morbus Paget (Bielack und Tabone, 2003).

Das OS neigt, wie viele andere solide Tumoren, zur Aneuploidie und zeigt eine Vielfalt an numerischen und strukturellen Aberrationen (Ragland et al., 2002; Sandberg and Bridge, 2003), die nur schwer mit molekularen Veränderungen zu korrelieren sind.

Bei einigen Subtypen des OS lässt sich eine gewisse Spezifität der Veränderungen ausmachen. So finden sich in paraossalen OS (*low grade*) als einzige zytogenetische Veränderung häufig Ringchromosomen (Bridge et al., 1997). *Comparative genome hybridisation* (CGH)-Analysen haben gezeigt, dass diese Ringchromosomen häufig mit einer DNA-Amplifikation auf Chromosom 12q13-15 vergesellschaftet sind (Szymanska et al., 1996), einer Region, die CDK4, MDM2, SAS und andere mögliche Protoonkogene beherbergt (Ragazzini et al., 1999). Im kleinzelligen OS wurde eine Translokation der Chromosomen 11 und 22, wie sie auch in Ewingtumoren vorkommt, beschrieben (Noguera et al., 1990).

Bisher ist kein spezifischer, zytogenetischer oder molekulargenetischer Marker für das OS identifiziert worden. Während die genaue molekulare Pathogenese noch unklar bleibt, konnten Veränderungen in einzelnen Genen und Signalwegen (wie im *RB*- und *p53*-Gen) beschrieben werden, die anerkanntermaßen bei der Entstehung des OS eine wichtige Rolle spielen. Offenbar ist hier jedoch noch eine Vielzahl anderer Gene beteiligt.

Mutierte oder deletierte Allele von Tumorsuppressorgenen wie *RB* und *p53* wirken gegenüber dem normalen Allel rezessiv. Ihre pathologische Veränderung kommt erst zum Tragen, wenn auch das zweite Allel verloren geht oder mutiert wird. Tumorsuppressorgene kodieren für negative Wachstumsregulatoren, Effektoren von Apoptose und Zellalterung (Seneszenz) sowie DNA-Reparaturfaktoren. Sie unterdrücken unter physiologischen Bedingungen die Wirkungen von wachstumsfördernden und anti-apoptotischen Genen und halten so die Proliferation und Lebensdauer von Zellen unter Kontrolle.

Das *RB*-Gen ist auf Chromosom 13q14 lokalisiert. Sein Genprodukt inaktiviert durch Bindung den E2F1-Transkriptionsfaktor, der Gene der DNA-Synthese und des Zellzyklus reguliert. Wird *RB* phosphoryliert, entlässt es den E2F1-Transkriptionsfaktor aus seiner Bindung, wodurch dieser aktiviert wird und die Progression im Zellzyklus von G1- zur S-Phase vermittelt (Alberts, 2002a). Sowohl Alterationen in *RB* selbst als auch in den zahlreichen Proteinen, die dessen Phosphorylierung regulieren, können zum Verlust der wachstumshemmenden Funktion von *RB* führen. Patienten mit hereditärem *RB* haben ein bis zu 1000-fach erhöhtes Risiko, an einem OS zu erkranken (Kitchin and Ellsworth, 1974; Abramson et al., 1984). Aber auch beim sporadischen OS zeigen sich in etwa 70 % der Fälle Alterationen im *RB*-Gen. Der Verlust eines Allels (*loss of heterozygosity*, LOH) am *RB*-Genlokus findet sich in 60-70 % der OS (Yamaguchi et al., 1992; Belchis et al., 1996), während strukturelle Rearrangements und Punktmutationen weniger häufig zu finden sind (Araki et al., 1991; Wunder et al., 1991; Miller et al., 1996). Ein LOH am *RB*-Genlokus

wurde als ungünstiger prognostischer Faktor beim OS beschrieben (Feugeas et al., 1996; Benassi et al., 1999).

Das Tumorsuppressorgen p53 auf Chromosom 17p13 scheint ebenfalls bei der OS-Entwicklung eine wichtige Rolle zu spielen (Hung and Anderson, 1997). p53 ist das in menschlichen Krebsarten am häufigsten mutierte Gen. p53 ist ein Transkriptionsfaktor, der die Transkription vieler Gene reguliert, die an der Zellzyklus- und Apoptosekontrolle beteiligt sind (Prives and Hall, 1999; Vogelstein and Kinzler, 2004). Über die Transaktivierung des p21^{WAF1}-Gens, dessen Genprodukt RB-phosphorylierende Proteine blockiert, greift p53 indirekt in den RB-Signalweg ein und arretiert Zellen in der G1-Phase. In zahlreichen Studien konnten mit Häufigkeiten von bis zu 50 % Veränderungen (LOH, Genrearrangements oder Punktmutationen) des p53-Gens in OS nachgewiesen werden (Masuda et al., 1987; Guo et al., 1996; Miller et al., 1996; Lonardo et al., 1997; Sztan et al., 1997). Auch die Tatsache, dass Patienten mit Li-Fraumeni-Syndrom, die eine Keimbahnmutation von p53 aufweisen, ein erhöhtes Risiko haben, an Knochensarkomen zu erkranken, liefert weitere Hinweise auf die wichtige Rolle von p53. Veränderungen am p53-Genlocus haben möglicherweise auch prognostische Bedeutung, da gezeigt werden konnte, dass sie mit vermindertem Ansprechen auf Chemotherapeutika einhergehen (Goto et al., 1998). Die kausale Rolle der p53-Veränderungen wird dadurch belegt, dass die Einführung des normalen p53-Gens in OS-Zellen mit p53-Genmutation den neoplastischen Phänotyp revertieren kann (Diller et al., 1990).

An der Regulation von p53 und RB sind weitere Gene, wie z.B. der p53-Antagonist MDM2 (*murine double minute-2*), beim Menschen auch HDM2 genannt, und CDK4 (*cyclin-dependent kinase-4*), beteiligt. Das MDM2-Gen kodiert für ein Protein, das an das p53-Protein bindet und dadurch dessen Degradation einleitet (Momand et al., 1992; Wu et al., 1993). Eine Überexpression von MDM2 setzt den normalen p53-Signalweg außer Kraft und ist in OS bereits beschrieben worden (Miller et al., 1996; Lonardo et al., 1997). CDK4 phosphoryliert im Komplex mit den Regulatorproteinen Cyclin D1 und Cyclin D2 RB und ist damit für die Aktivierung von E2F1 und die Zellzyklusprogression verantwortlich. Durch Amplifikation des CDK4-Gens auf Chromosom 12q13 erhöhte CDK4-Spiegel (Khatib et al., 1993; Maelandsmo et al., 1995) (Elkahloun et al., 1996) sowie Mutationen in CDK4, die zur konstitutiven Aktivierung der Kinase führen, können die Phosphorylierung von RB begünstigen und dadurch die Zellzykluskontrolle stören (Wolfel et al., 1995; Rane et al., 2002). In einer von Ragazzini und Kollegen durchgeführten Untersuchung waren in 13 von 20 *low grade* OS CDK4-Genprodukte hoch exprimiert (Ragazzini et al., 1999).

Das *CDKN2A*-Gen auf Chromosom 9p21, das für den CDK-Inhibitor INK4A kodiert, ist ein anderes möglicherweise bedeutendes Gen, das sowohl an der Regulation des RB- als auch des p53-Signalwegs beteiligt ist. Sein Genprodukt p16^{INK4a} wirkt durch Blockierung von CDK4 im RB-Signalweg als negativer Regulator der Zellzyklusprogression. Das p14^{ARF}-Produkt des *INK4A*-Gens, das von einem alternativen Leserahmen (*alternative reading frame*, ARF) abgelesen wird, hat durch Bindung des Genprodukts MDM2 einen protektiven Effekt auf p53 (Quelle et al., 1995; Weber et al., 1999). Deletionen im *INK4A*-Gen setzen damit gleichzeitig die Wirkung von p16^{INK4a} und p14^{ARF} außer Kraft und beeinträchtigen damit sowohl den RB- als auch den p53-Signalweg. INK4A-Deletionen mit Verlust von p16 finden sich in 10-15 % der OS (Patino-Garcia and Sierrasesumaga, 1997; Maitra et al., 2001).

Noch weitere Tumorsuppressorgene stehen im Verdacht, mit der Entwicklung des OS in Verbindung zu stehen. Häufungen von LOH wurden nicht nur auf Chromosom 13q (RB) und 17p (p53), sondern auch auf 3q und 18q (Yamaguchi et al., 1992; Kruzelock et al., 1997), 4q32-34 (Simons et al., 1999), 6q14 und 15q21 (Nathrath et al., 2002) nachgewiesen. In der Region 18q liegt das *deleted in colon cancer* (DCC)-Gen dessen Expression in einer großen Zahl von OS offenbar herunterreguliert ist (Horstmann et al., 1997). Diese Region ist zudem eng mit dem Paget-Syndrom (Osteitis deformans), einer prädisponierenden Erkrankung mit einem mehr als 1000-fach erhöhten Risiko für das OS des Erwachsenenalters, gekoppelt. Ein LOH 18q wurde sowohl in Paget-Tumoren als auch in sporadischen OS nachgewiesen (Hansen et al., 1999).

Daneben wurde beim OS die Überexpression und/oder Amplifikation verschiedener Proto-Onkogene wie *sarcoma amplified sequence* (SAS), *c-fos*, *c-myc* und *human epidermal growth factor receptor 2* (HER2)/*neu* (*c-erbB-2*) beschrieben (Noble-Topham et al., 1996) (Wu et al., 1990; Onda et al., 1996; Gamberi et al., 1998; Gorlick et al., 1999). Proto-Onkogene steuern als positive Wachstumsregulatoren oder anti-apoptotische Gene die Proliferation und das Überleben einer Zelle. Veränderte Proto-Onkogene wirken dominant gegenüber dem normalen Allel und werden durch Chromosomentranslokationen oder Mutationen sowie durch Fusion mit neuen regulatorischen Elementen bzw. Bildung neuer Fusionsproteine aktiviert.

Die Überexpression zahlreicher anderer, mit Wachstumsfaktoren in Zusammenhang stehender Proteine in OS wie TGFβ-1, TGFβ-3, IGF-1 und des Rezeptor/Ligand-Paars MET/*hepatocyte growth factor* (HGF) wurde ebenfalls berichtet (Ferracini et al., 1995; Kloen et al., 1997; Burrow et al., 1998; Franchi et al., 1998; Oda et al., 2000), lässt sich aber in ihrer pathogenetischen Bedeutung noch nicht hinreichend bewerten. Die Expression der

Metalloproteinasen 2, 9 und 14 spielt darüber hinaus möglicherweise eine Rolle für Wachstum und Invasivität von OS-Zellen (Gorlick et al., 2003).

Auch die Resistenz von OS gegenüber Chemotherapeutika wurde mit spezifischen genetischen Alterationen in Zusammenhang gebracht. Die Resistenz gegenüber Hochdosis (HD)-Methotrexat (MTX) kann auf eine verminderte Aufnahme des Medikaments zurückgeführt werden. Diese kann entweder durch eine verminderte Expression bzw. einen Defekt im Carrier-System für reduziertes Folat (*reduced folate carrier*, RFC), dem Hauptmembrantransporter für MTX in die Zellen, oder durch Alterationen der Dihydrofolat-Reduktase (DHFR) selbst hervorgerufen sein. Nur ein kleiner Prozentsatz der OS zeigte bereits zum Zeitpunkt der initialen diagnostischen Biopsie eine verstärkte Expression der DHFR, während das Enzym nach neoadjuvanter Chemotherapie zum Zeitpunkt der definitiven Operation häufig überexprimiert war. Dies deutete auf eine erworbene MTX-Resistenz hin (Guo et al., 1999). Der Verlust von funktionellem RB könnte ebenfalls zu einer MTX-Resistenz beitragen, da Zellen, denen RB fehlt, über konsekutiv erhöhte Spiegel von E2F1 auch erhöhte Spiegel von Enzymen des DNA-Metabolismus, wie z. B. DHFR, aufweisen (Sandberg and Bridge, 2003).

Das vom *multidrug resistance gene* (MDR1)-Gen kodierte, ATP-abhängige Glycoprotein P fungiert als Efflux-Pumpe für hydrophobe Substanzen, verhindert dadurch die Anreicherung von Zytostatika wie Doxorubicin und Etoposid in der Zelle und vermittelt auf diese Weise Chemotherapieresistenz (Baldini et al., 1999). Aus dieser Erkenntnis ergab sich die Hoffnung, anhand der Expression von Glykoprotein P Patienten mit schlechtem Ansprechen von Patienten mit gutem Ansprechen auf die Chemotherapie frühzeitig unterscheiden und auf dieser Basis die Therapie modifizieren zu können. Ob der Überexpression von Glycoprotein P eine prognostische Bedeutung zukommt, kann noch nicht abschließend beurteilt werden (Gorlick et al., 2003).

I.3.3. Klinische Stadieneinteilung

In der aktuellen, klinischen europäisch-amerikanischen Therapieoptimierungsstudie zum OS, EURAMOS1, wird im Gegensatz zu vielen anderen, soliden Tumoren keine lokale Stadieneinteilung vorgenommen, sondern -unabhängig vom Metastasierungsstatus- lediglich zwischen operablen (chirurgische Komplettresektion mit Sicherheitsabstand) und inoperablen Tumoren unterschieden. Darüberhinaus ist das Ansprechen des Tumors auf die präoperative Chemotherapie entscheidend für die Einteilung in zwei verschiedene Risikogruppen (EURAMOS, 2005).

In der Literatur wird allerdings häufig auf die Klassifikation nach Enneking der *Muskuloskeletal Tumor Society* Bezug genommen (Enneking et al., 1980). Dieses Klassifikationssystem sieht die Einteilung in lokalisierte (Stadium I, II) und primär metastasierte (Stadium III) Tumoren vor, wobei die lokalisierten Primärtumoren weiter nach ihrem histologischen Grad (Stadium I: *low grade*, Stadium II: *high grade*) und ihrer anatomischen Ausdehnung innerhalb der Kortikalisgrenze (A) oder über diese hinaus (B) unterteilt werden (Marina et al., 2004). Im Kindesalter überwiegt deutlich das OS vom *high grade*-Typ (ca. 75 %), das die Kortikalis im Allgemeinen sehr rasch überschreitet (Ragland et al., 2002; Sandberg and Bridge, 2003). Fast alle pädiatrischen OS befinden sich deshalb zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits im klinischen Stadium IIB oder III nach Enneking . Seit 2003 ist zudem eine überarbeitete TNM-Klassifikation für maligne Knochentumoren gültig (Sobin, 2003). Das T-Stadium wird hier vom Durchmesser des Tumors in seiner größten Ausdehnung abgeleitet (T1 \leq 8cm, T2 $>$ 8cm, T3 diskontinuierlicher Primärbefall mit *skip lesions*), Stadium M1 wurde unterteilt in Lungen- (M1a) und andere Fernmetastasen (M1b).

I.3.4. Häufigkeit und Verteilung

Knochentumoren machen mit 4,7 % in der Altersgruppe von 5 bis 9 Jahren und 11,4 % in der Altersgruppe von 10 bis 14 Jahren (Daten des Deutschen Kinderkrebsregisters) (Kaatsch, 2006) einen relativ geringen Anteil unter den kindlichen Malignomen aus. Unter den primären bösartigen Knochentumoren des Kindes- und Jugendalters steht das OS allerdings mit 52,9 % an erster Stelle. Die Rate an Neuerkrankungen beträgt im deutschsprachigen Raum insgesamt etwa 200-250 pro Jahr. International liegen die Inzidenzen für das OS im Kindesalter zwischen 0,1 und 0,4 / 100.000 (Zoubek, 2006). Die Altersverteilung des OS zeigt einen deutlichen Gipfel im zweiten Lebensjahrzehnt während der pubertären Wachstumsphase (daneben einen zweiten Gipfel im späten Erwachsenenalter). In der Altersgruppe der unter 5-Jährigen stellt es eine ausgesprochene Rarität dar. Jungen sind etwas häufiger betroffen als Mädchen (Bielack et al., 2002; Gurney, 2006; Link, 2006).

I.3.5. Prognose

Vor Einführung der Chemotherapie betrug die 2-Jahres-Überlebensrate von Patienten mit OS nach chirurgischer Entfernung des Tumors mit oder ohne Bestrahlung 15-20 % (Marina et al., 2004; EURAMOS, 2005). Durch die Kombination von prä- und postoperativer Chemotherapie und chirurgischer Tumorresektion werden heute in den meisten Studien 3-Jahres-Überlebensraten von 60-70 % erreicht (EURAMOS, 2005).

I.3.5.1. Klassische prognostische Parameter

Mehrere Faktoren haben sich beim OS inzwischen als eindeutig prognostisch bedeutsam erwiesen und gehen deshalb in die klinische Risikostratifizierung ein.

An erster Stelle steht hier die Operabilität des Tumors mit adäquater chirurgischer *en bloc* Resektion, die an der Einhaltung eines Sicherheitsabstands im gesunden Gewebe gemessen wird (Bielack et al., 2004; Marina et al., 2004; Link, 2006). Ein weiterer bedeutender prognostischer Indikator ist das Ansprechen des Tumors auf die präoperative Induktionschemotherapie zum Zeitpunkt der Operation, welches im Prozentsatz vitaler Tumorzellen im Operationspräparat Ausdruck findet (Salzer-Kuntschik et al., 1983). Die 5-Jahres-ÜLR liegt bei Patienten mit *good response* (<10 % vitaler Resttumor) bei 75-80 %, bei Patienten mit *poor response* (\geq 10 % vitaler Resttumor) dagegen lediglich zwischen 45 und 55% (Bielack et al., 2002; EURAMOS, 2005).

Lokalisation und Größe des Primärtumors, die in der Literatur teilweise als eigene prognostische Parameter Erwähnung finden, haben ihrerseits Einfluss auf die Operabilität. Lange schien auch der primäre Metastasierungsstatus prognostisch eine wichtige Rolle zu spielen. Sowohl das Vorhandensein von Metastasen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung als auch eine Lokalisation des Primärtumors im Bereich des Achsenskeletts wurde vielfach als mit einer bedeutend schlechteren Prognose einhergehend beschrieben (Bacci et al., 1998; Kaste et al., 1999; Nagarajan et al., 2005; Picci, 2007). Patienten mit primär metastasiertem OS wurden deshalb ebenso wie Patienten mit Tumoren im Bereich des Stammskeletts in der Vergangenheit häufig von vornherein aus Therapiestudien ausgeschlossen, um eine Verschleierung der Ergebnisse zu vermeiden (vgl. COSS-96). Neuere Analysen zeigen jedoch, dass auch im Hinblick auf primär vorhandene Metastasen lediglich deren vollständige chirurgische Resektabilität für den Therapieerfolg entscheidend ist (Kager et al., 2003; EURAMOS, 2005).

Weitere Faktoren, die für das lokalisierte, konventionelle OS als prognostisch relevant beschrieben worden sind, umfassen das Alter des Patienten (Saeter et al., 1991; Bacci et al.,

2006; Link, 2006) und die Serumspiegel von Laktatdehydrogenase und Alkalischer Phosphatase, wobei diese höchstwahrscheinlich indirekt wiederum die Tumorlast anzeigen (Bielack et al., 2002; Bacci et al., 2006). Diese Parameter gehen international nicht in die aktuelle Risikostratifizierung ein.

I.3.5.2. Neue prognostische Parameter

Eine Vielfalt weiterer im Hinblick auf die Prognose möglicherweise aussagekräftiger Faktoren sind inzwischen identifiziert, jedoch noch nicht an größeren Patientengruppen evaluiert worden. Hierzu gehören beispielsweise die Überexpression des HER2/c-erbB-2 (Onda et al., 1996; Gorlick et al., 1999; Kilpatrick et al., 2001; Scotlandi et al., 2005), die Ploidie der Tumorzellen, spezifische chromosomale Zugewinne oder Verluste (Ozaki et al., 2002; Ozaki et al., 2003), LOH des *RB*-Gens (Feugeas et al., 1996), LOH des *p53*-Lokus (Goto et al., 1998) und die verstärkte Expression des vom MDR1-Gen kodierten Glykoprotein P (Serra et al., 1999; Hornicek et al., 2000; Pakos und Ioannidis, 2003; Serra et al., 2006). Die Daten sind jedoch teilweise uneinheitlich und erlauben noch keine abschließende Beurteilung (vgl. **Kap. I.2.1.2.**).

I.3.6. Therapie

I.3.6.1. Konventionelle Behandlungsverfahren

Voraussetzung für die erfolgreiche Behandlung des lokalisierten OS ist eine Kombination aus effektiver, systemischer Chemotherapie und kompletter operativer Entfernung aller klinisch detektierbaren Tumorherde mit Sicherheitsabstand.

Bei chirurgischer Tumorresektion als alleiniger Behandlungsmethode starb die überwiegende Mehrzahl der Patienten infolge von innerhalb von 1-2 Jahren regelmäßig auftretenden Tumormetastasen (Bielack et al., 2004). Die systemische prä- und postoperative Chemotherapie richtet sich in erster Linie gegen bereits zum Diagnosezeitpunkt bestehende, klinisch okkulte Mikrometastasen. Die präoperative Chemotherapie dient darüber hinaus der lokalen Tumorkontrolle als Voraussetzung für eine möglichst wenig verstümmelnde Operation. Sie erlaubt außerdem eine postoperative Beurteilung der Chemotherapieempfindlichkeit und erleichtert somit die weitere Therapiestratifizierung.

Da OS relativ strahlenresistent sind, spielt die Radiatio für die Lokalthherapie eine deutlich untergeordnete Rolle und sollte inoperablen Situationen vorbehalten bleiben. Im Falle der Unmöglichkeit einer adäquaten Tumorresektion, z.B. bei am Stammskelett lokalisierten Primärtumoren, kann eine zusätzliche Bestrahlung mit bis zu 80 Gray für den Patienten

jedoch von Vorteil sein, wie retrospektive Analysen nahelegen (DeLaney et al., 2005; EURAMOS, 2005; Kempf-Bielack et al., 2005; Link, 2006).

Bis Ende 2002 wurden in Deutschland Patienten mit OS unter Berücksichtigung vorgegebener Einschlusskriterien innerhalb der deutsch-österreichisch-schweizerischen Cooperativen Osteosarkom-Studie (COSS) behandelt. Als Studienpatienten im engeren Sinne wurden lediglich nicht vorbehandelte Patienten mit primär nicht-metastasiertem *high grade* Extremitäten-OS aufgenommen. Therapeutischer Ansatz der COSS 96-Studie war eine Anpassung von Zusammensetzung und Gesamtdosis der notwendigen Chemotherapie an das individuelle Metastasierungsrisiko und damit Rezidivrisiko des Patienten. Anhand der Ergebnisse aus Vorgängerstudien wurden zunächst drei Risikogruppen definiert. Als Stratifikationskriterien dienten ein radiologisch definiertes Tumolvolumen von >150 ml bzw. ≤ 150 ml zum Zeitpunkt der Diagnosestellung sowie der histologische Regressionsgrad 1-6 nach Salzer-Kuntschik, der den Prozentsatz vitaler Tumorzellen im Operationspräparat nach präoperativer Chemotherapie angibt. Der Grenzwert des Tumorzellvolumens wurde auf 150 ml festgelegt, da sich in vorangegangenen Studien oberhalb dieses Grenzwerts ein sprunghafter Anstieg des Metastasierungsrisikos gezeigt hatte. Bis einschließlich Woche 14 erhielten alle Patienten eine identische prä- und postoperative Chemotherapie mit Doxorubicin, HD-MTX, Cisplatin und Ifosfamid sowie eine Tumor-Operation in Woche 10, anschließend erfolgte die Stratifizierung in eine der drei Risikogruppen (vgl. **Abb. I.1**, COSS 96-Therapieübersicht).

Im Niedrigrisikozweig wurde die Therapie zur weiteren Toxizitätseinsparung auf 5 Wochen verkürzt. Obwohl hier aufgrund der Ergebnisse der Vorgängerstudien so gut wie keine Rezidive erwartet wurden, musste der Niedrigrisiko-Therapiearm jedoch im Jahr 2000 vorzeitig geschlossen werden, nachdem innerhalb kurzer Zeit mehrere Meldungen von Spätrezidiven in der entsprechenden Patientengruppe eingegangen waren.

Patienten, die die Kriterien der Standardrisikogruppe erfüllten, wurden randomisiert zwei unterschiedlichen Behandlungsarmen zugeführt, um zu prüfen, ob sich bei gleicher Therapieeffizienz Langzeittoxizität einsparen lässt (COSS-96, 2000).

Die derzeit laufende, europäisch-amerikanische Kooperationsstudie EURAMOS1 für das resezierbare *high grade* OS baut auf den empirisch gewonnenen Erkenntnissen vorausgegangener Therapiestudien mehrerer partizipierender Studiengruppen auf. Zu letzteren zählen neben der COSS-Gruppe die *North American Children's Oncology Group* (COG), die *European Osteosarcoma Intergroup* (EOI) und die *Scandinavian Sarcoma Group* (SSG).

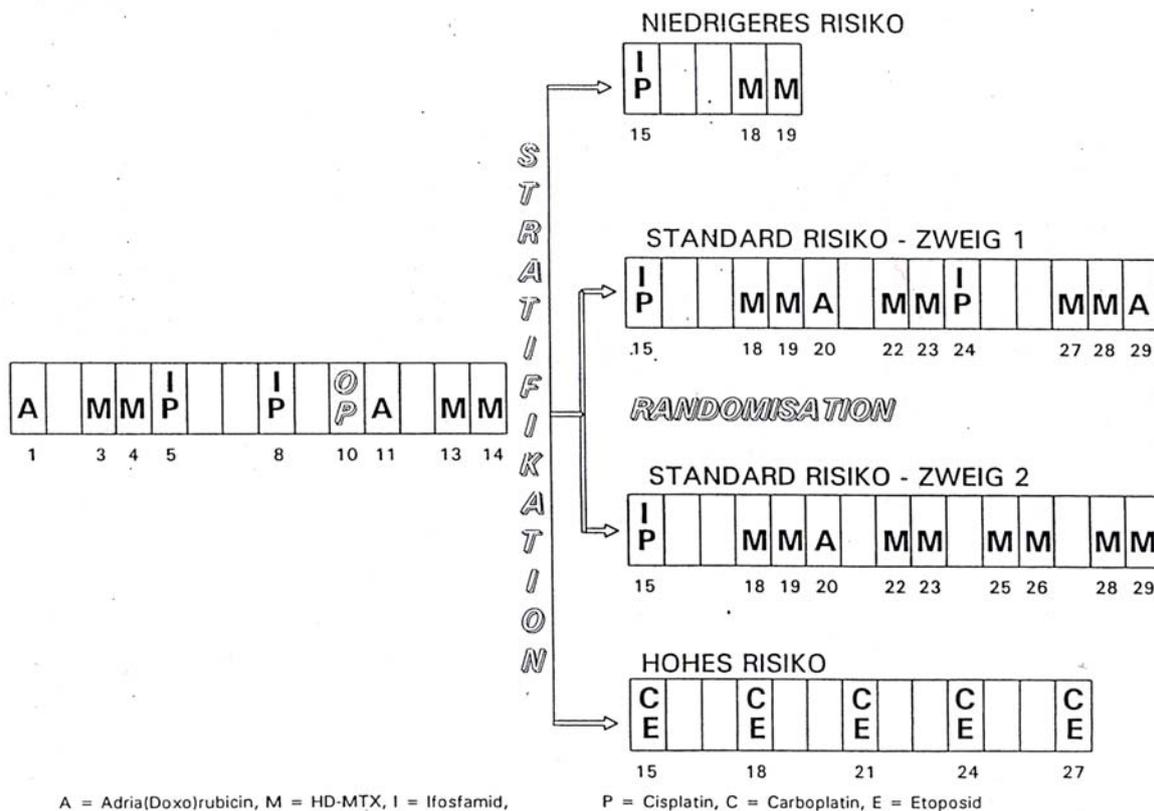


Abb. I.1. COSS 96-Therapieübersicht.

Das Schema entstammt dem Studienprotokoll COSS 96. Der Niedrigrisikozweig wurde wegen vermehrten Auftretens von Spätrezidiven im Jahr 2000 vorzeitig geschlossen.

Voraussetzung für den Einschluss eines Patienten mit *high grade* OS in die gemeinsame Studie EURAMOS1 ist im Gegensatz zu den Vorgängerstudien nunmehr lediglich die operative Zugänglichkeit des Tumors sowie ggf. vorhandener Metastasen. Entscheidend ist die Möglichkeit der Komplettresektion mit Sicherheitsabstand, unabhängig davon, ob es sich um ein Primär- oder ein strahleninduziertes Sekundärmalignom handelt, und unabhängig vom primären Metastasierungsstatus. Patienten mit bereits bei Diagnosestellung metastasiertem Tumor werden allerdings separat stratifiziert und randomisiert. Eine eventuelle Verfälschung von Überlebenszeit-Endpunkten wird hierdurch vermieden.

Das EURAMOS1-Protokoll sieht für alle Patienten eine 10-wöchige präoperative Standardinduktionstherapie mit HD-MTX, Doxorubicin und Cisplatin (MAP) vor. Die im Resektat gemessene Chemotherapieempfindlichkeit entscheidet nunmehr als einziger Parameter darüber, welcher Risikogruppe der Patient postoperativ zugeordnet wird. Zur Gewährleistung einer Vergleichbarkeit mit den COSS-Studien wurde das Regressions-Grading nach Salzer-Kuntschik beibehalten, allerdings in vereinfachter Form mit <10 % (Regressionsgrad 1-3, *good response*) bzw. ≥10 % (Regressionsgrad 4-6, *poor response*) vitalen Resttumorzellen nach präoperativer Chemotherapie als Stratifizierungskriterium.

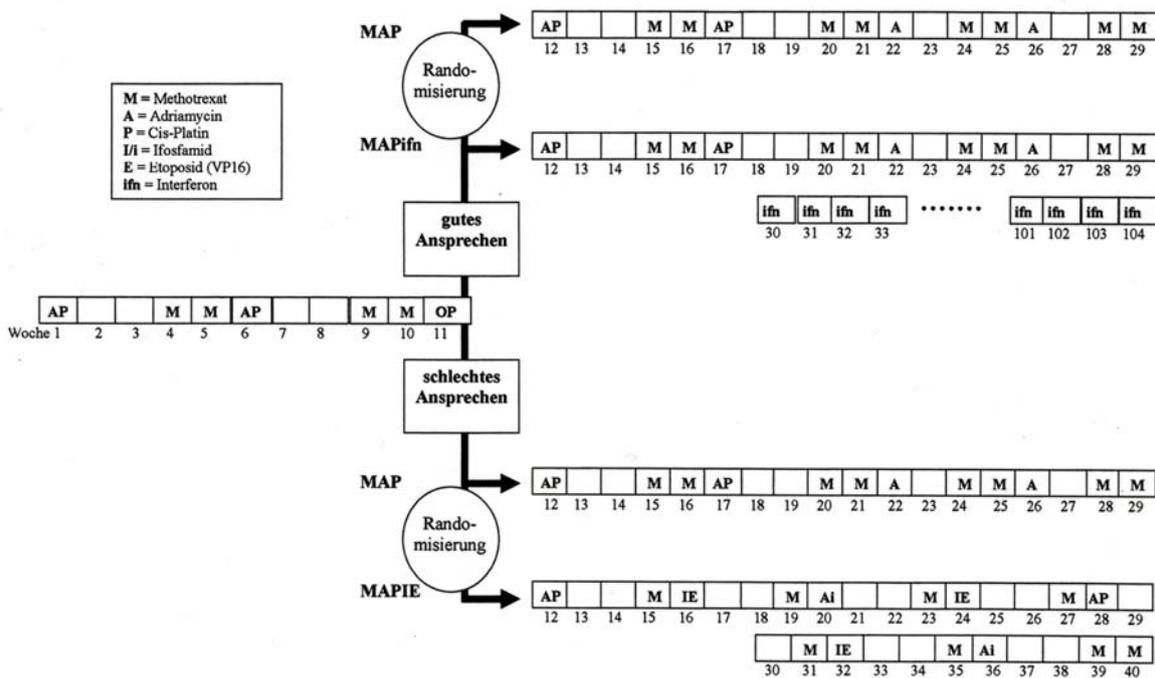


Abb. I.2. EURAMOS1–Therapieübersicht

Das Schema entstammt dem aktuellen Studienprotokoll EURAMOS1 (Version vom 18.01.2005).

Good responder erhalten postoperativ abermals über 18 Wochen MAP oder bekommen randomisiert zusätzlich eine Erhaltungstherapie mit pegyliertem Interferon-alpha 2b (PEG-IFN α 2b) (PegIntron®), das wachstumshemmend auf OS-Zellen wirken soll (Strander und Einhorn, 1977; Brosjo et al., 1985; Strander et al., 1995; Strander, 2007).

Poor responder werden ebenfalls randomisiert: Eine Patientengruppe wird nach dem MAP-Schema therapiert, bei der anderen schließt sich eine Salvage-Therapie an, die um Ifosfamid und Etoposid erweitert wird (MAPIE) (vgl. **Abb. I.2.** EURAMOS1-Therapieübersicht). Beide Medikamente haben in Vorgängerstudien beim OS deutliche Antitumor-Aktivität gezeigt, eine Verbesserung des Langzeitüberlebens konnte jedoch bisher nicht eindeutig nachgewiesen werden (Bacci et al., 1993; Winkler et al., 1993; Goorin et al., 2002).

Primäres Ziel der laufenden Therapiestudie EURAMOS1 ist also die Klärung der Frage, ob die postoperative Gabe zusätzlicher Medikamente das ereignisfreie Überleben, Kurzzeit-/Langzeittoxizität und Lebensqualität verbessern kann (EURAMOS, 2005).

Mögliche unerwünschte Spätfolgen der aggressiven multimodalen Therapie beinhalten irreversible Schäden des Herzens, der Nieren, des Gehörs, der reproduktiven Funktionen, orthopädische Probleme sowie die Entwicklung von Sekundärmalignomen (Bacci et al., 2006).

I.3.6.2. Experimentelle Behandlungsverfahren

Für Patienten mit inoperablem OS oder schlechtem Ansprechen auf die Chemotherapie sind die Aussichten auf eine dauerhafte Heilung nach wie vor sehr schlecht. Die Motivation ist deshalb groß, nach ergänzenden Therapiestrategien zu suchen.

Aufbauend auf vielversprechenden Ergebnissen einer Voruntersuchung (Kleinerman et al., 1995) wurde in einer kürzlich abgeschlossenen, amerikanischen Studie der COG die zusätzliche Gabe von liposomal verpacktem Muramyl-Tripeptid-Phosphatidyl-Ethanolamin (L-MTP-PE), einem sogenannten *biological response modifier* mit Makrophagen-aktivierender Wirkung (Mori et al., 2006) und Ifosfamid in Ergänzung zur Standardchemotherapie geprüft. Ein eindeutiger Vorteil ergab sich hieraus jedoch nicht (Bielack et al., 2004; EURAMOS, 2005; Meyers et al., 2005).

Da das OS Osteoid produziert, ist es zugänglich für Pharmaka, die im Knochenstoffwechsel angereichert werden. Samarium-153-Ethylen-Diamin-Tetramethylen-Phosphonat (Sm-153-EDTMP), ein an Phosphonat gekoppelter β -Strahler, gehört in diese Gruppe. Bei inoperablen OS, die mittels diagnostischer Szintigraphie detektierbar sind, können so –gefolgt von einer autologen Stammzelltransplantation– erhebliche Mengen Strahlung direkt an den Ort des malignen Geschehens gebracht werden. Die zusätzliche Applikation von Gemcitabine, das strahlensensibilisierend wirkt, verstärkt möglicherweise die radiobiologische Wirkung. Da das OS relativ strahlenresistent ist, bestand die Hoffnung, dass eine auf diese Weise erreichte Erhöhung der totalen Strahlendosis zusammen mit einer externen Bestrahlung die lokale Tumorprogression bremsen oder sogar dauerhaft kontrollieren kann (Franzius et al., 2001; Anderson et al., 2002; Franzius et al., 2002). Klinische Studien mit kleinen Fallzahlen haben bisher jedoch keinen durchschlagenden Erfolg gezeigt (Anderson et al., 2005).

Eine weitere mögliche Therapieoption ist die Kombination von Chemotherapie mit Hyperthermie. Trieb und Kollegen konnten zeigen, dass Hyperthermie die Expression der Telomerase in OS-Zellen inhibiert (Trieb et al., 2000a). Kubista und Mitarbeiter beschrieben, dass Hyperthermie die Expression des Hitzeschockproteins 72 (HSP72) in OS-Zellen stimuliert und damit vermutlich die Suszeptibilität für natürliche Killerzell (NK)-vermittelte Lyse erhöht (Kubista et al., 2002). Während zu den Weichteilsarkomen ausgedehnte klinische Studien über die Kombination von Chemotherapie und Hyperthermie vorliegen (Issels et al., 2006), fehlen bisher entsprechende klinische Daten zum OS.

Eine Hochdosis-Chemotherapie mit anschließender, autologer Stammzelltransplantation hat sich bei verschiedenen soliden Tumoren des Kindesalters als wirksam erwiesen (Hale, 2005). Im Zusammenhang mit dem OS liegen einzelne Studien vor, die zum Teil über positive

Effekte berichten; ein eindeutiger Vorteil hat sich jedoch bisher nicht gezeigt (Miniero et al., 1998; Sauerbrey et al., 2001; Arpaci et al., 2005).

Auch die allogene Stammzelltransplantation hat beim OS bisher keine durchschlagenden Erfolge vorzuweisen. Von Fagioli und Kollegen wurde der Fall eines 12-jährigen Jungen berichtet, der nach abgeschlossener neoadjuvanter Chemotherapie mit multiplen Knochenmetastasen rezidierte. In der Hoffnung auf einen Spender-gegen-Tumor (*graft versus tumor*, GvT)-Effekt wurde bei diesem Jungen eine allogene Stammzelltransplantation von einem HLA-identen Geschwisterkind durchgeführt und vorübergehend eine komplette Remission ohne Auftreten einer Spender-gegen-Empfänger-Erkrankung (*graft-versus-host disease*, GvHD) erreicht. Die Tumorremission wurde als GvT-Effekt interpretiert. Die Spenderlymphozyten-Infusion (*donor lymphocyte infusion*, DLI) in steigender Dosierung nach erneutem Rezidiv führte allerdings nicht zu einer erneuten Remission. Sie löste wiederum keine GvHD aus (Fagioli et al., 2003). Bei einem 11-jährigen japanischen Mädchen mit ähnlicher Konstellation kam es unter der Konditionierung (*reduced intensity conditioning regimen*) zu einer rapiden Tumorprogression des metastasierten OS, das auch auf die sich anschließende HLA-identen, allogene Stammzelltransplantation nicht ansprach, mit Todesfolge ohne Engraftment an Tag +19 (Shinkoda et al., 2006).

Weitere experimentelle Therapieansätze, die sich jedoch noch nicht in klinischer Erprobung befinden, werden unter I.4.4.2.1. behandelt.

I.4. Tumorimmuntherapie

Bei der Tumorimmuntherapie unterscheidet man zwischen antigenspezifischen und nicht-antigenspezifischen Therapieverfahren, die sich jeweils in zelluläre und humorale sowie in passive und aktive Ansätze unterteilen lassen (**Abb. I.3.** Tumorimmuntherapie).

I.4.1. Nicht-antigenspezifische Tumorimmuntherapie

In der Vorstellung, dass das Immunsystem zwischen „Selbst“ und „Fremd“ unterscheiden kann und prinzipiell in der Lage ist, mit einer Immunantwort auf Tumoren zu reagieren, wurden schon früh Lysate von autologen oder allogenen Tumorzellen zur Vakzinierung eingesetzt (Marsh et al., 1972; Marcove et al., 1973; Marcove, 1974). Die Immunogenität der Gesamtzelllysate konnte durch Transfer von Zytokingenen, wie beispielsweise *IL-2*, *IL-7* oder *GM-CSF* deutlich gesteigert werden (Dranoff et al., 1993; Pardoll, 1995; Soiffer et al., 1998) (Roskrow et al., 1999).

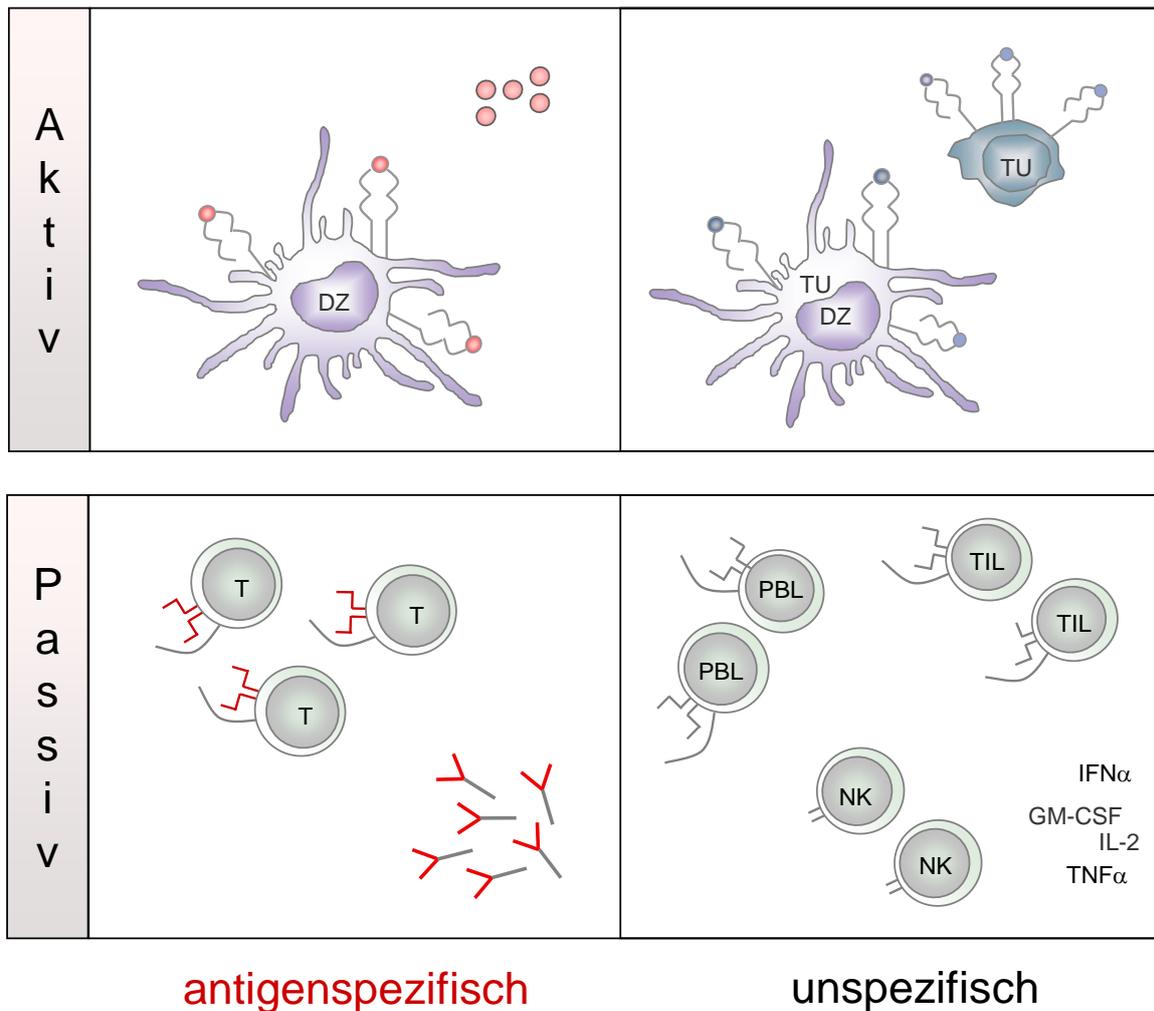


Abb. I.3. Immuntherapeutische Strategien.

Nicht-antigenspezifische Behandlungskonzepte können in aktiven Strategien wie der Übertragung von abgetöteten, evtl. genmodifizierten Tumorzellen (TZ) oder Tumorzellbeladenen Dendritischen Zellen (DZ) oder passiven Strategien wie der Behandlung mit Zytokinen (IFN, GM-CSF, IL-2, TNF), mit natürlichen Killerzellen (NK), tumorinfiltrierenden T-Zellen (TIL) oder peripheren Blut-T-Lymphozyten (PBL) bestehen. Antigenspezifische Konzepte beinhalten die aktive Vakzinierung mit bekannten Antigenen bzw. Antigenabkömmlingen (roter Kreis) oder Antigen-beladenen Dendritischen Zellen ebenso wie die passive Therapie mit monoklonalen Antikörpern (Y) oder antigenspezifischen T-Zellen (T).

Eine weitere Form der nicht-antigenspezifischen, aktiven Immuntherapie sieht vor, patienteneigene, antigenpräsentierende Zellen (APC) mit Tumorzelllysaten zu beladen und dem Patienten anschließend zur Stimulation einer T-Zellantwort *in vivo* zu reinfundieren (Holtl et al., 2002; Thumann et al., 2003; Ackermann et al., 2004). Die beladenen APC können auch zur Stimulation und Expansion von autologen T-Zellen *in vitro* eingesetzt werden. Auf diese Weise *in vitro* stimulierte und expandierte T-Zellen können dem Patienten im Sinne einer passiven Immuntherapie reinfundiert werden (*adoptive cell transfer, ACT*) (Bernhard et al., 2005). Als eine sehr wirksame Form des ACT hat sich die DLI nach allogener Stammzelltransplantation erwiesen. Sie wird erfolgreich zur Therapie von

Leukämieresiduen, besonders der CML, eingesetzt (Kolb et al., 1990; Kolb et al., 2004). Die DLI ist allerdings mit einem erheblichen GvHD-Risiko behaftet, solange die übertragenen T-Zellen nicht antigenspezifisch selektioniert sind. Die passive Immuntherapie kann auch durch alleinige Applikation von Zytokinen wie z.B. IFN α (vgl. **Kap. I.3.6.1**), GM-CSF oder/ und IL-2 erfolgen (Koulova et al., 2005).

I.4.2. Antigen-spezifische Tumormimmuntherapie

I.4.2.1. Passive Immunisierung

Die passive Immunisierung mit monoklonalen Antikörpern hat in den letzten Jahren eine ausgesprochene Renaissance erfahren. Einige davon haben bei verschiedenen Tumorerkrankungen einen festen Platz in der adjuvanten Therapiesituation erworben, z.B. der anti-Her2/neu-Antikörper Trastuzumab (Herzeptin®) oder der anti-CD20-Antikörper Rituximab (Mabthera®) (Pegram et al., 2004; Hiddemann et al., 2007).

Bispezifische Antikörper tragen in ihrem variablen Anteil zwei Bindungsstellen verschiedener Spezifität, die einerseits ein Antigen auf der Oberfläche der Tumorzelle und andererseits ein Antigen auf einer Effektorzelle erkennen. Auf diese Weise sollen bispezifische Antikörper Effektorzellen wie z.B. zytotoxische T-Zellen, NK-Zellen oder Neutrophile Granulozyten spezifisch in die Nähe von Tumorzellen dirigieren. Mehrere Typen von bispezifischen Antikörpern sind bereits in klinischer Erprobung (Lum et al., 2006), z.B. der bispezifische Antikörper MT103® (MEDI-538) (Pressemitteilung der Firma Micromet, Jahrestagung der American Society of Hematology, 2006; http://www.micromet.de/fileadmin/template/main/pdf/news/news_7fe7d23120dcfe147ba9f9f772ef80e9_0_dt.pdf) bei NHL oder der trispezifische Antikörper Removab® (Catumaxomab, Trion Pharmaceuticals) für die palliative Therapie des malignen Aszites beim Ovarialkarzinom (Heiss et al., 2005).

Eine weitere Form der antigenspezifischen, passiven Immunisierung besteht in der Gabe von *in vitro* expandierten T-Zellen mit bekannter Spezifität. Sie haben gegenüber Antikörpern den Vorteil, dass sie als zelluläre Effektoren nahezu alle Gewebestrukturen erreichen und bei antigener Stimulation zum Aufbau eines zellulären Gedächtnisses beitragen. Ihre Wirksamkeit ist durch die Gabe Epstein-Barr-Virus (EBV)-spezifischer T-Zellen bei EBV-induzierten lymphoproliferativen Erkrankungen nach Organ- und Stammzelltransplantation (*posttransplant lymphoproliferative disease*, PTLD) eindrucksvoll unter Beweis gestellt worden. Die Anreicherung virusspezifischer T-Zellen gelingt hier so gut, dass keine GvHD induziert wird (Rooney et al., 1995; Heslop et al., 1996; Rooney et al., 1998).

I.4.2.2. Aktive Immunisierung

Bei der antigenspezifischen Tumorimmuntherapie werden die Chancen auf eine erfolgreiche Immunisierung sehr viel höher eingeschätzt als bei der Applikation von Gesamttumorzell-Vakzinen, bei gleichzeitig deutlich geringerem Risiko für das Auftreten von Autoimmunreaktionen. Aus diesem Grund liegt der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit auf der Identifizierung von tumorspezifischen oder tumorassoziierten Antigenen. Sind solche Antigene einmal bekannt, werden prinzipiell die gleichen Ansätze wie bei der nicht-antigenspezifischen Immuntherapie verfolgt, mit dem Unterschied, dass APC (z.B. Dendritische Zellen) mit definierten Antigenen und nicht mit Gesamttumorzelllysate beladen werden (**Abb. I.3.**).

I.4.3 Immunologische Maskierung von Tumoren

Ein grundsätzliches Hindernis für alle Immuntherapiestrategien ist die Fähigkeit von Tumorzellen, sich dem Zugriff durch das adaptive Immunsystem gezielt zu entziehen (*immune escape*). Als mögliche Mechanismen kommen der Verlust des Zielantigens im Tumor durch Selektion antigennegativer Varianten, der Verlust von MHC-Molekülen auf der Oberfläche der Tumorzellen (Restifo et al., 1993b; Jager et al., 1997), eine gestörte Antigenprozessierung (Restifo et al., 1993a; Rowe et al., 1995; Staeger et al., 2002), die Produktion immunsuppressiver Zytokine wie IL-10 und TGF- β (Zou, 2005; Leen et al., 2007) und die Expression des Fas-Liganden (CD95) (Hahne et al., 1996; O'Connell et al., 1996) durch die Tumorzellen in Frage. Als eine prophylaktische Maßnahme gegen die immunologische Maskierung des Tumors werden polyvalente Immuntherapiestrategien angestrebt, die dem Tumor die Möglichkeit zur Selektion von *immune escape*-Varianten primär nehmen sollen. Im Falle der antigenspezifischen Strategien, müssen demnach möglichst viele verschiedene Spezifitäten zum Einsatz kommen. Einen Schutz gegen MHC-Verlustvarianten des Tumors bieten möglicherweise NK-Zellen, deren zytotoxische Funktion durch Fehlen von MHC-Molekülen aktiviert wird. Physiologischerweise wird die zytotoxische Funktion von NK-Zellen durch die Bindung von bestimmten MHC-Klasse I-Molekülen an inaktivierende NK-Zellrezeptoren (KIR) außer Kraft gesetzt (Karre, 2002; Moretta und Moretta, 2004). Moderne Strategien streben außerdem die Elimination von regulatorischen T-Zellen (Treg) durch eine immunsuppressive Vorbehandlung des Patienten vor der Immuntherapie an (Gattinoni et al., 2005; Klebanoff et al., 2005; Wrzesinski und Restifo, 2005).

I.4.4. Tumorantigene

I.4.4.1. Definition und molekulare Charakteristika

Die maligne Entartung von Zellen wird von genetischen und epigenetischen Veränderungen im zellulären Genom verursacht. Diese manifestieren sich in qualitativen und/oder quantitativen Veränderungen im Genexpressionsprogramm der Zellen.

Erkennt das spezifische Immunsystem diese Veränderungen, so spricht man von Tumorantigenen (Tureci et al., 1999). Tritt dasselbe Tumorantigen bei verschiedenen Tumorentitäten auf, spricht man von einem gemeinsamen (*shared*) Tumorantigen (Pfreundschuh, 2000).

Von tumorspezifischen Antigenen spricht man, wenn die Antigene nur im Tumorgewebe und nicht in Normalgewebe vorkommen. Tumorspezifische Antigene enthalten Neoepitope, die aufgrund verschiedener Mechanismen entstehen können, so z.B. durch eine Fusion von Genen im Rahmen einer Chromosomentranslokation, durch Genmutation, durch Nutzung neuer Promotoren, die beispielsweise durch Demethylierung zugänglich gemacht werden, durch neue Spleißdonor- und -akzeptorstellen, durch neue Translationsstartsignale (Sahin et al., 1995)(Probst-Kepper et al., 2001; Behrends et al., 2002; Behrends et al., 2003), durch neue posttranslationale Modifikationen (Skipper et al., 1996) wie z.B. Glykosylierung im Falle des MUC1 beim Ovarial-Karzinom (Taylor-Papadimitriou et al., 1999) sowie durch Verschiebungen im Leserahmen wie im Falle bestimmter Reparaturproteine beim familiären, nicht-polypösen Kolonkarzinom (HNPCC) (Linnebacher et al., 2001; Woerner et al., 2001).

Als tumorassoziierte Antigene werden Antigene bezeichnet, die auch in Normalgewebe exprimiert sind, jedoch nur im Kontext von Tumoren eine signifikante Immunantwort auslösen und deshalb als weitgehend selektive, therapeutische Zielstrukturen in Frage kommen. Zu dieser Klasse von Antigen zählen verschiedene Antigengruppen:

Eine therapeutisch wichtige Gruppe tumorassoziiierter Antigene stellen die in Tumoren überexprimierten Antigene dar. Ihre klassischen Vertreter, die Rezeptoren HER2/neu und EGFR (*epidermal growth factor receptor*) dienen als Zielstrukturen für die Antikörpertherapie beim fortgeschrittenen Mammakarzinom und Plattenepithelkarzinom des Nasopharynx (Pegram et al., 2004; Astsaturov et al., 2006).

Auch sogenannte Differenzierungsantigene werden zu den tumorassoziierten Antigenen gezählt. Sie werden nicht nur in Tumorzellen, sondern auch in verwandten normalen Zellen mit einem bestimmten Differenzierungsstadium exprimiert. Typische Beispiele liefern die in Melanomen exprimierten Melanozytenantigene Melan A, Tyrosinase oder gp100 (Coulie et

al., 1994). Sie können als immuntherapeutische Zielstrukturen dienen, sofern ihre Expression auf Gewebe beschränkt ist, deren Zerstörung mit dem Leben vereinbar ist.

Bei den tumorassoziierten, sogenannten *Cancer-Testis*-Antigenen (CTA) wie z.B. Antigenen der MAGE- oder GAGE-Familien sowie NY-ESO-1 handelt es sich um Proteine, die in verschiedenen Tumoren exprimiert werden, sonst aber normalerweise nur in immunprivilegierten Organen wie Hoden und Ovar vorkommen (Scanlan et al., 2002; Zendman et al., 2003; Scanlan et al., 2004). Allerdings lässt sich aus dem Expressionsmuster der *Cancer-Testis*-Antigene keine zuverlässige Vorhersage über das Vorhandensein oder Fehlen von zentraler Toleranz treffen, wie man dies ursprünglich angenommen hatte (Bos et al., 2005).

Auch manche virale Antigene können als tumorassoziierte Antigene prophylaktisch oder therapeutisch hilfreich sein. So wird die Vakzinierung gegen das Hepatitis B-Virus zur Vorbeugung gegen hepatozelluläre Karzinome und die Impfung gegen humane Papillomaviren zur Prophylaxe von Zervixkarzinomen eingesetzt (Frazer, 2004; Roden und Wu, 2006). Immuntherapeutische Strategien gegen EBV kommen therapeutisch und prophylaktisch im Kontext EBV-assoziiierter Malignome zum Einsatz (Heslop et al., 1996).

Von tumorabhängigen Autoantigenen sprechen manche Autoren, wenn ihre Immunogenität nur bei Tumorpatienten nachweisbar ist, sich Expressionsniveau und –muster in Tumor- und Normalgewebe jedoch nicht unterscheiden (Tureci et al., 1999; Knuth et al., 2000). Sehr wahrscheinlich liegen diesem Phänomen schwer nachweisbare, posttranslationale Modifikationen oder eine unterschiedliche Antigenprozessierung und –präsentation in Normal- und Tumorgewebe zugrunde, so dass letztendlich doch Neoepitope für die Immunogenität bei Tumorpatienten verantwortlich sind (Skipper et al., 1996; Morel et al., 2000).

Neoantigene unterscheiden sich von Autoantigenen in der Regel durch die Verfügbarkeit einer hochaffinen T-Zellantwort. Die meisten Autoantigene unterliegen demgegenüber der zentralen Toleranzentwicklung, die im Thymus die hochaffinen T-Zellen eliminiert und niedrigaffine T-Zellen übrig lässt. Neben der zentralen Toleranz gibt es außerdem vielfältige Mechanismen der peripheren Toleranzentwicklung, z.B. durch Treg (Zou, 2006).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Antigene abhängig von der Nachweisbarkeit von spezifischen Antikörpern bei gesunden Probanden als Autoantigene oder –im negativen Falle– Tumorantigene klassifiziert.

I.4.4.2. Methoden zur Identifizierung von Tumorantigenen

I.4.4.2.1. T-Zell-Verfahren

Die klassischen Methoden der Identifizierung von Zielantigenen tumorspezifischer T-Zellen setzen die Verfügbarkeit von antigenspezifischen CD4⁺ und/oder CD8⁺ T-Zellklonen voraus. Die Generierung von T-Zellklonen ist technisch äußerst anspruchsvoll. Periphere T-Zellen des Patienten oder T-Zellen aus dem Tumordinfiltrat müssen mit Zelllinien des autologen Tumors kokultiviert, zur Proliferation gebracht und in regelmäßigen zeitlichen Abständen in gleicher Weise restimuliert werden. Durch *limiting dilution* müssen die T-Zellklone aus antigenreaktiven T-Zelllinien vereinzelt werden, so dass nur noch eine Spezifität vorliegt (Riddell und Greenberg, 1994; Riddell und Greenberg, 1995). Einmal zur Proliferation gebracht, kann man die T-Zellklone dann über Stimulation mit Anti-CD3-Antikörpern und IL-2 expandieren. Wenn im Patienten bereits eine antigenspezifische Gedächtnis-T-Zell-Antwort vorliegt, wie z.B. bei den sehr selten vorkommenden, spontanen Tumorremissionen, sind die Chancen auf eine erfolgreiche Etablierung von T-Zellklonen um ein Vielfaches besser. Eine weitere wesentliche Limitation für die Etablierung antigenspezifischer T-Zellklone ist die Verfügbarkeit von Tumorzelllinien. Viele Tumoren lassen sich nur sehr schlecht oder gar nicht *in vitro* kultivieren, bei manchen gelingt dies erst mit steigender Apoptoseresistenz nach wiederholter Rezidivierung des Tumors. Die isolierten T-Zellklone werden auf Tumorspezifität, HLA-Restriktion, Phänotyp und Zytokin-Sekretionsprofil untersucht, bevor sie zur Antigenidentifizierung eingesetzt werden.

I.4.4.2.1.1. Genetische Methoden

Thierry Boon und Mitarbeiter entwickelten ein genetisches Verfahren zur Identifizierung von Tumorantigenen mit Hilfe tumorspezifischer T-Zellklone (Wolfel et al., 1987; van der Bruggen et al., 1991; De Plaen et al., 1997; van der Bruggen et al., 2007). Es baut darauf auf, dass man eine in Fraktionen aufgeteilte genomische oder cDNA-Bibliothek aus einer antigenexprimierenden Tumorzelllinie durch Transfektion in einer antigennegativen Zelllinie zur Expression bringt. Durch die Aufnahme der genetischen Information der antigenpositiven Linie wird die antigennegative Zelllinie in eine antigenpositive Linie konvertiert, in der das Antigen vereinzelt werden kann. Wenn die rekombinanten Zielzellen das relevante Antigen exprimieren, löst eine Kokultur mit dem tumorspezifischen T-Zellklon bei diesem eine Zytokinausschüttung (z.B. GM-CSF oder IFN γ) in den Kulturüberstand aus, die in Enzymgekoppelten Immunadsorptions-Assays (ELISAs) gemessen werden kann. Anfangs setzten Boon und Mitarbeiter mühsam hergestellte, antigennegative Varianten antigenpositiver

Zelllinien als Zielzellen ein, die einerseits das restringierende HLA-Element exprimierten und andererseits auf gute Transfizierbarkeit *in vitro* selektioniert worden waren. Heute werden als antigennegative Zielzellen in der Regel die sehr gut transfizierbare humane embryonale Nierenzelllinie HEK293 oder die Affenzelllinie COS verwendet, in die man zusätzlich das Gen für das relevante HLA-Restriktionselement einbringt. Inzwischen kommen alternativ zur Transfektion retro-, lentivirale oder Vaccinia-Vektoren zum Einsatz, durch die der Gentransfer auch in humane APC, die von vornherein das gewünschte Restriktionselement exprimieren, erheblich verbessert werden kann (Wang et al., 1998; Smith et al., 2001; Smith et al., 2004).

Aufgrund des sehr viel komplexeren Antigenpräsentationswegs ist die Identifizierung MHC Klasse II-restringierter Antigene mit genetischen Methoden ungleich schwieriger als die von MHC Klasse I-restringierten Antigenen und bisher nur in Einzelfällen gelungen (Pieper et al., 1999; Wang, 2003).

I.4.4.2.1.2. Biochemische Methoden

Eine alternative Methode der Antigenidentifizierung geht von der biochemischen Fraktionierung der Tumorzelllysate, Beladung von APC mit Einzelfraktionen und Testung der beladenen APC mit dem tumorspezifischen T-Zellklon aus. Die biochemische Fraktionierung bis hin zu Einzelkomponenten ist sehr zeit- und arbeitsintensiv, erfordert große Mengen an Tumorzellmaterial und ein hohes Maß an biochemischer Expertise (Cox et al., 1994; Slingluff et al., 1994). Ein weiterer biochemischer Ansatz sieht die Elution von Peptiden aus der Grube des MHC, die anschließende Fraktionierung mittels *high pressure liquid chromatography* (HPLC), Beladung von APC mit den Einzelkomponenten, Testung der beladenen APC in T-Zell-Assays und schließlich Identifizierung der relevanten Peptide mittels Massenspektrometrie vor (Singh-Jasuja et al., 2004).

Der biochemische Ansatz ist aufgrund der anspruchsvollen technischen Voraussetzungen weltweit nur in wenigen Labors etabliert und für MHC Klasse II-restringierte Antigene ebenfalls noch sehr problematisch (Slingluff et al., 1994; Engelhard et al., 2002).

I.4.4.2.2. SEREX-Methode

Alle T-Zell-Verfahren setzen die Verfügbarkeit von antigenspezifischen T-Zellklonen sowie von Tumorzelllinien zur T-Zellstimulation voraus. Mit der Entwicklung der SEREX-Technologie wurden diese beiden entscheidenden Engpässe erstmals überwunden.

Wie eingangs bereits beschrieben, basiert die von Pfreundschuh und Mitarbeitern entwickelte SEREX-Technologie auf dem Nachweis einer spezifischen IgG-Antikörperantwort gegen im Tumor exprimierte Antigene. Der stattgehabte Isotyp-Klassenwechsel der Antikörper dient dabei als Surrogat einer antigenspezifischen Stimulation CD4+ T-Zellen (Sahin et al., 1995). Eine cDNA-Expressionsbibliothek aus Tumorgewebe wird mit Hilfe eines lambda-Bakteriophagen in *E.coli*-Bakterien rekombinant exprimiert, und ein Screening der rekombinanten Proteine mit Patientenserum und einem markierten Sekundärantikörper mit Spezifität für humanes IgG durchgeführt. Antigene, die IgG-Antikörper aus dem Patientenserum gebunden haben, werden anschließend subkloniert und mittels Sequenzierung auf cDNA-Ebene in ihrer Primärstruktur aufgeklärt. Ob es sich bei den erkannten Antigenen um tumorspezifische, tumorassoziierte oder Autoantigene handelt, muss durch Folgeuntersuchungen zum Antigenvorkommen in gesundem Gewebe sowie zum Vorkommen der Antikörperantwort bei gesunden Probanden ermittelt werden.

Aufgrund der Einfachheit des Verfahrens hat die SEREX-Technologie rasch Verbreitung gefunden (Tureci et al., 2005). Eine Reihe von Antigenen, die primär mit dem SEREX-Verfahren identifiziert wurden, sind inzwischen auch mit Hilfe von T-Zellklonen als T-Zellantigene bestätigt worden, wie z.B. das *Cancer-Testis*-Antigen NY-ESO-1 (Chen et al., 1997; Jager et al., 1998; Valmori et al., 2000).

Das SEREX-Verfahren wurde von der eigenen Arbeitsgruppe erstmals auf Tumoren von Kindern angewandt. Die untersuchten pädiatrischen Tumorentitäten, Neuroblastom und Medulloblastom, waren beide neuroektodermalen Ursprungs (Behrends et al., 2002; Behrends et al., 2003). Zu Beginn der eigenen Arbeit war noch nicht über eine Anwendung der SEREX-Technologie im Kontext des OS berichtet worden.

I.4.5. Immuntherapie des Osteosarkoms

I.4.5.1. Historische Entwicklung

Bis 1970 war die radikale chirurgische Behandlung die Therapie der Wahl für OS. Durch die alleinige Operation konnten jedoch nur bis zu 20 % der Patienten geheilt werden (Marina et al., 2004), weshalb systematisch nach neuen Therapieansätzen gesucht wurde. Hier kristallisierten sich neben der Chemotherapie auch erste immuntherapeutische Ansätze heraus. Da die Chemotherapie jedoch deutlich schneller überzeugende Ergebnisse vorzuweisen hatte, konzentrierte sich die Therapieoptimierung in den darauffolgenden Jahrzehnten zunächst auf diese Option.

In den ersten immuntherapeutischen Versuchen wurden Tumorzellen oder Tumorzellextrakte zur autologen Vakzinierung eingesetzt (Marsh et al., 1972; Marcove et al., 1973; Marcove, 1974). Sogar ein adoptiver Transfer von allogenen Lymphozyten wurde versucht. Frische Tumorzellen vom Patienten wurden zur Induktion einer antitumoralen zellulären Immunantwort auf einen gesunden Empfänger transplantiert, dessen Lymphozyten durch Apherese gesammelt und dem Patienten in Unkenntnis des Phänomens der HLA-Restriktion infundiert (Neff und Enneking, 1975). Die Ergebnisse wurden zwar damals teilweise als erfolgversprechend bewertet, den Ansätzen mangelte es jedoch an Spezifität, und es fehlten immunologische Monitoring-Verfahren, um den eventuellen Erfolg genauer beurteilen zu können.

In den 80-er Jahren beschrieben Slovin und Kollegen die ersten OS-spezifischen zytotoxischen CD8⁺ T-Zellklone (Slovin et al., 1986; McClay und Slovin, 1989), die technischen Voraussetzungen zur Antigenidentifizierung fehlten jedoch noch.

Einige Jahre später wurden zwei Fallberichte zur spontanen Regression von OS-Metastasen publiziert (Ogihara et al., 1994; Sabate et al., 1998). Das Auftreten von Spontanremissionen wurde ebenso wie der Nachweis von tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL) und der selektionsbedingte Verlust von MHC-Molekülen als Hinweis auf eine prinzipielle Immunogenität von Tumoren gewertet. Die Präsenz von TIL, vor allem von CD8⁺ T-Zellen, wurde beim OS beschrieben (Rivoltini et al., 1992; Trieb et al., 1998); besitzt jedoch keine prognostische Relevanz (Trieb et al., 1998). Dagegen fanden Tsukahara und Kollegen eine signifikant schlechtere Überlebensrate bei OS mit fehlender Expression von HLA-Klasse I (Tsukahara et al., 2006). Auch der vorangegangene Bericht über eine transiente, komplette Remission eines multipel metastasierten OS nach HLA-identer, allogener Stammzelltransplantation lieferte einen Hinweis auf die Immunogenität des OS (Fagioli et al., 2003).

Zusammengenommen untermauern diese Befunde die Hypothese, dass das Immunsystem bei OS eine Tumor-Surveillance-Funktion ausübt.

I.4.5.2. Aktuelle, nicht-antigenspezifische Ansätze

Aufbauend auf den am Karolinska-Institut seit 1971 von Hans Strander durchgeführten Untersuchungen zur Wirkung von IFN α auf OS-Zelllinien und Nacktmaus-Tumoren sowie ersten klinischen Studien wird in der aktuellen internationalen OS-Therapiestudie EURAMOS1 die Wirkung von im Rahmen einer zusätzlichen Erhaltungstherapie verabreichtem pegyliertem IFN α evaluiert. Ob die von Strander berichteten Antitumor-

Effekte auf eine direkte zytotoxische oder eine immunmodulatorische Wirkung von IFN α zurückzuführen sind, bleibt bisher offen (Strander und Einhorn, 1977; Brosjo et al., 1985; Strander et al., 1995; Strander, 2007).

Inaba und Kollegen zeigten, dass auch IFN γ therapeutische Wirkung haben könnte. IFN γ reguliert den Oberflächenrezeptor Fas (CD95) auf OS-Zellen hoch und sensibilisiert die Zellen dadurch gegenüber Fas-induzierter Apoptose (Inaba et al., 2004). Apoptose von OS-Zellen konnte auch durch den HSP90-Inhibitor Geldanamycin (GA) induziert werden, wobei die antitumorale Wirkung durch die gleichzeitige Gabe von Cisplatin verstärkt wurde (Bagatell et al., 2005).

Von anderen Zytokinen, wie Interleukin-2 (IL-2), IL-12, IL-17 und IL-18, wurde beschrieben, dass sie die Lyse von OS-Zellen durch NK-Zellen *in vitro* stimulieren (Mariani et al., 2000; Liebau et al., 2002; Honorati et al., 2003). Eine klinische Beurteilung steht noch aus.

Die Fusion von OS-Zellen mit dendritischen Zellen des Patienten stellt einen nicht-antigenspezifischen Ansatz für die aktive Immuntherapie dar (Yu et al., 2005). Er ist jedoch - ebenso wie die Behandlung mit anderen Zytokinen als IFN α - noch nicht in klinischer Erprobung.

I.4.5.3 Zielstrukturen für antigenspezifische Ansätze

Im Zusammenhang mit dem OS wurden bisher drei Antigene gefunden, die sich als Zielstruktur für die antikörperbasierte Immuntherapie eignen könnten. Hierzu gehören Disialogangliosid-2 (GD2) (erkannt durch die Antikörper 3F8, 5F11, ch14.18), das ursprünglich auf Neuroblastomzellen entdeckt wurde (Saito et al., 1985) und auch regelmäßig auf OS-Zellen zu finden ist (Heiner et al., 1987), das Glykoprotein gp58 (erkannt durch den Antikörper 8H9), das auf einer Vielzahl von pädiatrischen Tumoren exprimiert wird (Modak et al., 2001) sowie ein noch nicht molekular charakterisiertes Antigen. Letzteres bindet die beiden monoklonalen Antikörper TP-1 und TP-3, die spezifisch gegen OS-Zellen generiert worden sind (Bruland et al., 1986). An Toxine wie Ricin A oder Pseudomonas-Exotoxin gekoppelt, stellen diese Antikörper interessante, mögliche Therapeutika für das OS dar (Onda et al., 2004; Onda et al., 2005).

Weitere Zielantigene auf der Zelloberfläche von OS stellen auch die oben zum Teil bereits genannten Mitglieder aus der Familie der epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren dar, so z.B. EGFR (Hughes et al., 2004), Her2/neu (identisch mit erbB-2) und das Adhäsionsmolekül MUC18. Wie bereits erwähnt, gibt es mehrere Untersuchungen zur Her2/neu-Genexpression beim OS, die zu teilweise widersprüchlichen Ergebnissen und Interpretationen bezüglich

prognostischer und therapeutischer Relevanz führten (Thomas et al., 2002; Valabrega et al., 2003; Anninga et al., 2004; Hughes et al., 2004; Scotlandi et al., 2005). Von dem Anti-MUC18-Antikörper ABX-MA1 ist beschrieben, dass er in einem Nacktmausmodell das Metastasierungspotential von menschlichen OS-Zellen vermindert (McGary et al., 2003). Zu keinem der genannten Antikörper liegen bisher klinische Studien vor.

Sudo und Kollegen hatten OS-Zelllinien sowie frische Tumoren auf die Expression von *Cancer-Testis*-Antigenen der MAGE-Familie untersucht, die ursprünglich im Melanom identifiziert worden waren. Sie detektierten Transkripte der Antigene MAGE-1, -2, -3 und -6 in etwa der Hälfte der untersuchten OS-Zelllinien und in der Mehrzahl der OS-Tumorproben. (Sudo et al., 1997).

Die beiden ursprünglich in einer Ösophaguskarzinom-Zelllinie identifizierten Antigene SART-1 und SART-3 (*squamous cell carcinoma antigen recognized by T cells*) wurden von Itoh und Mitarbeitern in ca. der Hälfte der untersuchten OS-Zelllinien und -Biopsate nachgewiesen und als tumorspezifisch beschrieben (Ishida et al., 2000; Tsuda et al., 2001). Andere Arbeiten zeigten jedoch, dass es sich bei den identifizierten Antigenen um hochkonservierte RNA-bindende Proteine handelte, die beim Assembly der Spleißosomen eine wichtige Rolle spielen und ubiquitär vorkommen (Makarova et al., 2001; Bell et al., 2002). Gegen eine tumorspezifische Expression spricht außerdem die Tatsache, dass eines der beiden Antigene auch als IgE-bindendes Autoantigen bei atopischer Dermatitis beschrieben wurde (Valenta et al., 1998; Wheatley et al., 2002).

Aufgrund des limitierten Wissens um das Antigenrepertoire von OS sollte in der eigenen Arbeit systematisch nach neuen Antigenen dieser Tumorentität gesucht werden. Durch Einsatz des SEREX-Verfahrens mit gepoolten Seren von verschiedenen betroffenen Patienten wurde eine möglichst hohe Ausbeute an neuen Antigenen angestrebt.

II. MATERIAL

II.1. Biologisches Material

II.1.1. Tumor cDNA-Expressionsbibliothek

Die Tumor-cDNA zur Herstellung einer cDNA-Expressionsbibliothek war freundlicherweise vom Labor zur Verfügung gestellt worden. Aus der schockgefrorenen Gewebeprobe eines nicht vorbehandelten, lokalisierten *high grade* OS eines 8-jährigen Mädchens war zunächst mithilfe des mRNA *isolation kit* der Firma Stratagene die mRNA isoliert worden. Mithilfe des ZAP-cDNA[®] Synthesis Kit und des ZAP-cDNA[®] Gigapack III Gold Cloning Kit war diese anschließend in cDNA umgeschrieben, über die Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen *XhoI* und *EcoRI* in den Polylinker (*multiple cloning site*, MCS) des Vektors Uni-ZAP-XR kloniert und zu λ -Phagen verpackt worden. In der so konstruierten primären cDNA-Expressionsbibliothek waren ca. eine Million rekombinanter λ -Phagen enthalten. Die Kontrolle der Klonierungseffizienz erfolgte über den Blue-White-Test (vgl. **Kap. III.1.5**). Das Protokoll sah im nächsten Schritt zur Stabilisierung der primären Phagenbank deren Amplifikation im *Escherichia coli* (*E. coli*) Bakterienstamm XL-1 Blue MRF' (XL-1) vor (vgl. **Kap. III.1.6**). Der Phagentiter der amplifizierten cDNA-Expressionsbibliothek lag bei $4,3 \times 10^9$ Plaque bildenden Einheiten (*plaque forming units*, pfu) pro ml (vgl. **Kap. III.1.4**).

II.1.2. Bakterien

Dem Protokoll der Firma Stratagene entsprechend wurden die *E. coli* Bakterienstämme XL-1 und SOLR eingesetzt.

Für die Transfektion mit rekombinanten λ -Phagen (vgl. **Kap. III.1.2**) und Isolierung des pBluescript Vektors aus dem λ -Vektor durch den filamentösen fl-Helferphagen („in vivo Excision“, vgl. **Kap. III.3.1**) wurden XL-1-Bakterien verwendet. XL-1-Bakterien besitzen ein F' Episom, das einen *lac* Repressor (*lacI^q* Gen) enthält. Die Transkription des im λ -Vektor stromaufwärts des *lacZ* Gens liegenden *lacZ* Promotors wird in Abwesenheit von IPTG durch den *lac* Repressor blockiert. Durch Zugabe von IPTG (Isopropyl- β -D-Thiogalacto-Pyranosid) in den Transfektionsansatz, wird die Blockierung des *lacZ* Promotors aufgehoben und auf diese Weise die Synthese rekombinanter Proteine induziert. Darüberhinaus enthält das F' Episom Gene, die für die Ausbildung von F' Pili auf der Bakterienoberfläche verantwortlich sind. Diese F' Pili ermöglichen dem fl- Helferphagen die Infektion von *E.coli*-Bakterien und sind damit Voraussetzung für die Isolation des Plasmidanteils (p) der λ -Phagen-DNA bei der „in vivo excision“ (vgl. **Kap. III.3.1**).

Der Ampicillin-resistente Bakterienstamm SOLR wurde zur Aufreinigung der DNA rekombinanter Phagemide eingesetzt (vgl. **Kap. III.3.1.**). SOLR ist gegen die Infektion durch λ -Phagen resistent, kann aber von filamentösen fl-Helferphagen infiziert werden. Diese können sich in den SOLR-Zellen jedoch nicht vermehren, da die Synthese essentieller fl-Proteine nicht möglich ist. Verantwortlich ist eine sog. *amber*-Mutation des Phagengenoms, deren Effekt der *E. coli*-Stamm SOLR im Gegensatz zum Stamm XL1-Blue-MRF' nicht unterdrücken kann. Durch die Passage in den infizierten SOLR-Bakterien können so ausschließlich rekombinante Plasmide selektioniert werden.

II.1.3. Phagen

Die Verpackung der cDNA-Expressionsbibliothek zu λ -Phagen erfolgte gemäß den Angaben der Herstellerfirma Stratagene.

Zur Kopie der Plasmidsequenzen (*in vivo excision*) aus dem Uni-ZAP[®]-XR Vektor wurde der fl-Helferphage ExAssist[™] der Firma Stratagene verwendet (vgl. **Kap. III.3.1.**).

II.1.4. Serumproben

Die Entnahme aller verwendeten Serumproben von pädiatrisch-onkologischen Patienten war mit ausdrücklichem Einverständnis der Sorgeberechtigten und Genehmigung durch die Ethikkommission der Technischen Universität München (TUM) erfolgt. Der Zeitpunkt der Entnahme entsprach jeweils dem Zeitpunkt der Erstdiagnose der Tumorerkrankung. Die Seren waren vor Beginn der serologischen Analyse gegen Bestandteile des verwendeten Vektorsystems präabsorbiert worden (Sahin et al., 1995; Behrends et al., 2002; Behrends et al., 2003). Für das Screening der OS cDNA-Expressionsbibliothek wurde ein Pool aus Seren von fünf Patienten mit OS eingesetzt. Enthalten war eine Serumprobe des bei Diagnose acht Jahre alten Mädchens, von dem die in dieser Arbeit mit SEREX untersuchte Tumorprobe stammte (Patient # 177), sowie vier weitere Serumproben eines bei Diagnose des OS 11-jährigen Jungen (Patient # 193) sowie je eines 16- 15- und 15-jährigen Mädchens (Patient # 008, # 158-2, # 192). Die im Pool enthaltenden Seren wurden bei der Herstellung des Serumpools jeweils 1:370, 1:500, 1:350, 1:330 und 1:200 verdünnt. Die für die differentielle Serumanalyse benötigten Seren waren von der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt worden. Zum Einsatz kamen hier präabsorbierte Seren in einer Verdünnung von 1:100 von je 10-20 gesunden Probanden (<30 Jahre) sowie 15-20 pädiatrisch-onkologischen Patienten, darunter die fünf erwähnten OS-Patienten. Nach protokollgemäßer Präabsorption waren alle Seren mit 1x TBS 1:100 verdünnt, mit 10 % Natrium-Acid und 10 % Thimerosal versetzt, und bei 4°C

aufbewahrt worden. Die Aufbewahrungszeit bei 4°C betrug bei den Proben der Serie A etwa zwei Jahre, bei denen der Serie B nur wenige Tage bis wenige Wochen (vgl. **Kap. IV.2.1.**).

II.1.5. Sekundärantikörper

Zum Nachweis einer stattgefundenen IgG-Antikörper-Bindung an rekombinante Tumorproteine wurde ein Alkalische Phosphatase (ALP)-gekoppelter anti-human-IgG-Fc-Antikörper aus der Ziege (Dianova, Hamburg) verwendet. Die Herstellung der 0,03 % Stammlösung erfolgte mit 0,6 mg lyophilisiertem Antikörper in 1 ml autoklaviertem ddH₂O + 1 ml Glycerin.

II.1.6. Gesamtzelluläre RNA und cDNA aus Gewebe

Die für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) benötigten Gewebe-RNA- bzw. -cDNA-Proben waren zum Teil von einer Firma erworben (Herz, ZNS, Plazenta, Lunge, Leber, Skelettmuskel, Niere, Pankreas, Milz, Thymus, Prostata, Testis, Ovar, Dünndarm, Kolon, PBL) (BD Biosciences Clontech Palo Alto), zum Teil von der Arbeitsgruppe aus klinischen Gewebematerial präpariert und zur Verfügung gestellt worden (sechs Neuroblastome, vier Medulloblastome, ein embryonaler Tumor, ein Nephroblastom, ein Ewingtumor) (vgl. **Kap. III.5.1.**).

II.2. Oligonukleotide

Die für die PCR benötigten Oligonukleotid-Primer wurden auftragsgemäß durch die Firma Metabion (Planegg-Martinsried, D) synthetisiert. Die Sequenzen der sense (se) und antisense (an) Oligonukleotidprimer sind in 5´ nach 3´-Richtung aufgeführt (**Tab. II.1.**).

Name	Sequenz	Beschreibung (NM_001813, Position)	Annealing Temp. (°C)	Größe des Produkts (bp)
177-268-se1	gaagagtagaggagacactc	bp 5774-5793	55	
177-268-an1	gagcacttttctctcaggct	bp 6358-6377	55	321/ 604
177-268-se2	gtctcttgacttgagaagg	bp 6444-6463	55	
177-268-an2	gctagggaaactcactttctg	bp 6716-6735	55	399/ 291

Tab. II.1. Oligonukleotide pr177-268 für die PCR.

Die Position der Primerpaare wurde auch in die schematische Abbildung der relevanten cDNA und ihres Homologs in Kapitel IV (Abb. IV.16.) eingetragen. Die PCR diente der Expressionsanalyse in anderen Geweben.

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)
- 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 (München)
- Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder, # SM0311, MBI (Eggenstein)
- IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalacto-pyranoside), # R0392, Fermentas (St. Leon-Rot)
- Isopropanol, # 1.00547, Merck (Darmstadt)
- Kanamycin, # K0879, Sigma (München)
- Maltose, # M-5885, Sigma (München)
- MgSO₄·7H₂O, # M-5921, Sigma (München)
- MOPS (4-Morpholine-propanesulfonic acid), # 1124684, Roche (Mannheim)
- NaCl, # 1.06404, Merck (Darmstadt)
- NaOH # 6498, Merck (Darmstadt)
- NBT (Nitroblue-Tetrazolium-chloride), # 06428, Biomol (Hamburg)
- N-N-Dimethylformamide (DMF), # D-4551, Sigma (München)
- Polyoxyethylene-sorbitan Monolaurate (Tween 20), # P-1379, Sigma (München)
- Primer p(dT)₁₅, 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)
- Tetracyclin, # T7660, Sigma (München)
- Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, # 1.08382.2500, Merck (Darmstadt)
- X-Gal (5Bromo-4chloro-3indolyl-β-D-galactopyranoside), # 02249, Biomol (Hamburg)
- [γ-³²P]-ATP, 370 MBq/ml, 10 mCi/ml, # AA0068, Amersham Pharmacia (NJ, USA)

II.4. Enzyme

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

II.5. Kits

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

II.6. Verbrauchsmaterial

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

II.7. Software und Datenbanken

- Clone Manager 7.04, Sci Ed Central (NC, USA)
- Gene Tool 1.0, BioTools (Edmonton, Canada)
- BLAST: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>
- OMIM: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>
- Ensembl gene report: <http://www.ensembl.org/index.html>
- SWISSPROT Database: <http://www.ebi.ac.uk/swissprot/>
- SEREX-Database: <http://www2.licr.org/CancerImmunomeDB/>
- PubMed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed>
- HUGE protein database: <http://www.kazusa.or.jp/huge/>

II.8. Geräte

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

III. METHODEN

III.1. Serex

Mittels einer Bibliothek rekombinanter λ -Bakteriophagen, die OS-cDNA enthielten, und gepooltem, je 1:200 bis 1:500 verdünntem Serum von insgesamt fünf an einem OS erkrankten Patienten wurde eine systematische Suche nach Tumorantigenen durchgeführt. Um dabei eine weitgehend vollständige Repräsentation der exprimierten Gene des Tumors in der Expressionsbibliothek zu gewährleisten, wurden ca. eine Million rekombinante Phagen in das serologische Screening einbezogen. Mit den rekombinanten Phagen wurden XL-1-Bakterien infiziert, auf Agarplatten ausplattiert und durch Zusatz von Isopropyl- β -D-Thiogalactosid (IPTG) in den Bakterien die Synthese rekombinanter Proteine induziert. Jeder rekombinante Phage bildete dabei ein „Loch“ im Bakterienrasen (lytischer Plaque). Die im Bereich der lytischen Plaques enthaltenen rekombinanten Proteine wurden auf Nitrozellulosefolien übertragen und mit Serum inkubiert. Durch einen markierten Zweit-Antikörper und anschließende enzymatische Färbung wurden diejenigen Tumorproteine identifiziert, die mit IgG-Antikörpern des Serums reagiert hatten. Die entsprechenden Phagenklone wurden vereinzelt, in *E.coli*-Bakterien vermehrt, und schließlich die inserierten cDNAs sequenziert. Im Folgenden werden die einzelnen Arbeitsschritte näher erläutert.

III.1.1. Bakterienanzucht

Die rekombinante Phagenbibliothek wurde in *E. coli*-XL1-Blue MRF'-Bakterien der Firma Stratagene zur Expression gebracht. Der Bakterienstamm *E. coli*-SOLR wurde für die Aufreinigung rekombinanter pBluescript-Phagemide verwendet.

III.1.1.1. *E.coli*-Bakterien des Stammes XL1-Blue MRF'

10 μ l des Glycerin-Stocks von *E. coli* XL1-Blue-MRF' wurden auf einer tetrazyklinhaltigen LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C bebrütet. Zur Anlage einer Kultur wurden ca. 10 Kolonien der XL-1-Bakterien-Stammpalte in das Transfektionsmedium gegeben und bei 37°C mit 200 rpm geschüttelt. Die Zugabe von Maltose und Magnesiumsulfat in das Medium sollte die spätere Anheftung der Phagen an die Bakterien begünstigen. Die Kultur wurde bei einer optischen Dichte (OD) von 0,5 (Wellenlänge 600 nm) geerntet, da man bei dieser OD von einem exponentiellen Wachstum der Bakterien ausgehen kann, und die Infektion der Bakterien mit den Phagen in der exponentiellen Wachstumsphase erfahrungsgemäß die besten Ergebnisse bringt. Nach Zentrifugation des Kulturansatzes für 10 Minuten bei 500 g wurde der Überstand abgegossen und das

Bakterienpellet anschließend in sterilem 0,01 M MgSO₄ bis zu einer OD von 0,5 resuspendiert. Pro Platte mit einem Durchmesser von 14 cm wurden für einen dichten Bakterienrasen 600 µl einer Bakteriensuspension von OD 0,5 benötigt.

LB-Medium:

10 g NaCl

10 g Select Peptone

5 g Select Yeast Extract

auf 1000 ml mit dd H₂O, mit 5 N NaOH auf pH 7,0 einstellen, autoklavieren

Tetrazyklin-Stammlösung (10mg/ml):

500 mg Tetrazyklin ad 50 ml 70% EtOH lichtgeschützt bei -20°C aufbewahren

Transfektionsmedium:

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

III.1.1.2. *E.coli*-Bakterien des Stammes SOLR

Die Anzucht der *E. coli* SOLR-Bakterien erfolgte durch das Animpfen des Transfektionsmediums mit einer Bakterienkolonie von der Bakterien-Stammplatte. Die SOLR-Bakterien trugen ein Kanamycin-Resistenzgen. Neben Maltose und Magnesiumsulfat wurde dem Medium deshalb Kanamycin-Stammlösung zugesetzt, um eine selektive Bakterienanzucht zu gewährleisten. Die Anzucht der Bakterien erfolgte im Bakterienschüttler bei 30°C über Nacht. Am nächsten Tag wurden die Bakterien für 10 Minuten bei 500 g zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet in 0,01M MgSO₄ resuspendiert und auf eine optische Dichte von 1,0 bei einer Wellenlänge von 600nm eingestellt. Die Bakterien wurden bis zum weiteren Gebrauch bei 4°C aufbewahrt.

Kanamycin-Stammlösung (7,5mg/ml):

375mg Kanamycin ad 50 ml 70% EtOH, bei -20°C aufbewahren

III.1.2. Transfektion der XL-1 Bakterien mit λ -Phagen

Das Volumen der Phagensuspension pro Transfektionsansatz wurde so gewählt, dass sich auf einer Agarplatte mit 14 cm Durchmesser ca. 3000 pfu bildeten. Die jeweils einen rekombinanten Phagenklon enthaltenden Plaques sollten zur Gewährleistung einer optimalen Effizienz des Screenings einerseits möglichst dicht liegen, andererseits dabei jedoch nur minimal überlappen. Um die Anheftung der λ -Phagen an die Bakterienwand weiter zu begünstigen, wurde die pro Platte gewählte Menge Phagensuspension (3000 pfu) mit 600 μ l der XL-1 Bakteriensuspension (OD 0,5) für 15 Minuten im Wasserbad bei 37°C inkubiert

III.1.3. Kultur der transfizierten Bakterien auf Agarplatten

Jedem Transfektionsansatz wurde vor dem Ausplattieren je 6 ml vorgewärmter Topagar (52°C) und -falls eine rekombinante Expression der Tumorproteine gewünscht war - je 30 μ l 1 M IPTG-Stammlösung zugesetzt. Der Ansatz wurde auf vorgewärmte LB-Tet-Platten (37°C) ausplattiert, und die Platten über Nacht im 37°C Brutschrank gelagert.

Top-Agar:

200 ml LB-Medium

+ 1,4 g Agarose

autoklavieren, auf 52°C im Wasserbad warmstellen bis zum Ausplattieren

LB-Tet-Platten:

400 ml LB-Medium

+ 8 g Select Agar,

autoklavieren, abkühlen auf 52°C im Wasserbad

+ 600 μ l Tetrazyklin-Stammlösung (10 mg/ml)

III.1.4. Titerbestimmung der Phagenlösung

Um die Konzentration der Phagenlösung zu bestimmen wurde eine Verdünnungsreihe der Phagenlösung von 1:10 bis 1:10⁹ in 0,01 M MgSO₄ hergestellt, die XL-1-Bakterien mit verschiedenen Mengen der Phagen infiziert und auf LB-Tet-Platten ausplattiert (vgl. **Kap. III.1-3**). Am nächsten Tag konnten zwei Platten, deren Plaque-Dichte dies zuließ, ausgezählt und unter Berücksichtigung des eingesetzten Volumens und der Verdünnung der Titer der Phagenlösung in *plaque forming units* (pfu) pro ml berechnet werden (Formel: $Plaques/\mu l = Anzahl\ der\ Plaques \times Verdünnung/Volumen\ Einsatz$). Zur Kontrolle der Effizienz der

Klonierung in der Primärbibliothek wurde die Titeranalyse mit dem sogenannten Blue-White-Test (vgl. **Kap. III.1.5.**) kombiniert.

III.1.5. Blue-White-Test

Mithilfe des Blue-White-Tests konnte das zahlenmäßige Verhältnis von nicht-rekombinanten zu rekombinanten Phagen und damit die Effizienz der Klonierung überprüft werden. Der Polylinker des „Uni-ZAP[®] XR“-Vektors liegt innerhalb des Leserahmens des *lacZ*-Gens, das für eine essentielle Untereinheit (α -Domäne) des Enzyms β -Galaktosidase kodiert (**Abb. III.1.**). Durch Zugabe von IPTG, das den lac-Repressor durch Konformationsänderung vom Promotor löst, wird das Gen induziert. Nach Zugabe des Lactoseanalogons X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid) als Substrat entsteht bei Vorhandensein von β -Galaktosidase das dunkelblaue Reaktionsprodukt 5,5-Dibrom-4,4-dichlorindigo. Rekombinanten Klonen fehlt die Enzymaktivität der β -Galaktosidase, da das *lacZ*-Gen durch die einklonierte Tumor-cDNA unterbrochen ist, so dass es nicht zu einer Blaufärbung der Plaques kommt. Bei guter Effizienz der Klonierung liegt das Verhältnis von blauen zu weißen Plaques bei $< 1:10$. Um möglichst alle im Tumor exprimierten Gene in das Screening einzubeziehen, sollte die primäre cDNA-Bibliothek zudem einen Titer von mehr als 1×10^6 rekombinanten Phagen aufweisen.

Je $3 \mu\text{l}$ verdünnte Aliquots ($1:10$ - $1:10^9$) der Phagenbibliothek wurden mit $600 \mu\text{l}$ XL-1 Bakterien und 6 ml Topagar ausplattiert (vgl. **Kap. III.1-3**). Vor Zugabe des Topagars wurden zu dem Bakterien-Phagengemisch $30 \mu\text{l}$ (1M) IPTG und $150 \mu\text{l}$ (1M) X-Gal zugesetzt.

III.1.6. Amplifikation der cDNA-Expressions-Bibliothek

Zur Vermeidung von Informationsverlust durch Zugrundegehen einzelner Phagen und Generation eines stabilen Stocks musste die primäre cDNA-Expressionsbibliothek, die etwa eine Million rekombinanter λ -Phagen enthielt, amplifiziert werden.

Die gesamte primäre cDNA-Bibliothek wurde mit XL-1 fraktioniert auf 20 frisch hergestellte LB-Tet-Platten ausplattiert (20 Ansätze mit je $600 \mu\text{l}$ Bakteriensuspension und ca. 50.000 pfu der cDNA-Bibliothek). Nachdem die Plaques, die einander gerade berührten, eine Größe von maximal 2 mm erreicht hatten, wurden die Platten mit jeweils 6-8 ml SM-Puffer überschichtet und zur Herauslösung der Phagen aus den Plaques über Nacht auf dem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurde der die Phagen enthaltende Puffer abgenommen und gepoolt. Durch Zugabe von 5 vol% Chloroform wurden die Bakterien in der Phagensuspension abgetötet.

Nach Abzentrifugieren der Zelltrümmer bei 2000 g für 10 Minuten wurde der die Phagen enthaltende Überstand mit 0,3 vol% Chloroform versetzt und bei 4°C gelagert. Ein Aliquot wurde nach Bestimmung des Phagentiters mit 7 vol% DMSO versetzt und bei -80 °C asserviert.

Nach erfolgreicher Amplifikation einer Primärbank mit ca. 1×10^6 rekombinanten Phagen sollte das Amplifikat mindestens ca. 1×10^9 rekombinante Phagen enthalten.

III.1.7. Übertragung der Proteine auf Nitrozellulose-Folien

Die inkubierten Agar-Platten wurden unter Vermeidung von Luftblasenbildung sorgfältig mit beschrifteten Nitrozellulose-Blotting Membranen bedeckt. Um nach Ablösen der Membranen und erfolgtem Screening das spätere Wiederauffinden seroreaktiver Plaques auf der jeweiligen Agar-Platte sicherzustellen, wurden die Membranen einschließlich der darunterliegenden Agarschicht mit 3 asymmetrischen Einstichen (20 G-Kanüle) versehen. Zur Übertragung der Proteine auf die Nitrozellulosefilter wurden die membranbedeckten Platten für zwei Stunden in den 37°C Brutschrank gestellt. Anschließend wurden sie bei 4°C über eine Dauer von mindestens 30 Minuten gekühlt, um die Loslösung der Membranen vom Topagar zu erleichtern. Nach vorsichtigem Abziehen wurden die Membranen in eine Schale mit 1 x TBS-T Puffer gelegt (mindestens 20 ml pro Membran) und für 30 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Ggf. noch an den Membranen haftende Agarrückstände wurden mithilfe rauher Handschuhe sanft abgerieben und die gesäuberten Membranen nochmals in frischem 1 x TBS-T-Puffer (mindestens 20 ml pro Membran) bei Raumtemperatur für 15 Minuten geschüttelt. Im Anschluss wurden die Membranen zur Blockung unspezifischer Bindungen einzeln in sauberen Petrischalen mit jeweils 20 ml 1 x TBS/Magermilch-Lösung eine Stunde sanft geschüttelt.

10 x TBS-Stammlösung:

87,5 g NaCl
+ 60 g Tris-Base,
in wenig dd H₂O lösen,
mit 32 % HCl auf pH 7,5 einstellen,
auf 1000 ml mit dd H₂O

1 x TBS-Gebrauchslösung:

900 ml dd H₂O
+ 100 ml 10 x TBS

10 x TBS-T-Stammlösung:

1000 ml 10 x TBS Puffer
+ 5 ml TWEEN 20

1 x TBS-T-Gebrauchslösung:

900 ml dd H₂O
+ 100 ml 10 x TBS-T

TBS/Magermilchlösung:

1 x TBS-Puffer mit 0,5 % Magermilchpulver

III.1.8. Inkubation der Folien mit Patientenserum

Nach drei Waschgängen auf dem Schüttler in frischem 1 x TBS-Puffer von je 10 Minuten Dauer wurden die Membranen einzeln in saubere Petrischalen gelegt und mit je 20 ml präabsorbiertem Serum überschichtet. Bei Vorliegen von Antikörpern gegen im Tumor exprimierte Antigene im Patientenserum, banden diese an die entsprechenden auf Nitrozellulose übertragenen Proteine. Zur Optimierung der Effizienz des serologischen Screens, kam ein Pool aus Seren von fünf Patienten mit OS zum Einsatz. Die Seren lagen darin jeweils in Verdünnungen von 1:200 bis 1:500 vor. Eingangs war dem Serumpool zur Stabilisierung 10 % NaAcid und 10 % Thimerosal zusetzt worden. Über Nacht wurden die mit Serum inkubierten Membranen bei Raumtemperatur sanft geschüttelt.

III.1.9. Inkubation der Folien mit ALP-markiertem Zweitantikörper

Eine immunologische Färbung mit einem Alkalische Phosphatase-gekoppelten Sekundär-Ak aus der Ziege, der gegen den Fc-Teil menschlichen IgGs gerichtet war, ermöglichte die Identifikation seroreaktiver Antigene.

Nachdem die Membranen nach Abnehmen des Serums dreimal 10 Minuten in jeweils frischem 1 x TBS-Puffer gewaschen worden waren, wurden sie einzeln in Petrischalen gegeben und mit je 20 ml verdünnter Ak-Stammlösung für eine Stunde sanft geschüttelt.

Verdünnte Ak-Lösung:

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

III.1.10. Alkalische Phosphatase-Färbung

Die Zugabe von 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP) und Nitroblautetrazolium (NBT) enthaltender Entwicklerlösung führte zu einer enzymatischen Farbreaktion mit der an den Sekundär-Ak gekoppelten Alkalischen Phosphatase. Auf diese Weise konnte ein gebildeter Antigen-Ak-Komplex auf der Nitrozellulosemembran sichtbar gemacht werden.

Die Membranen wurden zweimal für 15 Minuten in jeweils frischem 1 x TBS-Puffer gewaschen, anschließend mit je 20 ml Entwicklerlösung überschichtet und für ein bis zwei Stunden bei 37°C inkubiert.

Entwicklerlösung pro Membran:

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

5 x CDS:

250 ml 2 M NaCl

+ 500 ml 1 M Tris

+ 5,083 g $MgCl_2 \times 6 H_2O$, auf 1000 ml mit ddH₂O, auf pH 9,5 einstellen

III.1.11. Isolation positiver Klone

Durch die beschriebene enzymatische Reaktion kam es zu einer Blaufärbung derjenigen Plaques auf der Nitrozellulosefolie, in denen IgG-Ak aus dem Patientenserum an Tumorproteine gebunden hatten. Dank der initial angebrachten Markierung durch Kanüleneinstiche konnten die seroreaktiven Plaques auf den kühl gelagerten Agarplatten identifiziert werden. Diese Plaques wurden zusammen mit zwei bis drei angrenzenden seronegativen Plaques polyklonal ausgestochen, die Agarwürfel in 1,5 ml-Eppendorfgefäßen gegeben und über Nacht bei 4°C mit 500 µl SM-Puffer inkubiert, so dass die Phagen in den Puffer diffundieren konnten. Am nächsten Tag wurden die Eppendorfgefäße ca. 30 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der die Phagen enthaltende Überstand, wurde nach Überführung in ein neues Eppendorfgefäß mit 20 µl Chloroform versetzt und nach kurzer Vermischung bei 4°C gelagert.

SM-Puffer:

5,8 g NaCl

+ 2,0 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$

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

+ 5 ml Gelatine (2 %), auf 1000 ml mit dd H₂O, steril filtrieren

III.1.12. Identifikation von IgG-Klonen und Färbeartefakten

Da es sich bei der Tumorprobe, aus der die cDNA hergestellt worden war, um durchblutetes Gewebe handelte, enthielt sie u.a. auch B-Lymphozyten, die IgG-mRNA exprimierten. Bei der reversen Transkription (RT) wurde folglich nicht nur die Tumor-mRNA, sondern auch die mRNA dieser B-Zellen einschließlich IgG-mRNA in cDNA umgeschrieben und in das Phagengenom kloniert. In den Plaques exprimiertes rekombinantes IgG konnte den Sekundär-Ak gegen menschliches IgG im Gegensatz zu anderen Proteinen direkt binden und zeigte dementsprechend unabhängig von der Inkubation mit Patientenserum eine positive Farbreaktion.

Eine leichte Abwandlung des SEREX-Verfahrens ermöglichte die Identifikation von rekombinantem IgG und etwaigen Färbeartefakten (z.B. durch Farbkümmel, Randabdrücke, Falten in der Folie) und damit den Ausschluß der korrespondierenden Klone vor weiteren Untersuchungen: Da der Titer der primären Phagenlösungen zunächst nicht bekannt war, wurden zwei Verdünnungen von je 1:100 und 1:1000 mit 0,01 M MgSO₄ hergestellt. Von jeder verdünnten Phagenlösung wurden 10 µl ausplattiert wie oben erläutert. Bevor die Agarplatten belegt wurden, wurden die Nitrozellulose-Membranen in zwei Hälften geschnitten, diese unterschiedlich beschriftet und zur Markierung der exakten Position auf der Agarplatte jede für sich mit drei Nadelstichen versehen. Nach Inkubation bei 37°C über zwei Stunden, Entfernen und Waschen der Membranen, wurden diese wie beschrieben mit Magermilch überschichtet und eine Stunde sanft geschüttelt. Um zu prüfen, ob es zu einer Serum-unabhängigen Bindung des Sekundär-Ak kam, wurde über Nacht jeweils die eine Hälfte der Membranen mit Serum, die andere mit reinem 1 x TBS inkubiert.

Seroreaktive Antigene zeigten nur nach Inkubation mit Serum, jedoch nicht nach Inkubation mit reinem 1 x TBS eine Farbreaktion. IgG-Klone dagegen färbten sich sowohl nach Inkubation mit Serum als auch mit reinem 1 x TBS an, während Färbeartefakte weder nach Inkubation mit Serum noch mit reinem 1 x TBS reproduzierbar waren.

III.1.13. Vereinzelung positiver Klone

Um die seroreaktiven Phagenklone zu vereinzeln, wurde eine Plaquedichte von ca. 200 pfu pro Platte gewählt. Bei den übrigen Arbeitsschritten wurde analog des oben beschriebenen SEREX-Verfahrens vorgegangen. Da positive Klone zunächst polyklonal isoliert worden waren, zeigte nur ein kleiner Teil der 200 Plaques eine positive Farbreaktion. Diese konnten problemlos monoklonal ausgestochen werden. In einer weiteren SEREX-Runde zur Bestätigung der Monoklonalität färbten sich erwartungsgemäß alle Plaques mit gleicher

Intensität. Die seroreaktiven Klone wurden mit einer zwei- bzw. dreiteiligen Nummer versehen. Dabei benannte die erste Zahl die interne Labornummer des untersuchten Tumors, die zweite diejenige der chronologisch durchnummerierten Agarplatten, von der der Phage isoliert worden war, und ggf. die dritte die Reihenfolge, in der mehrere seropositive Klone von einer einzigen Platte isoliert worden waren.

III.1.14. Vermehrung positiver Phagenklone

Um für nachfolgende Untersuchungen eine suffiziente Phagenmenge zur Verfügung zu haben, mussten die identifizierten positiven Phagenklone amplifiziert werden. Zu diesem Zweck wurde eine XL-1 MRF'-Bakterienkultur bei 30°C über Nacht angesetzt. Der Transfektionsansatz aus 600 µl Bakteriensuspension (OD 0,5) und 5×10^4 pfu wurde 15 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend mit 6 ml vorgewärmtem Topagar (48°C) auf frische LB-Tet-Platten ausplattiert. Nachdem der Topagar fest geworden war, wurden die Platten bei 37°C für sechs bis acht Stunden inkubiert. Für eine möglichst effiziente Vermehrung der Phagen, sollten die einzelnen Plaques zusammenstoßen, jedoch noch voneinander abgrenzbar sein, und ihr Durchmesser sollte nicht mehr als zwei Millimeter betragen. Anschließend wurden je 8 ml SM-Puffer auf die Platten gegeben und diese bei 4°C über Nacht sanft geschüttelt. Die Phagen diffundierten in den Puffer, der am Folgetag von jeder Platte abgenommen und in ein steriles Polypropylengefäß überführt wurde. Die Platten wurden nochmals mit 2 ml SM-Pufferlösung gespült, und diese ebenfalls asserviert. Anschließend wurde die Lösung zu 5 % mit Chloroform versetzt, gut durchmischt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zentrifugieren bei 500 g für 10 Minuten konnten sedimentierte Zelltrümmer entfernt, und der die amplifizierten Phagen enthaltende klare Überstand in ein neues steriles Polypropylengefäß überführt werden. Imponierte der Überstand noch trüb, so wurde der Reinigungsschritt mit Chloroform wiederholt und erneut zentrifugiert. Die amplifizierten Phagen wurden in 7 % DMSO bei -80°C gelagert.

III.1.15. Bestimmung des Titers positiver Phagenklone

Um den jeweiligen Phagentiter zu ermitteln, wurde mit 0,01 M MgSO₄ eine Verdünnungsreihe der Phagenlösungen von 1:10 bis 1:10⁹ hergestellt. Nach Anzucht und Infektion der Bakterien wurde diese ohne IPTG ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht inkubiert, und der Phagentiter der Lösung am folgenden Tag anhand der Anzahl der Plaques pro Platte mittels der oben aufgeführten Formel berechnet (vgl. **Kap. III.1.4.**).

III.2. Differentielle serologische Analyse SEREX-definierter Antigene

Mithilfe einer differentiellen serologischen Analyse sollte das Vorhandensein von Ak gegen gefundene SEREX-definierte Antigene im Serum pädiatrischer Patienten mit OS (n = 5), pädiatrischer Patienten mit anderen Tumoren (n = 10) sowie im Serum gesunder Probanden (n = 20) untersucht werden. Da die Menge des verfügbaren Serummaterials begrenzt war, wurde exemplarisch jeweils nur einer der homologen Phagenklone aus einer Antigenfamilie in die differentielle Serumanalyse eingesetzt (**Tab. IV.3**).

Um die Seroreaktivität klar darzustellen, wurden die zu testenden Klone auf seronegativem Hintergrund jeweils im Verhältnis 1:10 ausplattiert. Als weitgehend negativer Hintergrund wurde die primäre Phagenbank eingesetzt. Die verwendeten Seren reagierten erfahrungsgemäß höchstens mit zwei oder drei der 500 pro Platte eingesetzten pfu der Phagenbank, während bei der gewählten Verdünnung von 1:10 bei positiver Reaktion mit dem zu testenden Klon ca. 50 positive Plaques pro Platte zu erwarten waren. Entsprechend setzte sich der Transfektionsansatz aus Volumina der eingesetzten Phagenlösungen zusammen, die 50 pfu des zu testenden Klons und 500 pfu der Phagenbank entsprachen. Nach Inkubation im 37°C Wasserbad mit 600 µl Bakteriensuspension wurde der Ansatz mit IPTG ausplattiert, und die Platten über Nacht im 37°C Brutschrank gelagert. Die übrigen Arbeitsschritte erfolgten analog dem initialen SEREX-Screening, allerdings wurden statt des OS-Serumpools die genannten Tumor- und Normalseren eingesetzt.

III.3. DNA-Präparation

III.3.1. Subklonierung durch „*in vivo* Exzision“

Notwendige Voraussetzung für die Sequenzierung des Tumorantigen-Inserts war das Vorliegen der rekombinanten Plasmid-Vektor-DNA in reiner Form. Im Genom des großen λ-Vektors Uni-ZAP® XR (**Abb. III.2**) war die Sequenz des Plasmids pBluescript (**Abb. III.1**) enthalten. Die Tumor-cDNAs waren jeweils in die multiple Klonierungsstelle der pBluescript-Sequenzen (**Abb. III.3**) inkloniert worden.

Das cDNA-Insert konnte zusammen mit den flankierenden pBluescript-Sequenzen mit Hilfe des filamentösen fl-Helferphagen Ex-Assist® im lebenden Bakterium („*in vivo*“) aus dem großen λ-Phagen-Vektor kopiert und somit quasi herausgeschnitten werden (Exzision). Bei Coinfektion von XL-1-Bakterien mit λ- und fl-Helferphagen, waren die Replikations-Proteine der fl-Helferphagen in der Lage, fl-typische Start- und Stop-Signale der Replikation auf dem λ-Vektor zu erkennen, die die pBluescript-Sequenzen flankierten, und den dazwischenliegenden DNA-Abschnitt zu kopieren. Der kopierte Abschnitt repräsentierte

somit den vollständigen pBlueskript-Vektor mit der inklonierten Tumor-cDNA. Nach Verpackung des rekombinanten Plasmids durch f1-Hüllproteine wurde der Plasmid-tragende Helferphage bei der Bakterienlyse durch die λ -Phagen zusammen mit diesen freigesetzt.

Im Anschluss erfolgte die Trennung der DNA des Plasmidvektors von der DNA der beiden Phagen. Dies geschah durch Passage in einem zweiten *E. coli*-Bakterienstamm (SOLR), der gegen das Eindringen von λ -Phagen resistent war, und die Replikation des Ex-Assist[®] nicht unterstützte. Die f1-Helferphagen konnten zwar in die SOLR-Bakterien eindringen, sich jedoch wegen einer sog. *amber*-Mutation im Phagengenom in SOLR nicht vermehren. Im Gegensatz zum Bakterienstamm XL-1 konnte SOLR den Effekt dieser Mutation nicht unterdrücken, so dass in den infizierten SOLR-Bakterien nur die rekombinanten Plasmide vermehrt wurden.

Über Nacht wurde bei 30°C jeweils eine XL-1- und eine SOLR-Schüttelkultur angelegt. Am folgenden Tag wurden die Bakterienkulturen 10 Minuten lang bei 500 g zentrifugiert, der Überstand verworfen, und das Bakterien-Pellet in 0,01 M MgSO₄ bis zu einer OD von 1 (Wellenlänge 600 nm) resuspendiert. Die SOLR-Suspension wurde zunächst bei 4°C gelagert. Für die „in vivo-Exzision“ des Plasmidvektors in Bakterien wurden 200 μ l XL-1-Blue MRF' mit 250 μ l Phagenlösung eines positiven Phagen-Klons ($> 1 \times 10^5$ pfu) und 1 μ l des Helferphagen Ex-Assist[®] ($> 1 \times 10^6$ pfu) 15 Minuten im 37°C Wasserbad inkubiert. Nach Zugabe von 3 ml LB-Tet-Medium wurde der Ansatz bei 37°C für drei Stunden geschüttelt, anschließend für 20 Minuten auf eine Temperatur von 70°C erhitzt und für 15 Minuten bei 1000 g zentrifugiert. Der Überstand mit λ -Phagen, f1-Helferphagen und verpackten, rekombinanten pBluescript-Phagemiden wurde in sterile Falconröhrchen gegeben. Für die Transfektion der SOLR-Bakterien wurden zwei Ansätze mit verschiedenen Verdünnungen hergestellt: 200 μ l der SOLR-Bakteriensuspension wurden jeweils mit 100 μ l und mit 10 μ l des Überstandes in einem Eppendorfgefäß angesetzt. Dies sollte sicherstellen, später Einzelkolonien zur Verfügung zu haben. Nach Inkubation im 37°C Wasserbad für 15 Minuten wurden die Transfektionsansätze mit einem Glasspatel auf kleinen LB-Ampicillin-Platten ausplattiert und über Nacht im 37°C Brutschrank inkubiert. Da der pBluescript-Vektor ein Ampicillinresistenzgen trägt, gelang durch Zusatz von Ampicillin die Selektion rekombinanter Phagemide. Je eine der gewachsenen Kolonien wurden schließlich zur Aufreinigung in den Ansatz der Mini-Präparation überführt.

XL-1 MRF' Bakterien-Kultur:

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

SOLR Bakterienkultur:

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

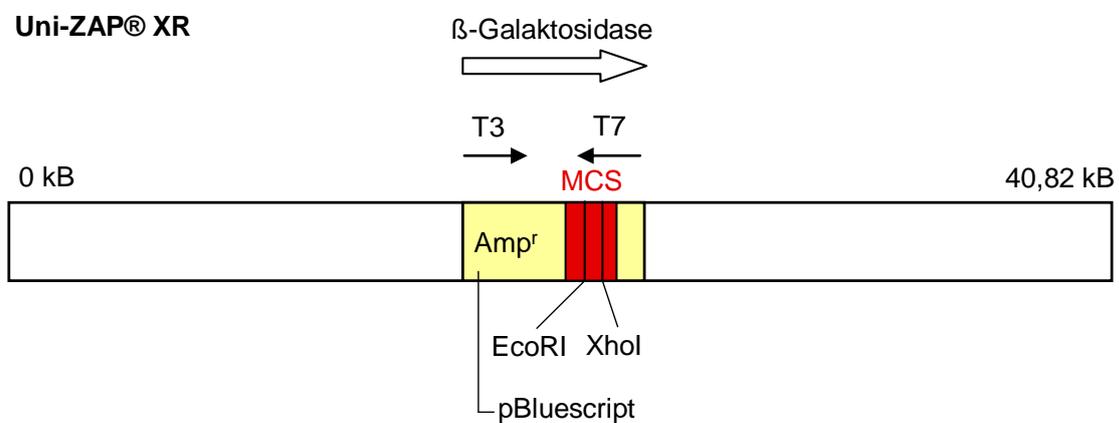


Abb. III.1. Schematische Karte des Uni-ZAP[®] XR Insertionsvektors.

Über die Restriktionsenzyme *EcoRI* und *XhoI* wurde die OS-cDNA in den Polylinker (rot) des Uni-ZAP[®] XR-Vektors der Firma Strategene hinein kloniert. Dieser lag innerhalb der Sequenzen des pBluescript-Vektors (gelb). Zur Sequenzierung und Charakterisierung des cDNA-Inserts wurde das pBluescript-Phagemid (Abb. III.3) durch *in vivo*-Excision mithilfe des f1-Helferphagen ExAssist[™] vom λ-Phagenvektor kopiert (*in vivo excision*), mit Hilfe von f1-Proteinen zu Phagen verpackt und schließlich in SOLR-Bakterien vermehrt.

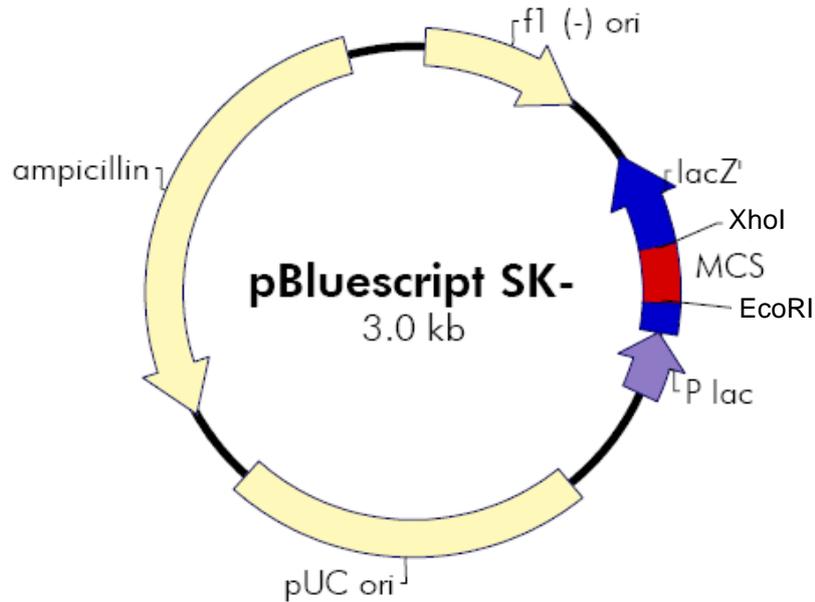


Abb.III.2. Zirkuläre Vektorkarte des pBlueskript-Phagemids (Modifiziert nach Stratagene, <http://www.stratagene.com/manuals/237211.pdf>).

Der pBluescript-Vektor hat eine Länge von 2958 bp. Der darin enthaltene Polylinker lag innerhalb des für eine Untereinheit des Enzyms β -Galaktosidase kodierenden *lacZ* Gens. Mittels Aufhebung der Repression des *lacZ* Genpromotors durch das Galaktose-Analogen Isopropyl- β -D-Thiogalactosid (IPTG) konnte die Expression der inklonierten Tumor-cDNA induziert werden. Im Falle einer erfolgreichen Rekombination des *lacZ* Gens stand kein funktionstüchtiges β -Galaktosidase-Enzym zur Verfügung, so dass der Blue-White-Test in weißen Plaques resultierte. f1 (-) ori = Ursprung der DNA-Replikation des *antisense*-Stranges des *lacZ*-Gens. lacZ' = *lacZ*-Gen. MCS = *multiple cloning site*. Innerhalb der MCS befinden sich die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme EcoRI und XhoI. P lac = *lac* Promoter. pUC ori = Ursprung der DNA-Replikation des Plasmids. ampicillin = Ampicillinresistenzgen.

**pBluescript SK (-) Multiple Cloning Site Region
(sequence shown 601-826)**

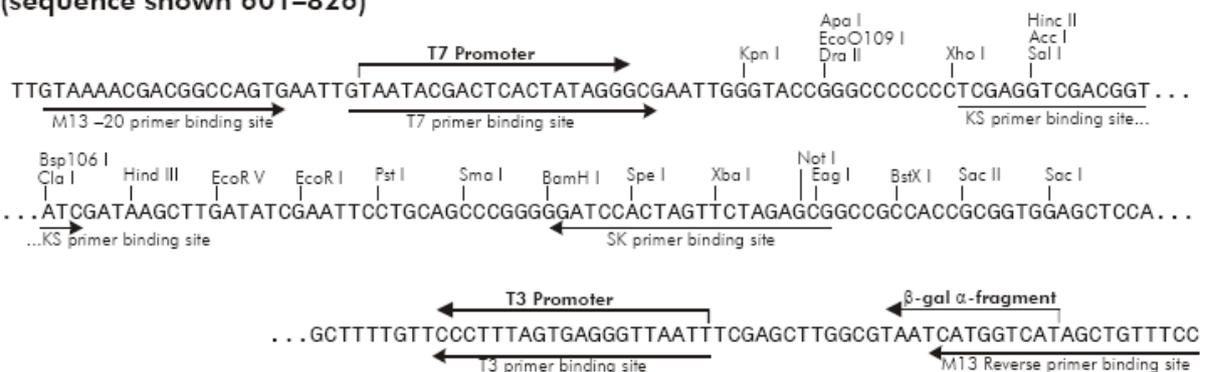


Abb. III.3. Sequenz der *multiple cloning site* (MCS) des pBluescript-Phagemids, (<http://www.stratagene.com/manuals/237211.pdf>).

Der Polylinker des pBluescript-Phagemids wird von T7- und T3-Promotoren flankiert, deren Sequenzen als Bindungsstelle für die Oligonukleotide der jeweils ersten Sequenzierreaktionen vom 3' und 5'-Ende der MCS dienen.

III.3.2. Mini-Präparation von Plasmid-DNA

Mittels Mini-Präparation durch alkalische Lyse konnten zügig kleinere Plasmidmengen gewonnen werden. Über Nacht wurde bei 37°C eine SOLR-Schüttelkultur mit 5 ml LB-Medium, 25 µl Ampicillin und 1 Kolonie von der SOLR-Platte angelegt. Etwa 1,5 ml jeder Kultur wurde jeweils in ein Eppendorfgefäß überführt und 5 Minuten bei 18000 rpm und Raumtemperatur in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Bakterienpellet wurde in 100 µl Lösung 1 resuspendiert und behutsam gemischt. Durch die Ribonuklease in Lösung 1 erfolgte der Abbau der im Präparat enthaltenen RNA. Nach Zugabe von 100 µl Lösung 2 zur Auflösung der Zellmembran wurde erneut vorsichtig gemischt. Die Beschädigung der chromosomalen Bakterien-DNA war hierbei möglichst zu vermeiden, um später deren problemlose Trennung von der Plasmid-DNA (pDNA) zu gewährleisten. Nach Inkubation bei Raumtemperatur für 5 Minuten wurden 100 µl Lösung 3 zugegeben und behutsam gemischt. Durch 20-minütige Zentrifugation bei 15000 rpm (Raumtemperatur) wurden die Bakterienzelltrümmer von der pDNA getrennt. Der die pDNA enthaltende Überstand wurde in ein frisches Eppendorfgefäß gegeben und nach Zusatz von 750 µl 100 % Ethanol zur Ausfällung der DNA für 15 Minuten bei 15000 rpm (Raumtemperatur) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und das sedimentierte Plasmid nach kurzem Trocknen an der Luft in 100 µl autoklaviertem H₂O gelöst. Über die Größenbestimmung mithilfe einer sich anschließenden Restriktionsanalyse (vgl. **Kap. III.4.1.**) wurde untersucht, ob in der gereinigten pDNA ein cDNA-Insert enthalten war.

Lösung 1:

50 mM Sucrose

25 mM TRIS (pH 8)

10 mM EDTA

1 µl RNase A (10 mg/ml)

Lösung 2:

1 % w/v SDS

0,2 M NaOH

Lösung 3:

600 ml 5 M Kaliumacetat (pH 5,3)

115 ml Eisessig

ddH₂O ad 1000 ml

III.3.3. Maxi-Präparation von Plasmid-DNA

Mithilfe der Maxi-Präparation konnte eine ausreichende Menge reiner pDNA zur Sequenzierung gewonnen werden. Nach erfolgter Restriktionsanalyse wurden in Erlenmeyerkolben 400 µl geeignete Mini-Präp-Kulturen mit 400 ml LB-Amp (2 ml Ampicillin 100 µg/ml) angesetzt und bis zum Erreichen einer maximalen Bakteriendichte über Nacht bei 37°C geschüttelt. Am nächsten Tag wurde die Kultur 10 Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert, ihr Überstand verworfen und das gewonnene Bakterienpellet in 10 ml Lösung 1 (vgl. III.3.2.) resuspendiert. 800 µl der Bakteriensuspension wurden entnommen und nach Zusatz von 1 ml LB-Medium und 100 µl DMSO bei -80°C als Rückstellprobe eingefroren. Zur Lyse der Zellen wurden 10 ml Lösung 2 in die übrige Bakteriensuspension gegeben, und das Gemisch für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 10 ml Lösung 3 hinzugefügt und kräftig geschüttelt. Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 20000 rpm befand sich die pDNA im klaren Überstand, während bakterielle DNA und Zelltrümmer im geleeartigen Rückstand verblieben waren. Mittels Anionenaustauschchromatographie konnte der die pDNA enthaltende Überstand noch weiter aufgereinigt werden. Das Säulenmaterial fing dabei die stark negativ geladenen Nukleinsäuren ab, während die weniger stark geladenen Proteine ungehindert hindurchtraten. Die Säulen (Qiagen) mussten zunächst mit 15 ml Lösung 4 equilibriert werden. Um Sedimentreste abzufangen, wurde das die pDNA enthaltende Lysat durch Verbandmull auf die Säule gegossen. Nach wiederholtem Durchspülen mit 30 ml Lösung 5, wurde die DNA mit 15 ml Lösung 6 wieder aus dem Säulenmaterial herausgelöst. Um eine Ausfällung der Nukleinsäuren zu erreichen wurde dem Eluat 11 ml Isopropanol zugesetzt und anschließend 30 Minuten bei 5000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das pDNA-Pellet an der Luft getrocknet und in 1 ml autoklaviertem Wasser gelöst. Mittels eines Kontron-Photometers wurde nach Verdünnung von 1:20 bei 260 nm die Konzentration der vorliegenden pDNA bestimmt, und zur Größenkontrolle eine Spaltung mit Restriktionsenzymen durchgeführt (vgl. **Kap. III.4.1.**).

In Analogie zur Nomenklatur der monoklonalen Phagen wurde die aufgereinigte pDNA mit einer dreiteiligen Nummer benannt. Die erste Zahl bezeichnete den individuellen Tumor aus dem die Phagenbank hergestellt worden war, die zweite Zahl gab die Nummer der Agarplatte an, von der der Phage isoliert worden war, und eine dritte Zahl stand ggf. für einen von mehreren isolierten, seroreaktiven Phagenklonen derselben Platte.

III.4. DNA-Analyse

III.4.1. Bestimmung der Länge der cDNA-Inserts

III.4.1.1. DNA-Verdau mit Restriktionsenzymen

Mithilfe von Restriktionsanalysen konnte die Größe der in den Plasmidvektor inserierten cDNA ermittelt werden. Für den DNA-Verdau wurden die Endonukleasen BamHI, EcoRI und XhoI eingesetzt. BamHI machte aus dem zirkulären Plasmidvektor ein lineares Fragment, dessen Größe der Länge des Vektors (2,9 kb) plus der Länge des Inserts entsprach, sofern letzteres nicht eine zusätzliche BamHI-Schnittstelle trug. Für das Herausschneiden des cDNA-Inserts oder von Insert-Fragmenten aus dem Uni-ZAP-XR[®]-Vektor wurden EcoRI und XhoI verwendet, also die gleichen Enzyme, mit deren Hilfe das Insert eingangs in die MCS inkloniert worden war. Für den DNA-Verdau wurde ein Ansatz aus 17 µl der Mini-Präp-DNA mit 1 µl Enzym und 2 µl des geeigneten 10 x Puffers hergestellt, der eine Stunde bei 37°C inkubiert wurde. Für die Kontrollspaltung der Maxi-Präp-DNA wurden 1 µg DNA mit 2 µl geeignetem 10 x Restriktionspuffer und 1 µl Enzym veresetzt, mit ddH₂O auf ein Volumen von 20 µl aufgefüllt und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Abschätzung der Fragmentlänge durch Vergleich mit einem Größenmarker nach gelelektrophoretischer Auftrennung in einem Agarose-Gel (vgl. **Kap. III.4.1.2.**).

III.4.1.2. Agarose-Gelelektrophorese

Mithilfe der Gelelektrophorese konnten Restriktionsfragmente und PCR-Produkte (vgl. **Kap. III.5**) ihrer Größe nach aufgetrennt und deren ungefähre Basenzahl bestimmt werden. Ein aus 1 % Agarose und 1 x TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA) hergestelltes Gel wurde in der Mikrowelle für 3 Minuten aufgeköcht. Der Zusatz von 0,1 µg/ml Ethidiumbromid war notwendig, um die DNA später im Gel unter UV-Licht sichtbar werden zu lassen. Ethidiumbromid ist eine interkalierende Substanz, die durch Komplexbildung mit Nukleinsäuren unter UV-Licht helle Fluoreszenzen erzeugt. Nachdem das Gel in der dafür vorgesehenen Kammer erstarrt war, wurden dessen Taschen mit je 17 µl DNA-Lösung und 3 µl Glycerin-Ladepuffer versehen. Als Größenstandard wurde eine 1 kb-DNA-Leiter (Gene Ruler) verwendet. Unter einer Spannung von 80 bis 100 Volt wanderten die DNA-Fragmente für ca. eine Stunde durch das Gel. und konnten anschließend im Transilluminator unter UV-Licht fotografiert werden (**Abb. IV.4b, Abb.IV.21**).

50 x TAE-Puffer:

2,0 M Tris-Base (242,2 g)

1,0 M Eisessig (57,1 mL)
0,1 M Na₂EDTA x 2 H₂O (18,61 g)
auf pH 8,3 einstellen

5 x Glycerin-Ladepuffer

50 mM Tris-HCl
1 % SDS (Natriumdodecylsulfat)
50 mM EDTA
40 % Glycerin
0,02 % Bromphenolblau
auf pH 8,0 einstellen

III.4.1.3. Sequenzanalyse

Die Sequenzierung der cDNA-Inserts wurde bei der Firma Sequiserve (Vaterstetten) in Auftrag gegeben. In einem Eppendorfgefäß wurden 4 µg Plasmid bzw. 100 ng PCR-Produkt (vgl. **Kap. III.5.1.3.**) in 20 µl ddH₂O und 2 µl einer Lösung des jeweils passenden, 18-Basen langen Oligonukleotidprimers in ddH₂O (100 pmol/µl) an die Firma verschickt. Da die multiple Klonierungsstelle (657-759bp) des pBluescript-Vektors und damit die inserierte cDNA von einer T3- und T7-Promotorregion (T3: 5'-AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG; T7: 5'-CAT TAT GCT GAG TGA TAT CCC G) flankiert wurde (**Abb. III.3**), konnten für die ersten Sequenzierreaktionen komplementäre Oligonukleotide als Primer benutzt werden. Ein zuverlässiges Leseergebnis waren jedoch mit einem Primer nur über eine Strecke von etwa 500 Nukleotiden zu erwarten, weshalb mehr als 1500 Basen umfassende Inserts in mehreren Schritten sequenziert werden mussten. Dies erforderte die Auswahl weiterer innerhalb des einklonierten Inserts gelegener Primer.

Nach Entschlüsselung wurden die einzelnen Antigensequenzen zunächst mittels der Computerprogramme Gene Tool und Clone Manager untereinander verglichen und anschließend mithilfe des Suchprogramms BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) der GenBank des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) sowie der SEREX-Datenbank (www.licr.org/SEREX.html) auf Homologie oder Identität mit bereits bekannten Sequenzen untersucht.

Auf der Grundlage ihrer cDNA-Homologie konnten die gefundenen Antigene unterschiedlichen Gengruppen zugeordnet werden, die mit MU-OS-177-1 bis -19 bezeichnet wurden. Verschiedene cDNAs einer Gruppe wurden jeweils mit dem Suffix a-c gekennzeichnet.

Mithilfe des Programms Clone Manager wurden die möglichen offenen Leserahmen (*open reading frame*, ORF) bestimmt, wobei eine ORF-Mindestlänge von 20 Aminosäuren (AS) als Untergrenze festgelegt wurde.

III.5. mRNA Expressionsanalyse

III.5.1. RT-PCR

Die mRNA-Expression eines ausgewählten SEREX-definierten Antigens und des bekannten Homologs in verschiedenen Normal- und Tumorgewebeproben wurde mithilfe der RT-PCR untersucht.

III.5.1.1. Reverse Transkription (RT)

Zur reversen Transkription der Gewebe-mRNA in cDNA wurde ein Ansatz aus 3 µg RNA, 15 µl RNase-freiem ddH₂O (1:1000 mit DEPC [Diethylenpyrocarbonat] verdünnt) und 1 µl Oligo-dT-Primer hergestellt, und dieser nach 10-minütiger Denaturierung der Nukleinsäuren bei 70°C umgehend auf Eis kaltgestellt. Anschließend wurden 2 µl dNTP (10 mM), 2 µl 10 x Puffer und 1 µl M-MuLV-Reverse Transkriptase (200 U/µl) zugesetzt, so dass es während der folgenden Inkubation bei 42°C über eine Stunde zur Auffüllreaktion kommen konnte.

III.5.1.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Analyse der mRNA-Expression mittels PCR wurde ein Ansatz aus 3 µl cDNA-Lösung, je 1 µl der beiden zu diesem Zweck hergestellten und 1:10 verdünnten Oligonukleotidprimer von 20 bp Länge (**Tab.II.1**) (vgl. **Kap. II.2.**), 3 µl MgCl₂, 5 µl 10 x Polymerasepuffer, 1 µl dNTP (10 mM), 33 µl ddH₂O und 2,5 µl DMSO hergestellt. Die Zugabe von DMSO sollte die Reaktion beschleunigen. Die dsDNA wurde bei 95°C für eine Minute denaturiert, auf Eis gestellt, und anschließend 0,2 µl Taq DNA-Polymerase zugesetzt. Die Bindung der Primer an den als Matritze dienenden DNA-Einzelstrang erfolgte abhängig von deren Schmelztemperatur bei 50 bis 60°C. Bei einer Temperatur von 72°C setzte die Verlängerung durch die Polymerase ein. Der beschriebene Zyklus wurde protokollgemäß 40-fach wiederholt.

Um zu gewährleisten, dass nur PCR-Produkte von cDNA und nicht von genomischer DNA entstanden, mussten die benötigten Primerpaare im Bereich von zwei ein möglichst großes Intron überspannenden Exons liegen.

Zur Prüfung von Spezifität und Effektivität der PCR wurden Kontrollproben analysiert. Als Positivkontrolle dienten jeweils 3 µl der mit SEREX untersuchten λ-Phagenbank aus OS-

Gewebe und 1 µl einer 1:100 verdünnten Plasmid-Lösung, die die antigenkodierende pDNA enthielt. Durch Einsatz von 3 µl ddH₂O als Negativkontrolle wurde nachgewiesen, dass es bei der PCR-Analyse nicht zu einer systematischen Kontamination der Proben gekommen war. Mittels Agarose-Gelelektrophorese (vgl. **Kap. III.4.1.2.**) konnte unter Zuhilfenahme eines kommerziell zu erwerbenden DNA-Größenstandards die Größe der PCR-Produkte ermittelt werden. Hierzu wurde das Gel mit 15 µl der Probe und 5 µl Glycerin-Ladepuffer beladen und anschließend für eine Stunde eine Spannung von 100 Volt angelegt (**Abb. IV.21.**).

III.5.1.3. Isolation von PCR-Produkten aus dem Agarosegel

Nach Größenauftrennung im Agarosegel konnten die PCR-Produkte (vgl. **Kap. III.5.**) mittels Skalpell unter langwelligem UV-Licht aus dem Gel herausgeschnitten werden. Mit dem *Quiaex II Gel-Extraction Kit* der Firma Quiagen wurde die DNA anschließend aus dem Gel isoliert. Die entsprechenden Arbeitsschritte richteten sich nach den Hersteller-Vorgaben.

IV. ERGEBNISSE

IV.1. Serologische Identifizierung und molekulare Charakterisierung von Osteosarkomantigenen

Mit dem Ziel der Identifizierung von Tumorantigenen wurde eine OS-cDNA-Expressionsbibliothek mittels des SEREX-Verfahrens untersucht. Für das serologische Screening wurde ein Pool aus Seren von fünf Patienten mit OS eingesetzt. Um eine weitgehend vollständige Repräsentation der exprimierten Gene des Tumors in der Expressionsbibliothek zu gewährleisten, wurden ca. eine Million Phagenklone in die Untersuchung einbezogen.

Von den untersuchten Klonen ergaben insgesamt 108 Klone eine positive Fäberekation. Diese beruhte bei 16 Klonen auf einer direkten Anfärbung von rekombinantem IgG aus B-Zellen im Tumorgewebe (vgl. **Kap. III.1.9.**). Bei den übrigen 92 Klonen handelte es sich um die gewünschte Bindung von rekombinantem Antigen an IgG-Serumantikörper. Die rekombinanten Antigene konnten aufgrund ihrer cDNA-Homologie 20 verschiedenen Genen zugeordnet und entsprechend in 20 Antigengruppen unterteilt werden (**Tab. IV.1**). Innerhalb der 20 Antigengruppen zeigten 14 eine Homologie zu cDNAs, die für bekannte Proteine kodieren, und sechs waren Homologe von cDNAs mit bisher unbekannter Funktion. Einige Antigene waren homolog zu cDNAs, die mithilfe von SEREX bereits aus anderen Tumoren kloniert worden waren (**Tab. IV.2**).

Die gefundenen Antigene wurden in Analogie zu anderen publizierten SEREX-Antigenen mit MU-OS-177-1 bis MU-OS-177-19 benannt. Die ersten beiden Buchstaben (MU) repräsentierten den Ort der Antigenidentifizierung (München), der dritte und vierte die Tumorentität (OS), die erste Zahl die interne Labornummer des untersuchten Tumors und die zweite Zahl die Antigengruppe. Sofern mehrere, unabhängig voneinander klonierte cDNAs vom selben Gen kodiert wurden, wurden sie -soweit unterschiedlich voneinander-chronologisch mit dem Suffix „a“ bis „c“ versehen (**Tab. IV.1**). Bei der kompletten Sequenzanalyse zeigte sich die Antigengruppe 13 als zu zwei unterschiedlichen Genen gehörig, die für zwei Isoenzyme kodieren. Die Gruppe 13 wurde deshalb in zwei Untergruppen 13.1 und 13.2 unterteilt.

Die vergleichenden Abbildungen zu den einzelnen Antigengruppen beziehen sich, wo immer möglich, auf homologe Referenz-cDNAs einer Datenbank (*GenBank*) des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Die jeweiligen Zugangsnummern zur Datenbank wurden angegeben (z.B. NM_006644). Im Text wurden auch Gemeinsamkeiten mit und Differenzen zu Einträgen der SEREX-Databse und ggf. zu genomischen Sequenzen in der *GenBank*

besprochen. Die meisten der identifizierten Antigene wurden wahrscheinlich von demselben offenen Leserahmen (ORF) abgelesen wie das bekannte Homolog, da dieser in der Regel dem ersten und größten ORF in der antigenkodierenden cDNA entsprach; er wurde in den Abbildungen jeweils als grüne Box gekennzeichnet. Neue molekulare Charakteristika der cDNAs wurden mit Bezug auf diesen ORF bzw. auf die korrespondierenden, hypothetischen Antigene diskutiert und in den Abbildungen rot hervorgehoben. Basenpaardifferenzen, die in einer öffentlich zugänglichen Datenbank (*Ensembl gene report*) als *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) erfasst waren, wurden in den Abbildungen mit einem Stern (*) markiert. Drei der identifizierten Antigene werden von cDNAs kodiert, die den bekannten ORF nicht enthielten, so dass ein alternativer ORF postuliert wurde. Hier wurde jeweils der größte hypothetische ORF angegeben, ohne dass dessen serologische Erkennung in dieser Arbeit verifiziert wurde.

Die Antigene der Gruppe MU-OS-177-1 sind wahrscheinlich mit HSP105 α und β identisch

Die serologisch detektierten Antigene a-c der Gruppe MU-OS-177-1 wurden von den überlappenden Inserts der Plasmide p177-82-1, p177-92-1 bzw. p177-281-6 kodiert

Die kodierenden cDNAs waren homolog zur cDNA des auf Chromosom 13 kodierten, 105 kDa großen Hitzeschockproteins HSPH1/HSP105 α (NM_006644) sowie zu Spleißvarianten derselben aus der transformierten, epithelialen Zelllinie HeLa 229 (AB003334), einem Leiomyosarkom (BC018124), einem Hodenkarzinom (BC037553) und normalem Hodengewebe (BX648125) (nicht gezeigt) (**Tab. IV.1a**). Mit Hilfe von SEREX waren HSPH1-Homologe auch aus Testis und verschiedenen Tumorgeweben isoliert worden (Scanlan et al., 1998; Nakatsura et al., 2001) (**Tab. IV.2a**).

Die cDNAs 82-1 (a) und 92-1 (b) waren mit HSP105 α identisch. Die cDNA 281-6 (c) entsprach der bislang nur in HeLa-Zellen beschriebenen Spleißform mit Deletion eines 132 bp-langen Exons im Bereich des ORF (HSP105 β) (AB003333) (**Abb. IV.1**).

Hitzeschockproteine sind in der Evolution hoch konserviert und katalysieren als molekulare Chaperone ATP-abhängig die Faltung von anderen Proteinen. Alle Organismen synthetisieren Hitzeschockproteine als Reaktion auf Stressfaktoren, wie Hitzeschock, Schwermetalle, oxidative Agenzien und andere pathophysiologische Bedingungen (Ishihara et al., 2000). Hitzeschockproteine erlauben der Zelle eine Anpassung an sonst tödliche Umweltbedingungen und spielen deshalb eine Schlüsselrolle bei der Apoptose-Kontrolle (Chen et al., 2003).

Tumorantigen cDNA (Länge)	Anzahl isolierter Klone	cDNA Homologien [GenBank-Zugangsnummer] (Länge der cDNA)	Biologische Bedeutung der bekannten Genprodukte	Sequenzunterschiede zu homologen cDNAs	Sequenzunterschiede zu homologen Proteinen
MU-OS-177-1 a) 82-1 (3516 bp) b) 92-1 (3572 bp), c) 281-1 (2933 bp)	3	Human Heat Shock 105kDa Protein 1 (HSPH1) [NM_006644] (3680 bp)	Stressprotein, Apoptose-Kontrolle?	a – c) 5' inkomplett 3' inkomplett a, b) C→T in 5'UTR (<i>SNP</i>) c) bekannte Spleißvariante (-132 bp)	c) inkompletter N-Terminus 44 AS-Deletion
MU-OS 177-2 a) 21-1 (2641 bp) b) 168-1 (2490 bp)	2	Serine/threonine kinase, lysine deficient (PRKWINK1) [NM_018979] (7149 bp)	Regulation von epithelialem Ionentransport	a, b) 5' inkomplett erweiterte 3'UTR T→G, C→T (<i>SNPs</i>). b) 3' inkomplett (kein Poly-A-Signal)	a, b) inkompletter N-Terminus Ile→Met
MU-OS 177-3 88-1 (781 bp)	1	Homer, neuronal immediate early gene 3 (HOMER3) [NM_004838] (1561 bp)	beteiligt an Kalziumsignalübertragung	5' inkomplett	inkompletter N-Terminus
		” [AK124450] (1779 bp)	”	5' inkomplett 3' inkomplett (kein Poly-A-Signal) G→A in 3'UTR	inkompletter N-Terminus
MU-OS-177-4 a) 38 (2081 bp) b) 53 (3036 bp) c) 177 (3356 bp)	3	FLJ39610 fis [AK096929] (1808 bp)	nicht bekannt (Smc-Domäne?)	b) 5' inkomplett b, c) 3' erweitert b) C→T (<i>SNP</i>)	a) inkompletter N-Terminus a, b) erweiterter C-Terminus
		MGC33887 [NM_145036 = AF458591] (2076 bp)	nicht bekannt	b, c) 5' und 3' erweitert bekannte Spleißvariante (5') a-c) C→G (<i>SNP</i>) C→T (<i>SNP</i>) A→G (<i>SNP</i>) b) C→T (<i>SNP</i>) a, c) A→G (<i>SNP</i>)	a,b) erweiterter N-Terminus a,b) Ser→Cys Lys→Glu a, c) Lys→Glu

Tab. IV.1a. Homologierecherche in der *GenBank* zu den Osteosarkomantigenengruppen MU-OS-177-1 bis -4.

Gegenüber den cDNA-Einträgen in der *GenBank* neue molekulare Charakteristika der SEREX-definierten OS-Antigene sind rot hervorgehoben. Molekulare Charakteristika der OS-Antigene, die nur in aus Tumoren klonierten homologen cDNAs vorkommen (nicht jedoch in homologen cDNAs aus Normalgeweben), sind blau hervorgehoben.

Tumorantigen cDNA (Länge)	Anzahl isolierter Klone	cDNA Homologien [GenBank-Zugangsnummer] (Länge der cDNA)	Biologische Bedeutung der bekannten Genprodukte	Sequenzunterschiede zu homologen cDNAs	Sequenzunterschiede zu homologen Proteinen
MU-OS 177-5 47 (1309 bp)	1	<i>U2AF small subunit related protein 2 (U2AF1-RS2)</i> [NM_005089] (1488 bp)	Spleißfaktor	5' inkomplett C→T (SNP)	inkompletter N-Terminus
MU-OS 177-6 63-1 (249 bp)	1	<i>Cross immune reaction antigen 1 (PCIA 1)</i> [NM_024050] (1086 bp)	nicht bekannt	nur 3'UTR kloniert→alternativer ORF	alternatives Genprodukt
		DKFZp762PO215 [AL832922] (3202 bp)	nicht bekannt	nur 5'UTR kloniert→alternativer ORF	alternatives Genprodukt
MU-OS 177-7 168-3 (1786 bp)	1	<i>fibronectin type III domain containing 1 (FNDC1)</i> DKFZp667FO313 [AL832410] (2833 bp)	Protein-Protein-Interaktion	5' inkomplett 3' inkomplett zahlreiche SNPs	inkompletter N-Terminus
		KIAA1866 [AB058769] (4811 bp)	nicht bekannt	5' inkomplett bekannte Spleißvariante (-108 bp) zahlreiche SNPs	36 AS-Deletion
MU-OS 177-8 a) 174-1 (661 bp) b) 290-4 (650 bp)	2	<i>Nonmetastatic protein homolog 2 (NM23-H2)</i> [NM_002512] (822 bp)	Nukleosid Diphosphat Kinase, Regulation von Proliferation und Zelldifferenzierung, Signaltransduktion	a, b) 5' inkomplett a) A→T.	a, b) evtl. inkompletter N-Terminus evtl. His→Leu
MU-OS-177-9 290-3 (969 bp)	1	<i>Ribophorin II (RPN 2)</i> [NM_002951.2] (2509 bp)	Membran-Glykoprotein des rauen ER, beteiligt an der Ribosomenbindung	5' inkomplett 3' inkomplett (kein Poly-A-Signal) G→A C→T (SNP)	Inkompletter N-Terminus Gly→Asp
MU-OS-177-10 63-2 (3865 bp)	1	<i>Golgi autoantigen, golgin subfamily a, 1 (GOLGA1)</i> [NM_002077.2] (4805 bp)	beteiligt am vesikulären Transport	5' und 3' inkomplett C→T (SNP)	Thr→Met

Tab. IV.1b. Homologierecherche in der *GenBank* zu den Osteosarkomantigenengruppen MU-OS-177-5 bis -10 (Anmerkungen wie zu Tab IV.1a).

Tumorantigen cDNA (Länge)	Anzahl isolierter Klone	cDNA Homologien [GenBank-Zugangsnummer] (Länge der cDNA)	Biologische Bedeutung der bekannten Genprodukte	Sequenzunterschiede zu homologen cDNAs	Sequenzunterschiede zu homologen Proteinen
MU-OS-177-11 70 (4187 bp)	1	Early endosome antigen 1 (EEA 1) [NM_003566] (4874 bp)	peripheres Membranprotein, beteiligt an Phagosomenreifung und endozytotischer Membranfusion	5' inkomplett erweiterte 3'UTR G→T in 3'UTR G→A (SNP)	inkompletter N-Terminus
		DKFZp686014119 [BX648463] (4187 bp)	nicht bekannt	bekannte Spleißvariante (+158 bp) 5' erweitert G→T in 3'UTR A→C in 3'UTR	erweiterter N-Terminus
MU-OS-177-12 a) 51 (3310 bp) b) 71-1 (2551 bp) c) 96 (3653 bp)	3	Uveal autoantigen, transcript 2 (UACA) [NM_001008224] (7096 bp)	bekanntes Autoantigen bei Panuveitis und autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen	a, b) 5' inkomplett a-c) 3' inkomplett b, c) kein Poly-A-Signal a, c) C→T (SNP) c) C→G (SNP) c) neue Spleißvariante (5' ORF und UTR)	a, b) inkompletter N-Terminus b, c) inkompletter C-Terminus c) alternativer N-Terminus
MU-OS-177-13.1 57-1 (1474 bp)	1	Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1 (ROCK1) [NM_005406] (4065 bp)	Serin/Threonin-Kinase (<i>downstream</i> von Rho), beteiligt an Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts während Zellmorphogenese und -motilität	5' und 3' inkomplett	inkompletter N- und C-Terminus
MU-OS-177-13.2 76-2 (4469 bp)	1	Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 2 (ROCK2) [NM_004850.3] (6401 bp)	Isoenzym von ROCK1	5' inkomplett 2bp-Deletion G→A in 3'UTR (SNP)	inkompletter N-Terminus
MU-OS-177-14 93-2 (3104 bp)	1	Kinectin 1 (KTN 1) [NM_182926] (4816 bp)	Mikrotubuli-assoziiertes, integrales ER-Membranprotein, beteiligt am intrazellulären Transport von Zellorganellen entlang der Mikrotubuli	5' und 3' inkomplett bekannte Spleißvariante (-87 bp, -56 bp→ alternatives Stopkodon stromabwärts)	inkompletter N-Terminus 29 AS-Deletion ohne Konsequenz
		" [L25616] (4416 bp)	"	5' und 3' inkomplett bekannte Spleißvariante (+84 bp)	inkompletter N-Terminus 28 AS-Insertion

Tab. IV.1c. Homologierecherche in der *GenBank* zu den Osteosarkomantigengruppen MU-OS-177-10 bis -14 (Anmerkungen wie zu Tab. IV.1a).

Tumorantigen cDNA (Länge)	Anzahl isolierter Klone	cDNA Homologien [GenBank-Zugangsnummer] (Länge der cDNA)	Biologische Bedeutung der bekannten Genprodukte	Sequenzunterschiede zu homologen cDNAs	Sequenzunterschiede zu homologen Proteinen
MU-OS-177-15 127-2 (495 bp)	1	Galectin 1 (LGALS 1, Gal-1) [NM_002305.2] (526 bp)	β-Galaktosid-bindendes Protein, autokriner Regulator der Zellprolifera- tion mit immunregulatorischer Funktion, beteiligt an Prä-mRNA-Spleißen, funktionelle Verbindung zu H-RAS	5' inkomplett 1 bp-Insertion (C) in 3'UTR	keine
MU-OS-177-16 a) 192 (3700 bp) b) 197 (2485 bp)	2	STE-like kinase (hSLK) [AB002804] (5810 bp)	Serin/Threonin Kinase (Funktion unbekannt) Interaktion mit Zytoskelett?	a) 5' inkomplett alternatives Poly-A-Signal (?) T→C und 1bp-Deletion in 3'UTR b) 3' inkomplett T→G in 5'UTR a, b) A→G (SNP), T→C, C→T (SNP)	a) inkompletter N-Terminus b) inkompletter C-Terminus a, b) Thr→Ile
		KIAA0204 [D86959] (5988 bp)	nicht bekannt	a) 5' inkomplett alternatives Poly-A-Signal (?) 2bp-Insertion→ORF-Shift b) 3' inkomplett a, b) A→G (SNP), C→T (SNP)	a) inkompletter N-Terminus a) erweiterter C-Terminus a, b) Thr→Ile
		CTCL TumorAg se20-9 [AF273048 = NM_014720] (5629 bp)	nicht bekannt	a) 5' inkomplett alternatives Poly-A-Signal (?) bekannte Spleißvariante (-93 bps) b) 5' erweitert 3' inkomplett a, b) A→G (SNP), C→T (SNP)	a) inkompletter N-Terminus 31 AS-Deletion b) inkompletter C-Terminus a, b) Thr→Ile
MU-OS-177-17 106 (2117 bp)	1	Spermatogenesis associated 18 homolog (rat) (SPATA 18) [NM_145263] (4317 bp)	nicht bekannt	nur 3'UTR kloniert→alternativer ORF 1bp-Deletion und C→T in 5'UTR	alternatives Genprodukt
		" [BC037886] (3096 bp)	nicht bekannt	nur 3'UTR kloniert→alternativer ORF G →A im alternativen ORF	alternatives Genprodukt AS-Austausch

Tab. IV.1d. Homologierecherche in der *GenBank* zu den Osteosarkomantigengruppen MU-OS-177-15 bis -17 (Anmerkungen wie zu Tab. IV.1a).

Tumorantigen cDNA (Länge)	Anzahl isolierter Klone	cDNA Homologien [GenBank-Zugangsnummer] (Länge der cDNA)	Biologische Bedeutung der bekannten Genprodukte	Sequenzunterschiede zu homologen cDNAs	Sequenzunterschiede zu homologen Proteinen
MU-OS-177-18 268 (3204 bp)	1	Centromere protein E (CENP-E) [NM_001813 = Z15005] (8257 bp)	Motorprotein, beteiligt an Chromosomenbewegung und Spindelverlängerung	5' inkomplett erweiterte 3'UTR A→G (<i>SNP</i>) G→A (<i>SNP</i>) G→C (<i>SNP</i>) G→T. neue Spleißvariante (-285 bp,+108 bps) alternatives Spleißsignal→zusätzliches Triplet (CAG)	inkompletter N-Terminus Glu→Lys Cys→Ser Arg→Ser neue Spleißvariante (-95 AS, +36 AS) 1 AS-Insertion
MU-OS-177-19 273-2 (346 bp)	1	highly similar to transmembrane 9 superfamily protein member 2 precursor (T9SPM2P) [AK129798] (1664 bp)	nicht bekannt	nur 3'UTR kloniert→alternativer ORF	alternatives Genprodukt
		" CSODIO87Y124 [CR605342] (2270 bp)	"	"	"

Tab. IV.1e. Homologierecherche in der *GenBank* zu den Osteosarkomantigengruppen MU-OS-177-18 und -19 (Anmerkungen wie zu Tab. IV.1a)

MU-OS-177-Antigen [cDNA]	Homolog aus der SEREX-Datenbank und/oder Literatur				
	Name [Länge in bp]	Gewebeursprung (nur SEREX Ag)	Beste Homologie (bp) Osteosarkom-Ag / Ag SEREX-Datenbank ¹	Positive/Gesamtzahl getesteter Seren bei Diagnose	Referenz
1 b) 92-1 ³ [3596 bp]	NY-CO-25 [3309 bp]	Kolorektales Ca.	268-3573/4-3309 ²	3/16 Kolon-Ca. ⁶ 2/16 Normalseren ²	Scanlan et al., 1998
	KM-PA-18 [3612 bp]	Pankreas-Ca.	1-3572/41-3612	1/1 Pankreas-Ca.	Nakatsura et al., 2001
	HOM-Ts-PMR3-6R [2800 bp]	Testis	414-1033/37-656	1/1 Rheuma. Arthritis, 1/19 Arteriitis 1/12 Normalseren	- ⁴
	HOM-TsMe5-121R [3000]	Testis	465-981/16-532	1/1 Melanom	-
	Mel2 [655 bp]	Melanom	465-981/16-532	1/1 Melanom	-
	HOM-Ts-PMR3-4R [3300 bp]	Testis	15-435/15-434	1/1 Rheuma. Arthritis 3/19 Arteriitis 4/12 Normalseren	-
	HOM-Ts-PMR3-2R [3400]	Testis	1-367/96-461	1/1 Rheuma. Arthritis 5/19 Arteriitis 5/12 Normalseren	-
2	Keines ⁵				
3	Keines				
4	Keines				
5 [1309 bp]	NGO-St-122 [1488 bp]	Magen-Ca.	1-1309/180-1488	1/1 Magen-Ca. 5/13 Magen-Ca. 3/16 Normalseren	-
	NY-REN-20 [1488 bp]	Nierenzell-Ca.	1-1309/180-1488	1/1 Nierenzell-Ca.	-
	NY-SAR-11 [834 bp]	Sarkom	1-580/180-756	1/1 mal. Histiozytom	-
	NY-BR-74 [1431 bp]	Mamma-Ca.	1-1035/146-1180 1052-1126/1197-1271 1183-1309/1304-1430	1/1 Mamma-Ca.	-
	HOM-HD2-223 [1219 bp]	Hodgkin-Lymphom	53-237/3-187 282-1040/193-950 1105-1291/1015-1201	1/1 Hodgkin-Lymph.	-
6	Keines				
7	Keines				
8 a) 174-1 [661 bp]	Hom-Gliom-GT 3 [675 bp]	Gliom	7-638/26-657	1/20 Gliom 3/20 Melanom	-
	NW-F 102a [523 bp]	Kolorektales Ca.	7-522/8-523	1/1 Kolorektales Ca.	-
	NM23-H2	Astrozytom ^o II	kein Eintrag ¹	1/1 Astrozytom ^o II 1/20 Gliom 2/20 Normalseren	Schmits et al., 2002 ⁵

Tab. IV.2a. Homologierecherche in SEREX-Datenbank und Literatur zu MU-OS-177-1 bis -8.

¹Homologer Bereich des Osteosarkom-Antigens (Ag) und des Antigens der SEREX-Datenbank; ²Farbig markiert sind Kontrollseren von gesunden Probanden (rot) und Patienten mit nicht-malignen Erkrankungen (blau). ³Für die Datenbankrecherche wurde jeweils das längste Insert herangezogen; ⁴Bislang keine Publikationen. ⁵Kein Eintrag in der SEREX-Datenbank. ⁶Ca: Karzinom.

MU-OS-177-Antigen [cDNA]	Homolog aus der SEREX-Datenbank und/oder Literatur				
	Name [Länge in bp]	Gewebeursprung (nur SEREX Ag)	Beste Homologie (bp) Osteosarkom-Ag/Ag SEREX-Datenbank ¹	Positive/Gesamtzahl getesteter Seren bei Diagnose	Referenz
9	Keines ⁵				
10 [3865 bp]	MO-BC-1148 [322 bp] MO-BC-1144 [304 bp] GOLGA1 [4805 bp]	Mamma-Ca. Mamma-Ca. HeLa-Zellen	788-1102/9-322 38-182/148-292 kein Eintrag	1/1 Mamma-Ca. 1/1 Mamma-Ca. 8/12 Sjögren-Syndrom 12/60 Seren mit Anti-Golgi-Ak	- ⁴ - Griffith et al., 1997
11	EEA1	kein Eintrag	kein Eintrag	1/1 SCLE ⁶ 5/38 Rheumat. Beschw.	Mu et al., 1995 ⁵ ; Waite et al., 1998 ⁵
12 c) 96 ³ [3653 bp]	NY-ESO-12 [598 bp] MO-BC-440 [381 bp] MO-BC-423 [310 bp] HOM-HCC-25.8 [910 bp] MO-CO-80 [560 bp] MO-TES-217 [463 bp] UACA [7096 bp]	Ösophagus-Ca. Mamma-Ca. Mamma-Ca. Leberzell-Ca. Kolorektales Ca. Testis kein Eintrag kein Eintrag	1204-1786/2-584 268-647/1-381 1522-1831/1-310 603-856/190-444 1996-2069/1-74, 2107-2324/112-331 1848-2053/19-225 kein Eintrag kein Eintrag	1/1 Ösophagus-Ca. 1/1 Mamma-Ca. 14/14 Normalseren 1/1 Mamma-Ca. 1/1 Leberzell-Ca. 1/1 Kolorektales-Ca. 1/1 Kolonrektales Ca. 10/23 Normalseren 9/46 VKH ⁷ 9/32 BD 4/19 S 0/36 Normalseren. 24/159 GD, 1/26 HT, 1/11 ST, 0/43 Normalseren	- - - - - - - Yamada et al., 2001 ⁵ Okhura et al. 2004
13.1 [1474 bp]	NY-REN-35 [4065 bp] NW-TK 156 [771 bp] NY-SAR-66 NGO-Br-4 [509 bp] Clone 15	Nierenzell-Ca. Testis Sarkom Mamma-Ca. Leberzell-Ca.	23-1474/1151-2602 140-912/1-771 23-495/394-866 1101-1474/1-374 kein Eintrag	1/1 Nierenzell-Ca. 6/24 Nierenzell-Ca. 1/15 Normalseren 1/1 Mamma-Ca. 1/1 Fibrosarkom 1/1 Mamma-Ca. 16/31 Mamma-Ca. 13/30 Normalseren 1/1 Leberzell-Ca. 2/20 Leberzell-Ca. 3/20 Normalseren	- - - - - Uemura et al., 2003 ⁵

Tab. IV.2b. Homologierecherche in SEREX-Datenbank und Literatur zu MU-OS-177-9 bis -13.1.

¹Homologer Bereich des Osteosarkom-Antigens (Ag) und des Antigens der SEREX-Datenbank; ²Farbig markiert sind Kontrollseren von gesunden Probanden (rot) und Patienten mit nicht-malignen Erkrankungen (blau). ³Für die Datenbankrecherche wurde jeweils das längste Insert herangezogen; ⁴Bislang keine Publikationen. ⁵Kein Eintrag in der SEREX-Datenbank. ⁶SCLE: Subakuter, kutaner Lupus erythematodes, ⁷VKH: Morbus Vogt-Koyanagi-Harada, ⁸BD: Morbus Behçet, ⁹S: Sarkoidose, GD: M.Basedow, HT: Hashimoto-Thyreoiditis, ST: subakute Thyreoiditis, Ca: Karzinom.

MU-OS-177-Antigen [cDNA]	Homolog aus der SEREX-Datenbank und/oder Literatur				
	Name [Länge in bp]	Gewebeursprung (nur SEREX Ag)	Beste Homologie (bp) Osteosarkom-Ag/Ag SEREX-Datenbank ¹	Positive/Gesamtzahl getesteter Seren bei Diagnose	Referenz
13.2 [4469 bp]	NW-TWe 37 [679 bp]	Testis	405-1083/1-679	1/1 Kolorektales Ca.	-
	HOM-HCC-25.2 [959 bp]	Leberzell-Ca.	4208-4239/192-261	1/1 Leberzell-Ca.	-
	HOM-HCC-25.7 (3') [959 bp]	Leberzell-Ca.	4208-4239/292-261	1/1 Leberzell-Ca.	-
14 [3104 bp]	NGO-Br-1 [4416 bp]	Mamma-Ca.	1-2566/1075-3640, 2650-3104/3640-4094.	1/1 Mammakarzinom 22/44 Magen-Ca. 30/100 Normalseren 1/1 Magen-Ca.	- ⁴
	NGO-St-47 [4449 bp]	Magen-Ca.	1-2566/1075-3640, 2650-3104/3640-4094.	22/44 Magen-Ca. 30/100 Normalseren	-
	HOM-HD2-232 (3') [1080 bp]	Hodgkin-Lymphom	689-1356/15-681,	1/1 Hodgkin-Lymph.	-
	HOM-HD2-228 (3') [648 bp]	Hodgkin-Lymphom	691-1208/18-538.	1/1 Hodgkin-Lymph.	-
	MO-OVA-42 [318 bp]	Ovarial-Ca.	1570-1887/1-318.	1/1 Ovarial-Ca.	-
	MO-OVA-206 [500 bp]	Ovarial-Ca.	1275-1562/3-289.	1/1 Ovarial-Ca.	-
	HOM-TSOv3-41 (5') [730 bp]	Testis	1-431/241-670.	1/1 Mamma-Ca.	-
	HOM-HCC-27.12.2 (5') [758 bp]	Leberzell-Ca.	989-1093/18-122	1/1 Leberzell-Ca.;	Stenner-Liewen et al., 2000
	HOM-HD2-177 (5') [709 bp]	Hodgkin-Lymphom	683-1251/22-590, 1280-1367/618-704.	1/1 Hodgkin-Lymph.	-
	HOM-HD2-191(3') [956 bp]	Hodgkin-Lymphom	684-1243/1-560, 1274-1331/589-646, 1383-1434/696-747.	1/1 Hodgkin-Lymph	-
	HOM-HD2-2 (3') [644 bp]	Hodgkin-Lymphom	684-1208/1-524, 1223-1251/538-566.	1/1 Hodgkin-Lymph.	-
	HOMTSSemA-64 (5') [550 bp]	Testis	1-40/544-583	1/1 Seminom	-
	Kinectin	fetale Niere	kein Eintrag	7/18 Aplast. Anämie 0/20 T+SCD, 0/35 Normalseren	Hirano et al., 2003 ⁵
Kinectin	Leberzell-Ca.	kein Eintrag	1/1 Leberzell-Ca.	Wang et al., 2004 ⁵	
Kinectin	Blasen-Ca-Zelllinie T24	kein Eintrag	9/39 BD 0/20 Normalseren	Lu et al., 2005	
15 [495 bp]	NY-SAR-44 [921 bp]	Fibrosarkom	1-491/73-563	1/1 Fibrosarkom	-
16 a) 192 ³ [3700 bp]	se20-9 [5629bp]	Testis	1-2507/312-2818, 2508-3700/2912-4104 3045-3700/15-665	1/1 CTCL 2/8 Haut-Lymphom 0/5 Normalseren	Eichmüller et al., 2001
	TE2-29 [676 bp]	Testis	1094-1485/1-393	1/1 Ösophaguskarz.	-
	4-15.1-3 T3 [393 bp]	Zungen-Ca.	558-770/9-221	1/1 nicht klass.Tumor	-
MO-BC-1128 [221 bp]	Mamma-Ca.		1/1 Mamma-Ca.	-	

Tab. IV.2c. Homologierecherche in SEREX-Datenbank und Literatur zu MU-OS-177-13.2 bis -16.

¹Homologer Bereich des Osteosarkom-Antigene (Ag) und des Antigens der SEREX-Datenbank; ²Farbig markiert sind Kontrollseren von gesunden Probanden (rot) und Patienten mit nicht-malignen Erkrankungen (blau). ³Für die Datenbankrecherche wurde jeweils das längste Insert herangezogen; ⁴Bislang keine Publikationen. T: Thalassämie, SCD: Sichelzellanämie, BD: M.Behcet. Ca: Karzinom.

MU-OS-177-Antigen [cDNA]	Homolog aus der SEREX-Datenbank und/oder Literatur				
	Name [Länge in bp]	Gewebeursprung (nur SEREX Ag)	Beste Homologie (bp) Osteosarkom-Ag/Ag SEREX-Datenbank ¹	Positive/Gesamtzahl getesteter Seren bei Diagnose	Referenz
17	Keines				
18	CENP-E	kein Eintrag	kein Eintrag	15/60 Sjögren-Syindr.	Rattner et al., 1996
19	Keines				

Tab. IV.2d. Homologierecherche in SEREX-Datenbank und Literatur zu MU-OS-177-17 bis -19. Farbig markiert sind Kontrollseren von Patienten mit nicht-malignen Erkrankungen (blau).

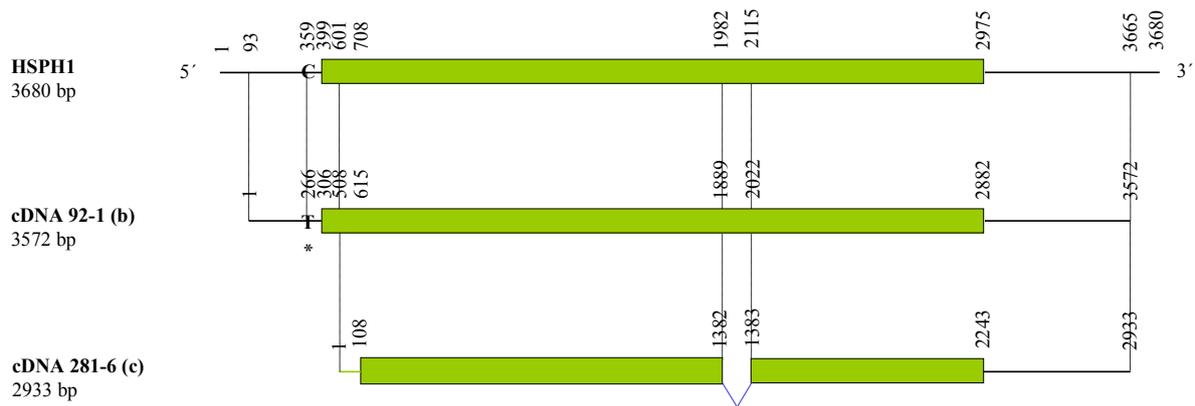


Abb. IV.1. Schematischer Vergleich der cDNA-Sequenzen von MU-OS-177-1 (b: cDNA 92-1, c: cDNA 281-6) und HSPH-1 (NM_006644).

cDNA 82-1 (a) war lediglich kürzer als cDNA 92-1 (b) und ist deshalb hier nicht dargestellt. In der NCBI-Datenbank existieren mehrere Spleißvarianten (BC037553, BC018124, BX618125, AB003333), die hier ebenfalls nicht abgebildet sind. Der größte gemeinsame ORF von 2577 bp Länge ist als grüne Box dargestellt. Die MU-OS-177-1-cDNA-Sequenzen sind am 5'- und 3'-Ende höchstwahrscheinlich inkomplett. cDNA 281-6 (c) ist eine in der Literatur bereits in Tumorzellen beschriebene Spleißvariante (HPS105 β , AB003333): im Vergleich zu den anderen cDNAs fehlt zwischen Position 1382/83 (NM_006644 bp 1983-2114) ein 132 bp langes Exon (blau) (Ishihara et al., 1999). In der gemeinsamen 5'UTR von cDNA 92-1 und HSPH1 findet sich ein Basenaustausch von C→T* (NM_006644 bp 359), der bereits als Polymorphismus beschrieben wurde (*Ensembl gene report SNPs*). Der grüne ORF von cDNA 92-1 und 281-6 lag nicht *in frame* mit dem Vektor-ATG und wurde daher wahrscheinlich in *E. coli* vom nächsten stromabwärts *in frame* gelegenen ATG abgelesen (bp 306 bzw. bp 108). Die cDNA 281-6 (c) enthielt stromaufwärts des Translationsstartsignals (bp 108) (grüne Linie), kein *in frame* gelegenes Stoppsignal so dass der ORF *in vivo* möglicherweise 5' noch länger ist.

Die Antigene der Gruppe MU-OS-177-2 sind wahrscheinlich mit PRKWINK1 identisch; die klonierte cDNA enthält allerdings eine erweiterte 3'UTR

Das Antigen MU-OS-177-2 wurde von den überlappenden, 5' inkompletten Inserts der Plasmide p177-21-1 und p177-168-1 kodiert.

Die cDNA zeigte Homologie zu aus Herzmuskelgewebe (AJ296290 = NM_018979), Hirngewebe (AB002342) und einem Chorionkarzinom (BC013629) klonierten cDNAs, die für eine bestimmte Serin/Threonin-Proteinkinase kodierten („protein kinase with no k-1“, PRKWINK1) (**Tab. IV.1a**). Das PRKWINK1-Gen wurde auf Chromosom 12p13.3 lokalisiert (NCBI). Mit SEREX waren bislang keine homologen cDNAs kloniert worden (**Tab. IV.2a**).

Die 3'UTR der cDNA 21-1 war gegenüber den bekannten, homologen cDNAs aus der *GenBank* stromabwärts erweitert (**Abb. IV.2**).

WNK-Kinasen wurden erstmals von Verissimo und Jordan beschrieben (Verissimo und Jordan, 2001). Die PRKWINK1 wurde als Regulator des MAP-Kinase-Signalwegs beschrieben (Xu et al., 2004; Sun et al., 2006) und stellt ein Substrat des

Protoonkogenprodukts AKT dar (identisch mit der Proteinkinase B, PKB) (Vitari et al., 2004; Jiang et al., 2005), welches in der Regulation der Apoptose eine zentrale Stellung einnimmt (Bader und Vogt, 2004). Besondere Aufmerksamkeit hat die Tatsache geweckt, dass WNK-Kinasen (vor allem auch WNK1) eine wichtige Rolle in der Elektrolyt-Homöostase spielen (Kahle et al., 2004). Mutationen im *WNK1*-Gen prädisponieren für Bluthochdruck (hereditärer Pseudohypoaldosteronismus Typ II) (Wilson et al., 2001).

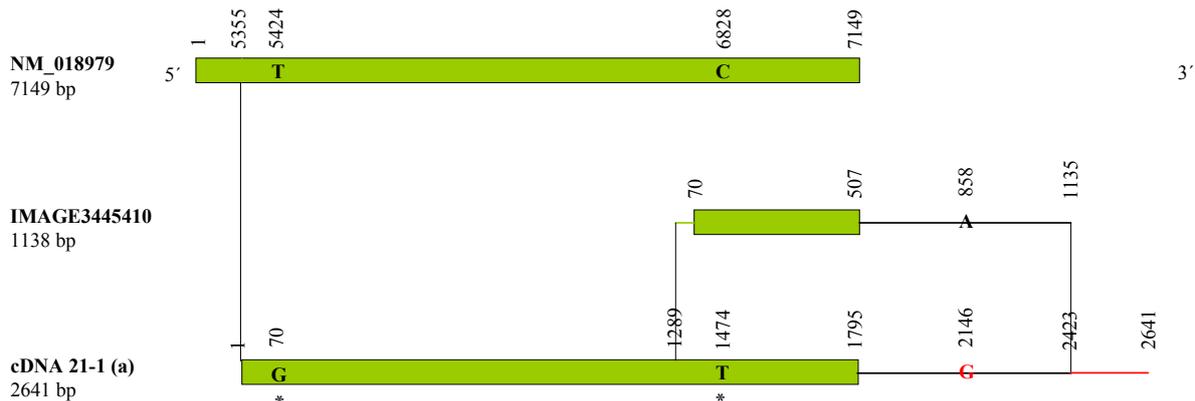


Abb. IV.2. Schematischer Vergleich der cDNA-Sequenzen von MU-OS-177-2 (a: cDNA 21-1), PRKWNK1 (NM_018979) und IMAGE3445410 (BC013629).

Gegenüber cDNA 21-1 (a) war die cDNA 168-1 (b) an ihrem 5'-Ende um 79 bp länger und an ihrem 3'-Ende um 230 bp kürzer (nicht gezeigt). Der längste gemeinsame ORF ist als grüne Box dargestellt. Die neue, erweiterte 3'UTR der cDNA 21-1 ist rot dargestellt. Die Translation des ORF von cDNA 21-1 wurde vermutlich am *in frame* gelegenen ATG des Vektors gestartet. Gegenüber der Referenz-cDNA fand sich ein Austausch von T→G* (NM_018979 bp 5424), der zu einem Aminosäureaustausch von Isoleucin zu Methionin führte. Ein Austausch von C→T* (NM_018979 bp 6828) war konservativ. Beide Basenaustausche sind bereits als Polymorphismen bekannt (*Ensembl gene report SNPs*). Gegenüber der IMAGE3445410-cDNA (BC013629) fand sich ein Basenaustausch von A→G in der gemeinsamen 3'UTR. Die cDNA IMAGE3445410 enthielt stromaufwärts des Translationsstartsignals (bp 70) (grüne Linie), kein *in frame* gelegenes Stoppsignal so dass der ORF *in vivo* möglicherweise 5' noch länger ist.

Das Antigen MU-OS-177-3 ist im klonierten Abschnitt mit HOMER3 identisch

Das Antigen MU-OS-177-3 wurde vom Plasmid p177-88-1 kodiert.

Die 5' inkomplette Sequenz war im klonierten Abschnitt identisch mit cDNAs, die aus Zerebellum (AK124450) und einem Leiomyosarkom (BC012113 = NM_004838) kloniert worden waren. Das kodierende Gen war *Homer, neuronal immediate early gene, 3* (HOMER3) genannt und auf Chromosom 19 lokalisiert worden (Tu et al., 1998; Xiao et al., 1998)(**Tab. IV.1a**).

Mit SEREX waren bislang keine homologen cDNAs kloniert worden (**Tab. IV.2a**).

Gegenüber der aus Normalgewebe klonierten 3'UTR (AK124450) fand sich in den cDNAs aus OS (88-1) und Leiomyosarkom (NM_004838) ein Basenaustausch (**Abb. IV.3**).

HOMER3 ist ein dendritisches Protein, das die Verbindung von G-Protein-gekoppelten Glutamat-Rezeptoren (mGluR) an der postsynaptischen Membran mit ER-assoziierten intrazellulären IP3-Rezeptoren vermittelt und so eine Rolle bei der intrazellulären Kalzium-Signalübertragung spielt (Tu et al., 1998). In T-Zellen moduliert HOMER3 die Signaltransduktion an der immunologischen Synapse (Ishiguro und Xavier, 2004).

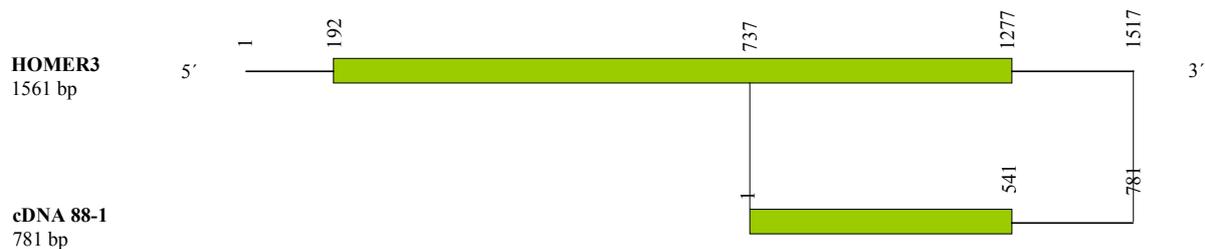


Abb. IV.3. Schematischer Vergleich der cDNA-Sequenzen von MU-OS-177-3 (cDNA 88-1) und HOMER3 (NM_004838).

Der längste gemeinsame ORF wurde als grüne Box dargestellt. Ein fehlendes Poly-A-Signal an zu erwartender Stelle lässt darauf schließen, dass die cDNA 88-1 am 3'-Ende unvollständig war. Sie begann an Position 737 der HOMER3-cDNA (NM_004838) und war damit höchstwahrscheinlich auch 5' unvollständig. Die Translation des ORF von cDNA 88-1 wurde vermutlich am *in frame* gelegenen ATG des Vektors gestartet. Im Vergleich zu der aus Normalgewebe klonierten cDNA AK124450 (nicht gezeigt) fand sich in cDNA 88-1 (ebenso wie in cDNA NM_004838) ein einzelner Basenaustausch von G→A (AK124450 bp 1889, NM_004838 bp 1427) in der gemeinsamen 3'UTR.

Das Antigen MU-OS-177-4 ist ein neues Protein mit unbekannter Funktion

Das Antigen MU-OS-177-4 wurde von den überlappenden Inserts der Plasmide p177-38, p177-53 und p177-177 kodiert. In **Abb. IV.4a** ist eine exemplarische Restriktionsanalyse des großen Plasmids p177-177 gezeigt.

In der NCBI-Datenbank fanden sich je eine aus Lungengewebe (AF458591 = NM_145036.1; *hypothetical protein MGC33887*), Trachea (AK098070), Hodengewebe (BC029524), einem Neuroblastom (AK096929) und einem Leiomyosarkom (BC037991) klonierte homologe cDNAs, die von einem Gen auf Chromosom 17q24 kodiert wurden (NCBI) (**Tab. IV.1a**, **Abb. IV.4b**).

Mit SEREX war bislang keine homologe cDNA kloniert worden (**Tab. IV.2a**).

Alle fünf homologen cDNAs enthielten nur Teile des in der cDNA 177 durchlaufenden 2929 bp-langen ORF. Das von cDNA 177 kodierte, 955 Aminosäuren (AS) lange Protein war

bislang in Literatur und Datenbanken noch nicht beschrieben worden¹. Innerhalb des ORF fanden sich mehrere Polymorphismen, darunter zwei, die in den aufgelisteten Normalgewebe-cDNAs vorbeschrieben aber noch nicht in der *SNP*-Datenbank aufgeführt waren (*Ensembl gene report SNPs*) (**Abb. IV.4b**).

Orthologe Genprodukte fanden sich in Ratte (93%), Zebrafisch (71%) und *Drosophila* (49%, inklusive konservativer AS-Austausche) (eigene Homologierecherche, NCBI blastp).

Die Suche nach Protein-Domänen (NCBI *Conserved Domain Search*) ergab eine Homologie zu Smc-Domänen (*structural maintenance of chromosomes*) mit fraglicher Signifikanz (Score: 49,3 bits; Expect= 2e-06). Diese Domäne zeigte nämlich zu Smc-Domänen in *E.coli* höhere Homologie als zu humanen Smc-Domänen. Smc-Proteine sind in der Evolution hoch konservierte chromosomale ATPasen, die vielfältige Funktionen in der Chromosomen-Dynamik innehaben. Sie spielen eine Rolle in der Chromosomen-Kondensation, Kohäsion von Schwester-Chromatiden und DNA-Reparatur durch homologe Rekombination in somatischen und meiotischen Zellen (Hopfner, 2003; de Jager et al., 2004; Lehmann, 2005).

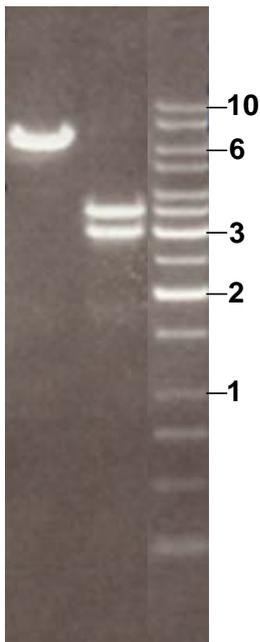


Abb. IV.4a. Beispiel einer Restriktionsanalyse

Das 6,4 kb große Plasmid p177-177 wurde mit BamHI (linke Spur) linearisiert und mit EcoRI und XhoI (mittlere Spur) in ein 3,4 kb (Insert) und ein 2,9 kb großes Fragment (Vektor) gespalten, die Fragmente auf einem 1 %-igen Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht. Die rechte Spur enthält einen Größenstandard als Referenz (1-10 kb).

¹ Kurz vor Fertigstellung dieser Arbeit fiel bei der Aktualisierung der Literatur auf, dass dieses Protein (Abweichung einer Aminosäure) am 18.11.2006 in die NCBI-Datenbank aufgenommen worden ist, nachdem es in einem genomweiten Protein-Expressions-Screen mit Hilfe einer neu entwickelten Technik (*random activation of gene expression*, RAGE) identifiziert worden war Harrington, J.J., Sherf, B., Rundlett, S., Jackson, P.D., Perry, R., Cain, S., Leventhal, C., Thornton, M., Ramachandran, R., Whittington, J., Lerner, L., Costanzo, D., McElligott, K., Boozer, S., Mays, R., Smith, E., Veloso, N., Klika, A., Hess, J., Cothren, K., Lo, K., Offenbacher, J., Danzig, J. and Ducar, M.: Creation of genome-wide protein expression libraries using random activation of gene expression. *Nat Biotechnol* 19 (2001) 440-5.. Das Protein wurde *coiled-coil domain containing 46 isoform a* (CCDC46) genannt (NP_659473; cDNA NM_145036.2). Es wird als filamentöses Myosin-Protein mit ATPase-Funktion beschrieben.

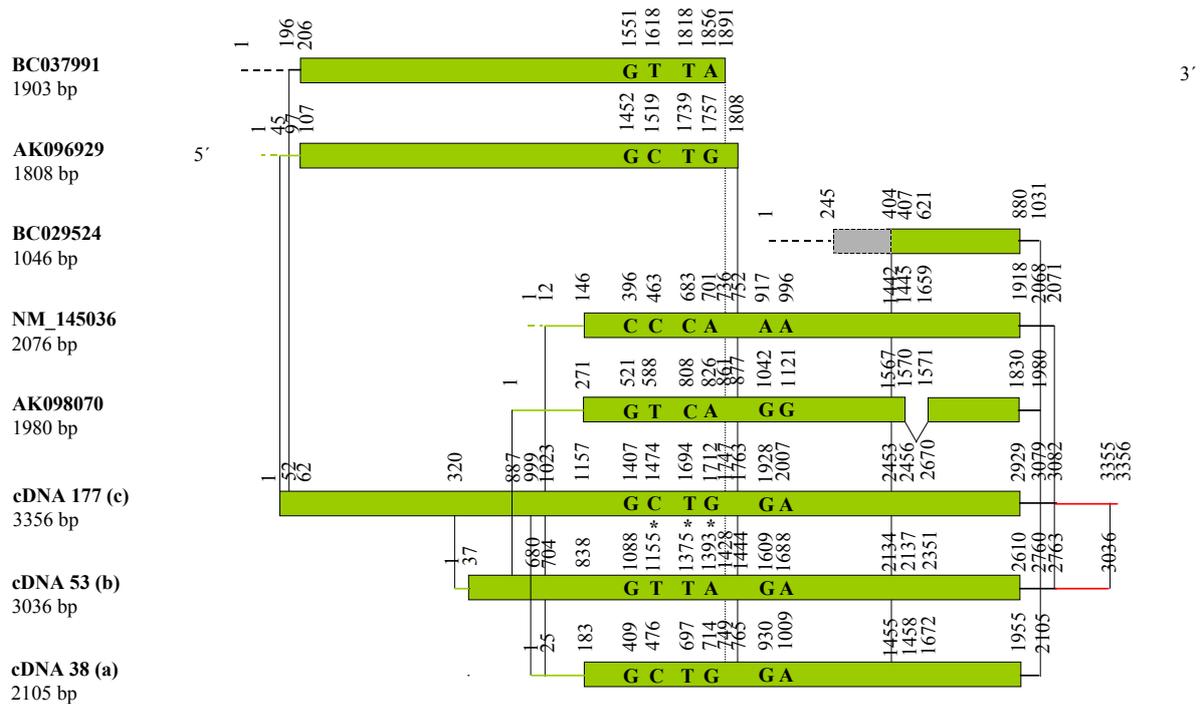


Abb. IV.4b. Schematischer Vergleich der cDNA-Sequenzen von MU-OS-177-4 (a: cDNA 38, b: cDNA 53, c: cDNA 177), FLJ39610 (AK096929), IMAGE5535087 (BC037991), IMAGE5297725 (BC029424), hypothetical protein MGC33887 (NM_145036) und FLJ40751 (AK098070).

Der längste gemeinsame ORF wurde als grüne Box dargestellt. Bekannte Polymorphismen sind mit einem Stern (*) gekennzeichnet (*Ensembl gene report SNPs*). Alle homologen cDNAs aus der NCBI-Datenbank sind im Vergleich zur 177-cDNA am 5'- und/oder 3'-Ende kürzer und enthalten nur Teile des in der 177-cDNA durchlaufenden 2929 bp langen ORF. Die Translation des ORF von cDNA 177 wurde vermutlich im stromaufwärts *in frame* gelegenen ATG des Vektors gestartet. AK098070 ist eine Spleißvariante, der zwischen Position 1570 und 1571 (cDNA 177, bp 2457-2671) im Vergleich zu allen anderen homologen cDNAs ein Exon von 213 bp Länge fehlt. AK096929, BC037991, BC029524 und NM_145036 sind 5'-Spleißvarianten (gestrichelte Linien, graue Box). An mehreren Positionen fanden sich Austausch einzelner Basenpaare (Vergleich cDNA 177 mit NM_145036). Davon war ein Austausch konservativ (C→T*) (NM_145036, bp 683), die übrigen Austausch waren proteinwirksam: Der Basenaustausch C→G (NM_145036 bp 396) resultierte in einem Aminosäureaustausch von Serin zu Cystein, der Austausch von A→G (NM_145036 bp 917) führte zum Austausch der Aminosäure Lysin zu Glutamin. Die beiden letzteren Basenaustausche sind in den aufgelisteten Normalgewebe-cDNAs vorbeschrieben, aber noch nicht in der *SNP*-Datenbank erfasst (*Ensembl gene report SNPs*). Die 3'UTR der cDNAs 53 und 177 waren im Vergleich zu den homologen cDNAs erweitert (rot hervorgehoben). In den cDNAs AK096929, NM_145036 und AK098070 fand sich stromaufwärts des Translationsstartsignals kein *in frame* gelegenes Stoppsignal (grüne Linie), so dass der ORF 5' möglicherweise *in vivo* noch länger ist. Der grüne ORF von cDNA 53 und 38 lag nicht *in frame* mit dem Vektor-ATG und wurde daher wahrscheinlich in *E. coli* vom nächsten, stromabwärts *in frame* gelegenen ATG abgelesen.

Das Antigen MU-OS-177-5 ist wahrscheinlich mit U2AF1-RS2 identisch

Das Antigen MU-OS-177-5 wurde vom Plasmid p177-47 kodiert.

In der NCBI-Datenbank fand sich je eine aus normalem Hirngewebe (D49677 = NM_005089) und einem Leiomyosarkom (BC050451) klonierte homologe cDNA, die das *U2AF small subunit related protein 2* (U2AF1-RS2) (auch als *U2(RNU2) small nuclear RNA auxiliary factor 1-like 2*, U2AF1L2 bezeichnet) kodieren (**Tab. IV.1b**). Das für U2AF1-RS2

kodierende Gen wurde erstmals von Kitagawa und Kollegen isoliert und auf Chromosom Xp22.1 lokalisiert (Kitagawa et al., 1995).

Mit SEREX wurden inzwischen auch aus verschiedenen, anderen Malignomen homologe cDNAs kloniert (**Tab. IV.2a**).

Die cDNA 47 war an ihrem 5'-Ende kürzer als die U2AF1-RS2-cDNA. Innerhalb des 1293 bp langen gemeinsamen ORF fand sich ein einzelner, konservativer Basenaustausch (**Abb. IV.5**).

Bei U2AF1-RS2 handelte es sich um einen wichtigen Spleißfaktor, der mit dem aus einer großen und einer kleinen Untereinheit bestehenden U2AF-Heterodimer assoziiert ist. Das U2AF-Heterodimer ist zur Erkennung von funktionellen 3'-Spleißerkennungsstellen beim Spleißen von Prä-mRNA erforderlich (Tronchere et al., 1997; Mollet et al., 2006; Soares et al., 2006).

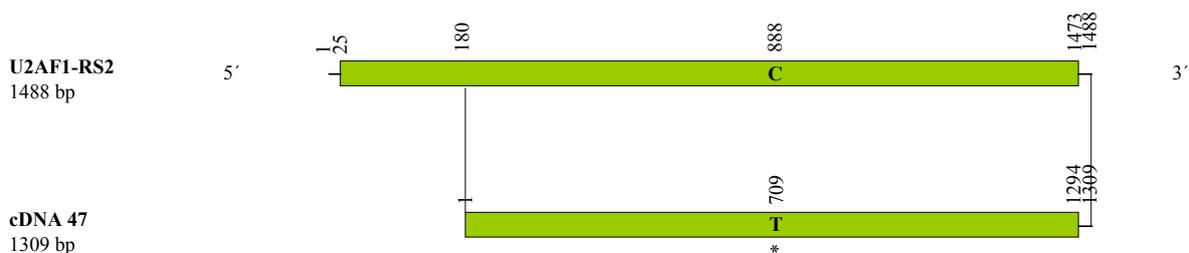


Abb. IV.5. Schematischer Vergleich der cDNA-Sequenzen von MU-OS-177-5 (cDNA 47) und U2AF1-RS2 (NM_005089).

Der längste gemeinsame ORF wurde als grüne Box dargestellt. Die Translation des ORF von cDNA 47 wurde vermutlich im stromaufwärts *in frame* gelegenen ATG des Vektors gestartet. Es fand sich ein konservativer Basenaustausch von C→T* (NM_005089 bp 888), der bereits als Polymorphismus bekannt war (*Ensembl gene report SNPs*). Die cDNA 47 war an ihrem 5'-Ende kürzer als die cDNA von U2AF1-RS2.

Das Antigen MU-OS-177-6 ist ein alternatives Translationsprodukt der PCIA1-mRNA

Das Antigen MU-OS-177-6 wurde vom Plasmid p177-63-1 kodiert.

Zwei homologe cDNAs aus Plazentagewebe (NM_024050) und B-Zellen (CR620603) kodieren mit einem stromaufwärts der Homologie gelegenen ORF für das *cross immune reaction antigen* (PCIA1) (AY563006), dessen Gen auf Chromosom 19 lokalisiert wurde (NCBI-Datenbank). Ein weiteres cDNA-Homolog aus einer Melanomzelllinie (AL832922) kodiert mit einem stromabwärts der Homologie gelegenen ORF für ein unbekanntes 161 AS langes Protein (AL832922) (NCBI-Datenbank). Originalpublikationen liegen zu keiner der drei homologen Sequenzen vor. (**Tab. IV.1b**)

Mit SEREX ist bislang kein cDNA-Homolog kloniert worden (**Tab. IV.2a**).

Gegenüber einigen homologen cDNAs fand sich in cDNA 177-63-1 ein Basenaustausch, der bereits als Polymorphismus bekannt ist. Der einzige ORF der mit SEREX identifizierten cDNA ist in den homologen cDNAs als kleiner alternativer ORF repräsentiert (**Abb. IV.6**). Das 30 AS umfassende Genprodukt dieses ORF ist bisher noch nicht beschrieben worden (NCBI Blastp).

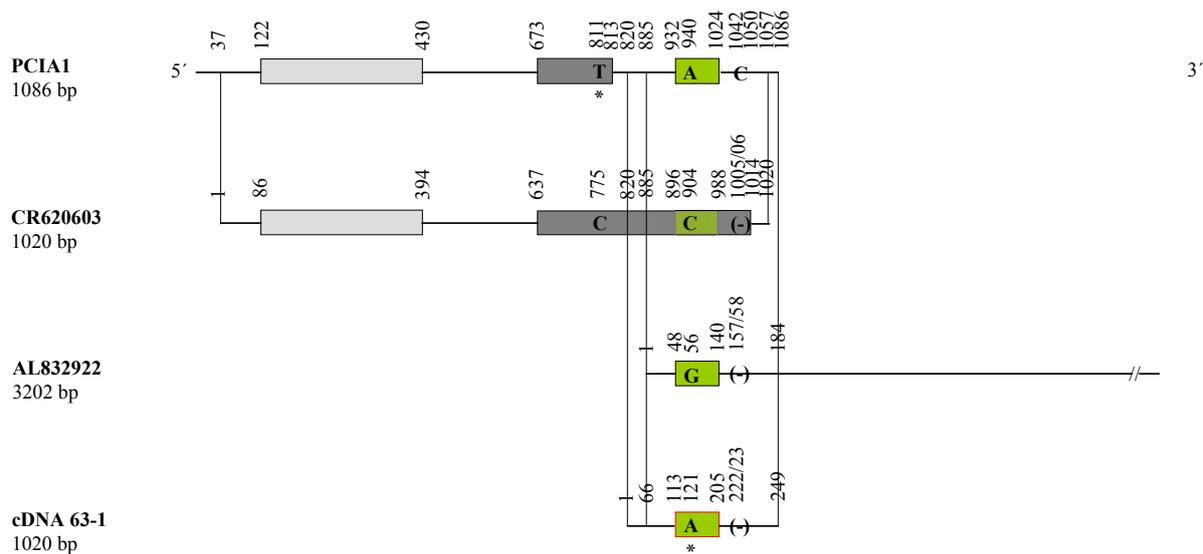


Abb. IV.6. Schematischer Vergleich der cDNA-Sequenzen von PCIA1 (NM_024050, CR620603), DKFZp76P0215 (AL832922) und MU-OS-177-6 (cDNA 63-1).

Der längste, gemeinsame und in cDNA 63-1 einzige ORF wurde als grüne Box dargestellt. Die cDNA 63-1 ist an ihrem 5'-Ende und 3'-Ende wesentlich kürzer als die gefundenen homologen cDNAs (NM_024050, CR620603 bzw. AL832922) und überlappt lediglich mit deren 3' bzw 5'UTR. Die cDNA 63-1 enthält keine weiteren ORFs. Der grün markierte ORF liegt zwar *in frame* mit dem Vektor-ATG, ist jedoch von diesem durch ein *in frame* gelegenes Stoppsignal (TGA, bp 17-19) getrennt. Der mit der cDNA 63-1 gemeinsame Leserahmen (93 bp) stellt in den homologen cDNAs einen alternativen ORF dar. Die homologen cDNAs (NM_024050, CR620603 und AL832922) enthalten jeweils wesentlich größere, weiter stromaufwärts bzw. stromabwärts gelegene und mit der 273-2-cDNA nicht überlappende ORFs (NM_024050: 309 bp, CR620603: 378 bp Länge) (hellgraue und dunkelgraue Box) (AL832922, bp 2571-3056: 486 bp Länge). Das 30 AS umfassende hypothetische Genprodukt des alternativen, grün dargestellten ORF (rote Umrahmung) ist bisher nicht vorbeschrieben worden (NCBI Blastp). Es fanden sich zwei Austausche einzelner Basenpaare, die bereits als Polymorphismen beschrieben sind (NM_024050 bp 811 und 940) (*Ensembl gene report SNPs*). Der Austausch von C→T* (NM_024050 bp 811) führt in der PCIA1-cDNA zum vorzeitigen Stop des in cDNA CR620603 größten ORF (dunkelgraue Box), der für ein putatives Protein mit Homologie zu einer *fibronectin type III* Domäne vom Zebrafisch kodiert. In der 3'UTR der PCIA1-cDNA findet sich im Vergleich zu allen anderen homologen cDNAs eine 1bp-Insertion (NM_024050 bp 1042).

Das Antigen MU-OS-177-7 ist wahrscheinlich mit FNDC1 identisch

Das Antigen MU-OS-177-7 wurde vom Plasmid p177-168-3 kodiert.

In der NCBI-Datenbank fanden sich vier homologe cDNAs die aus einer Fibroblastenzelllinie („expression induced by melanoma cell line supernatant“) (AJ586132), Synoviozyten eines

Patienten mit rheumatoider Arthritis (AK127635), Lymphknoten- (AL832410) und Hirngewebe (AB058769) kloniert worden waren (**Tab. IV.1b**).²

Mit SEREX war bislang keine homologe cDNA identifiziert worden (**Tab. IV.2a**)

Drei der vorbeschriebenen, homologen cDNAs waren an ihrem 5'-Ende deutlich länger als die cDNA 168-3, deren Translation vermutlich im stromaufwärts *in frame* gelegenen Vektor-ATG gestartet worden war. Eine der homologen cDNAs (AB058769) enthielt ein zusätzliches Exon von 108 bp Länge (**Abb. IV.7**).

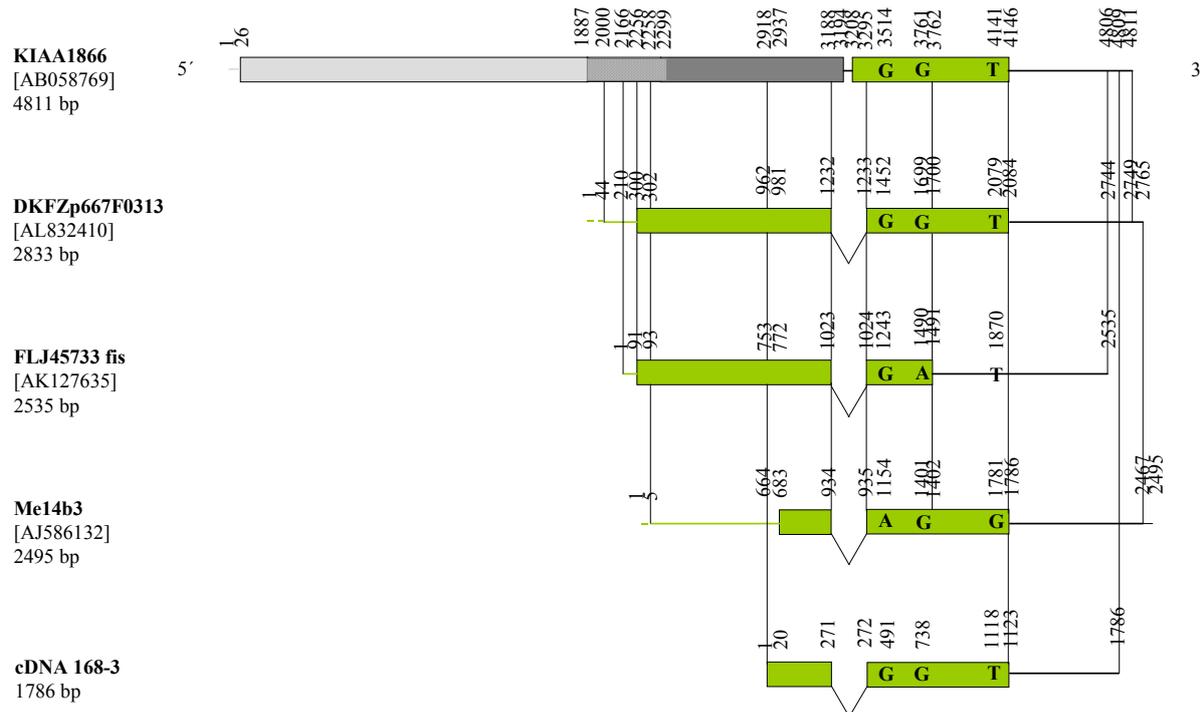


Abb. IV.7. Schematischer Vergleich der cDNA-Sequenzen von MU-OS-177-7 (cDNA 168-3), DKFZp667F0313 (AL832410), Me14b3 (AJ586132), FLJ45733fis (AK127635) und KIAA1866 (AB058769).

Der gemeinsame ORF wurde als grüne Box dargestellt. Die cDNA 168-3 ist jeweils am 5'- und/oder 3'-Ende kürzer als die homologen cDNAs. Die Translation des ORF von cDNA 168-3 wurde vermutlich im ATG des Vektors gestartet. Die cDNA KIAA1866 enthielt an Position 3189-3294 ein zusätzliches Exon von 108 bp Länge (cDNA 168-3 bp 271/72, DKFZp667F0313 bp 1232/33). Die *Fibronectin Typ 3*-Domäne (FN3) fand sich in cDNA 168-3 an den Positionen 256-529 der hier gezeigten Nukleotidsequenz. In der cDNA KIAA1866 waren drei ORFs enthalten, die für 758 (hellgraue Box, bp 26-2299), 436 (dunkelgraue Box, bp 1887-3194) und 313 (grüne Box, bp 3208-4146) Aminosäuren kodieren, wobei der letztere dem ORF von cDNA 168-3 entsprach. Es fanden sich gegenüber den homologen cDNAs zahlreiche, konservative Austausche einzelner Basenpaare. Außerdem fand sich in cDNA AK127635 ein Austausch von G→A (AK127635 bp 1490), der hier zum vorzeitigen Stop des ORF führte, sowie zwei proteinwirksame Basenaustausche in cDNA AJ586132: Ein Austausch von G→A (AJ586132 bp 1154) führte zum Austausch der Aminosäure Asparagin zu Asparaginsäure, ein Austausch von T→G (AJ586132 bp 1781) resultierte im Austausch der Aminosäure Glycin zu Tryptophan. Alle drei genannten Basenaustausche wurden bislang nicht in der Datenbank für Polymorphismen erfasst (*Ensembl gene report SNPs*). In den cDNAs AB058769, AL832410 und AK127635 fand sich stromaufwärts des Translationsstarts kein *in frame*-Stopsignal (hellgraue bzw. grüne Linien), so dass der ORF möglicherweise 5' noch länger war.

² Seit neuestem gibt es eine vom NCBI editierte Referenz-cDNA mit der Zugangsnummer NM_032532, die in der Abb. 4 keine Berücksichtigung mehr fand.

Die homologen cDNAs kodierten für ein hypothetisches Protein, das eine *Fibronectin Typ 3*-Domäne (FN3) enthält (NCBI Conserved Domain Search) und deshalb *fibronectin type III domain containing 1* (FNDC1) genannt wurde. Fibronectin Typ3-Domänen sind Protein-Protein-Interaktionsdomänen und finden sich in zahlreichen Rezeptoren, Integrinen und Adhäsionsmolekülen (de Pereda et al., 1999) (Swiss Prot Database, cd00063).

Das Antigen MU-OS-177-8 unterschied sich eventuell von NM23-H2 an einer Aminosäureposition

Das Antigen MU-OS-177-8 wurde von den überlappenden Inserts der Plasmide p177-174-1 und p177-290-4 kodiert.

In der NCBI-Datenbank fanden sich mehrere homologe cDNAs, die u. a. aus T-Zellen (CR620528), einem Retinoblastom (BC002476.2) und aus HeLa-Zellen (L16785) kloniert worden waren und für das *nonmetastatic protein 23, homolog 2* (NM23-H2) (auch *metastasis inhibition factor*, NM23B genannt) aus der *nm23*-Genfamilie kodierten. Das NM23-H2-Gen war von Stahl und Kollegen erstmals beschrieben (Stahl et al., 1991) und von Backer und Kollegen auf Chromosom 17q21.3 lokalisiert worden (Backer et al., 1993) (**Tab. IV.1b**).

Mit SEREX war die NM23-H2-cDNA bereits von Schmits und Kollegen aus Gliomgewebe kloniert worden (Schmits et al., 2002) (**Tab. IV.2a**).

Die cDNA 174-1 war an ihrem 5'-Ende kürzer als die NM23-H2-cDNA. Da der 174-1-ORF allerdings vermutlich im Vektor-ATG gestartet wurde, war das putative, homologe Protein N-terminal *in vitro* um 21 Aminosäuren länger als das bislang postulierte NM23-H2-Genprodukt (**Abb. IV.8**). Gegenüber einem eventuell aminoterminal erweiterten NM23-H2-Homolog wies das putative Antigen einen Aminosäureaustausch von Histidin zu Leucin auf. Ob diese molekulare Differenz auf einer tumorspezifischen Mutation oder einem Polymorphismus beruhte, blieb hier offen.

NM23-H2 ist ein DNA-bindendes, heterodimeres Protein, das als Nukleosiddiphosphat (NDP)-Kinase wirkt (NCBI OMIM) (Engel et al., 1995). NDP-Kinasen katalysieren den Phosphattransfer zwischen Nukleosidtriphosphaten und Nukleosiddiphosphaten und sind an der Regulation von normalen Entwicklungsprozessen, Proliferation und Zelldifferenzierung beteiligt (Willems et al., 1998; Pinon et al., 1999; Postel, 2003; Boissan und Lacombe, 2006; Braun et al., 2007).

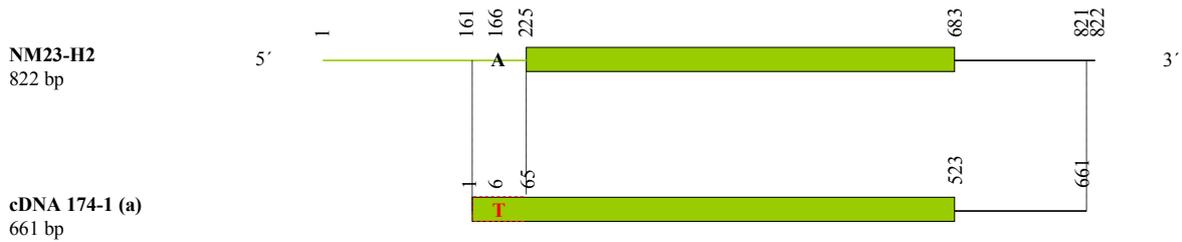


Abb. IV.8- Schematischer Vergleich der cDNA-Sequenzen von MU-OS-177-8 (a: cDNA 174-1) und NM23-H2 (NM_002512.2).

Der längste gemeinsame ORF wurde als grüne Box dargestellt. Die 174-1-cDNA ist an ihrem 5'-Ende kürzer als die NM23B-cDNA. Da der 174-1-ORF vermutlich im Vektor-ATG gestartet wurde, ist das entsprechende Protein N-terminal um 21 Aminosäuren länger als das bislang postulierte NM23-H2-Genprodukt. In der NM23-H2-cDNA findet sich stromaufwärts des ORF-Starts kein *in frame* gelegenes Stoppsignal, so dass der ORF 5' möglicherweise noch länger ist (grüne Linie). Es fand sich ein einzelner Basenaustausch von A→T (NM_002512.2 bp 166), der bisher nicht als Polymorphismus beschrieben worden war (NCBI *SNP* Blast). Hier käme es im Falle längerer Aminotermini zu einem Austausch von Histidin zu Leucin. Die cDNA 290-4 (b) war lediglich am 5'-Ende kürzer als die cDNA 174-1 (a) und wurde deshalb in der Abb. nicht berücksichtigt.

Das Antigen MU-OS-177-9 unterschied sich wahrscheinlich von RPN2 an einer Aminosäureposition

Das Antigen MU-OS-177-9 wurde vom Insert des Plasmids p177-290-3 kodiert.

In der NCBI-Datenbank fanden sich mehrere, einander sehr ähnliche, homologe cDNAs, die aus einem Rhabdomyosarkom (BC02380.2 und BC013028.2), einem Pankreaskarzinom (BC020222), einem Chorionkarzinom (BC003560), der Zelllinie HeLa (Y00282, NM_002951.2) und Plazentagewebe (CR626786 und weitere) kloniert worden waren. Die homologen cDNAs kodierten für *Ribophorin 2* (RPN2) (**Tab. IV.1b**), welches zusammen mit RPN1 als Protein der Rattenleber erstbeschrieben (Kreibich et al., 1978), später kloniert (Crimaudo et al., 1987), und schließlich einem Gen auf Chromosom 20q12-q13.1 zugeordnet worden war (Loffler et al., 1991).

Mit SEREX war bislang kein cDNA-Homolog kloniert worden (**Tab. IV.2b**).

Die cDNA 290-3 war an ihrem 5'- und 3'-Ende kürzer als die RPN2-cDNA. Es fanden sich Austausche einzelner Basenpaare, wovon einer auf Proteinebene zum Austausch der Aminosäure Glycin zu Asparaginsäure führte. Dieser Basenaustausch war bisher nicht beschrieben worden (**Abb. IV.9**). Ob er auf einer tumorspezifischen Mutation oder einem Polymorphismus beruhte, ist noch ungeklärt.

RPN2 ist ein in der Evolution hoch konserviertes Glykoprotein mit Lokalisation in der Membran des rauhen Endoplasmatischen Retikulums (Crimaudo et al., 1987) und Teilhabe am eukaryotischen Oligosaccharyltransferase-Komplex, der im Endoplasmatischen Retikulum

die N-Glykosylierung von Proteinen vermittelt (Shibatani et al., 2005; Kelleher und Gilmore, 2006).

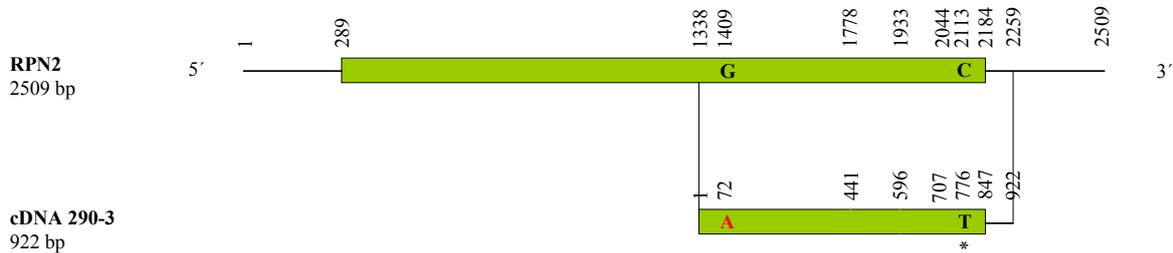


Abb. IV.9. Schematischer Vergleich der cDNA-Sequenzen von MU-OS-177-9 (cDNA 290-3) und RPN2 (NM_002951.2).

Der längste und gemeinsame ORF wurde als grüne Box dargestellt. Die cDNA 290-3 war an ihrem 5'- und 3'-Ende kürzer als die RPN2-cDNA. Ein fehlendes Poly-A-Signal an zu erwartender Stelle ließ darauf schließen, dass die cDNA 290-3 an ihrem 3'-Ende inkomplett war. Die cDNA 290-3 wurde vermutlich aus dem stromaufwärts *in frame* gelegenen ATG des Vektors abgelesen. Es fanden sich zwei Austausche einzelner Basenpaare. Ein neuer Austausch von G→A (NM_002951.2 bp 1409) bewirkte einen Austausch von Glycin zu Asparaginsäure. Ein Austausch von C→T* (NM_002951.2 bp 2113) war konservativ. Bei letzterem handelte es sich um einen bekannten Polymorphismus (*Ensembl gene report SNPs*).

Das Antigen MU-OS-177-10 ist wahrscheinlich mit GOLGA1 identisch

Das Antigen MU-OS-177-10 wurde vom Plasmid p177-63-2 kodiert.

In der NCBI-Datenbank fanden sich vier homologe cDNAs, die aus Hodengewebe (BC032853), der Zelllinie HeLa (U51587, [NM_002077.2]) und Hirngewebe (AB208858) kloniert worden waren und für das *golgi autoantigen, golgin subfamily a, 1* (GOLGA1) kodieren. GOLGA1 (auch als Golgin 97 bezeichnet) war durch Screening einer HeLa-cDNA-Expressionsbibliothek mit Seren von Patienten mit Sjögren-Syndrom identifiziert worden, (Griffith et al., 1997), wurde inzwischen mit SEREX auch aus anderen Tumorgeweben kloniert und ist auf Chromosom 9q33.3 lokalisiert (NCBI) (**Tab. IV.1b**, **Tab. IV.2b**).

Die cDNA 63-2 war 5' und 3' kürzer als die GOLGA1-cDNA (**Abb. IV.10**).

GOLGA1 bzw. die Golgine sind, wie der Name sagt, im Golgi-Apparat lokalisiert (NCBI, siehe NM_002077.2) und am vesikulären Transport beteiligt (Barr, 1999; Barr und Short, 2003). Kürzlich wurde gezeigt, dass das Drosophila-Homolog am Zentrosomenzyklus beteiligt ist und damit eine wichtige Rolle für die Zellteilung und Verteilung der Chromosomen auf die Tochterzellen spielt (Eisman et al., 2006).

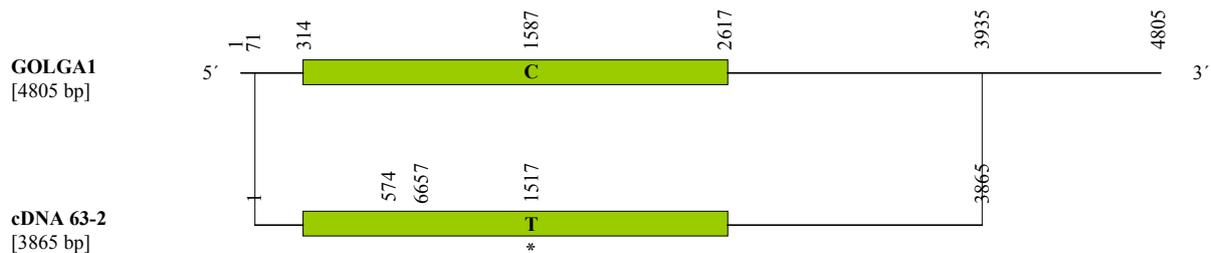


Abb. IV.10. Schematischer Vergleich der cDNA-Sequenzen von MU-OS-177-10 (cDNA 63-2) und GOLGA1 (NM_002077.2).

Der längste gemeinsame ORF wurde als grüne Box dargestellt. Die cDNA 63-2 war an ihrem 5'- und 3'-Ende kürzer als die GOLGA1-cDNA. Die hier nicht dargestellte cDNA BC032853 war an ihrem 5'-Ende alternativ gespleißt (bp 1-5). Die ebenfalls nicht dargestellte cDNA U51587, auf deren Struktur sich u. a. die GOLGA1-cDNA gründet, ist im Vergleich zu allen anderen beschriebenen cDNAs an ihrem 5'- und 3'-Ende etwas länger und 3' alternativ gespleißt (ab bp 4800). Es fand sich ein Basenaustausch von C→T* (NM_002077.2 bp 1587), der zu einem Aminosäureaustausch von Threonin zu Methionin führte und bereits als Polymorphismus beschrieben worden war (*Ensembl gene report SNPs*). Der grüne ORF von cDNA 63-2 lag nicht *in frame* mit dem Vektor-ATG und wurde daher wahrscheinlich in *E. coli* vom nächsten, stromabwärts *in frame* gelegenen ATG abgelesen. Dieses entsprach dem vorbeschriebenen Translationsstartsignal in der GOLGA1-cDNA.

Das Antigen MU-OS-177-11 ist wahrscheinlich mit EEA-1 identisch

Das Antigen MU-OS-177-11 wurde vom Plasmid p177-70 kodiert.

In der NCBI-Datenbank fanden sich drei homologe cDNAs (X78998, L40157, beide aus HeLa-Zellen kloniert; NM_003566) die für das *early endosome antigen 1* (EEA-1) kodierten (**Tab. IV.1c**). Eine weitere cDNA (BX648463), die aus fetalem Nierengewebe kloniert wurde, war 3' deutlich länger als cDNA 70. EEA-1 wurde erstmals von Mu und Kollegen kloniert (Mu et al., 1995) und später auf Chromosom 12q22 lokalisiert (NCBI).

Mit SEREX war bislang kein cDNA-Homolog des EEA1 identifiziert worden (**Tab. IV.2b**).

Die cDNA 70 war an ihrem 5'-Ende kürzer als die für EEA-1 kodierenden cDNAs. Es fanden sich neue Austausche einzelner Basenpaare, die jedoch nicht proteinwirksam waren (**Abb. IV.11**).

EEA-1 ist ein in der Evolution hoch konserviertes, peripheres Membranprotein, das beim vesikulären Transport von Proteinen durch frühe Endosomen zur Phagosomenreifung und endozytotischen Membranfusion erforderlich ist (Mu et al., 1995; Callaghan et al., 1999a; Callaghan et al., 1999b; Fratti et al., 2003). Der vesikuläre Transport spielt eine besonders wichtige Rolle bei der synaptischen Übertragung und beim axonalen Transport im Nervensystem (Selak et al., 2004) sowie bei allen exokrinen Prozessen (Alberts, 2002b).

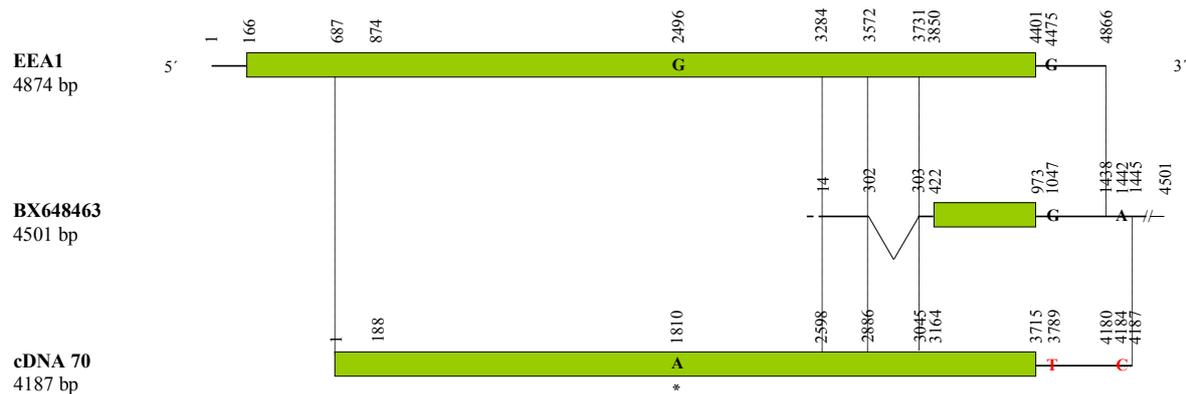


Abb. IV.11. Schematischer Vergleich der cDNA-Sequenzen von MU-OS-177-11 (cDNA 70), EEA-1 (NM_003566) und BX648463

Der längste gemeinsame ORF wurde als grüne Box dargestellt. Die Translation der cDNA 70 wurde vermutlich im stromaufwärts *in frame* gelegenen ATG des Vektors gestartet. Die cDNA 70 war am 5'-Ende kürzer als die EEA1-cDNA. Die cDNA BX648463 war eine Spleißvariante, ein 158 bp langes Exon fehlte; da sich stromaufwärts des grün eingezeichneten homologen ORF ein *in frame* gelegenes Stoppsignal fand (bp 281-283), wirkte sich die Deletion (bp 302/303) (cDNA 70 bp 2887-3044, NM_003566 bp 2573-3730) nicht auf das hypothetische Genprodukt aus. In der cDNA 70 fanden sich gegenüber den homologen cDNAs mehrere Austausche einzelner Basenpaare. Ein Austausch von G→A* (NM_003566 bp 2496) war konservativ, ein Austausch von G→T (NM_003566 bp 4475) und ein weiterer von A→C (BX648463 bp 1442) befanden sich im nicht kodierenden Bereich. Ersterer war bereits als Polymorphismus beschrieben (*Ensembl gene report SNPs*). Die cDNA BX648463 trug gegenüber der cDNA 70 eine um 3063 bp erweiterte 3'UTR. Ihr größter ORF lag im Bereich der homologen Sequenzen.

Eines der Antigene aus der Gruppe MU-OS-177-12 ist wahrscheinlich eine neue Spleißvariante des uveal Autoantigens UACA

Das Antigen MU-OS-177-12 wurde von den überlappenden Inserts der Plasmide p177-51, p177-71-1 und p177-96 kodiert.

Die cDNAs waren homolog zur cDNA *uveal autoantigen, with coiled-coil domains and ankyrin repeats (UACA), transcript variant 2* aus normalem Hirngewebe (AB046781.2, NM_001008224), welche von einem Gen auf Chromosom 15q22-q24 kodiert wird (NCBI) (**Tab. IV.1c**).

UACA-cDNA war erstmals durch Screening einer bovinen Uvea-cDNA-Bank mit Serum eines Patienten mit Morbus Vogt-Koyanagi-Harada identifiziert (Yamada et al., 2001) und inzwischen mit SEREX aus verschiedenen Karzinomen und Testis kloniert worden (**Tab. IV.2b**).

Die cDNAs 51, 71-1 und 96 waren an ihrem 5'- und 3'-Ende kürzer als die UACA-cDNA. cDNA 96 zeigte sich gegenüber den bekannten cDNAs am 5'Ende alternativ gespleißt. Dies führte dazu, dass das putative Genprodukt der cDNA 96 sich von dem der Referenz-cDNA durch einen 26 AS langen, alternativen N-Terminus unterschied (**Abb. IV.12**).

UACA wurde wiederholt mit verschiedenen, mit Panuveitis einhergehenden Autoimmunerkrankungen sowie mit autoimmunen Schilddrüsenenerkrankungen (Morbus Basedow mit Ophthalmopathie) in Zusammenhang gebracht (Ohkura et al., 2004). Über die Funktion des Proteins ist nichts bekannt.

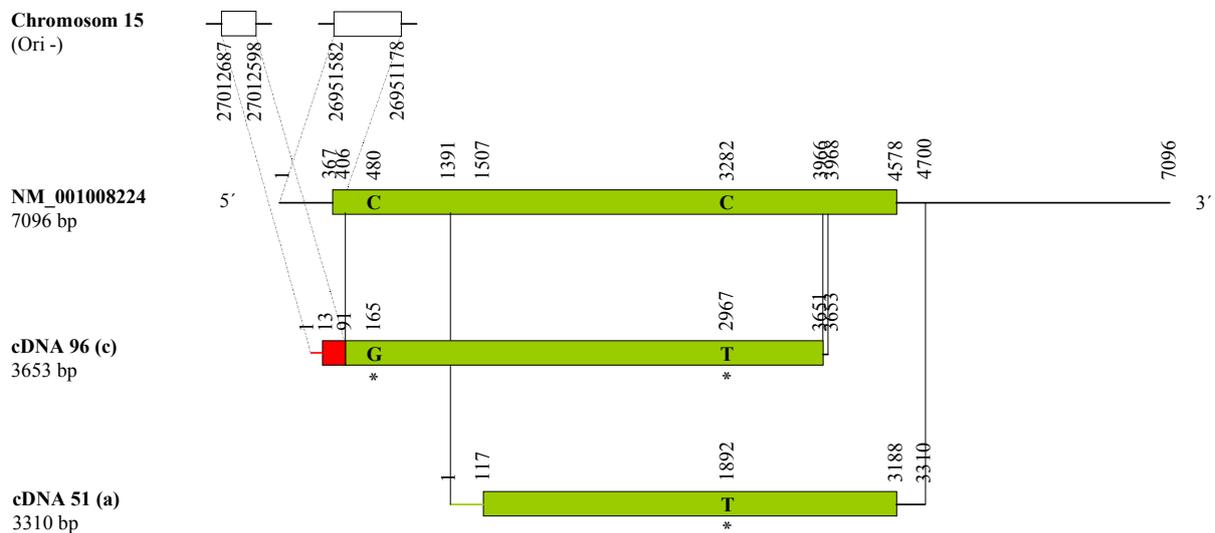


Abb. IV.12. Schematischer Vergleich der cDNA-Sequenzen von MU-OS-177-12 (a: cDNA 51, c: cDNA 96) und der zweiten cDNA-Variante des UACA (NM_001008224).

Der längste, gemeinsame ORF wurde als grüne Box dargestellt. Die cDNAs 51 und 96 waren am 5'- und 3'-Ende kürzer als die UACA-cDNA. Die cDNA 96 zeigte sich an ihrem 5'-Ende alternativ gespleißt (bp 1-90) (rot hervorgehoben), was in einem neuen N-Terminus von 26 AS Länge resultierte. Die neuen Sequenzen waren homolog zu genomischen Sequenzen stromaufwärts des *UACA*-Gens auf Chromosom 15. Es fanden sich zwei konservative Austausche einzelner Basenpaare im kodierenden Bereich, C→G* (NM_001008224 bp 480) und C→T* (NM_001008224 bp 3282). Beide waren bereits als Polymorphismen vorbeschrieben (*Ensembl gene report SNPs*). In cDNA 96 fand sich stromaufwärts des ORF-Starts kein *in frame* gelegenes Stoppsignal, so dass der ORF 5' möglicherweise noch länger war (rote Linie). Die in der Abbildung nicht dargestellte cDNA 71-1 (b) war 5' bzw. 3' lediglich kürzer als cDNA 51 und 96. Der grüne bzw. grün-rote ORF von cDNA 51 bzw. 96 lag nicht *in frame* mit dem stromaufwärts gelegenen Vektor-ATG und wurde daher wahrscheinlich in *E. coli* vom nächsten, stromabwärts *in frame* gelegenen ATG abgelesen.

Das Antigen MU-OS-177-13.1 ist wahrscheinlich mit ROCK1 identisch

Das Antigen MU-OS-177-13.1 wurde vom Plasmid p177-57-1 kodiert.

In der NCBI-Datenbank fanden sich je eine aus Hirngewebe (AB208965) und aus Thrombozyten (U43195 = NM_005406) klonierte homologe cDNA, die für die *Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1* (ROCK1) kodierten (**Tab. IV.1c**). ROCK1 war erstmals von Ishizaki und Kollegen beschrieben (Ishizaki et al., 1996) und inzwischen auf Chromosom 18 lokalisiert worden (NCBI).

Mit SEREX waren diverse cDNA-Homologe aus Karzinomen, einem Sarkom und Testis kloniert worden (**Tab. IV.2b**).

Die cDNA 57-1 ist 5'- und 3' kürzer als die ROCK1-cDNA und enthält nur einen Teil des gemeinsamen ORF (**Abb. IV.13a**).

ROCK1 ist eine Serin/Threonin-Kinase, die durch Bindung an die GTP-gebundene Form der *small GTPase Rho* aktiviert wird und eine zentrale Rolle in der Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts während der Zellmorphogenese und –motilität spielt (Maekawa et al., 1999).

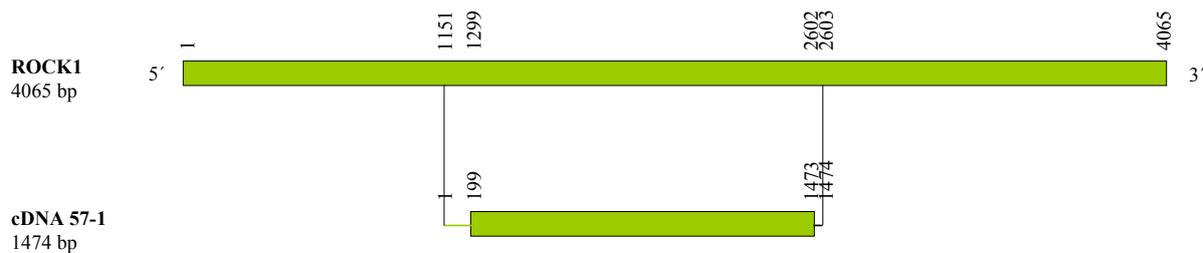


Abb. IV.13a. Schematischer Vergleich der cDNA-Sequenzen von MU-OS-177-13.1 (cDNA 57-1) und ROCK1 (NM_005406).

Der längste gemeinsame ORF wurde als grüne Box dargestellt. Die cDNA 57-1 war an ihrem 5'- und 3'-Ende kürzer als die ROCK1-cDNA mit Fehlen eines Poly-A-Signals an typischer Stelle. Der grüne ORF in cDNA 57-1 lag nicht *in frame* mit dem stromaufwärts gelegenen Vektor-ATG und wurde daher wahrscheinlich in *E. coli* vom nächsten, stromabwärts *in frame* gelegenen ATG abgelesen.

Das Antigen MU-OS-177-13.2 ist wahrscheinlich mit ROCK2 identisch

Das Antigen MU-OS-177-13.2 wurde vom Plasmid p177-76-2 kodiert.

Die cDNA zeigte Homologie zu aus Hirngewebe (AB014519, D87931, [NM_004850.3]) klonierten cDNAs, die für die *Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 2* (ROCK2) kodierten (**Tab. IV.1c**). ROCK2 war erstmals von Witke und Kollegen beschrieben (Witke et al., 1998) und von Takahashi und Kollegen auf Chromosom 2p24 lokalisiert worden (Takahashi et al., 1999).

Mit SEREX waren cDNA-Homologe aus Testis und Leberzellkarzinomen kloniert worden (**Tab. IV.2c**).

Die cDNA 76-2 ist an ihrem 5'-Ende kürzer als die ROCK2-cDNA und enthält nur einen Teil von deren ORF (**Abb. IV.13b**).

ROCK2 ist ein Isoenzym von ROCK1 und reguliert ebenso wie ROCK1 (vgl. Gruppe 13.1) die Kontraktion von glatten Muskelzellen (Turner et al., 2002), die Reorganisation des Zytoskeletts, die Ausbildung von Stressfibrillen und die lokale Anheftung von Zellen während der Zellmotilität und Zytokinese (Amano et al., 2000).

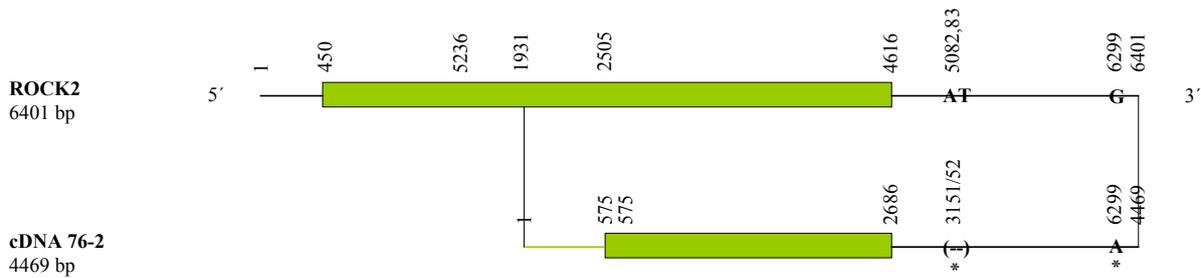


Abb. IV.13b. Schematischer Vergleich der cDNA-Sequenzen von MU-OS-177-13.2 (cDNA 76-2) und ROCK2 (NM_004850.3).

Der längste gemeinsame ORF wurde als grüne Box dargestellt. Die cDNA 76-2 war an ihrem 5'-Ende kürzer als die ROCK2-cDNA. Am 3'-Ende waren vermutlich beide cDNAs inkomplett, da die Sequenzen an zu erwartender Stelle kein Poly-A-Signal enthielten. In cDNA 76-2 fehlten im Gegensatz zur ROCK2-cDNA in der gemeinsamen 3'UTR zwei Basenpaare* (cDNA 76-2 bp 3151/52, NM_004850.3 bp 5082 und 5083 [AT]). Außerdem fand sich in der 3'UTR ein einzelner Basenaustausch von G→A* (NM_004850.3 bp 6299). Beide Veränderungen waren bereits als Polymorphismen vorbeschrieben (*Ensembl gene report SNPs*). Die hier nicht abgebildete cDNA D87931 war im Bereich der 3'UTR alternativ gespleißt (bp 4245-4363). Der grüne ORF in cDNA 76-2 lag nicht *in frame* mit dem stromaufwärts gelegenen Vektor-ATG und wurde daher in *E. coli* wahrscheinlich vom nächsten, stromabwärts *in frame* gelegenen ATG abgelesen.

Das Antigen MU-OS-177-14 ist wahrscheinlich eine bekannte Spleißvariante von *Kinectin 1*

Das Antigen MU-OS-177-14 wurde von dem Plasmid p177-93-2 kodiert.

Es zeigte eine ausgeprägte Homologie zu fünf cDNAs aus der NCBI-Datenbank, die aus einer Myeloblastenzelllinie (D13629), einem Gewebe ohne Herkunftsangabe (AY264265 = NM_182926), Leukozyten (L25616), der Zelllinie L540 (Z22551) und einem Bronchialkarzinom (BC050555) kloniert worden waren. Die homologen cDNAs kodierten für das Mikrotubuli-assoziierte Protein *Kinectin 1* (KTN1) (**Tab. IV.1c**). Das *ktn-1*-Gen war nach Klonierung durch Print und Kollegen (Print et al., 1994) genauer charakterisiert (Futterer et al., 1995; Yu et al., 1995) und auf Chromosom 14q22.1 lokalisiert worden (Rao et al., 1997). Es sind zahlreiche Spleißvarianten des KTN1 bekannt.

Mit SEREX waren homologe cDNAs auch aus anderen Tumoren und Testis kloniert worden (**Tab. IV.2c**). Die von cDNA 93-2 kodierte Spleißvariante war mit SEREX bereits in einem Hepatozellulären Karzinom identifiziert worden (Wang et al., 2004).

Die cDNA 93-2 ist an ihrem 5'- und 3'-Ende kürzer als die KTN1-Referenz-cDNA. Wie in der von Wang und Kollegen klonierten Variante (Wang et al., 2004), fehlten in der cDNA-93-2 zwei Exons der KTN1-cDNA mit jeweils 87 bp bzw. 56 bp Länge (**Abb. IV.14**).

KTN1 ist ein großes integrales Membranprotein des endoplasmatischen Retikulums, das als Rezeptor die Bindung des Motorproteins Kinesin an Zellorganellen vermittelt und so eine Rolle beim Transport der Organellen entlang der Mikrotubuli spielt (Futterer et al., 1995; Yu et al., 1995). Kürzlich wurde beschrieben, dass KTN1 auch den Translationsfaktorkomplex

EF-1 an das Endoplasmatische Retikulum rekrutiert und damit die Synthese von Membranproteinen steuert (Ong et al., 2006).

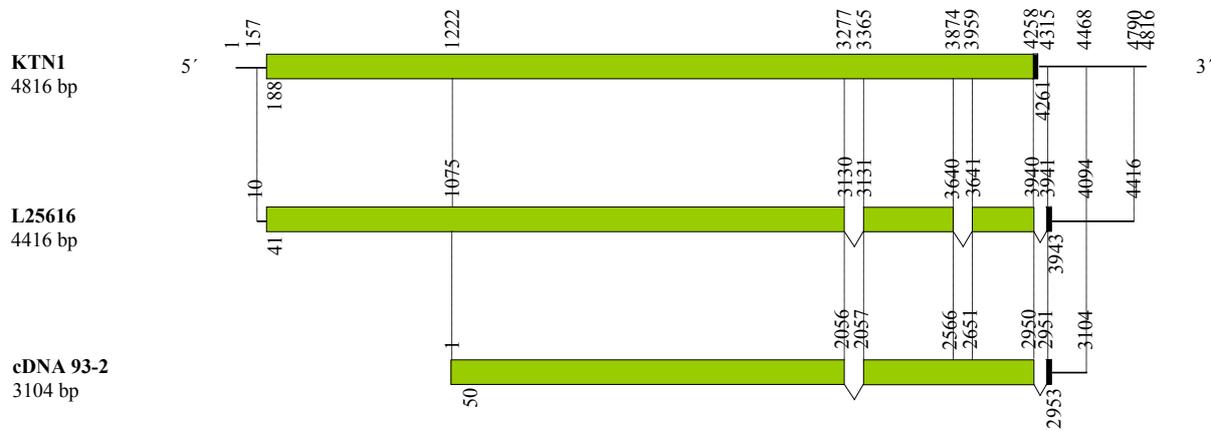


Abb. IV.14. Schematischer Vergleich der cDNA-Sequenzen von MU-OS-177-14 (cDNA 93-2), KTN1 (NM_182926) und L25616.

Der längste, gemeinsame ORF ist als grüne Box dargestellt. Die Translation der 5' inkompletten cDNA 93-2 wurde vermutlich im stromaufwärts *in frame* gelegenen ATG des Vektors gestartet. Die 93-2-cDNA ist eine bekannte Spleißvariante der KTN1-cDNA, der zwei Exons fehlen, ein 87 bp langes Exon an Pos. 2056/57 (NM_182926 bp 3278-3364) und ein 56 bp langes Exon an Pos. 2950/51 (NM_182926 bp 4259-4314). Beide Exons fehlen zusammen mit einem dritten Exon von 84 bp Länge (NM_182926 bp 3875-3958) auch in der cDNA L25616 (bp 3130/31, bp 3640/41 und bp 3940/41). Da das Translationsstoppsignal des ORF der KTN1-cDNA direkt am Beginn des letzten, in den beiden Homologen ausgespleißten Exons liegt („TGA“ NM_182926 bp 4259-61), wird in 93-2 und L25616 ein weiter stromabwärts gelegenes Stopkodon benutzt („TGA“, cDNA 93-2 bp 2951-53, NM_182926 bp 4315-17)(Stopkodons jeweils als schwarze Balken dargestellt); auf Proteinebene ergibt sich hieraus jedoch keine Konsequenz. In der Datenbank fanden sich weitere Spleißvarianten (D13629, Z22551), die hier nicht abgebildet sind.

Das Antigen MU-OS-177-15 ist wahrscheinlich mit LGALS1 identisch

Das Antigen MU-OS-177-15 wurde vom Plasmid p177-127-2 kodiert.

In der Datenbank fanden sich mehrere, sehr ähnliche, homologe cDNAs (NM_002305.2, AB097036 = J04456, BC001693, BC020765 und weitere), die für Galectin 1 (LGALS1, auch Gal-1 genannt), ein β -Galaktosid-bindendes, dimeres Protein aus der Familie der Galectine, kodieren (**Tab. IV.1d**). Galectine wurden erstmals von Gitt und Barondes als eine Genfamilie beschrieben (Gitt und Barondes, 1986). LGALS1 wurde zeitgleich von verschiedenen Arbeitsgruppen kloniert und charakterisiert (Abbott und Feizi, 1989; Couraud et al., 1989; Hirabayashi et al., 1989a; Hirabayashi et al., 1989b) und später auf Chromosom 22q12-q13.1 lokalisiert (Baldini et al., 1993).

Mit SEREX wurde eine homologe cDNA aus einem Fibrosarkom kloniert (**Tab. IV.2c**).

Die cDNA 127-2 ist an ihrem 5'-Ende kürzer als die LGALS1-cDNA (**Abb. IV.15**).

Das in der Evolution hoch konservierte LGALS1 (Houzelstein et al., 2004) wirkt als autokriner Regulator der Zellproliferation (NCBI OMIM) mit immunmodulatorischen Funktionen (Liu, 2005) und spielt eine Rolle beim Spleißen von Prä-mRNA (Vyakarnam et al., 1997; Liu, 2005).



Abb. IV.15. Schematischer Vergleich der cDNA-Sequenzen von MU-OS-177-15 (cDNA 127-2) und LGALS1 (NM_002305.2).

Der längste, gemeinsame ORF wurde als grüne Box dargestellt. Die cDNA 127-2 war an ihrem 5'-Ende kürzer als die LGALS1-cDNA. In der cDNA 127-2 fand sich im Bereich der 3' UTR an Position 492 eine Insertion von Cytosin. Eine Insertion an gleicher Stelle fand sich auch in der aus einem Melanom klonierten cDNA BC001693, hier fand sich jedoch ein zusätzliches T. Der grüne ORF in cDNA 127-2 lag nicht *in frame* mit dem Vektor-ATG und wurde daher wahrscheinlich in *E. coli* vom nächsten, stromabwärts *in frame* gelegenen ATG abgelesen. Die anderen homologen cDNAs wiesen sonst keine weiteren Sequenzunterschiede auf und wurden deshalb hier nicht dargestellt.

Das Antigen MU-OS-177-16 ist wahrscheinlich mit hSLK identisch

Das Antigen MU-OS-177-16 wurde von den überlappenden Inserts der Plasmide p177-197 und p177-192 kodiert.

Bei der Recherche in der NCBI-Datenbank zeigte sich eine signifikante Homologie zu vier cDNAs aus Retinoblastom (BC008697), der Lungenkarzinomzelllinie A549 (AB002804), normalem Hirngewebe (D86959) und Testis (se20-9, AF273048 = NM_014720), die für *human STE20-like kinase* (hSLK) kodierten (**Tab. IV.1d**). hSLK war etwa gleichzeitig erstbeschrieben (Sabourin et al., 2000; Yamada et al., 2000) und inzwischen einem Gen auf Chromosom 10 zugeordnet worden (NCBI) (**Abb. IV.16**).

Mit SEREX waren neben dem aus Testis klonierten CTCL-Tumorantigen se20-9 (AF273048 = NM_014720) (Eichmüller et al., 2001) auch cDNA-Homologe aus Karzinomgewebe isoliert worden (**Tab. IV.2c**).

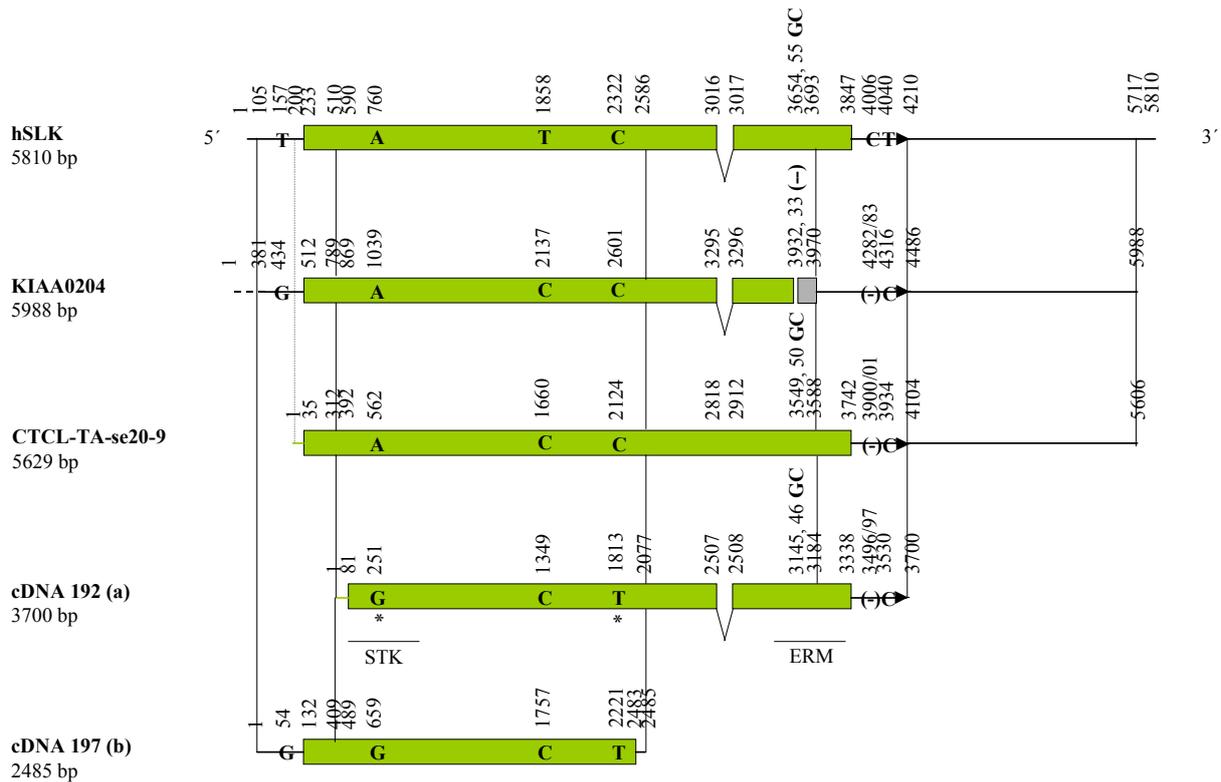


Abb. IV.16. Schematischer Vergleich der cDNA-Sequenzen von MU-OS-177-16 (a: cDNA 192, b: cDNA 197), hSLK (AB002804), KIAA0204 (D86959) und CTCL-Tumorantigen se20-9 (AF273048).

Der längste, gemeinsame ORF aller cDNAs wurde als grüne Box dargestellt, und ist am 5'-Ende nicht vollständig in cDNA 192 und 197 und am 3'-Ende nicht vollständig in cDNA 197 enthalten. Bekannte Polymorphismen wurden mit einem Stern (*) gekennzeichnet (*Ensembl gene report SNPs*). cDNA 192 und 197 waren vermutlich an ihrem 5'-Ende inkomplett, cDNA 197 auch an ihrem 3'-Ende. Die aus Testis klonierte cDNA se20-9 eines Tumorantigens (NM_014720) war eine Spleißvariante und enthielt im Vergleich zu allen anderen homologen cDNAs ein zusätzliches Exon von 93 bp Länge an Position 2819-2911 (zwischen Position 2507 und 2508 in cDNA 192). Das Antigen MU-OS-177-16 enthielt eine hoch konservierte Serin/Threonin-Kinase (STK)-Domäne (Protein zu cDNA 192: AS 1-173, cDNA 192 bp 81-600; Protein zu cDNA 197: AS 34-292, cDNA 197 bp 134-1010) und zwei weniger hoch konservierte Domänen: eine ERM-Domäne (AS 917-1074, bp 2832-3303) und eine Smc-Domäne (AS 780-1067, bp 2421-3282) fraglicher Signifikanz (NCBI Conserved Domain Search). Im längsten gemeinsamen ORF fanden sich ein konservativer (A→G, AB002804 bp 2322), der in einem Austausch von Threonin zu Isoleucin resultierte. Es handelte sich jeweils um einen bekannten Polymorphismus (*Ensembl gene report SNPs*). 13 bp stromaufwärts des Poly-A-Schwanzes in Klon 192 fand sich ein Polyadenylierungssignal (Position 3682-3687, „AATAAA“) (schwarzes Dreieck). Warum dieses nur hier als Polyadenylierungssignal gedient hat, nicht aber in den homologen cDNAs ist unklar. Ein *false priming* bei der reversen Transkription der OS-RNA war unwahrscheinlich, da an dieser Stelle in den homologen Transkripten keine poly-A-reiche Region zu finden war. In cDNA 197 fand sich gar kein Poly-A-Signal an zu erwartender Stelle, so dass hier ein *false priming* anzunehmen war. In der cDNA aus gesundem Gehirn (D86959) fand sich gegenüber den anderen cDNAs eine 2bp-Deletion (bp 3932/33), was zu einer Rasterverschiebung mit kurzem, alternativem C-Terminus geführt hatte (graue Box). Die cDNAs hSLK und KIAA0204 (D86959) zeigten sich am 5'-Ende der 5'UTR unterschiedlich gespleißt. In ihrer gemeinsamen 5'Region fanden sich Differenzen einzelner Basen. Die aus Retinoblastom klonierte cDNA (BC008697) wurde in der Abbildung nicht dargesellt; sie war lediglich kürzer als die KIAA0204-cDNA. In der cDNA se20-9 des CTCL-Tumorantigens fand sich stromaufwärts des ORF-Start kein *in frame*-Stopsignal (grüne Linie), so dass der ORF möglicherweise 5' noch länger war. Der grüne ORF in cDNA 192 und 197 lag nicht *in frame* mit dem stromaufwärts gelegenen Vektor-ATG und wurde daher wahrscheinlich in *E. coli* vom nächsten, stromabwärts *in frame* gelegenen ATG abgelesen.

Die cDNAs 192 und 197 waren an ihrem 5'-Ende vermutlich inkomplett, cDNA 197 ebenso an ihrem 3'-Ende. Die aus Testis klonierte cDNA (se20-9) enthielt im Vergleich zu Klon 192 und allen anderen, homologen cDNAs ein zusätzliches Exon von 93 bp Länge innerhalb des 3258 bp langen gemeinsamen ORF. Die aus der Lungenkarzinomzelllinie klonierte cDNA (AB002804) war gegenüber der aus Hirngewebe klonierten cDNA (D86959) im Bereich der 5'UTR alternativ gespleißt

Der längste ORF aller cDNAs kodierte für ein Protein mit einer hoch konservierten und zwei weniger hoch konservierten Domänen (NCBI *Conserved Domain Search*). Bei der hoch konservierten Domäne handelte es sich um eine Serin/Threonin-Kinase-Domäne aus der Gruppe der STE20-like-Kinasen (vgl. MU-OS-177-2). Diese ursprünglich in Hefe definierte Serin/Threonin-Kinasefamilie umfasst mehrere Untergruppen, wie z.B. die p21 *activated kinase* (PAK1) und *germinal center*-Kinasen (GCK), die z.T. Regulatoren im MAP-Kinase (*mitogen activated kinase*)-Signalweg darstellen (als MAPK-KKK) (Dan et al., 2001) und die MST2 Kinase, die ein proapoptotisches Signal vermittelt und durch Interaktion mit Raf1 inaktiv gehalten wird (O'Neill et al., 2004; O'Neill und Kolch, 2005). Bei den weniger hoch konservierten Domänen handelt es sich um eine Domäne aus der ERM (*ezrin/radixin/moesin*)-Familie, deren Vertreter an der Regulation von Zelladhäsion, -migration und -invasion beteiligt sind (Sabourin et al., 2000; Curto und McClatchey, 2004) (Score 40.0, Expect 0.002) und eine Smc-Domäne (Score 40.4, Expect 0.001) (vgl. MU-OS-177-4), deren Homologie vermutlich nicht signifikant ist.

Das Antigen MU-OS-177-17 ist ein alternatives Translationsprodukt von SPATA18

Das Antigen MU-OS-177-17 wurde vom Plasmid p177-106 kodiert. In der NCBI-Datenbank fanden sich drei homologe cDNAs, die aus Testis (BC025396.1= NM_145263.1), Blutzellen (AC093858) und Hirngewebe (BC037886) kloniert worden waren und für das Homolog des Rattengens *spermatogenesis associated 18 homolog* (SPATA18) auf Chromosom 4q11 kodierten (NCBI) (**Tab. IV.1d**).

Mit SEREX war bislang keine homologe cDNA isoliert worden (**Tab. IV.2d**).

Die cDNA 106 war bemerkenswerterweise nur zur 3'UTR der gefundenen cDNAs homolog und enthielt den bekannten SPATA18-ORF nicht. Der 222 bp lange, größte ORF der cDNA 106 stellte in den homologen cDNAs einen alternativen ORF dar, der wesentlich kleiner war als der stromaufwärts gelegene, bekannte SPATA18-ORF (**Abb. IV.17**).

Das 73 AS lange Genprodukt des alternativen ORF war bisher nicht beschrieben worden. Bei der Suche nach charakteristischen Proteindomänen ergab sich nur eine geringfügige,

vermutlich nicht signifikante Homologie (NCBI Conserved Domain Search, Score 33.1 bits, Expect = 2.3) zu einer *helicase with zinc finger domain* (HELZ) (NP_055692.2) aus der ubiquitär vorkommenden *superfamily I class of RNA helicases* (NCBI Blastp), die an der Regulation des Spleißens, der Ribosomen-Biogenese, Initiation der Translation und Stabilisierung der mRNA beteiligt sind (Wagner et al., 1999).

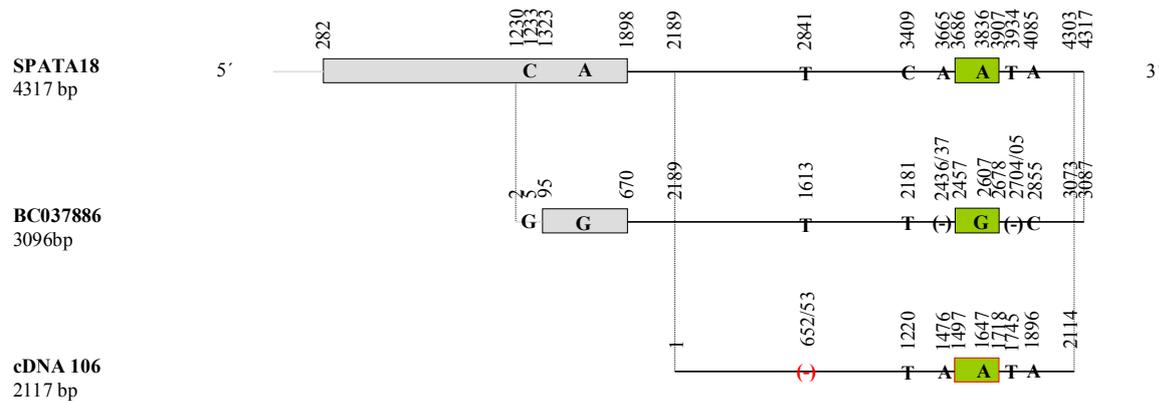


Abb. IV.17. Schematischer Vergleich der cDNA-Sequenzen von MU-OS-177-17 (cDNA 106), SPATA18 (NM_145263) und einer Retinoblastom-cDNA (BC037886).

Der längste, gemeinsame ORF wurde als grüne Box dargestellt. Die cDNA 106 war am 5'-Ende wesentlich kürzer als die homologen cDNAs und überlappte lediglich mit deren 3'UTR. Der bekannte ORF (hellgraue Box) der SPATA18-cDNA (1617 bp in NM_145263) fand sich nur 5'inkomplett in der cDNA BC037886 (576 bp) und gar nicht in cDNA 106 enthalten. Stromaufwärts des bekannten SPATA18-ORF (hellgraue Linie) fand sich in NM_145263 kein *in frame* gelegenes Translationsstoppsignal so dass dieser ORF 5' möglicherweise noch länger ist. Der größte ORF in cDNA 106 war 222 bp lang (Kozak-Sequenz: „AAATCA-ATG-T“, bp 1491-1500) und fand sich in beiden cDNA-Homologen stromabwärts des bekannten SPATA18-ORF als kleiner, alternativer ORF. Der vom Vektor-ATG eröffnete ORF wurde in cDNA 106 nach wenigen bp gestoppt (bp 145). Es fanden sich in der cDNA 106 gegenüber den einzelnen cDNA-Homologen Austausch einzelner Basenpaare, die in anderen homologen cDNAs vorherbeschrieben waren. Einzelne davon sind noch nicht in der *SNP*-Datenbank erfasst: C→T, (-)→A, G→A, (-)→T und C→A (cDNA 106 bp 1220, 1476, 1647, 1745, 1896). Der Austausch von G→A im grünen ORF (NM_145263 bp 3836) führte auf Proteinebene zum Austausch der Aminosäure Glutaminsäure zu Lysin. Die Deletion eines Thymidin (cDNA 106 bp 652/53) war neu (rot) (*Ensembl gene report SNPs*). In der cDNA 106 waren neben dem grünen ORF noch acht weitere kleinere ORFs enthalten (cDNA 106 bp 789-956, 451-609, 1116-1271, 1722-1859, 68-145, 716-784, 651-713); der zweitkleinste (bp 716-784) zeigte die beste Kozak-Sequenz („ATAAGA-ATG-G“, bp 710-719).

Das Antigen MU-OS-177-18 ist wahrscheinlich eine neue Spleißvariante von CENP-E

Das Antigen MU-OS-177-18 wurde vom Plasmid p177-268 kodiert.

Die cDNA 268 zeigte weitgehende Homologie zu der aus Mammakarzinom klonierten cDNA des *centromeric protein E* (CENP-E) (NM_001813). Eine weitere, aus fetalem Hirngewebe klonierte cDNA (CR613861) zeigte nur mit dem 3'-Ende von cDNA 268 Homologie (**Tab. IV.1e**). CENP-E wurde kurz nach der Erstbeschreibung (Yen et al., 1991) einem Gen auf Chromosom 4 zugeordnet (Testa et al., 1994).

Mit SEREX waren bislang keine homologen cDNAs kloniert worden (**Tab. IV.2d**).

CENP-E ist ein Motorprotein, das für die Chromosomenbewegung und Elongation des Spindelapparates im Übergang von der Metaphase zur Anaphase des Zellzyklus verantwortlich ist (Yen et al., 1991; Yen et al., 1992). Mehrere Arbeitsgruppen konnten kürzlich zeigen, dass CENP-E eine essentielle Rolle in der Kontrolle des Mitose-Checkpoints spielt, der für die Aufrechterhaltung der normalen Chromosomenzahl entscheidend wichtig ist (Tanudji et al., 2004; Mao et al., 2005; Morrow et al., 2005). Für die Motorfunktion von CENP-E ist eine N-terminale Domäne des Proteins verantwortlich, die in cDNA 268 fehlt. Weiter stromabwärts enthalten die homologen Proteine eine Smc-Domäne mit fraglicher Signifikanz (vgl. MU-OS-177-4) (eigene Computer-basierte Proteinsequenzanalyse, NCBI blastp). Die durch alternatives Spleißen verursachten Unterschiede in den Proteinen CENP-E und Antigen MU-OS-177-18 betreffen die fragliche Smc-Domäne.

Das Antigen MU-OS-177-19 ist ein alternatives Genprodukt der T9SM2P-mRNA

Das Antigen MU-OS-177-20 wurde vom Plasmid p177-273-2 kodiert.

In der NCBI-Datenbank fanden sich zwei homologe cDNAs, die aus einem Dermoidtumor (AK129798) und aus Plazentagewebe (CR605342) kloniert worden und vom *transmembrane 9 superfamily member 2 precursor* (T9SM2P)-Gen auf Chromosom 13 kodiert waren (NCBI) (**Tab. IV.1e**).

Mit SEREX war bislang keine homologe cDNA isoliert worden (**Tab. IV.2d**).

Die cDNA 273-2 war lediglich mit der 3'UTR der gefundenen cDNAs homolog und enthielt den bekannten T9SM2P-ORF nicht. Der mit 81 bp längste ORF der cDNA 273-2 kodierte ein bislang nicht beschriebenes, 26 AS langes Genprodukt (NCBI Blastp) (**Abb. IV.19**).

IV.2. Untersuchungen zur Immunogenität der SEREX-definierten OS Antigene

Um Aussagen darüber treffen zu können, ob es sich bei den identifizierten Antigenen um Tumorantigene oder Autoantigene handelte, und wie stark die Immunogenität der Antigene war, wurden zum einen serologische Anschlussuntersuchungen (vgl. **Kap. IV.2.1.**) und zum anderen Literatur- und SEREX-Datenbank-Recherchen (**Tab. IV.2**) zum Vorkommen von spezifischen Serumantikörpern bei gesunden und krebserkrankten Individuen durchgeführt.

In der SEREX-Datenbank fanden sich diverse serologische Informationen zu SEREX-Antigenen, die noch nicht in kritisch redigierten Fachzeitschriften publiziert waren.

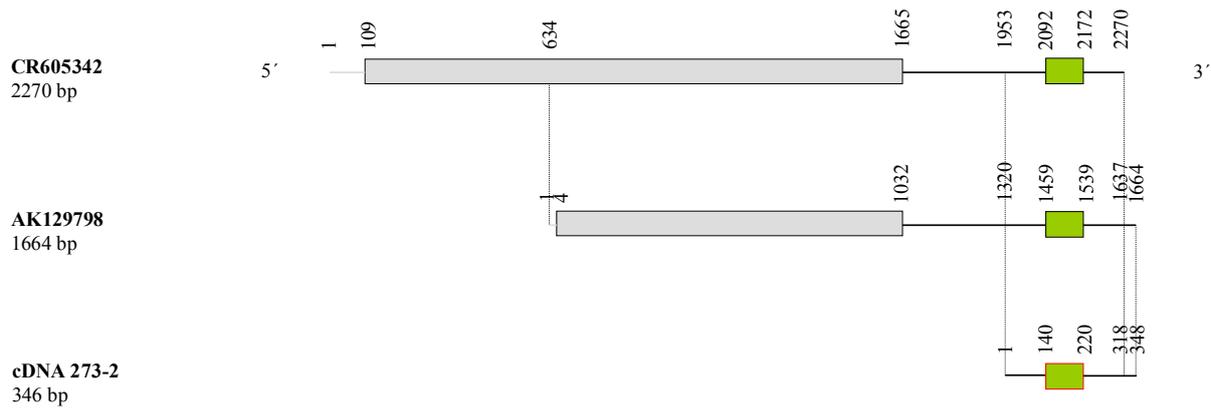


Abb. IV.19. Schematischer Vergleich der Sequenzen von MU-OS-177-19-cDNA (273-2), einer Plazenta-cDNA CR605342) und einer cDNA aus einem Dermoidtumor (AK129798).

Der längste gemeinsame ORF wurde als grüne Box dargestellt. Als graue Box ist der bekannte T9SM2P-ORF in cDNAs CR605342 (1557 bp) und in AK129798 (5' inkomplett, 1029 bp) eingetragen. In der langen cDNA CR605342 fand sich stromaufwärts des ORF-Starts (graue Linie) kein *in frame* gelegenes Stoppsignal so dass der ORF möglicherweise 5' noch länger war. Die cDNA 273-2 war am 5'-Ende wesentlich kürzer als die homologen cDNAs und überlappte lediglich mit deren 3'UTR. Der größte ORF (81 bp) in cDNA 273-2 war stromaufwärts von einem *in frame* gelegenen Translationstoppsignal flankiert; er fand sich stromabwärts des bekannten ORF auch in den homologen cDNAs. Das 26 AS umfassende Genprodukt des alternativen, kleinen ORF (grün) ist bisher nicht bekannt (NCBI Blastp). Der im Vektor von cDNA 273-2 eröffnete ORF brach schon nach wenigen bp ab (bp 13). Weitere, alternative ORF fanden sich in der cDNA 273-2 nicht.

IV.2.1. Differentielle Serumanalyse

Um Autoantigene zu erkennen, wurden die Antigene je nach Reaktivität im ersten Durchlauf mit Einzelseren von 5-30 gesunden, jungen Erwachsenen untersucht (**Abb. IV.20**). Um die Immunogenität bei Tumorpatienten zu analysieren, wurde die differentielle Serumanalyse mit Proben von zehn Patienten mit OS und zehn Patienten mit anderen pädiatrischen Tumoren getestet (**Tab. IV.3**). Unter den zehn Patienten mit OS fanden sich die fünf Patienten, deren Proben in den Serumpool für das SEREX-Screening eingesetzt worden waren.

Aus jeder Antigengruppe wurde stellvertretend das Antigen ausgewählt, welches von der längsten, zu diesem Zeitpunkt bereits sequenzierten cDNA kodiert wurde. Aus der Antigengruppe 13 wurde nur das Antigen MU-OS-177-13.1 serologisch untersucht.

Um Autoantigene ohne unnötigen Materialverbrauch frühzeitig auszuschließen, wurden die serologischen Analysen zunächst mit vorbenutzten, bei 4°C gelagerten Proben von gesunden Probanden und Tumorpatienten durchgeführt (Serie A); bei negativem Ergebnis für alle Kontrollproben sollte sicherheitshalber eine zweite Serie von Analysen mit frisch absorbierten Serumproben von Kontrollpersonen und Tumorpatienten durchgeführt werden (Serie B).

Alle mit SEREX identifzierten OS-Antigene kodierten definitionsgemäß Autoantigene

In einer initialen Versuchsreihe mit den bis zu zwei Jahre gelagerten Serumproben (A) reagierten sechs der getesteten Antigene mit zwei oder mehr Kontrollseren und mussten somit definitionsgemäß als Autoantigene klassifiziert werden (MU-OS-177-5, -10c, -12b, -13.1, -15 und -19). Bei den übrigen Antigenen fiel auf, dass bei Reaktivität von keinem oder nur einem Kontrollserum insgesamt wenige der gelagerten OS-Seren, aber relativ viele der frisch absorbierten Seren von OS-Patienten reaktiv waren. Dies deutete auf einen Abfall der IgG-Antikörpertiter durch Lagerung hin und ließ zwei Hypothesen zu. Erstens konnte es sich bei den Antigenen um niedrig immunogene Tumorantigene handeln, und zweitens war es denkbar, dass es sich um Autoantigene handelte, deren Reaktivität durch einen Abfall der IgG-Antikörpertiter in den lange gelagerten Seren maskiert war. Um diese Hypothesen zu testen, wurden frische Kontrollseren absorbiert und in einer zweiten Versuchsreihe (B) mit den fraglichen Tumorantigenen getestet. Diese reagierten ausnahmslos mit jeweils mehreren Kontrollseren und erfüllten somit ebenfalls die Kriterien von Autoantigenen. Damit bestätigte sich die zweite Hypothese zu den Ergebnissen der Versuchsreihe A (**Tab. IV.3**).

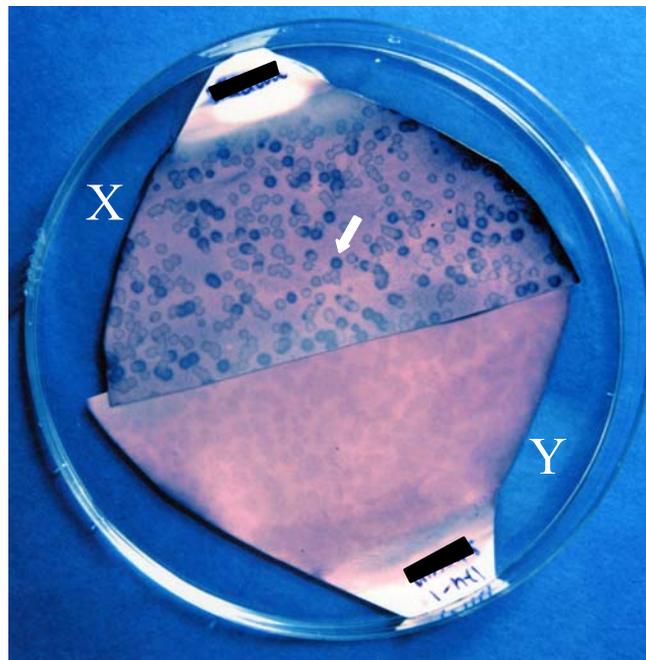


Abb. IV.20. Differentielle Serumanalyse

Bei Plaque Assay-Analysen der Nitrozelluloseabzüge von Antigen MU-OS-177-8a (Plasmid 174-1) mit Serumproben von zwei verschiedenen, gesunden Kontrollpersonen erkannte man nur im Falle der Person X nicht aber der Person Y dunkelblaue, reaktive, Antikörper-bindende Plaques (Pfeil) neben hellblauen, nicht-reaktiven Plaques, was bedeutete, dass die Person X seropositiv, die Person Y seronegativ für dieses Antigen war.

A	Zahl der Seren mit Reaktivität gegen die MU-OS-177 Antigene									
	1a	2a	3	4a	4b	5	6	7	8a	9
Kontrollen (n = 20) ¹	1	0	0	0	1	2	0	1	0	1
Patienten mit OS (n = 10) ²	3	9	7	4	7	n.u.	4	3	n.u.	2
Andere Patienten (n = 10) ³	1	3	4	2	1	n.u.	0	3	n.u.	1
	10c	11	12b	13.1	14	15	16a	17	18	19
Kontrollen (n = 20) ¹	2	1	4 (15)	4 (5)	0	3 (10)	0	1	0	2
Patienten mit OS (n = 10) ²	n.u.	1	n.u.	n.u.	5	n.u.	4	n.u.	6	n.u.
Andere Patienten (n = 10) ³	n.u.	2	n.u.	n.u.	1	n.u.	2	n.u.	5	n.u.

B	Zahl der Seren mit Reaktivität gegen die MU-OS-177 Antigene									
	1a	2a	3	4a	4b	5	6	7	8a	9
Kontrollen (n = 10) ¹	8	8	9	3 (30)	13(30)	n.u.	8	9	6 (29)	6
Patienten mit OS (n = 5) ⁴	1	5	3	n.u.	3	n.u.	1	1	n.u.	n.u.
	10c	11	12b	13.1	14	15	16a	17	18	19
Kontrollen (n = 10) ¹	n.u.	8	n.u.	n.u.	8	n.u.	8	25(25)	8	n.u.
Patienten mit OS (n = 5) ⁴	n.u.	1	n.u.	n.u.	1	n.u.	2	n.u.	3	n.u.

Tab. IV.3. Differentielle Serumanalyse der SEREX-definierten OS-Antigene

Die Tabelle zeigt Ergebnisse von Plaque-Assays mit jeweils einem antigenkodierenden Phagen und 1:100 verdünntem, präabsorbiertem Serum, das **(A)** bis zu zwei Jahre bei 4°C gelagert worden oder **(B)** direkt nach Präabsorption in die Untersuchung eingesetzt worden war. ¹Als Kontrollen dienten freiwillige, gesunde, junge Erwachsene. Die Zahlen in Klammern beziffern die Gesamtzahl der untersuchten Probanden im Falle n= abweichend von 20 bzw. 10. ²Fünf der zehn Seren von OS-Patienten waren frisch absorbiert worden und zu jeweils einem Teil in das SEREX-Screening eingegangen. ³Andere Patienten: Bei diesen Patienten war ein Ewingtumor (n = 2), Neuroblastom (n = 2), Medulloblastom (n = 2), Wilmstumor (n = 2) oder Rhabdomyosarkom (n = 2) diagnostiziert worden. ⁴Patienten mit OS: Diese fünf Seren von OS-Patienten waren sämtlich frisch absorbiert worden und zu jeweils einem Teil in das SEREX-Screening eingegangen. „n.u.“: Eindeutige Autoantigene (≥ 2 positive Kontrollseren) wurden nach den initialen Experimenten mit älteren Kontrollseren nicht weiter untersucht. Alle Antigene, die nicht eindeutig Autoantigene waren (< 2 positive Kontrollseren) (rot) wurden in **(A)** auch mit Seren von Tumorpatienten untersucht, und in **(B)** mit frisch absorbierten Kontrollseren getestet. In **(B)** wurden stichprobenartig frisch absorbierte Seren von Patienten mit OS mitgeführt.

IV.2.2. SEREX-Datenbank- und Literaturrecherche zur Immunogenität der mit SEREX identifizierten Antigene

Homologe von etwa der Hälfte aller im Osteosarkom identifizierten Gruppen von putativen Antigenen waren bereits von anderen Autoren als Autoantigen klassifiziert worden

Homologe von zehn der hier beschriebenen zwanzig Antigengruppen waren mit SEREX bereits aus anderen Tumoren, überwiegend aus Karzinomen, isoliert worden (MU-OS-177-1, -5, -8, -10, -12, -13.1, -13.2, -14, -15 und -16). Für sieben der Antigengruppen fanden sich in der SEREX-Datenbank bereits Hinweise auf eine Reaktivität mit Kontrollseren (MU-OS-177-1, -5, -8, -12, -13.1, -14 und -16). (**Tab. IV.2**).

In der Literatur fanden sich Hinweise zur Immunerkennung von Produkten der Gene *HSPH1* (Scanlan et al., 1998; Nakatsura et al., 2001), *NM23-H2* (Schmits et al., 2002), *GOLGA1* (Griffith et al., 1997), *EEA-1* (Waite et al., 1998), *UACA* (Yamada et al., 2001; Ohkura et al., 2004), *ROCK1* (Uemura et al., 2003), *Kinectin* (Stenner-Liewen et al., 2000; Hirano et al., 2003; Wang et al., 2004; Wang et al., 2005), *hSLK* (Eichmüller et al., 2001) und *CENP-E* (NCBI Entrez Gene, general protein information)(Rattner et al., 1996). Auch die verfügbaren Literaturdaten untermauerten die Klassifikation der Antigene als Autoantigene (**Tab. IV.2**).

Produkte der Gene *HSPH1*, *U2AF1-RS2*, *NM23-H2* und *ROCK1* waren per definitionem als Autoantigene klassifiziert worden

MU-OS-177-1: Neben dieser Antigengruppe waren andere putative HSPH1-Homologe mit SEREX kloniert und einer differentiellen Serumanalyse unterzogen worden. Eine Reaktivität mit Seren von gesunden Probanden war für die aus Testis klonierten Antigene HOM-Ts-PPMR3-6R (1/12), -4R (4/12) und -2R (5/12) (SEREX-Datenbank) und für das aus Kolonkarzinom klonierte Antigen NY-CO-25 (2/16) (Scanlan et al., 1998) dokumentiert (**Tab. IV.2a**). *HSPH1*-Genprodukte waren demnach bereits als Autoantigene bekannt (Nakatsura et al., 2001).

MU-OS-177-5: Das putative U2AF1-RS2-Homolog NGO-St-122 war mit Hilfe von SEREX aus einem Magenkarzinom kloniert und aufgrund seiner Reaktivität mit Seren von gesunden Probanden (3/16) als Autoantigen klassifiziert worden (SEREX-Datenbank) (**Tab. IV.2a**).

MU-OS-177-8: Das putative Homolog NM23-H2 war mit Hilfe von SEREX aus einem Astrozytom isoliert, und spezifische Antikörper bei 2/20 gesunden Probanden gefunden worden (Schmits et al., 2002). Auch dieses Antigen war somit als Autoantigen vorbeschrieben.

MU-OS-177-13.1: Weitere putative Homologe des ROCK1 waren als NY_REN-35, NGO-Br-4 (SEREX-Datenbank) und Clone 15 (Uemura et al., 2003), mit SEREX aus Nierenzell-, Mamma- bzw. Leberzellkarzinomgewebe kloniert und mit Seren von gesunden Probanden positiv getestet worden (1/15, 13/30 bzw. 3/20) (**Tab. IV.2b**). Sie hatten sich somit eindeutig als Autoantigene erwiesen.

Produkte der Gene GOLGA1, EEA1, UACA, Kinectin und CENP-E waren im Rahmen von Autoimmunerkrankungen als Autoantigen charakterisiert worden

MU-OS-177-10: Das putative Homolog GOLGA1 (auch als Golgin 97 bezeichnet) wurde von Griffith und Kollegen durch Screening einer HeLa-cDNA-Expressionsbibliothek mit Seren von Patienten mit Sjögren-Syndrom identifiziert (Griffith et al., 1997). Die Arbeitsgruppe hatte darüber hinaus in 12/60 Seren, die bekanntermaßen Anti-Golgi-Antikörper enthielten, auch Antikörper gegen GOLGA1 nachgewiesen, darunter in 8/12 Seren von Patienten mit Sjögren-Syndrom. Bei Autoimmunerkrankungen und Infektionen sind Autoantikörper gegen Proteine des Golgi-Apparates vielfach beobachtet worden, erstmals im Serum eines Patienten mit Sjögren-Syndrom, der außerdem an einem Lymphom erkrankt war (Rodriguez et al., 1982). Auch bei Patienten mit verschiedenen anderen rheumatischen Erkrankungen wurden Anti-Golgi-Autoantikörper nachgewiesen (Systemischer Lupus erythematoses (Fritzler et al., 1984; Fritzler und Salazar, 1991; Nozawa et al., 2002), rheumatoide Arthritis (Hong et al., 1992; Hong et al., 2004), Wegener Granulomatose (Mayet et al., 1991)) sowie bei Patienten mit idiopathischer zerebellärer Ataxie (Gaspar et al., 1988). Bei viralen Infektionen wie Epstein-Barr Virus- oder HIV-Infektionen wurden ebenfalls Anti-Golgi-Antikörper beschrieben (Gentric et al., 1991; Huidbuchel et al., 1991).

MU-OS-177-11: Autoantikörper gegen das putative Homolog EEA-1 waren erstmals im Serum eines Patienten mit subakutem, kutanem Lupus Erythematoses (SCLE) nachgewiesen worden (Mu et al., 1995). Kurz darauf wurde über Antikörper gegen EEA1 in 5/38 Seren von Patienten mit generalisierten Gelenkschmerzen, Polyarthritis, Rheumatoider Arthritis oder positivem Rheumafaktor berichtet (Waite et al., 1998).

MU-OS-177-12: Die bovine Form des putativen Homologs UACA wurde durch Screening einer Uvea-cDNA-Expressionsbibliothek mit Seren von vier Patienten mit Morbus Vogt-Koyanagi-Harada (VKH) identifiziert. Nach Klonierung des menschlichen Homologs wurden mittels ELISA Seren verschiedener Patienten mit Panuveitis auf anti-UACA-Antikörper untersucht. Sie fanden sich bei Patienten mit VKH (9/46), Morbus Behçet (9/32) oder Sarkoidose (4/19), nicht jedoch bei 36 gesunden Probanden. UACA wurde damit als ein

möglicherweise pathogenetisch bedeutsames Autoantigen charakterisiert (Yamada et al., 2001). Später wurde auch über signifikant erhöhte anti-UACA-Antikörpertiter in Seren von Patienten mit autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen berichtet (Ohkura et al., 2004).

MU-OS-177-14: Mit SEREX waren mehrere Kinectin-Homologe isoliert und durch differentielle Serumanalyse weiter charakterisiert worden. Stenner-Liewen und Kollegen hatten das Antigen HOM-HCC-27.12.2 aus Leberzellkarzinomgewebe kloniert und aufgrund der fehlenden Reaktivität mit Proben von gesunden Kontrollpersonen (0/20) zunächst als Tumorantigen klassifiziert (Stenner-Liewen et al., 2000). Später isolierten Hirano und Kollegen ein weiteres Homolog aus fetaler Niere. Sie sahen zwar ebenfalls keine Reaktivität mit Seren von gesunden Kontrollen (0/35), aber dafür Reaktivität mit Proben von Patienten mit aplastischer Anämie (7/18) ohne Hinweis auf Malignität. Ähnliche Ergebnisse berichteten Lu und Kollegen, die Kinectin mit Serex aus einer Blasenkarzinom-Zelllinie (T24) kloniert und in 9/39 Seren von Patienten mit Morbus Behcet Autoantikörper fanden, nicht jedoch in 20 Kontrollseren. Beide Arbeitsgruppen identifizierten somit Kinectin als Autoantigen (Hirano et al., 2003; Lu et al., 2005). Diese Annahme war neben den eigenen Daten durch die Ergebnisse zu dem Mamma- und Magenkarzinomantigen NGO-Br-1 bzw. NGO-St-47 (je 30/100 positive Normalseren) (SEREX-Datenbank) bestätigt worden.

MU-OS-177-18: Dass bei Patienten mit Systemischer Sklerose Autoantikörper gegen einzelne Vertreter aus der Gruppe der *centromeric proteins* (CENPs) auftreten können, ist gut bekannt (Rattner et al., 1996). Gegen das putative Homolog des OS-Antigens, CENP-E, hatten 15/60 Seren betroffener Patienten reagiert, und unter den positiven Seren fanden sich in 14/15 Fällen auch Antikörper gegen andere CENPs. Alle Patienten mit CENP-E-Antikörpern wiesen interessanterweise eine weniger ausgeprägte Form der Systemischen Sklerose, bekannt als CREST-Syndrom, auf (Rattner et al., 1996).

Produkte der Gene ROCK2, Gal 1 und hSLK waren bislang nur im Kontext von Malignomen als immunogen vorbeschrieben

MU-OS-177-13.2: Die putativen ROCK2-Homologe NW-TWe 37, HOM-HCC-25.2 und HOM-HCC-25.7 waren mit SEREX aus Testis und Leberzellkarzinomen kloniert und jeweils mithilfe von Serum (1/1) eines Patienten mit Kolorektalem Karzinom (NW-TWe 37) und Leberzellkarzinomen (HOM-HCC-25.2, HOM-HCC-25.7) isoliert worden. Weitere serologische Untersuchungen wurden nicht durchgeführt (SEREX- Datenbank) (**Tab. IV.2b**).

MU-OS-177-15: Das putative LGALS1-Homolog NY-SAR-44 war von Scanlan und Kollegen mithilfe der SEREX-Methode mit autologem Serum aus einem Fibrosarkom isoliert

worden. Anschlussuntersuchungen mit weiteren Seren fehlen (SEREX-Datenbank) (**Tab. IV.2c**).

MU-OS-177-16: Das putative, ubiquitär exprimierte hSLK-Homolog se20-9 war mit Hilfe von Serum von Patienten mit kutanem T-Zell-Lymphom (CTCL) (Sézary Syndrom und Mycosis Fungoides) in Hodengewebe identifiziert und als Tumorantigen vorgeschlagen worden (0/5 positive Normalsern) (Eichmuller et al., 2001). Da die Autoren nur sehr wenige Proben von gesunden Kontrollen untersucht hatten, und in der eigenen Arbeit eine deutliche Reaktivität mit mehreren frisch absorbierten Kontrollseren gefunden wurde, muss wohl auch dieses Antigen als Autoantigen eingruppiert werden.

IV.3. Untersuchungen zur Expression der Osteosarkomantigene

IV.3.1. Literatur- und Datenbankrecherche zur Expression

Um überflüssige eigene Experimente zur mRNA-Expression der SEREX-definierten OS-Antigene zu vermeiden, wurde zunächst in Literatur und Datenbanken nach Angaben zum Expressionsmuster der bekannten, homologen cDNAs gesucht (**Tab. IV.4**).

Für alle antigenkodierenden Gene war eine Expression in Normal- und Tumorgewebe vorbeschrieben

Viele der homologen cDNAs waren aus verschiedenen Normal- und Tumorgeweben kloniert worden, so dass anzunehmen war, dass die Gene sehr breit oder ubiquitär exprimiert werden (NCBI) (vgl. **Kap. IV.3.** und **Tab. IV.4**).

Für die mRNA der Antigene MU-OS-177-6 (PCIA 1-cDNA-Homolog), MU-OS-177-17 (SPATA 18-cDNA-Homolog), MU-OS-177-19 (T9SPM2P-cDNA-Homolog) und MU-OS-177-9 (RPN 2-cDNA-Homolog) stützen sich die Angaben zum Vorkommen in verschiedenen Normal- und Tumorgeweben lediglich auf die Daten zur Klonierung des cDNA-Homologs und auf Daten der *expressed sequence tags* (EST)-Datenbank (NCBI); gezielte Expressionsanalysen sind nicht publiziert.

Für die nachfolgenden Gene sind bereits von anderen Arbeitsgruppen gezielte Expressionsanalysen durchgeführt worden. In allen Fällen wurde ein sehr breites bzw. ubiquitäres Expressionsmuster festgestellt:

Auf Northern Blot-Analysen stützen sich die Angaben zu den Genen *HSPH1/ KIAA0201* (Ishihara et al., 1999; Nakatsura et al., 2001; Chano et al., 2004)(www.kazusa.or.jp/huge), *U2AF1-RS2* (Tronchere et al., 1997), *NM23-H2* (Stahl et al., 1991), *EEA1* (Mu et al., 1995), *KTNI/ KIAA0004* (www.kazusa.or.jp/huge), *hSLK/ KIAA0204* (Sabourin und Rudnicki, 1999; Sabourin et al., 2000; Yamada et al., 2000) (www.kazusa.or.jp/huge).

Daten aus RT-PCR-Analysen fanden sich für die Gene *PRKWNK1/ KIAA0344* (www.kazusa.or.jp/huge), *KIAA1866* (www.kazusa.or.jp/huge), *ROCK 1* (Yoshinaga et al., 2003; Zhao und Rivkees, 2004), *ROCK 2/ KIAA0619* (Ishikawa et al., 1998) (www.kazusa.or.jp/huge), *KTNI* (Wang et al., 2004), *hSLK* (Eichmuller et al., 2001).

Immunhistochemische Analysen gab es lediglich für *HSPH1* (Nakatsura et al., 2001; Kai et al., 2003) und *HOMER3* (Xiao et al., 1998).

Für einzelne der antigenkodierenden Gene war eine Überexpression in verschiedenen Tumorgeweben bzw. eine Expression im Zusammenhang mit Tumorstadium vorgeschrieben

MU-OS-177-1: Kai und Kollegen hatten mittels immunhistochemischer Analysen gezeigt, dass das putative Homolog HSP105 (*HSPH1*) in vielen malignen Tumoren überexprimiert wird (Kai et al., 2003). Nakatsura und Kollegen hatten mithilfe von Northern Blot-Analysen eine Überexpression von *HSPH1*-mRNA in verschiedenen Kolonkarzinomen und Zelllinien des Pankreaskarzinoms gegenüber den entsprechenden Normalgeweben beschrieben (Nakatsura et al., 2001). In Varianten der menschlichen OS-Zelllinie U-2 OS mit *multidrug resistance* (MDR) war HSP105 von Chano und Kollegen mittels Northern Blot-Analysen als eines der Gene beschrieben worden, die bei MDR selektiv hochreguliert und an der Entwicklung von MDR beteiligt sind (Chano et al., 2004).

MU-OS-177-7: Von der homologen cDNA MEL4B3 (AJ586132) wurde berichtet, dass sie in Hautfibroblasten, die in Kokultur mit einer Melanom-Zelllinie wuchsen, exprimiert wird. Die Autoren zeigten, dass MEL4B3 im malignen Melanom, Basalzell- und Plattenepithelkarzinom, jedoch auch in Psoriasis-Läsionen exprimiert und durch proinflammatorische Zytokine induziert wird (Anderegge et al., 2005).

MU-OS-177-8: NM23-Proteine werden in verschiedenen Tumortypen exprimiert und sind über bisher unbekannte Mechanismen an der Kontrolle von Tumormetastasierung beteiligt. Von Rosengard und Kollegen war *nm23* als Gen identifiziert worden, das in bestimmten Tumorzellen mit hohem metastatischem Potential herunterreguliert ist (Rosengard et al., 1989). In anderen Tumortypen war dagegen eine positive Korrelation der Überexpression von

nm23 mit deren metastatischer Ausbreitung gefunden worden (Engel et al., 1993; Ji et al., 1995).

MU-OS-177-15: Van den Brule und Kollegen hatten eine Überexpression von LGALS1 in zahlreichen Tumorgeweben sowie eine positive Korrelation seiner Expression mit der Aggressivität und dem metastatischen Potential dieser Tumoren beobachtet (van den Brule et al., 2004).

MU-OS-177-16: Mit Hilfe von Microarray-Analysen war gezeigt worden, dass Ezrin, eine der in Antigen MU-OS-177-16 enthaltenen Domänen, in murinen Rhabdomyosarkom- und OS-Zelllinien mit hohem Metastasierungspotential signifikant höher exprimiert wird als in nicht-metastasierenden Kontrollen (Khanna et al., 2001; Yu et al., 2004).

Gen	MU-OS-Antigen-gruppe	Genexpression in Normalgewebe	Genexpression in Tumorgewebe	Referenzen (Methode)
<i>HSPH1</i>	177-1	Testis, Magen, Ösophagus, Pankreas, Leber, Gehirn, Lunge, Herzmuskel, Kolon, Dünndarm, Milz, Thymus	Embryonales Ca; Kolorektales Ca, Pankreas Ca; Schilddrüsen-Ca, Ösophagus-Ca, Mamma-Ca, Blasen-Ca, Inselzell-Tumor, malignes Magen-Lymphom, Phäochromozytom, Seminom, Hepatozelluläres Ca, diverse Pankreaskarzinom-Zelllinien, HeLa-Zellen, Leiomyosarkom, U-2 OS-Zellen Überexpression in Tumoren, besonders bei MDR-OS	Nakatsura et al., 2001 (N, I) Ishihara et al., 1999 und 2003 (N) Kai et al., 2003 (I) NCBI (K) www.kazusa.or.jp/huge (N) Chano et al., 2004 (N)
<i>PRKWNK1/KIAA0344</i>	177-2	Niere, Testis; Herz, Gehirn (nicht Milz und Dünndarm)	Chorion-Ca	NCBI (K) www.kazusa.or.jp/huge (P)
<i>HOMER3</i>	177-3	Gehirn, Thymus, Lunge, Plazenta	Leiomyosarkom	Xiao et al, 1998 (I) NCBI (K)
<i>FLJ39610</i>	177-4	Lunge, Trachea, Testis, Uterus	Neuroblastom, Leiomyosarkom	NCBI (K)
<i>U2AF1-RS2</i>	177-5	Ubiquitär; Gehirn	Leiomyosarkom	Trochère et al., 1997 (N) NCBI (K)

Tab. IV.4a. Gewebeexpression der Osteosarkomantigen-kodierenden Gene aus der Gruppe MU-OS-177-1 bis -5: Ergebnisse der Literatur- und Datenbankrecherche (NCBI)

Die homologen Referenz-cDNAs waren entweder aus den hier genannten Geweben kloniert worden (NCBI), oder es lagen von anderen Arbeitsgruppen publizierte Expressionsanalysen mittels RT-PCR (P), Northern-Blot-Hybridisierung (N) oder In situ-Hybridisierung (ISH) bzw. Immunhistochemie (I) vor. K = Klonierung des Homologs.

Gen	MU-OS-Antigen-gruppe	Genexpression in Normalgewebe	Genexpression in Tumorgewebe	Referenzen (Methode)
<i>PCIA1</i>	177-6	Gehirn, Lunge, Plazenta, B-Zellen; fetale Lunge, Nervus ischiadicus, fetales Pankreas, seneszente Fibroblasten	Bronchial-Ca, Nasopharynx-Ca, Ovarial- Ca, Leukämiezellen, Hämangiom, HeLa-Zellen, Zungen-Ca, Melanom	NCBI (K, E)
<i>FNDC1</i> <i>KIAA1866</i>	177-7	Gehirn, Lymphknoten, Epidermis, Fibroblasten, Synovial-Zellen; ubiquitär – bes. Herz, Ovar, Skelett-muskel, Lunge, Niere, Pankreas	Malignes Melanom, Basalzell-Ca, Plattenepithel-Ca	NCBI (K) www.kazusa.or.jp/ huge (P) Anderegg et al., 2005 (ISH)
<i>NM23-H2</i>	177-8	Testis, Gehirn, Skelettmuskel, Niere, Milz, Leber, Pankreas, Bronchus, Ovar, T-Zellen	Gliom, Meningeom, Melanom, Bronchial-Ca, Hepatozelluläres Ca, Prostata-Ca, Rektum-Ca, Kolon-Ca, Mamma-Ca, Retinoblastom, HeLa-Zellen Korrelation mit metastatischem Potential?	Stahl et al., 1991 (N) Schmits et al., 2002 (N) NCBI (K) Rosengard et al., 1989 Ji et al., 1995
<i>RPN2</i>	177-9	Plazenta; Pterygeum, T-Zellen (Jurkat)	Rhabdomyosarkom, Pankreas-Ca, Chorion-Ca, Neuroblastom	NCBI (K, E)
<i>GOLGA1</i>	177-10	Gehirn, Testis	HeLa-Zellen	NCBI (K)
<i>EEA1</i>	177-11	Fetale Niere	HeLa-Zellen	NCBI (K) Mu et al., 1995 (I)
<i>UACA</i>	177-12	Skelettmuskel, Choroidea, Retina, Melanozyten, Schilddrüse; Gehirn,	Leiomyosarkom; Schilddrüsen-Ca-Zelllinien	Yamada et al., 2001 (P) Ohkura et al., 2004 (I) NCBI (K)
<i>ROCK1</i>	177-13.1	Gehirn, Thrombozyten; Umbilikalgefäßendothel. Endokard		NCBI (K) Yoshinaga et al., 2003 (P) Zhao und Rivkees, 2004 (P)
<i>ROCK2/</i> <i>KIAA0619</i>	177-13.2	Gehirn; ubiquitär-bes. Lunge, Niere, Ovar		NCBI (K) Ishikawa et al., 1998 (P) www.kazusa.or.jp/ huge (P)

Tab. IV.4b. Gewebeexpression der Osteosarkomantigen-kodierenden Gene aus der Gruppe MU-OS-177-6 bis -13: Ergebnisse der Literatur- und Datenbankrecherche (NCBI)

Die homologen Referenz-cDNAs waren entweder aus den hier genannten Geweben kloniert worden (NCBI), oder es lagen von anderen Arbeitsgruppen publizierte Expressionsanalysen mittels RT-PCR (P), Northern-Blot-Hybridisierung (N) oder In situ-Hybridisierung (ISH) bzw. Immunhistochemie (I) vor. K = Klonierung des Homologs.

Gen	MU-OS-Antigen-gruppe	Genexpression in Normalgewebe	Genexpression in Tumorgewebe	Referenzen (Methode)
<i>KTNI/ KIAA0004</i>	177-14	Ubiquitär-bes. Testis, Skelettmuskel, Herzmuskel, Niere; hämatopoetische Zellen, Gehirn, Ovar, Leber	Bronchial-Ca, Hepatozelluläres Ca	Hirano et al., 2003 (I) Wang et al. 2004 (P) NCBI (K) www.kazusa.or.jp/ huge (N) van den Brule, 2004 (Ü)
<i>LGALS1</i>	177-15	Lunge, Plazenta Versch. Immunzellen	Melanom, Hepatom In Tumorgewebe überexprimiert, Korrelation mit metastatischem Potential	NCBI (K) Liu, 2005 (Ü)
<i>hSLK/ KIAA0204</i>	177-16	Ubiquitär; Gehirn, Testis	Bronchial-Ca, CTCL, Leukämie- Zellen, Melanom, Retinoblastom	Sabourin et al., 1999 und 2000 (N) Yamada et al., 2000 (N) Eichmüller et al., 2001 (P) www.kazusa.or.jp/ huge (N), NCBI (K)
<i>SPATA18</i>	177-17	Gehirn, Testis, Blutzellen,; Inselzellen, Glandula parathyroidea, Leber, Mamma, fetales Herz, Auge	Parathyroidea-Tumor, Ovarial-Tumor	NCBI (K, E)
<i>CENP-E</i>	177-18	fetales Gehirn	Mamma-Ca-Zelllinie	NCBI (K) Yen et al, 1992 (K)
<i>T9SPM2P</i>	177-19	Plazenta; Inselzellen, fetale Cochlea, fetale Leber, fetale Milz, fetales Herz	Dermoid-Tumor; Insulinom, AML- Zellen,	NCBI (K, E)

Tab. IV.4c. Gewebeexpression der Osteosarkomantigen-kodierenden Gene aus der Gruppe MU-OS-177-14 bis -19: Ergebnisse der Literatur- und Datenbankrecherche (NCBI)

Die homologen Referenz-mRNAs waren entweder direkt aus den hier genannten Geweben kloniert worden (NCBI), oder es liegen von anderen Arbeitsgruppen publizierte Untersuchungen zur Expression mittels RT-PCR bzw. Northern Blot oder immunhistochemischer Analysen vor. N = Northern Blot, P = RT-PCR, E = EST-Datenbank, I = Immunhistochemie, ISH = In-situ-Hybridisierung, K = Klonierung des Homologs, Ü = Übersichtsartikel.

IV.3.2. mRNA-Expressionsanalyse mittels RT-PCR

Mittels RT-PCR wurde die mRNA-Expression der neuen CENP-E-Spleißvariante, die das Antigen MU-OS-177-18 kodierte, in einer repräsentativen Sammlung von 16 Normalgeweben (Herz, ZNS, Plazenta, Lunge, Leber, Skelettmuskel, Niere, Pankreas, Milz, Thymus, Prostata, Testis, Ovar, Dünndarm, Kolon, PBL) und 13 pädiatrischen Tumoren (sieben Neuroblastomen, drei Medulloblastomen, einem Rhabdomyosarkom, einem Hepatoblastom und einem Ewingtumor) untersucht. Die verwendeten Primerpaare hybridisierten jeweils mit

Sequenzen auf zwei verschiedenen Exons. Sie sind schematisch in Abbildung 19 eingetragen (vgl. **Kap. IV.1.**).

Die neue -mRNA-Variante des CENP-E kommt in zahlreichen Normalgeweben und Tumorgeweben vor

Die mRNA von MU-OS-177-18 war gegenüber der CENP-E-mRNA (NM_001813) aus Mammakarzinomgewebe durch das Fehlen von Exon 38 (e38) und zusätzliche Sequenzen des Exons 40 des *CENP-E*-Gens (Exon 7 in cDNA 268, +e7) charakterisiert (vgl. **Abb. IV.18**). Sie zeigte in den untersuchten Normal- und Tumorgeweben im Vergleich zur CENP-E-mRNA eine wesentlich breiter gestreute Expression (**Abb. IV.21**).

Die MU-OS-177-18-Variante „-e38“ fand sich in 13/16 untersuchten Normalgeweben (nicht in Skelettmuskel, Prostata und Dünndarm) und in 7/13 Tumorgeweben (2/6 Neuroblastomen, 2/4 Medulloblastomen, 1/1 Embryonalen Tumor, 1/1 Nephroblastom, 1/1 Ewingtumor) und konnte bei Analyse der Exon 40-Region (+e7) in 14/16 Normalgeweben (nicht in Milz und PBL) und in 6/13 Tumorgeweben (1/6 Neuroblastom, 2/4 Medulloblastom, 1/1 Embryonaler Tumor, 1/1 Nephroblastom und 1/1 Ewingtumor) nachgewiesen werden.

Dagegen war die CENP-E-Variante „+e38“ in nur 1/16 Normalgeweben (Testis) und die Variante „-e7“ in 7/16 Normalgeweben (Herz, Niere, Pankreas, Thymus, Prostata, Testis, PBL) exprimiert. Diese Spleißvarianten ließen sich in keinem der untersuchten pädiatrischen Tumorgewebe nachweisen.

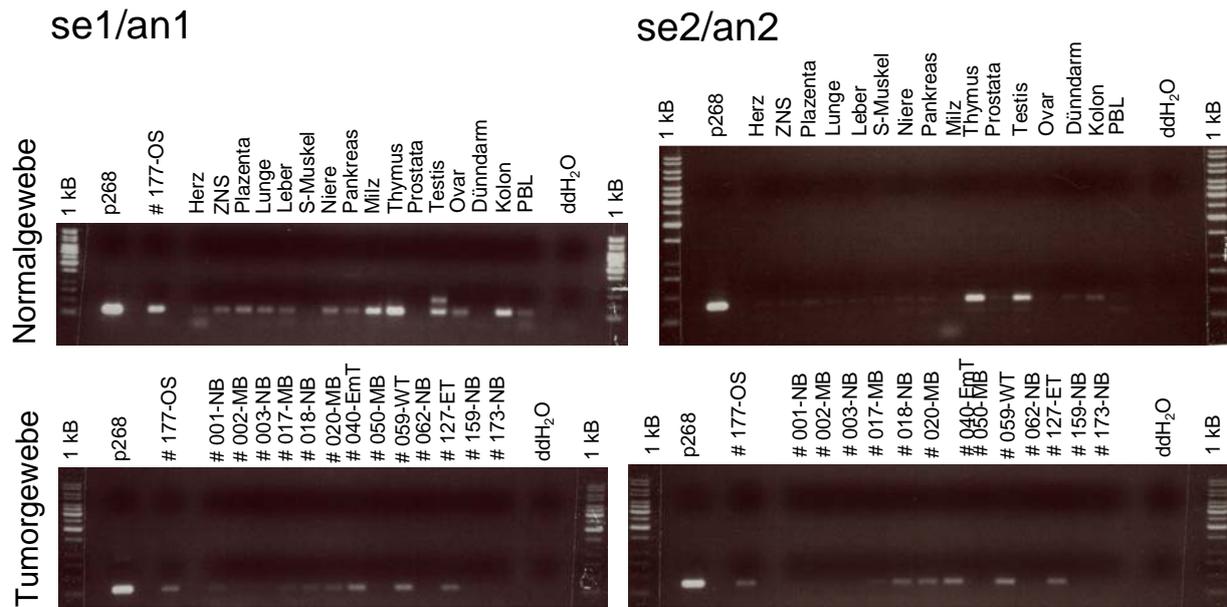


Abb. IV.21. mRNA-Expressionsanalyse von MU-OS-177-18 mittels RT-PCR mit jeweils zwei Primer-Paaren (se1/an1, se2/an2).

Die Amplifikationsprodukte wurden auf einem 1 %-igen Agarosegel mit Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht. Die flankierenden Spuren enthalten jeweils einen Größenstandard als Referenz (1 kb). Die Amplifikationsprodukte für die Variante –e7 sind nur schwach sichtbar (Foto oben rechts). NB: Neuroblastom, MB: Medulloblastom, EmT: Embryonaler Tumor, WT: Nephroblastom, ET: Ewing Tumor.

V. DISKUSSION

V.1. Dominante Rolle von Autoantigenen bei der Immunerkennung des Osteosarkoms

Um neue Antigene des OS zu identifizieren, wurde in der vorliegenden Arbeit die cDNA-Expressionsbibliothek eines lokalisierten *high grade* OS mithilfe von autologem Serum und Serum von vier weiteren, an einem OS erkrankten Patienten untersucht. Auf diese Weise wurden 20 verschiedene Antigene identifiziert, die 20 verschiedenen Genen bzw. Gruppen zugeordnet werden konnten.

Für acht der 20 Antigengruppen wurde die Immunogenität erstmals in der vorliegenden Arbeit dokumentiert. Für die restlichen zwölf Gruppen lagen bereits Evidenzen für eine Erkennung durch Serumantikörper vor. Neun der zwölf Gruppen enthielten vorbeschriebene Autoantigene. Drei Gruppen waren durch SEREX-Antigene anderer Autoren vorcharakterisiert, allerdings waren diese nicht bzw. nicht positiv auf eine Reaktivität mit Serum von gesunden Probanden und/oder Patienten mit Autoimmunerkrankungen getestet worden.

In der eigenen Arbeit wurden alle 20 Antigengruppen aufgrund ihrer eindeutigen Reaktivität mit Serum von gesunden Probanden als Autoantigene klassifiziert. Ein klassisches Tumorantigen fand sich überraschenderweise und im Gegensatz zu vielen anderen SEREX-Analysen pädiatrischer Malignome durch die eigene (Behrends et al., 2002; Behrends et al., 2003) (Golbeck, 2006; Götz, 2006; Rößler, 2006; Schneider, 2006; Jandl, 2007) und durch fremde Arbeitsgruppen (Tureci et al., 1997; Scanlan et al., 2002; Jager et al., 2004) nicht. Dies ließ auf eine immuntherapeutisch besondere Stellung des OS schließen.

Im Folgenden sollen zunächst die neuen molekularen Charakteristika der identifizierten, putativen Antigene besprochen (vgl. **Kap. V.2.**), dann die spezielle Bedeutung der jeweiligen Antigengruppen im Kontext von Tumoren diskutiert (vgl. **Kap. V.3.**), methodische Aspekte der Antigenklassifizierung kommentiert (vgl. **Kap. V.4.**), die biologische und klinische Bedeutung der humoralen Immunantwort im Kontext von Tumoren beleuchtet (vgl. **Kap. V.5.**), und schließlich die Rolle von Tumor- und Autoantigenen als mögliche Zielstrukturen der Immuntherapie erörtert werden (vgl. **Kap. V.7.**).

Die in den nachfolgenden Abschnitten diskutierten, putativen Antigene entsprechen jeweils den Produkten der in den Abbildungen des Ergebnisteils grün dargestellten ORF (vgl. **Kap. IV.1.**).

V.2. Neue molekulare Aspekte der identifizierten Autoantigene

Wie viele andere SEREX-Analysen trug auch die eigene dazu bei, neue Genprodukte zu identifizieren. An dieser Stelle sollen die wichtigsten, neuen Erkenntnisse zur Struktur der putativen Antigene zusammengefasst werden. Sie betreffen ein ganz neues Protein, zwei neue Spleißvarianten und drei neue Genprodukte von alternativen ORF.

Interessant waren die langen cDNAs der Gruppe **MU-OS-177-4**, die für ein neues, großes, polymorphes Protein kodierten. Bis kurz vor Fertigstellung der eigenen Arbeit waren nur Fragmente der langen cDNAs kloniert worden und das gemeinsame Gen deshalb unbekannt geblieben³. Eine Homologierecherche über die Grenze der Spezies Mensch hinaus legte nahe, dass es sich bei dem großen Genprodukt um ein evolutionär hochkonserviertes, filamentöses Protein handelte. Ob die in der Computer-basierten Domänenanalyse angegebenen, fraglichen Smc-Domänen des Proteins tatsächlich funktionell von Bedeutung sind und eine Rolle des Proteins bei der Chromosomen-Dynamik spielen, ist bislang unbekannt.

Die Antigene MU-OS-177-12c und MU-OS-177-18 wurden von neuen Spleißvarianten kodiert. Die für **MU-OS-177-12c** kodierende cDNA enthielt ein alternatives erstes Exon mit Translationsstartsignal, weshalb der N-Terminus des putativen Antigens von dem der homologen UACA-Variante abwich. Der neue, 26 AS lange N-Terminus könnte theoretisch für ein oder mehrere Neopepitope kodieren. Die Gewebeverteilung dieser neuen Spleißvariante wurde bislang nicht untersucht. Die Struktur des putativen Antigens **MU-OS-177-18** wich an zwei Stellen vom homologen Protein CENP-E ab. Durch das Fehlen von Exon 38 der Referenz-cDNA und Nutzung eines unterschiedlichen Spleißakzeptors war ein Protein entstanden, in dem die 95 AS lange, von Exon 38 kodierte Sequenz durch eine einzelne, neue Aminosäure ersetzt war. Außerdem enthielt das putative Antigen MU-OS-177-18 als Folge alternativen Spleißens weiter stromabwärts eine neue 36 AS lange Sequenz, die von einem in CENP-E herausgespleißten Abschnitt des Exon 40 kodiert wurde. Bei der durchgeführten RT-PCR-Analyse zum Vorkommen der bekannten und neuen mRNA-Variante zeigte sich, dass es sich in beiden Fällen um Wildtyp-Varianten der CENP-E-mRNA handelte.

Drei der mit SEREX identifizierten Antigene (**MU-OS-177-6, -17, -19**) waren vermutlich von einem kurzen, alternativen Leserahmen kodiert worden, der in der vormals als 3'UTR bezeichneten Region der PCIA1-, SPATA18- bzw. T9SPM2P-cDNA enthalten war. Da nur diese Region kloniert worden war, musste das antikörperbindende Antigen auch *in vivo* von

³ Während der Fertigstellung dieser Arbeit fiel bei der Aktualisierung der Literatur auf, dass dieses Protein unabhängig von der eigenen Arbeit am 18.11.2006 unter der Bezeichnung *coiled-coil domain containing 46 isoform a* (CCDC46) in die NCBI-Datenbank aufgenommen worden ist.

diesem Abschnitt kodiert worden sein. Um die Immunerkennung der alternativen Genprodukte zu beweisen, könnte man sie in Anschlußanalysen rekombinant exprimieren und nach Aufreinigung mit dem relevanten Serum testen. Beispiele für immunogene Genprodukte von alternativen ORF der ‚3'-UTR' waren in der eigenen Arbeitsgruppe auch in Neuroblastom-, Medulloblastom- und Rhabdomyosarkomgewebe identifiziert worden (Behrends et al., 2002; Behrends et al., 2003) (Götz, 2006). Hier handelte es sich jeweils definitionsgemäß um Tumorantigene. Die eigene Arbeit belegte erstmals, dass auch Autoantigene von alternativen 3'-ORF kodiert werden können.

V.3. Evidenzen für eine pathogenetische, diagnostische und/oder therapeutische Bedeutung der identifizierten Autoantigene im Kontext von malignen Tumoren

Zusammenfassend fällt auf, dass mit SEREX diverse, wichtige Schlüsselproteine der Zellhomöostase kloniert wurden. Die putativen Antigene MU-OS-177-10, und -11 sind am vesikulären Transport, MU-OS-177-9 an der N-Glykosylierung im endoplasmatischen Retikulum, MU-OS-177-2, -3, -8, -13.1, -13.2, -16 an der intrazellulären Signalübertragung und MU-OS-177-14 und -18 an intrazellulären Transportprozessen beteiligt. SEREX-Analysen können somit entscheidend zur Aufklärung der molekularen Zusammensetzung von Tumoren beitragen und auf diese Weise mögliche therapeutische bzw. diagnostische Zielstrukturen aufdecken. Die spezifische Bedeutung der mit SEREX klonierten Antigene im Kontext von Tumoren muss in vielen Fällen noch durch zusätzliche funktionelle und Expressionsanalysen weiter charakterisiert werden. Eine Expression in OS *ex vivo* war bislang für keines der identifizierten Antigene beschrieben worden. Die verfügbaren Evidenzen für eine klinisch-biologische Bedeutung der einzelnen Antigene im Kontext von Malignomen werden im Folgenden gesondert diskutiert.

Die putativen Antigene der Gruppe **MU-OS-177-1** gehörten zur Familie der HSP und entsprachen den vom *HSPH1*-Gen kodierten Spleißvarianten HSP105 α und β . HSP erlauben der Zelle als molekulare Chaperone eine Anpassung an sonst tödliche Umweltbedingungen und spielen deshalb eine wichtige Rolle in der Entscheidung über Leben oder Tod der Zelle (Chen et al., 2003). HSP105-Varianten wurden mit SEREX bereits aus verschiedenen, anderen Malignomen kloniert (Scanlan et al., 1998; Nakatsura et al., 2001) und werden in zahlreichen Normal- und Tumorgeweben exprimiert. Mehrere Autoren hatten gezeigt, dass das *HSPH1*-Gen in verschiedenen Tumoren und Tumorzelllinien überexprimiert wird (Nakatsura et al., 2001; Kai et al., 2003) und mit der tumorassoziierten Inhibition der Apoptose in Zusammenhang steht (Ceballos et al., 2005; Hosaka et al., 2006; Yamagishi et

al., 2006). Eine Expression des *HSPH1*-Gens wurde auch mit der Entwicklung von komplexer Chemotherapieresistenz (MDR) beim OS in Zusammenhang gebracht (Chano et al., 2004). Am Beispiel des HSP90 wurde gezeigt, dass die HSP-Wirkung in Zelllinien von Mammakarzinomen, Hodgkin-Lymphomen und pädiatrischer solider Tumoren, inklusive OS, gezielt antagonisiert werden kann (Isaacs et al., 2003; Broemer et al., 2004; Bagatell et al., 2005; Xu und Neckers, 2007), so dass sich auf dieser Basis möglicherweise auch im Kontext von OS therapeutische Optionen ergeben. Interessanterweise ist die T-Zellerkennung des HSPH1 bereits gut belegt und HSPH1 in DNA- und Protein-Vakzinierungsexperimenten mit Mäusen als Zielantigen bei der Tumorabstoßung identifiziert worden (Miyazaki et al., 2005; Yokomine et al., 2006). Dass das Vorkommen von HSP-Antikörpern prognostische Bedeutung haben kann, wurde im Kontext von Mammakarzinomen und OS belegt (Conroy et al., 1998; Trieb et al., 2000b) (vgl. **Kap. V.5**). Bei HSP105/HSPH1 könnte es sich damit um ein interessantes Zielantigen neuer diagnostischer und therapeutischer Ansätze im Kontext des OS und anderer Tumoren handeln.

Die Antigene der Gruppe **MU-OS-177-2** gehörten in die Gruppe der Serin/Threonin Proteinkinase, die den MAP-Kinase-Signalweg regulieren (Xu et al., 2004; Sun et al., 2006) (vgl. MU-OS-177-16). *PRKWNK1* wurde als Substrat der AKT-Kinase beschrieben (Vitari et al., 2004; Jiang et al., 2005), die in der Regulation der Apoptose eine zentrale Stellung einnimmt und in zahlreichen Tumoren konstitutiv aktiviert ist. Mit SEREX waren bislang keine Produkte des *PRKWNK1*-Gens kloniert worden. Als Hinweis auf eine Expression auch in anderen Tumoren fanden sich aber homologe cDNA-Sequenzen aus einem Chorionkarzinom (NCBI GenBank). Da bislang keine Expressionsstudien in Tumoren vorliegen, kann zu einer möglichen Überexpression in Tumoren und damit verbundener, möglicher Dysregulation der Apoptose noch keine Aussage getroffen werden.

Über das Homolog des Antigens **MU-OS-177-3**, *HOMER3*, war bisher sehr wenig bekannt. Das Protein spielt vermutlich eine Rolle bei der intrazellulären Signalübertragung durch Kalzium (Tu et al., 1998) und wird deshalb vor allem in der Neurobiologie intensiv beforscht (Szumlinski et al., 2006). Eine Immunogenität von *HOMER3*-Genprodukten wurde in der eigenen Arbeit zum ersten mal dokumentiert. Abgesehen davon, dass die cDNA auch aus einem Leiomyosarkom kloniert worden war (NCBI GenBank), ist über die Expression und mögliche pathogenetische, diagnostische und/oder therapeutische Bedeutung in Tumoren nichts bekannt.

Bei dem Antigen **MU-OS-177-4** handelte es sich um ein in der Evolution hoch konserviertes Protein von 955 AS Länge mit unbekannter Funktion, das in der Literatur in dieser Form noch

nicht beschrieben war². Die hohe Konservierung (eigene Protein-Homologierecherche, NCBI blastp) sprach dafür, dass dieses Protein eine wichtige Funktion erfüllt. Die Computer-basierte Domänenanalyse deutete auf ein filamentöses Protein mit coiled-coil Strukturen hin, das fragliche Homologie zu Proteinen der Smc-Familie besitzt. Homologe Transkripte waren aus verschiedenen Normalgeweben sowie aus Neuroblastom- und Leiomyosarkomgewebe kloniert worden, so dass eine breite Expression anzunehmen ist. Bislang waren keine immunogenen Produkte des kodierenden Gens beschrieben worden. Die unterschiedliche Reaktivität der beiden überlappenden cDNA Klone 53 (MU-OS-177-4b) und 38 (MU-OS-177-4a) in der differentiellen Serumanalyse (vgl. **Tab. IV.3**) sprach dafür, dass das Produkt der längeren cDNA 53 an seinem erweiterten N-Terminus ein zusätzliches Antikörperepitop enthielt. Um dies zu verifizieren, müssten N- und C-Terminus des Proteins getrennt zur Expression gebracht werden. Im Hinblick auf einen möglichen Einsatz des Proteins als immunologische Zielstruktur wäre es bedeutsam, mehr über die Expression dieses potentiell wichtigen Proteins in normalen und Tumorzellen zu wissen.

Bei dem Antigen **MU-OS-177-5** handelte es sich um den Spleißfaktor U2AF1-RS2, der zur Erkennung von funktionellen 3'-Spleißerkennungsstellen beim Spleißen von Prä-mRNA beiträgt (Tronchere et al., 1997; Mollet et al., 2006; Soares et al., 2006). Das Antigen war mit SEREX bereits aus mehreren Tumorentitäten kloniert worden und zeigte in der eigenen Analyse keine neuen molekularen Charakteristika. U2AF1-RS2 wird in Normalgeweben ubiquitär exprimiert und hatte sich in differentiellen Serumanalysen anderer Untersucher bereits als ein typisches Autoantigen erwiesen. Bislang wurden keine Evidenzen zur pathogenetischen oder klinischen Bedeutung dieses Spleißfaktors im Kontext von Tumoren publiziert.

Das 30 AS lange Antigen **MU-OS-177-6** wurde von einem bislang nicht beschriebenen, alternativen ORF translatiert. Entsprechend war über seine Funktion nichts bekannt, und es gab bislang keine Daten zur Immunogenität. Ob der alternative ORF nur in Tumoren exprimiert wird oder auch für normale Gewebe relevant ist, wurde nicht untersucht. Die Tatsache, dass sich Antikörper gegen dieses Genprodukt auch bei gesunden Personen fanden, sprach dafür, dass das Antigen so oder ähnlich auch in gesundem Gewebe vorkommt.

Bei dem Antigen **MU-OS-177-7** handelte es sich um ein hypothetisches Protein, das eine *Fibronectin Typ 3*-Domäne (FN3) enthielt und deshalb FNDC1 genannt wurde. Es war bisher funktionell nicht weiter charakterisiert und nicht als immunogen vorbeschrieben worden. Der Nachweis einer Antikörperantwort gegen das hypothetische Protein lieferte den ersten

² Am 18.11.2006 wurde das gleiche Protein unabhängig von unserer Identifizierung in die NCBI-Datenbank aufgenommen.

sicheren Hinweis auf die Existenz des Proteins. Die kodierende mRNA wird in zahlreichen Normalgeweben und in verschiedenen Hauttumoren exprimiert (Anderegge et al., 2005).

Dem Homolog des Antigens **MU-OS-177-8** wurden eine Reihe unterschiedlicher Funktionen zugeschrieben. Es war als NM23-H2 oder NM23B bezeichnet und einer Genfamilie (NM23-Familie) zugeordnet worden, die eine vielfältige Rolle in der Regulation von Proliferation und Zelldifferenzierung spielt (Gilles et al., 1991; Willems et al., 1998; Pinon et al., 1999; Postel, 2003; Boissan und Lacombe, 2006). Für NM23-H2 war eine NDP-Kinase-Aktivität (NCBI OMIM) (Engel et al., 1995) und Interaktion mit G-Proteinen bzw. Beteiligung an der Regulation der Signaltransduktion durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren postuliert worden (Hippe et al., 2003). Unabhängig davon wurde NM23-H2 als Transkriptionsfaktor identifiziert, der durch Bindung an Polypurin-Sequenzen die *c-myc*-Transkription *in vitro* reguliert (*c-myc purine-binding factor*, PuF) (Postel et al., 1993) und wahrscheinlich an der Deregulierung des translozierten *c-myc*-Allels in Burkitt-Lymphomzellen beteiligt ist (Ji et al., 1995). Eine Überexpression von NM23-H2 in der transformierten, humanen Keratinozytenlinie HaCaT führte zu einer verstärkten Proliferation, verminderten Apoptose und verändertem Differenzierungsverhalten (Braun et al., 2007). Mutationen im homologen *wing discs developmental (awd)*-Protein von *Drosophila* führten zu einer gestörten Gewebemorphologie, Nekrose und aberranten Differenzierungsprozessen, die mit Veränderungen bei maligner Progression verglichen wurden (Dearolf et al., 1988). Die NM23-Proteine scheinen im Kontext von Tumoren duale Funktionen innezuhaben, und die jeweilige Rolle im Kontext einer distinkten Entität muss sorgfältig geklärt werden. NM23-Protein wurde auch auf der Zelloberfläche von maligne transformierten, nicht jedoch normalen hämatopoetischen Zellen beobachtet (Willems et al., 1998), und daher als mögliche Zielstruktur für die Leukämietherapie vorgeschlagen (Okabe-Kado et al., 2002). Das ubiquitär exprimierte NM23-H2 war bereits in verschiedenen Malignomen als SEREX-Antigen beschrieben worden (Schmits et al., 2002) (**Tab. IV.2a**). Da beim OS keine klare Beziehung zu Progression oder Metastasierung festgestellt werden konnte (Oda et al., 1995; Liao et al., 2000), kommt es als therapeutische Zielstruktur beim OS wohl eher nicht in Frage. Ob es sich bei dem Aminosäureaustausch A→T an Position 6 des Antigens MU-OS-177-8 um eine tumorassoziierte Mutation oder einen *SNP* handelte, bleibt zu untersuchen

Bei dem Antigen **MU-OS-177-9** handelte es sich um RPN2, ein in der Evolution hoch konserviertes, ubiquitär exprimiertes Glykoprotein in der Membran des rauhen endoplasmatischen Retikulums (Crimaudo et al., 1987) und Teil des enzymatischen N-Glykosylierungsapparats (Shibatani et al., 2005; Kelleher und Gilmore, 2006). Bislang war

die Immunogenität dieses Proteins unbekannt. Im Kontext von Tumoren war eine Überexpression vorbeschrieben worden, deren Bedeutung jedoch noch nicht genauer untersucht wurde (Hufton et al., 1999). Kürzlich wurde eine Rolle des RPN2 bei der lymphovaskulären Invasion des Magenkarzinoms postuliert (Dicken et al., 2006). Ob es sich bei dem beschriebenen Austausch von Glycin zu Asparagin in Antigen MU-OS-177-9 um eine tumorassoziierte Mutation oder um einen SNP handelte, bleibt noch zu untersuchen.

Bei dem Antigen **MU-OS-177-10** handelte es sich um GOLGA1, das auch als Golgin 97 bezeichnet wird. Golgine sind am vesikulären Transport beteiligt (Barr, 1999). Kürzlich wurde beschrieben, dass das homologe Protein aus *Drosophila* an der Regulation des Zentrosomenzyklus beteiligt ist (Eisman et al., 2006). GOLGA1, ursprünglich als Autoantigen bei Sjögren-Syndrom beschrieben (Griffith et al., 1997), ist mehrfach in der SEREX-Datenbank repräsentiert. Die cDNA wurde aus verschiedenen Normalgeweben sowie HeLa-Zellen kloniert, gezielte Expressionsanalysen oder Daten zu einer spezifischen Rolle im Kontext von Tumoren liegen jedoch nicht vor.

Bei dem Antigen **MU-OS-177-11** handelte es sich um das bekannte Autoantigen EEA-1, ein in der Evolution hoch konserviertes, peripheres Membranprotein, das am Clathrin-vermittelten vesikulären Transport beteiligt ist (Mu et al., 1995; Callaghan et al., 1999a; Callaghan et al., 1999b; Fratti et al., 2003). EEA1 wurde erstmals als Autoantigen bei SCLE (*systemic cutaneous lupus erythematoses*) beschrieben (Mu et al., 1995) und nachfolgend mit diversen rheumatischen Beschwerden in Verbindung gebracht (Waite et al., 1998). Von mehreren Arbeitsgruppen wurde gezeigt, dass EEA-1 an der rezeptorvermittelten Endozytose beteiligt ist (Mace et al., 2005; Zwang und Yarden, 2006), einem Prozess, der eine wichtige Rolle für Proliferations- und Überlebenssignale durch Wachstumsfaktoren, wie z.B. EGF, spielt (Zwang und Yarden, 2006). Gezielte Analysen zur Expression von EEA-1 in normalen oder maligne transformierten Geweben liegen noch nicht vor. Auch die Auswirkungen einer möglichen Überexpression in Tumoren wurden nicht studiert.

Bei dem Antigen **MU-OS-177-12** handelte es sich um das Autoantigen UACA, welches im Kontext von Panuveitis-assoziierten Autoimmunerkrankungen mittels SEREX identifiziert (Yamada et al., 2001) und wiederholt mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen in Zusammenhang gebracht worden war (Ohkura et al., 2004). Laut SEREX-Datenbank wurde eine für UACA kodierende cDNA auch aus einer Reihe verschiedener Tumoren kloniert (**Tab. IV.2b**). Gezielte mRNA-Expressionsanalysen zeigen ein breites Expressionsmuster der vorbeschriebenen UACA-Sequenz in Normalgeweben (Yamada et al., 2001), quantitative Expressionsanalysen mit der Frage einer tumorassoziierten Überexpression finden sich nicht.

Aufgrund eines alternativen Exon-Gebrauchs enthielt MU-OS-177-12c einen neuen N-Terminus, dessen Expression in Normalgewebe bislang nicht untersucht wurde. Die Funktion des UACA in gesundem und maligne transformiertem Gewebe ist bisher nicht bekannt. Im Protein finden sich Ankyrin-Repeats als Protein-Protein-Interaktionsdomänen und eine fragliche Homologie zu Smc-Domänen (vgl. MU-OS-177-4) (eigene Computer-basierte Proteinsequenzanalyse, NCBI blastp).

Bei den Antigenen **MU-OS-177-13.1** und **MU-OS-177-13.2** handelte es sich um die ubiquitär exprimierte Isoenzyme ROCK1 und ROCK2 mit Serin/Threonin-Kinasefunktion und einer zentralen Rolle in der Regulation des Aktin-Zytoskeletts und der Zellmotilität (Amano et al., 2000). Untersuchungen mithilfe eines ROCK-spezifischen Inhibitors ergaben, dass der Rho-ROCK-Signalweg durch die Protoonkogen-Produkte Ras und Raf-1 aktiviert wird (Baccarini, 2005; Ehrenreiter et al., 2005) und bei der Transformation maligner Zellen sowie bei Tumorinvasion und Metastasierung eine wichtige Rolle spielt (Ishizaki, 2003; Suyama et al., 2003; Ying et al., 2006). ROCK2 wurde kürzlich auch als nukleäre Kinase für den Transkriptionscoaktivator p300 beschrieben (Tanaka et al., 2006). ROCK1 und ROCK2 wurden mehrfach als SEREX-Antigene aus verschiedenen Tumoren kloniert und ROCK1 bereits definitionsgemäß als Autoantigen klassifiziert (Uemura et al., 2003). Auch in einem transgenen Mausmodell, in dem es durch Überexpression des Protoonkogens *neu* zur spontanen Entwicklung von Mammakarzinomen kam, konnte eine humorale Immunantwort gegen ROCK1 nachgewiesen werden (Lu et al., 2006).

Bei dem Antigen **MU-OS-177-14** handelte es sich um das ubiquitäre KTN1, das als integrales Membranprotein des endoplasmatischen Retikulums den Kontakt von Zellorganellen zum Motorprotein Kinesin herstellt und beim Transport von Organellen entlang der Mikrotubuli eine wichtige Rolle spielt (Futterer et al., 1995; Yu et al., 1995). Kinectin war zunächst von zwei Arbeitsgruppen als Tumorantigen klassifiziert worden (Stenner-Liewen et al., 2000; Wang et al., 2004), stellte sich jedoch später im Kontext der aplastischen Anämie (Hirano et al., 2003) und der Behcet'schen Autoimmunerkrankung (Lu et al., 2005) passend zu den eigenen serologischen Daten als Autoantigen dar. Interessanterweise war Kinectin bei einer SEREX-Analyse von Leberzellkarzinomgewebe das am häufigsten isolierte Antigen und zeigte in diesem Tumorgewebe acht verschiedene, zum Teil tumorassoziiert überexprimierte Spleißvarianten (Wang et al., 2004). Für die in der eigenen Arbeit klonierte Spleißvariante ist bislang keine tumorassoziierte Überexpression beschrieben. Über die spezifische Rolle der einzelnen Spleißvarianten in gesundem und maligne transformiertem Gewebe ist noch nichts bekannt. Dass das *Kinectin*-Gen in tumorassoziierte Chromosomentranslokationen involviert

sein kann, zeigte der Nachweis einer Translokation t(10;14) in einem kindlichen, strahleninduzierten Schilddrüsenkarzinom; die Fusion der Gene *KTNI* und *RET* vermittelte hier eine Aktivierung des RET-Protoonkogenprodukts (Salassidis et al., 2000).

Bei Antigen **MU-OS-177-15** handelte es sich um das in der Evolution hoch konservierte Gal-1 oder LGALS1 (Houzelstein et al., 2004), das beim mRNA-Spleißen eine Rolle spielt (Vyakarnam et al., 1997; Liu, 2005; Liu und Rabinovich, 2005). Der Familie der Galectine werden darüber hinaus immunmodulatorische Funktionen zugeschrieben (Rabinovich, 2005). LGALS1 wurde bereits als immunogenes Protein in der SEREX-Datenbank erfasst und wird in zahlreichen Tumorgeweben überexprimiert. Verschiedene Autoren konnten zeigen, dass die Expression von LGALS1 mit der Aggressivität und dem metastatischen Potential dieser Tumoren in Zusammenhang steht (Liu und Rabinovich, 2005). Die Bindung von intrazellulärem LGALS1 an das onkogene, membranassoziierte H-RAS wird als essentiell für die Membranverankerung von H-RAS und damit für dessen maligne transformierende Aktivität angesehen (Paz et al., 2001). LGALS1 moduliert die homotypische Zelladhäsion sowie die Interaktion von Tumorzellen mit der extrazellulären Matrix und dem Endothel (Rabinovich, 2005). Darüber hinaus hemmt LGALS1 T-Zell-Aktivierung und -Überleben (Perillo et al., 1995) und blockiert die proinflammatorische Zytokinsekretion (Matarrese et al., 2005). Sternberg-Reed-Zellen sezernieren beim Hodgkin-Lymphom LGALS1 und generieren auf diese Weise ein immuntolerantes Mikromilieu (Gandhi et al., 2007; Juszczynski et al., 2007). Eine Blockade von LGALS1 stimulierte im Tiermodell die tumorspezifische, T-Zell-vermittelte Immunantwort und förderte so die Tumorabstoßung. Entsprechend wurde für LGALS1 eine zentrale Rolle bei der Immunevasion von Tumoren postuliert (Rubinstein et al., 2004). LGALS1 wird deshalb als ein interessantes Zielprotein für die Krebstherapie angesehen.

Bei dem Antigen **MU-OS-177-16** handelte es sich um eine hSLK, der wie anderen Serin/Threonin-Kinasen eine wichtige Rolle bei der intrazellulären Signaltransduktion (Dan et al., 2001) und der Regulation der Apoptose zugesprochen wird (O'Neill et al., 2004; O'Neill et al., 2005). Im hSLK-Protein fand sich bei der eigenen Computer-basierten Proteinsequenzanalyse (NCBI blastp) ein Abschnitt mit gewisser Homologie zu ERM (*ezrin/radixin/moesin*)-Domänen, was darauf hindeuten könnte, dass diese Kinase an der Regulation von Zelladhäsion, -migration und -invasion beteiligt ist (Curto und McClatchey, 2004). Eine Spleißvariante des Antigens war mit SEREX in Hodengewebe identifiziert und entgegen der eigenen serologischen Evidenzen zunächst als Tumorantigen klassifiziert worden (se20-9) (Eichmüller et al., 2001). Das Protein wird in Normal- und Tumorgeweben

breit exprimiert. Bemerkenswerterweise wird Ezrin in murinen Rhabdomyosarkom- und OS-Zelllinien mit hohem Metastasierungspotential signifikant höher exprimiert als in nicht-metastasierenden Kontrollen (Khanna et al., 2001; Yu et al., 2004). Es erscheint daher sehr lohnenswert das Expressionsniveau von hSLK in metastasierten und nicht-metastasierten Tumoren quantitativ zu untersuchen und auf diese Weise eine mögliche Assoziation mit dem Metastasierungspotential zu evaluieren.

Der ORF des Antigens **MU-OS-177-17** fand sich als alternativer Leserahmen in der vormals als 3'UTR bezeichneten Region der humanen SPATA 18 mRNA. Das 73 AS lange Genprodukt dieses ORF war bisher nicht beschrieben worden. Die Tatsache, dass Serumantikörper gegen ein Genprodukt der 3'UTR vorlagen, lieferte den ersten Hinweis auf die mögliche Existenz dieses Proteins. Den einzigen Hinweis auf seine mögliche Funktion lieferte eine fraglich signifikante Homologie zu einer HELZ-Domäne, die eine Beteiligung an RNA-Prozessierung, RNA-Stabilisierung und/oder Translationsinitiation bedeuten könnte (Wagner et al., 1999). Gezielte Untersuchungen zur Gewebeexpression der SPATA18-mRNA liegen noch nicht vor, und die Rolle der kodierten Proteine in gesunden und maligne transformierten Geweben ist noch gänzlich unbekannt.

Bei dem Antigen **MU-OS-177-18** handelte es sich um eine Spleißvariante des CENP-E, welches als Motorprotein an der Chromosomensegregation entlang der Mikrotubuli in der Mitose beteiligt ist (Yen et al., 1991; Yen et al., 1992). CENPs regulieren den Mitose-Checkpoint und verhindern dadurch die Aneuploidisierung der Zelle (Weaver et al., 2003; Weaver et al., 2007).

CENP-E war in der Literatur bereits als immunogen vorbeschrieben worden (Rattner et al., 1996). Die eigenen Untersuchungen zum mRNA-Expressionsmuster legten nahe, dass die neue Spleißvariante etwas häufiger als die bekannte in Normal- und Tumorgeweben exprimiert wird, aber durchaus auch gemeinsam mit letzterer vorkommt. Über mögliche funktionelle Unterschiede der beiden Spleißvarianten ist nichts bekannt. In der Literatur finden sich Hinweise darauf, dass die Expression von anderen CENP-Proteinen (CENP-H und CENP-F) prognostischen Wert haben kann (Liao et al., 2007; O'Brien et al., 2007). Besonders interessant ist, dass Autoantikörper gegen ein weiteres CENP-Protein (CENP-B) beim SCLC (*small cell lung cancer*) bereits als nützliche Tumormarker für Frühdiagnose und Therapieverlauf beschrieben wurden (Briasoulis et al., 2007). Da CENP-E und CENP-F farnesyliert sind, können Farnesylierungsinhibitoren mit der Chromosomensegregation und Checkpointkontrolle in der Mitose interferieren. Ob sich dies als therapeutischer Ansatzpunkt eignet, müssen weitere Untersuchungen zeigen (Schafer-Hales et al., 2007).

Der ORF des Antigens **MU-OS-177-19** fand sich als alternativer ORF in der vormals als 3'UTR beschriebenen Region der T9SM2P-cDNA. Das entsprechende, 26 AS umfassende Genprodukt wurde in der eigenen Arbeit zum ersten Mal beschrieben, und der serologische Nachweis lieferte den ersten Hinweis auf die Existenz eines alternativen, stromabwärts kodierten Genprodukts. T9SM2P-Transkripte waren bereits aus zahlreichen normalen und mehreren Tumorgeweben kloniert worden, gezielte Expressionsanalysen liegen allerdings nicht vor, und die Funktion von T9SPM2P-Genprodukten ist noch gänzlich unbekannt.

V.4. Methodische Anmerkungen zur Klassifizierung von SEREX-Antigenen

Aus der eigenen Beobachtung unterschiedlicher Ergebnisse mit länger gelagerten und frisch aufgetauten, präabsorbierten Serumproben von denselben Kontrollpersonen ließ sich ableiten, dass die Sensitivität der differentiellen Serumanalyse abhängig von der Lagerungszeit der Seren bei 4°C abnimmt. Negative Ergebnisse mit länger bei 4°C gelagerten Seren müssen demnach mit Vorsicht interpretiert und durch Anschlußuntersuchungen mit frisch aufgetauten Proben kontrolliert werden.

In der Literatur und in der SEREX-Datenbank findet man nicht selten widersprüchliche Angaben zum Vorkommen von antigenspezifischen Serumantikörpern bei gesunden Kontrollpersonen. Ein gutes Beispiel dafür lieferten die vorbeschriebenen Daten zu homologen Genprodukten des *Kinectin*-Gens (vgl. Gruppe MU-OS-177-14, **Tab. IV.2c**): Es ist durchaus möglich, dass Stenner-Liewen und Kollegen sowie Hirano und Kollegen ausschließlich mit älteren Kontrollseren gearbeitet und deshalb keine Reaktivität (0/20 bzw. 0/35 reaktive Normalseren) gefunden hatten, während eine japanische SEREX-Gruppe ihre Kinectin-Homologe (NGO-Br-1 und NGO-St-47) eventuell mit frischeren Seren analysiert und deshalb passend zu den eigenen Ergebnissen eine deutliche Reaktivität (30/100 reaktive Normalseren) erkannt hatte (SEREX-Datenbank; **Tab. IV.2c**). Sensitivitätsunterschiede im Nachweisverfahren waren möglicherweise auch verantwortlich für die unterschiedlichen Befunde zum Vorkommen von Antikörpern gegen EEA1 und UACA in den eigenen Analysen gegenüber Untersuchungen anderer Autoren (Waite et al., 1998; Yamada et al., 2001). Nicht auszuschließen ist, dass darüber hinaus unterschiedlich viele Antikörperepitope im verwendeten Testantigen zu den Differenzen beitrugen.

Der Gebrauch einer vorbenutzen und jederzeit verfügbaren Bibliothek präabsorbierter, verdünnter Seren ist für eine erste Eingruppierung von SEREX-Antigenen in die Klasse der Tumor- oder Autoantigene durchaus sinnvoll, um mit niedrigem Materialaufwand Autoantigene mit hoher Immunogenität zu erkennen. Dieser Untersuchungsschritt reduziert

die Zahl derjenigen Antigene, die wegen fehlender Reaktivität noch mit jeweils frisch aufgetautem, präabsorbiertem Serum gesunder Probanden untersucht werden müssen, kann aber diesen äußerst materialaufwändigen Untersuchungsschritt in diesen Fällen nicht ersetzen. Im Labor der Arbeitsgruppe wurden die präabsorbierten Seren deshalb in kleinen Fraktionen eingefroren, die jeweils frisch aufgetaut für gezielte Überprüfungen einzelner Klone zur Verfügung stehen.

Wenn nicht nur die Eingruppierung als Tumor- oder Autoantigen gewünscht wird, sondern darüberhinaus Frequenz und Titer der spezifischen Antikörper bei gesunden Probanden und Tumorpatienten verglichen werden sollen, ist es unumgänglich mit etwa gleichzeitig aufgetauten Serumproben zu arbeiten. Dies bedeutet einen hohen Materialaufwand. Er wurde in den ersten Analysen der eigenen Arbeitsgruppe in Kauf genommen, um erste quantitative Daten zum Vorkommen von Antikörpern gegen SEREX-Antigene bei pädiatrischen Tumorpatienten und gesunden Kontrollen zu sammeln (Behrends et al. 2002, Behrends et al. 2003). Diese Analysen hatten ergeben, dass Antikörper gegen Autoantigene bei Patienten mit Malignomen gegenüber gesunden Kontrollen in der Regel häufiger und mit höherem Titer vorkommen. Es verwundert daher nicht, dass bei Inkaufnahme von geringer Sensitivität durch längere Lagerung bei 4°C ein Ungleichgewicht zugunsten von Tumorantigenen herbeigeführt wird. In der eigenen Arbeit ist dieses Ungleichgewicht daran zu erkennen, dass die über einen Zeitraum von zwei Jahren bei 4°C gelagerten Seren von Patienten mit anderen pädiatrischen Malignomen häufiger mit den Antigenen reagierten als die ähnlich gelagerten Kontrollseren in der Versuchsreihe A. Bei drei Antigenen (MU-OS-177-2, -3 und -18) reagierten sogar >50% der Tumorseren positiv. Bei weiteren vier Antigenen (MU-OS-177-4a, 4b, -7, -14, -16) reagierten immerhin mind. 30% der Tumor-Seren positiv, während nur zwei dieser Antigene von je einem einzigen Serum aus der Kontrollgruppe erkannt wurde (MU-OS-177-4b, -7). Wenn man die quantitativen Unterschiede der Immunantwort gegen Autoantigene des OS zwischen Tumorpatienten und gesunden Probanden herausarbeiten wollte, müsste man wie in den oben genannten Arbeiten beschrieben (Behrends et al. 2002; Behrends et al., 2003) sehr materialaufwändige, zusätzliche Analysen durchführen.

V.5. Biologische und klinische Bedeutung der humoralen Immunantwort im Kontext von Tumoren

Die SEREX-Technologie geht davon aus, dass der Klassenwechsel der von einer B-Zelle produzierten Antikörper von IgM zu einem bestimmten IgG-Isotyp (*isotype switch*) als Surrogat für eine stattgehabte CD4+ T-Helferzellantwort gewertet werden kann. Passend zu

diesem Postulat konnten mit SEREX nachweislich Tumorantigene identifiziert werden, die auch von CD4⁺ T-Zellen der betroffenen Patienten erkannt wurden, so z.B. das Antigen NY-ESO-1 (Jager et al., 1998) oder verschiedene Neuroblastomantigene (Behrends et al., 2002). Das ist außerordentlich bedeutsam, da bis vor kurzem nur sehr aufwändige biochemische Methoden für eine direkte Antigenidentifikation mit CD4⁺ T-Zellen zur Verfügung standen (vgl. **Kap. I.4.3.2**). Von der eigenen Arbeitsgruppe wurde kürzlich mit DANI (*direct antigen identification*) erstmals ein Verfahren entwickelt, dass aufgrund seiner einfachen Handhabung vielversprechend erscheint (Milosevic et al., 2005; Milosevic et al., 2006). Da es allerdings wie alle direkten T-Zellverfahren die aufwändige Klonierung antigenspezifischer T-Zellen und dafür die problematische Generierung von Tumorzelllinien voraussetzt, wird es den effizienten serologischen Ansatz zur Antigensuche allenfalls ergänzen und nicht ersetzen.

Während die Spezifität eines Antikörpers durch seinen variablen Abschnitt festgelegt ist, wird der Isotyp 1-4 eines IgG-Antikörpers durch seinen Fc-Teil definiert, der wiederum die Bindung an verschiedene Fc-gamma-Rezeptoren (Fc γ RI-III bzw. IV) der Zielzellen vermittelt (Janeway, 2005; Nimmerjahn und Ravetch, 2006). In der Literatur sind bislang keine Daten zu der Frage verfügbar, welcher IgG-Isotyp bei den mit SEREX erfassten Antikörpern dominiert. Diese Frage ist aus den beiden nachfolgend skizzierten Gründen interessant.

Zum einen interessiert sie, weil der resultierende IgG-Isotyp vom Typ der CD4⁺ T-Helferzelle bestimmt wird, die den Klassenwechsel stimuliert. CD4⁺ T-Zellen vom Helfertyp 1 (Th1), die klassischerweise die Produktion von IgG1- und IgG3-Antikörpern stimulieren, unterstützen die im Kontext von Tumoren erwünschte Aktivierung von tumorspezifischen CD8⁺ T-Zellen und Makrophagen, während CD4⁺ T-Zellen vom Helfertyp 2 (Th2), die klassischerweise die Produktion von IgG2- und IgG4-Antikörpern anregen, weniger zur Induktion einer komplexen Effektorzellantwort gegen Tumoren beitragen (Janeway, 2005). Im Umkehrschluss spräche demnach eine nachweisliche Induktion von IgG1- und IgG3-Antikörpern für eine stattgehabte Th1-Antwort und für eine Induktion einer komplexen, zum Teil antigenspezifischen Effektorzellantwort gegen den Tumor.

Zum anderen interessiert die oben gestellte Frage auch deshalb, weil vom IgG-Isotyp abhängt, welche Effekte der Antikörper selbst vermittelt. Antikörper mit der gleichen variablen Region und damit Antigenpezifität können je nachdem, welcher Fc γ R vom Antikörper gebunden wird, an unterschiedliche Immunzellen binden und immunstimulatorisch (über Fc γ RI, Fc γ RIII und Fc γ RIV) oder immunsuppressiv (über Fc γ RII) wirken. Der aktivierende Fc γ RIII auf NK-Zellen, Makrophagen, Neutrophilen, Eosinophilen und Mastzellen wird beispielsweise nur von IgG1 und IgG3 gebunden (Janeway, 2005). Da die Mehrzahl der SEREX identifizierten

Antigene intrazellulär lokalisiert ist, spielen die direkten Effekte der spezifischen Serumantikörper allerdings therapeutisch eine untergeordnete Rolle.

Die vorliegende Arbeit hat mit den Anstoß dazu gegeben, dass Folgeuntersuchungen zum IgG-Isotyp der SEREX-Antigene-bindenden Antikörper durchgeführt wurden. Bislang wurden diese Analysen für zwei der eingesetzten OS-Seren durchgeführt und in beiden Fällen IgG-Antikörper vom Isotyp 1 oder 3 detektiert (unveröffentlichte Daten). Es handelte sich demnach um IgG-Isotypen, die von Th1-Zellen induziert worden waren und an alle (IgG1) bzw. fast alle (IgG3) Fc γ R banden. Angesichts der Tatsache, dass die Th1-Immunantwort offensichtlich bei der Induktion der SEREX-Antikörper eine dominante Rolle spielt, verwundert es nicht, dass andere Autoren gegen exemplarische SEREX-Antigene auch Antworten von CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen nachweisen konnten (Jager et al., 1998; Jager et al., 2000; Jager et al., 2002; Gnjatic et al., 2003).

Dafür, dass SEREX-Antigen-bindende Antikörper auch als diagnostische Parameter dienen können, gibt es verschiedene Evidenzen:

Zum einen kann das Vorkommen von Antikörpern gegen ein bestimmtes SEREX-Antigen prognostische Bedeutung haben und so die Risikostratifizierung innerhalb einer Patientenkohorte erleichtern. Zum Beispiel wurde bei Patientinnen mit Mammakarzinom und Patienten mit OS über eine positive Korrelation von Überleben bzw. Ansprechen auf die Chemotherapie mit dem Nachweis von Antikörpern gegen bestimmte HSP berichtet (Conroy et al., 1998; Trieb et al., 2000b). Antikörper gegen Hu-Antigene wurden wiederholt mit einem günstigen klinischen Stadium neuroektodermaler Tumorerkrankungen (Kleinzelliges Bronchialkarzinom [SCLC], NB) korreliert (Dalmau et al., 1995; Salmaggi et al., 1997; Douglas und Ellershaw, 2003). Es erscheint daher lohnenswert, auch die in dieser Arbeit erfassten Antikörper gegen SEREX-Antigene des OS auf eine mögliche prognostische Bedeutung bei OS-Patienten zu testen. Da zu diesem Zweck größere Patientenkohorten untersucht werden müssten, wäre es hilfreich, antigenspezifische ELISAs zu entwickeln, die die aufwändigen Plaque-Assay-Analysen ersetzen könnten.

Zum anderen wurde gezeigt, dass die Titer bestimmter Antikörper gegen SEREX-Antigene als Marker für die Tumorlast und somit als Verlaufsmarker dienen können. Beispiele hierfür lieferten Analysen zu Antikörpern gegen NY-ESO-1 bei Patienten mit Melanom und metastasierendem Adenokarzinom des Ösophagus (Jager et al., 1999) und Analysen der eigenen Arbeitsgruppe zu Antikörpern gegen SEREX-Antigene von neuroektodermalen Malignomen (Behrends et al., 2002; Behrends et al., 2003). Preiss und Mitarbeiter beschrieben auch im Mausmodell, dass Antikörper gegen definierte Antigene die Tumorlast

widerspiegeln können (Preiss et al., 2005). Aus den klinischen Untersuchungen wurde deutlich, dass ein Wiederanstieg von Antikörpertitern nach Therapieende ein frühzeitiges Alarmzeichen eines Krankheitsrückfalls darstellen kann, während ein Ausbleiben des Titeranstiegs nicht als sicheres Zeichen für eine Remission gewertet werden darf. Letzteres wurde damit erklärt, dass Rezidivtumoren die Reinduktion einer Immunantwort z.B. durch Herunterregulation der MHC- oder Antigenexpression unterlaufen können (Jager et al., 1999; Behrends et al., 2002; Behrends et al., 2003).

V.6. Seit Beginn der Arbeit neu beschriebene OS-Antigene

Seit Beginn der Arbeit wurden von einer Arbeitsgruppe zwei Arbeiten zum Thema SEREX-Antigene beim OS publiziert. In einer systematischen SEREX-Studie wurden zwei Klone identifiziert, die für HLA-Cw*0102 sowie für unmutiertes smooth muscle myosin light chain (SMMLC) kodieren. SMMLC reagierte nur mit dem autologen Serum des Patienten, nicht jedoch mit einer größeren Zahl von Seren von OS- und anderen Krebspatienten sowie gesunden Probanden (Nabeta et al., 2003). Von der gleichen Arbeitsgruppe wurde kürzlich noch ein weiteres Antigen mittels SEREX identifiziert, das clusterin-associated protein 1 (CLUAP1) genannt wurde und in OS-Gewebe und –Zelllinien sowie in einer Reihe anderer Tumoren überexprimiert ist (Ishikura et al., 2007).

Das erste über T-Zellen definierte Antigen beim OS wurde von Tsukahara und Mitarbeitern beschrieben. Die Autoren stimulierten T-Zellen mit einer frisch etablierten OS-Zelllinie des gleichen Patienten und identifizierten mittels Expressionsklonierung einen Transkriptionsfaktor als Antigen, der *papilloma virus binding factor* (PBF) genannt wird (Tsukahara et al., 2004). Über dessen Funktion ist wenig bekannt. Falls PBF ausschließlich im Kontext des sehr seltenen HLA-Allels B55 erkannt würde, wäre die potentielle therapeutische Nutzbarkeit möglicherweise gering.

Dass Antigene der *Cancer-Testis*-Antigenfamilie in OS exprimiert werden, war 1997 bereits von Sudo und Mitarbeitern für mehrere MAGE-Antigene beschrieben worden (Sudo et al., 1997). Diese Ergebnisse wurden von Jacobs und Kollegen kürzlich bestätigt und auf weitere Vertreter der *Cancer-Testis*-Antigenfamilie, wie z.B. NY-ESO-1, ausgedehnt (Jacobs et al., 2007).

V.7. Tumor- und Autoantigene als mögliche Zielstrukturen der Immuntherapie

Wie in der Einleitung beschrieben, zielen antigenspezifische Immuntherapieansätze in Ermangelung von tumorspezifischen Antigenen in der Regel auf tumorassoziierte Antigene

ab, d.h. auf Tumorantigene, die entweder im Tumor höher exprimiert sind (überexprimierte Antigene), oder deren Expressionsmuster auf entbehrliche Gewebe beschränkt ist (Differenzierungsantigene, *Cancer-Testis*-Antigene). Wie oben dargestellt, hängt die Klassifikation eines Antigens als Tumor- oder Autoantigen vom Nachweis der Immunantwort bei gesunden Personen und somit von der Sensitivität der verfügbaren Nachweisverfahren ab. Es gibt nicht nur bei der serologischen Klassifikation, sondern auch bei der Klassifikation auf der Basis der zellulären Immunantwort Graubereiche, wenn Antigene in gesunden Personen auf sehr niedrigem Niveau immunogen wirken. So konnten verschiedentlich auch bei gesunden Probanden zelluläre Immunantworten gegen klassische Vertreter der *Cancer-Testis*-Antigene und somit klassischer Tumorantigene detektiert werden (Valmori et al., 2005; Wang et al., 2007). Die *Cancer-Testis*-Antigene werden unabhängig von ihrer Klassifikation aufgrund ihrer Geweberestriktion als vielversprechende Kandidaten für Tumoringpfstoffe angesehen.

Für die Sicherheit der Immunisierungsstrategie ist die qualitative und quantitative Gewebeexpression der Kandidatenantigene daher von mindestens so grundlegender Bedeutung wie ihre Immunogenität. Im Hinblick auf eine mögliche therapeutische Nutzung sollten deshalb für alle neuen Antigene genaue Informationen zur Gewebeexpression erarbeitet werden. Die schnell verfügbaren RT-PCR-Analysen geben dabei erste Hinweise, sollten aber in jedem Fall auf eine quantitative Basis gestellt werden. Wenn sich ein Antigen als mögliche Zielstruktur erweist, sollten sich Analysen der Proteinexpression anschließen. Der Proteinnachweis gestaltet sich allerdings aufwändiger, da spezifische Antikörper als Reagenzien für immunhistologische und/oder Westernblot-Analysen benötigt werden. Mit Hilfe solcher Antikörper könnten nebenbei auch ELISAs mit dem Ziel entwickelt werden, eventuell von den Tumorzellen abgespaltene Antigene als Tumormarker in verschiedenen Körperflüssigkeiten wie Serum oder Urin zu detektieren.

Auch klassische Autoantigene können zu immuntherapeutischen Effekten beitragen. Ihr therapeutischer Wert hängt ebenfalls entscheidend von ihrer Gewebeexpression ab. Bei deutlicher Überexpression der Autoantigene im Tumor können antigenspezifische Immunantworten durchaus hilfreich sein, während eine starke Expression in lebenswichtigen Organen den positiven Aspekt antigenspezifischer Immunantworten limitiert. Der mögliche tumortheraeutische Effekt von Autoimmunantworten ist natürlich besonders kritisch zu bewerten; hier ist ein ausreichendes therapeutisches Fenster zwischen Antitumoreffekt und Nebenwirkungen durch induzierte Autoimmunität Voraussetzung für einen therapeutischen Einsatz.

Die eigene Arbeit liefert Evidenzen dafür, dass in OS eine Vielzahl von Antigenen exprimiert werden, die definitionsgemäß den Autoantigenen zuzuordnen sind, während klassische Tumorantigene bei der Immunerkennung wahrscheinlich eine geringere Rolle spielen. Möglicherweise ist die Expression eines breiten Sets von Autoantigenen sogar entscheidend dafür verantwortlich, dass eine Behandlung von aggressiven OS mit nicht-antigenspezifischen Immunstimulantien wie IFN therapeutische Effekte zeigt. Aktuell wird der Nutzen einer adjuvanten Therapie mit IFN α beim OS in einer groß angelegten, randomisierten, klinischen Studie der europäischen und amerikanischen OS-Studiengruppen geprüft (Strander, 2007). Es wäre außerordentlich interessant zu prüfen, welche Immunantworten bei IFN α -behandelten Patienten mit OS immundominant sind. Eine nachfolgende SEREX-Analyse in diesem Kontext könnte möglicherweise therapeutisch besonders wertvolle Autoantigene identifizieren.

Zusammenfassend muss man postulieren, dass sowohl Tumor- als auch Autoantigene eine wichtige Rolle bei der Immunerkennung von Tumoren spielen, und dass die Expression eines breiten Sets von Autoantigenen bei fehlender Expression oder geringer Immunogenität tumorspezifischer Zielstrukturen sogar therapeutisch hilfreich sein kann. Weiterhin kann man schlussfolgern, dass der Nachweis von zahlreichen Autoantigenen in einer besonders aggressiven Tumorentität als Argument dafür gewertet werden kann, z.B. eine Behandlung mit IFN zu testen bzw. durch eine vorsichtige Hochregulation der Autoimmunität therapeutische Effekte anzustreben.

V.8. Ausblick

Ogleich die pädiatrische Onkologie bei der Behandlung des OS bereits große Erfolge vorzuweisen hat, stellen die hohe Toxizität der Therapie und die signifikante Rate an therapieresistenten Erkrankungen weiterhin große Herausforderungen an die translationale Begleitforschung dar. Die eigene Arbeit zeigt, dass SEREX-Analysen von OS zur Aufklärung des tumorassoziierten Genoms und Immunoms beitragen und auf diese Weise nicht nur das tumorbiologische Verständnis erweitern, sondern auch Ansatzpunkte für neue klinische Strategien liefern können. Die diagnostische Relevanz der identifizierten, potentiellen Markerproteine und –antikörper kann durch Analysen großer Patientenkohorten zukünftig genauer evaluiert und das mögliche immuntherapeutische Potential einzelner Antigene durch quantitative Expressionsanalysen abgeschätzt werden. Sobald geeignete Kandidatenantigene zur Verfügung stehen, kann geprüft werden, ob eher passive, aktive oder passiv-aktiv-kombinierte immuntherapeutische Strategien im Kontext des pädiatrischen OS wirksam sind.

Die in dieser und anderen, jüngeren Arbeiten belegte hohe Komplexität des OS-assoziierten Antigenrepertoirs erscheint diesbezüglich vielversprechend und ermutigt zu weiteren SEREX-Analysen dieser aggressiven pädiatrischen Tumorentität.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, mithilfe der SEREX-Technologie neue immunogene Zielstrukturen im Osteosarkom zu identifizieren. Durch Screening einer cDNA-Expressionsbibliothek aus der Osteosarkom-Biopsie eines 8-jährigen Mädchens mit gepooltem Serum dieser und vier weiterer an einem Osteosarkom erkrankter pädiatrischer Patienten wurde systematisch nach Osteosarkom-Antigenen gesucht. Der Nachweis einer hochtitrigen IgG-Antikörperantwort diente dabei als indirekter Hinweis auf eine stattgehabte antigenspezifische T-Helfer-Zell-Antwort. Die cDNA der identifizierten Antigene wurde sequenziert, auf Homologien mit bekannten cDNA-Sequenzen getestet und mittels Literaturrecherche und eigener RT-PCR-Analysen bezüglich Expression in gesunden und maligne transformierten Geweben untersucht. Zudem wurde ein Screening aller identifizierten Antigene mit Seren weiterer pädiatrischer Tumorpatienten sowie gesunder Probanden durchgeführt.

Bei fünf der 20 identifizierten Autoantigene handelte es sich um neue, noch nicht vorherbeschriebene Genprodukte: Die Antigene MU-OS-177-12c und MU-OS-177-18 wurden von neuen Spleißvarianten kodiert. Bei dem UACA-Homolog MU-OS-177-12c resultierte daraus ein neuer, 26 AS langer N-Terminus, der theoretisch für ein oder mehrere Neopepitope kodieren könnte. In dem CENP-E-Homolog MU-OS-177-18 war eine 95 AS lange Sequenz durch eine einzelne, neue Aminosäure ersetzt und eine 36 AS lange neue Sequenz hinzugekommen. Die eigene Expressionsanalyse charakterisierte dieses Antigen als Wildtypvariante. Die Antigene MU-OS-177-6, -17 und -19 waren vermutlich von einem kurzen, alternativen Leserahmen kodiert worden, der in der vormals als 3'UTR bezeichneten Region der PCIA1-, SPATA18- bzw. T9SPM2P-cDNA enthalten war. Da bis kurz vor Fertigstellung der eigenen Arbeit nur Fragmente der langen cDNAs der Antigengruppe MU-OS-177-4 vorherbeschrieben waren, war das gemeinsame Gen bisher unbekannt geblieben.³ Es handelt sich um ein großes, polymorphes Protein mit noch unbekannter Funktion. Auffallend war, dass diverse Schlüsselproteine der Zellhomöostase kloniert wurden. Die putativen Antigene MU-OS-177-10, und -11 sind am vesikulären Transport, MU-OS-177-9 an der N-Glykosylierung im endoplasmatischen Retikulum, MU-OS-177-2, -3, -8, -13.1, -13.2, -16 an der intrazellulären Signalübertragung und MU-OS-177-14 und -18 an intrazellulären

³ Während der Fertigstellung dieser Arbeit fiel bei der Aktualisierung der Literatur auf, dass das Protein unabhängig von der eigenen Arbeit am 18.11.2006 unter der Bezeichnung *coiled-coil domain containing 46 isoform a* (CCDC46) in die NCBI-Datenbank aufgenommen worden ist.

Transportprozessen beteiligt. Eine Expression in primärem Osteosarkomgewebe war bislang für keines der identifizierten Antigene beschrieben worden.

Im Unterschied zu anderen bereits mit SEREX untersuchten pädiatrischen Tumor-Entitäten fanden sich gegen alle Osteosarkom-Antigene IgG-Antikörper auch bei den gesunden Kontrollpersonen, so dass es sich bei allen in der Arbeit identifizierten Antigenen definitionsgemäß um Autoantigene handelte. Für acht der 20 identifizierten Antigengruppen wurde die Immunogenität erstmals in der vorliegenden Arbeit dokumentiert (MU-OS-177-2, -3, -4, -6, -7, -9, -17, -19). Für die restlichen zwölf Gruppen lagen bereits Evidenzen für eine Erkennung durch Serumantikörper vor (MU-OS-177-1, -5, -8, -10, -11, -12, -13.1, -13.2, -14, -15, -16, -18). Neun der zwölf Gruppen enthielten vorbeschriebene Autoantigene (MU-OS-177-1, -5, -8, -10, -11, -12, -13.1, -14, -18). Mitglieder von drei Gruppen waren mit Hilfe von Seren onkologischer Patienten bereits in SEREX-Analysen anderer Autoren identifiziert worden, allerdings war die Reaktivität dieser Antigengruppen mit Serum gesunder Probanden noch nicht bekannt (MU-OS-177-13.2, -15, -16). Um die therapeutische Potenz der identifizierten Autoantigene zu klären, müssen zukünftige Experimente quantitative Daten zur Gewebeexpression ermitteln. Die Expression eines breiten Sets von Autoantigenen ist möglicherweise indirekt mitverantwortlich dafür, dass nicht-antigenspezifische Immunstimulantien wie Interferon beim Osteosarkom therapeutische Wirkung zeigen.

Zusammenfassend zeigte die eigene Arbeit, dass SEREX-Untersuchungen zur Aufklärung des tumorassoziierten Genoms und Immunoms von Osteosarkomen beitragen und auf diese Weise sowohl das tumorbiologische Verständnis erweitern als auch mögliche Ansatzpunkte für neue klinische Strategien liefern können.

VII. LITERATUR

- Abbott, W.M. und Feizi, T.: Evidence that the 14 kDa soluble beta-galactoside-binding lectin in man is encoded by a single gene. *Biochem J* 259 (1989) 291-4.
- Abramson, D.H., Ellsworth, R.M., Kitchin, F.D. und Tung, G.: Second nonocular tumors in retinoblastoma survivors. Are they radiation-induced? *Ophthalmology* 91 (1984) 1351-5.
- Abu-Elmagd, K.M., Zak, M., Stamos, J.M., Bond, G.J., Jain, A., Youk, A.O., Ezzelarab, M., Costa, G., Wu, T., Nalesnik, M.A., Mazariegos, G.V., Sindhi, R.K., Marcos, A., Demetris, A.J., Fung, J.J. und Reyes, J.D.: De novo malignancies after intestinal and multivisceral transplantation. *Transplantation* 77 (2004) 1719-25.
- Ackermann, B., Troger, A., Glouchkova, L., Korholz, D., Gobel, U. und Dilloo, D.: Characterization of CD34+ progenitor-derived dendritic cells pulsed with tumor cell lysate for a vaccination strategy in children with malignant solid tumors and a poor prognosis. *Klin Padiatr* 216 (2004) 176-82.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P.: The cell cycle and programmed cell death. In: "Molecular Biology of the Cell", Part IV. Garland Science, New York, 4th Edition (2002a) 1005-07.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P.: Intracellular vesicular traffic. In: "Molecular Biology of the Cell", Part IV. Garland Science, New York 4th Edition (2002b) 757-65.
- Amano, M., Fukata, Y. und Kaibuchi, K.: Regulation and functions of Rho-associated kinase. *Exp Cell Res* 261 (2000) 44-51.
- Andereg, U., Breitschwerdt, K., Kohler, M.J., Sticherling, M., Haustein, U.F., Simon, J.C. und Saalbach, A.: MEL4B3, a novel mRNA is induced in skin tumors and regulated by TGF-beta and pro-inflammatory cytokines. *Exp Dermatol* 14 (2005) 709-18.
- Anderson, P.M., Wiseman, G.A., Dispenzieri, A., Arndt, C.A., Hartmann, L.C., Smithson, W.A., Mullan, B.P. und Bruland, O.S.: High-dose samarium-153 ethylene diamine tetramethylene phosphonate: low toxicity of skeletal irradiation in patients with osteosarcoma and bone metastases. *J Clin Oncol* 20 (2002) 189-96.
- Anderson, P.M., Wiseman, G.A., Erlandson, L., Rodriguez, V., Trotz, B., Dubansky, S.A. und Albritton, K.: Gemcitabine radiosensitization after high-dose samarium for osteoblastic osteosarcoma. *Clin Cancer Res* 11 (2005) 6895-900.
- Anninga, J.K., van de Vijver, M.J., Cleton-Jansen, A.M., Kristel, P.M., Taminiau, A.H., Nooij, M., Egeler, R.M. und Hogendoorn, P.C.: Overexpression of the HER-2 oncogene does not play a role in high-grade osteosarcomas. *Eur J Cancer* 40 (2004) 963-70.
- Araki, N., Uchida, A., Kimura, T., Yoshikawa, H., Aoki, Y., Ueda, T., Takai, S., Miki, T. und Ono, K.: Involvement of the retinoblastoma gene in primary osteosarcomas and other bone and soft-tissue tumors. *Clin Orthop Relat Res* (1991) 271-7.
- Arpaci, F., Ataergin, S., Ozet, A., Erler, K., Basbozkurt, M., Ozcan, A., Komurcu, S., Ozturk, B., Celasun, B., Kilic, S. und Kuzhan, O.: The feasibility of neoadjuvant high-dose chemotherapy and autologous peripheral blood stem cell transplantation in patients with nonmetastatic high grade localized osteosarcoma: results of a phase II study. *Cancer* 104 (2005) 1058-65.
- Astsaturov, I., Cohen, R.B. und Harari, P.M.: EGFR-targeting monoclonal antibodies in head and neck cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 6 (2006) 691-710.
- Baccarini, M.: Second nature: biological functions of the Raf-1 "kinase". *FEBS Lett* 579 (2005) 3271-7.
- Bacci, G., Briccoli, A., Mercuri, M., Ferrari, S., Bertoni, F., Gasbarrini, A., Fabbri, N., Cesari, M., Forni, C. und Campanacci, M.: Osteosarcoma of the extremities with synchronous

- lung metastases: long-term results in 44 patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *J Chemother* 10 (1998) 69-76.
- Bacci, G., Longhi, A., Versari, M., Mercuri, M., Briccoli, A. und Picci, P.: Prognostic factors for osteosarcoma of the extremity treated with neoadjuvant chemotherapy: 15-year experience in 789 patients treated at a single institution. *Cancer* 106 (2006) 1154-61.
- Bacci, G., Picci, P., Ruggieri, P., Ferrari, S., Mercuri, M., Fabbri, N., Rosito, P., Barbieri, E., Ferraro, A., Casadei, R. et al.: No advantages in the addition of ifosfamide and VP-16 to the standard four-drug regimen in the maintenance phase of neoadjuvant chemotherapy of Ewing's sarcoma of bone: results of two sequential studies. *J Chemother* 5 (1993) 247-57.
- Backer, J.M., Mendola, C.E., Kovesdi, I., Fairhurst, J.L., O'Hara, B., Eddy, R.L., Jr., Shows, T.B., Mathew, S., Murty, V.V. und Chaganti, R.S.: Chromosomal localization and nucleoside diphosphate kinase activity of human metastasis-suppressor genes NM23-1 and NM23-2. *Oncogene* 8 (1993) 497-502.
- Bader, A.G. und Vogt, P.K.: An essential role for protein synthesis in oncogenic cellular transformation. *Oncogene* 23 (2004) 3145-50.
- Bagatell, R., Beliakoff, J., David, C.L., Marron, M.T. und Whitesell, L.: Hsp90 inhibitors deplete key anti-apoptotic proteins in pediatric solid tumor cells and demonstrate synergistic anticancer activity with cisplatin. *Int J Cancer* 113 (2005) 179-88.
- Baldini, A., Gress, T., Patel, K., Muresu, R., Chiariotti, L., Williamson, P., Boyd, Y., Casciano, I., Wells, V., Bruni, C.B. et al.: Mapping on human and mouse chromosomes of the gene for the beta-galactoside-binding protein, an autocrine-negative growth factor. *Genomics* 15 (1993) 216-8.
- Baldini, N., Scotlandi, K., Serra, M., Picci, P., Bacci, G., Sottili, S. und Campanacci, M.: P-glycoprotein expression in osteosarcoma: a basis for risk-adapted adjuvant chemotherapy. *J Orthop Res* 17 (1999) 629-32.
- Barr, F.A.: A novel Rab6-interacting domain defines a family of Golgi-targeted coiled-coil proteins. *Curr Biol* 9 (1999) 381-4.
- Barr, F.A. und Short, B.: Golgins in the structure and dynamics of the Golgi apparatus. *Curr Opin Cell Biol* 15 (2003) 405-13.
- Behrends, U., Jandl, T., Golbeck, A., Lechner, B., Muller-Wehrich, S., Schmid, I., Till, H., Berthold, F., Voltz, R. und Mautner, J.M.: 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 (2002) 669-77.
- Behrends, U., Schneider, I., Rossler, S., Frauenknecht, H., Golbeck, A., Lechner, B., Eigenstetter, G., Zobywalski, C., Muller-Wehrich, S., Graubner, U., Schmid, I., Sackerer, D., Spath, M., Goetz, C., Prantl, F., Asmuss, H.P., Bise, K. und Mautner, J.: Novel tumor antigens identified by autologous antibody screening of childhood medulloblastoma cDNA libraries. *Int J Cancer* 106 (2003) 244-51.
- Belchis, D.A., Meece, C.A., Benko, F.A., Rogan, P.K., Williams, R.A. und Gocke, C.D.: Loss of heterozygosity and microsatellite instability at the retinoblastoma locus in osteosarcomas. *Diagn Mol Pathol* 5 (1996) 214-9.
- Bell, M., Schreiner, S., Damianov, A., Reddy, R. und Bindereif, A.: p110, a novel human U6 snRNP protein and U4/U6 snRNP recycling factor. *Embo J* 21 (2002) 2724-35.
- Benassi, M.S., Molendini, L., Gamberi, G., Ragazzini, P., Sollazzo, M.R., Merli, M., Asp, J., Magagnoli, G., Balladelli, A., Bertoni, F. und Picci, P.: Alteration of pRb/p16/cdk4 regulation in human osteosarcoma. *Int J Cancer* 84 (1999) 489-93.
- Bernhard, H., Schmidt, B., Busch, D.H. und Peschel, C.: Isolation and expansion of tumor-reactive cytotoxic T-cell clones for adoptive immunotherapy. *Methods Mol Med* 109 (2005) 175-84.

- Bielack, S., Hunold, A., Kempf-Bielack, B., Jürgens, H.: Maligne Knochentumoren. In: "Kinder- und Jugendmedizin, Jahresregister Vol. 3". Schattauer GmbH, Verlag für Medizin und Naturwissenschaften, Stuttgart (2003) 13-20.
- Bielack, S.S., Kempf-Bielack, B., Delling, G., Exner, G.U., Flege, S., Helmke, K., Kotz, R., Salzer-Kuntschik, M., Werner, M., Winkelmann, W., Zoubek, A., Jurgens, H. und Winkler, K.: Prognostic factors in high-grade osteosarcoma of the extremities or trunk: an analysis of 1,702 patients treated on neoadjuvant cooperative osteosarcoma study group protocols. *J Clin Oncol* 20 (2002) 776-90.
- Bielack, S.S., Machatschek, J.N., Flege, S. und Jurgens, H.: Delaying surgery with chemotherapy for osteosarcoma of the extremities. *Expert Opin Pharmacother* 5 (2004) 1243-56.
- Bielack, S.S. und Tabone, M.D.: Osteosarcomas occurring as second malignant neoplasms. *Radiother Oncol* 68 (2003) 89.
- Boissan, M. und Lacombe, M.L.: Nm23/NDP kinases in hepatocellular carcinoma. *J Bioenerg Biomembr* 38 (2006) 169-75.
- Bos, R., van Duikeren, S., van Hall, T., Kaaijk, P., Taubert, R., Kyewski, B., Klein, L., Melief, C.J. und Offringa, R.: Expression of a natural tumor antigen by thymic epithelial cells impairs the tumor-protective CD4⁺ T-cell repertoire. *Cancer Res* 65 (2005) 6443-9.
- Boshoff, C. und Weiss, R.: AIDS-related malignancies. *Nat Rev Cancer* 2 (2002) 373-82.
- Braun, S., Mauch, C., Boukamp, P. und Werner, S.: Novel roles of NM23 proteins in skin homeostasis, repair and disease. *Oncogene* 26 (2007) 532-42.
- Briasoulis, E., Kamposioras, K., Tzovaras, V., Pafitanis, G., Kostoula, A., Mavridis, A. und Pavlidis, N.: CENP-B specific anti-centromere autoantibodies heralding small-cell lung cancer A case study and review of the literature. *Lung Cancer* (2007).
- Bridge, J.A., Nelson, M., McComb, E., McGuire, M.H., Rosenthal, H., Vergara, G., Maale, G.E., Spanier, S. und Neff, J.R.: Cytogenetic findings in 73 osteosarcoma specimens and a review of the literature. *Cancer Genet Cytogenet* 95 (1997) 74-87.
- Broemer, M., Krappmann, D. und Scheidereit, C.: Requirement of Hsp90 activity for IκappaB kinase (IKK) biosynthesis and for constitutive and inducible IKK and NF-kappaB activation. *Oncogene* 23 (2004) 5378-86.
- Brosjo, O., Bauer, H.C., Brostrom, L.A., Nilsson, U., Nilsson, O.S., Reinholt, F.P., Strander, H. und Tribukait, B.: Influence of human alpha-interferon on four human osteosarcoma xenografts in nude mice. *Cancer Res* 45 (1985) 5598-602.
- Bruland, O., Fodstad, O., Funderud, S. und Pihl, A.: New monoclonal antibodies specific for human sarcomas. *Int J Cancer* 38 (1986) 27-31.
- Burnet, F.M.: The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res* 13 (1970) 1-27.
- Burnet, F.M.: Immunological surveillance in neoplasia. *Transplant Rev* 7 (1971) 3-25.
- Burrow, S., Andrulis, I.L., Pollak, M. und Bell, R.S.: Expression of insulin-like growth factor receptor, IGF-1, and IGF-2 in primary and metastatic osteosarcoma. *J Surg Oncol* 69 (1998) 21-7.
- Callaghan, J., Nixon, S., Bucci, C., Toh, B.H. und Stenmark, H.: Direct interaction of EEA1 with Rab5b. *Eur J Biochem* 265 (1999a) 361-6.
- Callaghan, J., Simonsen, A., Gaullier, J.M., Toh, B.H. und Stenmark, H.: The endosome fusion regulator early-endosomal autoantigen 1 (EEA1) is a dimer. *Biochem J* 338 (Pt 2) (1999b) 539-43.
- Ceballos, E., Munoz-Alonso, M.J., Berwanger, B., Acosta, J.C., Hernandez, R., Krause, M., Hartmann, O., Eilers, M. und Leon, J.: Inhibitory effect of c-Myc on p53-induced apoptosis in leukemia cells. Microarray analysis reveals defective induction of p53 target genes and upregulation of chaperone genes. *Oncogene* 24 (2005) 4559-71.

- Chano, T., Mori, K., Scotlandi, K., Benini, S., Lapucci, C., Manara, M.C., Serra, M., Picci, P., Okabe, H. und Baldini, N.: Differentially expressed genes in multidrug resistant variants of U-2 OS human osteosarcoma cells. *Oncol Rep* 11 (2004) 1257-63.
- Chen, W.F., Huang, M.H., Tzang, C.H., Yang, M. und Wong, M.S.: Inhibitory actions of genistein in human breast cancer (MCF-7) cells. *Biochim Biophys Acta* 1638 (2003) 187-96.
- Chen, Y.T., Scanlan, M.J., Sahin, U., Tureci, O., Gure, A.O., Tsang, S., Williamson, B., Stockert, E., Pfreundschuh, M. und Old, L.J.: A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (1997) 1914-8.
- Conroy, S.E., Sasieni, P.D., Amin, V., Wang, D.Y., Smith, P., Fentiman, I.S. und Latchman, D.S.: Antibodies to heat-shock protein 27 are associated with improved survival in patients with breast cancer. *Br J Cancer* 77 (1998) 1875-9.
- COSS-96: Therapieprotokoll der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie in Zusammenarbeit mit: Arbeitsgemeinschaft Knochentumoren, Wiener Knochengeschwulstregister. Cooperative Osteosarkomstudiengruppe (Hrsg.) Fassung vom 24.03.2000 (2000).
- Coulie, P.G., Bricard, V., Van Pel, A., Wolfel, T., Schneider, J., Traversari, C., Mattei, S., De Plaen, E., Lurquin, C., Szikora, J.P., Renauld, J.C. und Boon, T.: A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J Exp Med* 180 (1994) 35-42.
- Couraud, P.O., Casentini-Borocz, D., Bringman, T.S., Griffith, J., McGrogan, M. und Nedwin, G.E.: Molecular cloning, characterization, and expression of a human 14-kDa lectin. *J Biol Chem* 264 (1989) 1310-6.
- Cox, A.L., Skipper, J., Chen, Y., Henderson, R.A., Darrow, T.L., Shabanowitz, J., Engelhard, V.H., Hunt, D.F. und Slingluff, C.L., Jr.: Identification of a peptide recognized by five melanoma-specific human cytotoxic T cell lines. *Science* 264 (1994) 716-9.
- Crimaudo, C., Hortsch, M., Gausepohl, H. und Meyer, D.I.: Human ribophorins I and II: the primary structure and membrane topology of two highly conserved rough endoplasmic reticulum-specific glycoproteins. *Embo J* 6 (1987) 75-82.
- Curto, M. und McClatchey, A.I.: Ezrin...a metastatic determinant? *Cancer Cell* 5 (2004) 113-4.
- Dalmau, J., Graus, F., Cheung, N.K., Rosenblum, M.K., Ho, A., Canete, A., Delattre, J.Y., Thompson, S.J. und Posner, J.B.: Major histocompatibility proteins, anti-Hu antibodies, and paraneoplastic encephalomyelitis in neuroblastoma and small cell lung cancer. *Cancer* 75 (1995) 99-109.
- Dan, I., Watanabe, N.M. und Kusumi, A.: The Ste20 group kinases as regulators of MAP kinase cascades. *Trends Cell Biol* 11 (2001) 220-30.
- de Jager, M., Trujillo, K.M., Sung, P., Hopfner, K.P., Carney, J.P., Tainer, J.A., Connelly, J.C., Leach, D.R., Kanaar, R. und Wyman, C.: Differential arrangements of conserved building blocks among homologs of the Rad50/Mre11 DNA repair protein complex. *J Mol Biol* 339 (2004) 937-49.
- de Pereda, J.M., Wiche, G. und Liddington, R.C.: Crystal structure of a tandem pair of fibronectin type III domains from the cytoplasmic tail of integrin $\alpha 6\beta 4$. *Embo J* 18 (1999) 4087-95.
- De Plaen, E., Lurquin, C., Lethe, B., van der Bruggen, P., Bricard, V., Renauld, J.C., Coulie, P., Van Pel, A. und Boon, T.: Identification of genes coding for tumor antigens recognized by cytolytic T lymphocytes. *Methods* 12 (1997) 125-42.
- Dearolf, C.R., Hersperger, E. und Shearn, A.: Developmental consequences of awdb3, a cell-autonomous lethal mutation of *Drosophila* induced by hybrid dysgenesis. *Dev Biol* 129 (1988) 159-68.

- DeLaney, T.F., Park, L., Goldberg, S.I., Hug, E.B., Liebsch, N.J., Munzenrider, J.E. und Suit, H.D.: Radiotherapy for local control of osteosarcoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 61 (2005) 492-8.
- Dicken, B.J., Graham, K., Hamilton, S.M., Andrews, S., Lai, R., Listgarten, J., Jhangri, G.S., Saunders, L.D., Damaraju, S. und Cass, C.: Lymphovascular invasion is associated with poor survival in gastric cancer: an application of gene-expression and tissue array techniques. *Ann Surg* 243 (2006) 64-73.
- Diller, L., Kassel, J., Nelson, C.E., Gryka, M.A., Litwak, G., Gebhardt, M., Bressac, B., Ozturk, M., Baker, S.J., Vogelstein, B. et al.: p53 functions as a cell cycle control protein in osteosarcomas. *Mol Cell Biol* 10 (1990) 5772-81.
- Douglas, C.A. und Ellershaw, J.: Anti-Hu antibodies may indicate a positive response to chemotherapy in paraneoplastic syndrome secondary to small cell lung cancer. *Palliat Med* 17 (2003) 638-9.
- Dranoff, G., Jaffee, E., Lazenby, A., Golumbek, P., Levitsky, H., Brose, K., Jackson, V., Hamada, H., Pardoll, D. und Mulligan, R.C.: Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (1993) 3539-43.
- Ehrenreiter, K., Piazzolla, D., Velamoor, V., Sobczak, I., Small, J.V., Takeda, J., Leung, T. und Baccarini, M.: Raf-1 regulates Rho signaling and cell migration. *J Cell Biol* 168 (2005) 955-64.
- Eichmuller, S., Usener, D., Dummer, R., Stein, A., Thiel, D. und Schadendorf, D.: Serological detection of cutaneous T-cell lymphoma-associated antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (2001) 629-34.
- Eisman, R.C., Stewart, N., Miller, D. und Kaufman, T.C.: centrosomin's beautiful sister (cbs) encodes a GRIP-domain protein that marks Golgi inheritance and functions in the centrosome cycle in *Drosophila*. *J Cell Sci* 119 (2006) 3399-412.
- Elkahloun, A.G., Bittner, M., Hoskins, K., Gemmill, R. und Meltzer, P.S.: Molecular cytogenetic characterization and physical mapping of 12q13-15 amplification in human cancers. *Genes Chromosomes Cancer* 17 (1996) 205-14.
- Engel, M., Theisinger, B., Seib, T., Seitz, G., Huwer, H., Zang, K.D., Welter, C. und Dooley, S.: High levels of nm23-H1 and nm23-H2 messenger RNA in human squamous-cell lung carcinoma are associated with poor differentiation and advanced tumor stages. *Int J Cancer* 55 (1993) 375-9.
- Engel, M., Veron, M., Theisinger, B., Lacombe, M.L., Seib, T., Dooley, S. und Welter, C.: A novel serine/threonine-specific protein phosphotransferase activity of Nm23/nucleoside-diphosphate kinase. *Eur J Biochem* 234 (1995) 200-7.
- Engelhard, V.H., Brickner, A.G. und Zarling, A.L.: Insights into antigen processing gained by direct analysis of the naturally processed class I MHC associated peptide repertoire. *Mol Immunol* 39 (2002) 127-37.
- Enneking, W.F., Spanier, S.S. und Goodman, M.A.: A system for the surgical staging of musculoskeletal sarcoma. *Clin Orthop Relat Res* (1980) 106-20.
- EURAMOS: EURAMOS 1. A randomized trial of the European and American Osteosarcoma Study Group to optimize treatment strategies for resectable osteosarcoma based on histological response to pre-operative chemotherapy. Cooperative Osteosarkomstudien-gruppe (Hrsg.), Fassung vom 18.01.2005 (2005) 7-23.
- Fagioli, F., Berger, M., Brach del Prever, A., Lioji, S., Aglietta, M., Ferrari, S., Picci, P. und Madon, E.: Regression of metastatic osteosarcoma following non-myeloablative stem cell transplantation. A case report. *Haematologica* 88 (2003) ECR16.
- Ferracini, R., Di Renzo, M.F., Scotlandi, K., Baldini, N., Olivero, M., Lollini, P., Cremona, O., Campanacci, M. und Comoglio, P.M.: The Met/HGF receptor is over-expressed in

- human osteosarcomas and is activated by either a paracrine or an autocrine circuit. *Oncogene* 10 (1995) 739-49.
- Feugeas, O., Guriec, N., Babin-Boilletot, A., Marcellin, L., Simon, P., Babin, S., Thyss, A., Hofman, P., Terrier, P., Kalifa, C., Brunat-Mentigny, M., Patricot, L.M. und Oberling, F.: Loss of heterozygosity of the RB gene is a poor prognostic factor in patients with osteosarcoma. *J Clin Oncol* 14 (1996) 467-72.
- Franchi, A., Arganini, L., Baroni, G., Calzolari, A., Capanna, R., Campanacci, D., Caldora, P., Masi, L., Brandi, M.L. und Zampi, G.: Expression of transforming growth factor beta isoforms in osteosarcoma variants: association of TGF beta 1 with high-grade osteosarcomas. *J Pathol* 185 (1998) 284-9.
- Franzius, C., Bielack, S., Flege, S., Eckardt, J., Sciuk, J., Jurgens, H. und Schober, O.: High-activity samarium-153-EDTMP therapy followed by autologous peripheral blood stem cell support in unresectable osteosarcoma. *Nuklearmedizin* 40 (2001) 215-20.
- Franzius, C., Schuck, A. und Bielack, S.S.: High-dose samarium-153 ethylene diamine tetramethylene phosphonate: low toxicity of skeletal irradiation in patients with osteosarcoma and bone metastases. *J Clin Oncol* 20 (2002) 1953-4.
- Fratti, R.A., Chua, J. und Deretic, V.: Induction of p38 mitogen-activated protein kinase reduces early endosome autoantigen 1 (EEA1) recruitment to phagosomal membranes. *J Biol Chem* 278 (2003) 46961-7.
- Frazer, I.H.: Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Nat Rev Immunol* 4 (2004) 46-54.
- Fritzler, M.J., Etherington, J., Sokoluk, C., Kinsella, T.D. und Valencia, D.W.: Antibodies from patients with autoimmune disease react with a cytoplasmic antigen in the Golgi apparatus. *J Immunol* 132 (1984) 2904-8.
- Fritzler, M.J. und Salazar, M.: Diversity and origin of rheumatologic autoantibodies. *Clin Microbiol Rev* 4 (1991) 256-69.
- Futterer, A., Kruppa, G., Kramer, B., Lemke, H. und Kronke, M.: Molecular cloning and characterization of human kinectin. *Mol Biol Cell* 6 (1995) 161-70.
- Gamberi, G., Benassi, M.S., Bohling, T., Ragazzini, P., Molendini, L., Sollazzo, M.R., Pompetti, F., Merli, M., Magagnoli, G., Balladelli, A. und Picci, P.: C-myc and c-fos in human osteosarcoma: prognostic value of mRNA and protein expression. *Oncology* 55 (1998) 556-63.
- Gandhi, M.K., Moll, G., Smith, C., Dua, U., Lambley, E., Ramuz, O., Gill, D., Marlton, P., Seymour, J.F. und Khanna, R.: Galectin-1 mediated suppression of Epstein-Barr virus specific T-cell immunity in classic Hodgkin lymphoma. *Blood* 110 (2007) 1326-9.
- Gaspar, M.L., Marcos, M.A., Gutierrez, C., Martin, M.J., Bonifacino, J.S. und Sandoval, I.V.: Presence of an autoantibody against a Golgi cisternal membrane protein in the serum and cerebrospinal fluid from a patient with idiopathic late onset cerebellar ataxia. *J Neuroimmunol* 17 (1988) 287-99.
- Gattinoni, L., Finkelstein, S.E., Klebanoff, C.A., Antony, P.A., Palmer, D.C., Spiess, P.J., Hwang, L.N., Yu, Z., Wrzesinski, C., Heimann, D.M., Surh, C.D., Rosenberg, S.A. und Restifo, N.P.: Removal of homeostatic cytokine sinks by lymphodepletion enhances the efficacy of adoptively transferred tumor-specific CD8+ T cells. *J Exp Med* 202 (2005) 907-12.
- Gentric, A., Blaschek, M., Julien, C., Jouquan, J., Pennec, Y., Berthelot, J.M., Mottier, D., Casburn-Budd, R. und Youinou, P.: Nonorgan-specific autoantibodies in individuals infected with type 1 human immunodeficiency virus. *Clin Immunol Immunopathol* 59 (1991) 487-94.
- Gilles, A.M., Presecan, E., Vonica, A. und Lascu, I.: Nucleoside diphosphate kinase from human erythrocytes. Structural characterization of the two polypeptide chains

- responsible for heterogeneity of the hexameric enzyme. *J Biol Chem* 266 (1991) 8784-9.
- Gitt, M.A. und Barondes, S.H.: Evidence that a human soluble beta-galactoside-binding lectin is encoded by a family of genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83 (1986) 7603-7.
- Gnjatic, S., Atanackovic, D., Jager, E., Matsuo, M., Selvakumar, A., Altorki, N.K., Maki, R.G., Dupont, B., Ritter, G., Chen, Y.T., Knuth, A. und Old, L.J.: Survey of naturally occurring CD4+ T cell responses against NY-ESO-1 in cancer patients: correlation with antibody responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (2003) 8862-7.
- Golbeck, A.: Serologische Identifizierung und Charakterisierung von Tumorantigenen beim Neuroblastom. Dissertation an der Fakultät für Biologie der LMU München (2006).
- Goorin, A.M., Harris, M.B., Bernstein, M., Ferguson, W., Devidas, M., Siegal, G.P., Gebhardt, M.C., Schwartz, C.L., Link, M. und Grier, H.E.: Phase II/III trial of etoposide and high-dose ifosfamide in newly diagnosed metastatic osteosarcoma: a pediatric oncology group trial. *J Clin Oncol* 20 (2002) 426-33.
- Gorlick, R., Anderson, P., Andrulis, I., Arndt, C., Beardsley, G.P., Bernstein, M., Bridge, J., Cheung, N.K., Dome, J.S., Ebb, D., Gardner, T., Gebhardt, M., Grier, H., Hansen, M., Healey, J., Helman, L., Hock, J., Houghton, J., Houghton, P., Huvos, A., Khanna, C., Kieran, M., Kleinerman, E., Ladanyi, M., Lau, C., Malkin, D., Marina, N., Meltzer, P., Meyers, P., Schofield, D., Schwartz, C., Smith, M.A., Toretsky, J., Tsokos, M., Wexler, L., Wigginton, J., Withrow, S., Schoenfeldt, M. und Anderson, B.: Biology of childhood osteogenic sarcoma and potential targets for therapeutic development: meeting summary. *Clin Cancer Res* 9 (2003) 5442-53.
- Gorlick, R., Huvos, A.G., Heller, G., Aledo, A., Beardsley, G.P., Healey, J.H. und Meyers, P.A.: Expression of HER2/erbB-2 correlates with survival in osteosarcoma. *J Clin Oncol* 17 (1999) 2781-8.
- Goto, A., Kanda, H., Ishikawa, Y., Matsumoto, S., Kawaguchi, N., Machinami, R., Kato, Y. und Kitagawa, T.: Association of loss of heterozygosity at the p53 locus with chemoresistance in osteosarcomas. *Jpn J Cancer Res* 89 (1998) 539-47.
- Götz, C.: 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 TU München (2006).
- Griffith, K.J., Chan, E.K., Lung, C.C., Hamel, J.C., Guo, X., Miyachi, K. und Fritzler, M.J.: Molecular cloning of a novel 97-kd Golgi complex autoantigen associated with Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 40 (1997) 1693-702.
- Guo, W., Gorlick, R., Ladanyi, M., Meyers, P.A., Huvos, A.G., Bertino, J.R. und Healey, J.H.: Expression of bone morphogenetic proteins and receptors in sarcomas. *Clin Orthop Relat Res* (1999) 175-83.
- Guo, W., Wang, X. und Feng, C.: P53 gene abnormalities in osteosarcoma. *Chin Med J (Engl)* 109 (1996) 752-5.
- Gurney, J.G., Bondy, M. L.: Epidemiology of Childhood Cancer. In: "Principles and Practice of Pediatric Oncology", Section I. Pizzo, P.A., Poplack, D.G. (Editors), Lippincott Williams & Wilkins, New York, 5th Edition (2006) 1-13.
- Gutjahr, P.: Osteosarkome. In: "Krebs bei Kindern und Jugendlichen". Deutscher Ärzte-Verlag, Köln, 5. Auflage (2004) 473-88.
- Hahne, M., Rimoldi, D., Schroter, M., Romero, P., Schreier, M., French, L.E., Schneider, P., Bornand, T., Fontana, A., Lienard, D., Cerottini, J. und Tschopp, J.: Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science* 274 (1996) 1363-6.
- Hale, G.A.: Autologous hematopoietic stem cell transplantation for pediatric solid tumors. *Expert Rev Anticancer Ther* 5 (2005) 835-46.

- Hansen, M.F., Nellisery, M.J. und Bhatia, P.: Common mechanisms of osteosarcoma and Paget's disease. *J Bone Miner Res* 14 Suppl 2 (1999) 39-44.
- Harrington, J.J., Sherf, B., Rundlett, S., Jackson, P.D., Perry, R., Cain, S., Leventhal, C., Thornton, M., Ramachandran, R., Whittington, J., Lerner, L., Costanzo, D., McElligott, K., Boozer, S., Mays, R., Smith, E., Veloso, N., Klika, A., Hess, J., Cothren, K., Lo, K., Offenbacher, J., Danzig, J. und Ducar, M.: Creation of genome-wide protein expression libraries using random activation of gene expression. *Nat Biotechnol* 19 (2001) 440-5.
- Heiner, J.P., Miraldi, F., Kallick, S., Makley, J., Neely, J., Smith-Mensah, W.H. und Cheung, N.K.: Localization of GD2-specific monoclonal antibody 3F8 in human osteosarcoma. *Cancer Res* 47 (1987) 5377-81.
- Heiss, M.M., Strohlein, M.A., Jager, M., Kimmig, R., Burges, A., Schoberth, A., Jauch, K.W., Schildberg, F.W. und Lindhofer, H.: Immunotherapy of malignant ascites with trifunctional antibodies. *Int J Cancer* 117 (2005) 435-43.
- Heslop, H.E., Ng, C.Y., Li, C., Smith, C.A., Loftin, S.K., Krance, R.A., Brenner, M.K. und Rooney, C.M.: Long-term restoration of immunity against Epstein-Barr virus infection by adoptive transfer of gene-modified virus-specific T lymphocytes. *Nat Med* 2 (1996) 551-5.
- Hiddemann, W., Buske, C., Dreyling, M., Weigert, O., Lenz, G. und Unterhalt, M.: Current management of follicular lymphomas. *Br J Haematol* 136 (2007) 191-202.
- Hippe, H.J., Lutz, S., Cuello, F., Knorr, K., Vogt, A., Jakobs, K.H., Wieland, T. und Niroomand, F.: Activation of heterotrimeric G proteins by a high energy phosphate transfer via nucleoside diphosphate kinase (NDPK) B and Gbeta subunits. Specific activation of G α by an NDPK B.Gbetagamma complex in H10 cells. *J Biol Chem* 278 (2003) 7227-33.
- Hirabayashi, J., Ayaki, H., Soma, G. und Kasai, K.: Cloning and nucleotide sequence of a full-length cDNA for human 14 kDa beta-galactoside-binding lectin. *Biochim Biophys Acta* 1008 (1989a) 85-91.
- Hirabayashi, J., Ayaki, H., Soma, G. und Kasai, K.: Production and purification of a recombinant human 14 kDa beta-galactoside-binding lectin. *FEBS Lett* 250 (1989b) 161-5.
- Hirano, N., Butler, M.O., Von Bergwelt-Baildon, M.S., Maecker, B., Schultze, J.L., O'Connor, K.C., Schur, P.H., Kojima, S., Guinan, E.C. und Nadler, L.M.: Autoantibodies frequently detected in patients with aplastic anemia. *Blood* 102 (2003) 4567-75.
- Holtl, L., Zelle-Rieser, C., Gander, H., Papesh, C., Ramoner, R., Bartsch, G., Rogatsch, H., Barsoum, A.L., Coggin, J.H., Jr. und Thurnher, M.: Immunotherapy of metastatic renal cell carcinoma with tumor lysate-pulsed autologous dendritic cells. *Clin Cancer Res* 8 (2002) 3369-76.
- Hong, H.S., Chung, W.H., Hung, S.I., Chen, M.J., Lee, S.H. und Yang, L.C.: Clinical association of anti-golgi autoantibodies and their autoantigens. *Scand J Immunol* 59 (2004) 79-87.
- Hong, H.S., Morshed, S.A., Tanaka, S., Fujiwara, T., Ikehara, Y. und Nishioka, M.: Anti-Golgi antibody in rheumatoid arthritis patients recognizes a novel antigen of 79 kDa (doublet) by western blot. *Scand J Immunol* 36 (1992) 785-92.
- Honorati, M.C., Neri, S., Cattini, L. und Facchini, A.: IL-17 enhances the susceptibility of U-2 OS osteosarcoma cells to NK cell lysis. *Clin Exp Immunol* 133 (2003) 344-9.
- Hopfner, K.P.: Chromosome cohesion: closing time. *Curr Biol* 13 (2003) R866-8.
- Hornicek, F.J., Gebhardt, M.C., Wolfe, M.W., Kharrazi, F.D., Takeshita, H., Parekh, S.G., Zurakowski, D. und Mankin, H.J.: P-glycoprotein levels predict poor outcome in patients with osteosarcoma. *Clin Orthop Relat Res* (2000) 11-7.

- Horstmann, M.A., Posl, M., Scholz, R.B., Anderegg, B., Simon, P., Baumgaertl, K., Delling, G. und Kabisch, H.: Frequent reduction or loss of DCC gene expression in human osteosarcoma. *Br J Cancer* 75 (1997) 1309-17.
- Hosaka, S., Nakatsura, T., Tsukamoto, H., Hatayama, T., Baba, H. und Nishimura, Y.: Synthetic small interfering RNA targeting heat shock protein 105 induces apoptosis of various cancer cells both in vitro and in vivo. *Cancer Sci* 97 (2006) 623-32.
- Houzelstein, D., Goncalves, I.R., Fadden, A.J., Sidhu, S.S., Cooper, D.N., Drickamer, K., Leffler, H. und Poirier, F.: Phylogenetic analysis of the vertebrate galectin family. *Mol Biol Evol* 21 (2004) 1177-87.
- Hufton, S.E., Moerkerk, P.T., Brandwijk, R., de Bruine, A.P., Arends, J.W. und Hoogenboom, H.R.: A profile of differentially expressed genes in primary colorectal cancer using suppression subtractive hybridization. *FEBS Lett* 463 (1999) 77-82.
- Hughes, D.P., Thomas, D.G., Giordano, T.J., Baker, L.H. und McDonagh, K.T.: Cell surface expression of epidermal growth factor receptor and Her-2 with nuclear expression of Her-4 in primary osteosarcoma. *Cancer Res* 64 (2004) 2047-53.
- Huidbuchel, E., Blaschek, M., Seigneurin, J.M., Lamour, A., Berthelot, J.M. und Youinou, P.: Anti-organelle and anti-cytoskeletal autoantibodies in the serum of Epstein-Barr virus-infected patients. *Ann Med Interne (Paris)* 142 (1991) 343-6.
- Hung, J. und Anderson, R.: p53: functions, mutations and sarcomas. *Acta Orthop Scand Suppl* 273 (1997) 68-73.
- Inaba, H., Glibetic, M., Buck, S., Ravindranath, Y. und Kaplan, J.: Interferon-gamma sensitizes osteosarcoma cells to Fas-induced apoptosis by up-regulating Fas receptors and caspase-8. *Pediatr Blood Cancer* 43 (2004) 729-36.
- Isaacs, J.S., Xu, W. und Neckers, L.: Heat shock protein 90 as a molecular target for cancer therapeutics. *Cancer Cell* 3 (2003) 213-7.
- Ishida, H., Komiya, S., Inoue, Y., Yutani, S., Inoue, A. und Itoh, K.: Expression of the SART1 tumor-rejection antigen in human osteosarcomas. *Int J Oncol* 17 (2000) 29-32.
- Ishiguro, K. und Xavier, R.: Homer-3 regulates activation of serum response element in T cells via its EVH1 domain. *Blood* 103 (2004) 2248-56.
- Ishihara, K., Yasuda, K. und Hatayama, T.: Molecular cloning, expression and localization of human 105 kDa heat shock protein, hsp105. *Biochim Biophys Acta* 1444 (1999) 138-42.
- Ishihara, K., Yasuda, K. und Hatayama, T.: Phosphorylation of the 105-kDa heat shock proteins, HSP105alpha and HSP105beta, by casein kinase II. *Biochem Biophys Res Commun* 270 (2000) 927-31.
- Ishikawa, K., Nagase, T., Suyama, M., Miyajima, N., Tanaka, A., Kotani, H., Nomura, N. und Ohara, O.: Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. X. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which can code for large proteins in vitro. *DNA Res* 5 (1998) 169-76.
- Ishikura, H., Ikeda, H., Abe, H., Ohkuri, T., Hiraga, H., Isu, K., Tsukahara, T., Sato, N., Kitamura, H., Iwasaki, N., Takeda, N., Minami, A. und Nishimura, T.: Identification of CLUAP1 as a human osteosarcoma tumor-associated antigen recognized by the humoral immune system. *Int J Oncol* 30 (2007) 461-7.
- Ishizaki, T.: [Rho-mediated signal transduction and its physiological roles]. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 121 (2003) 153-62.
- Ishizaki, T., Maekawa, M., Fujisawa, K., Okawa, K., Iwamatsu, A., Fujita, A., Watanabe, N., Saito, Y., Kakizuka, A., Morii, N. und Narumiya, S.: The small GTP-binding protein Rho binds to and activates a 160 kDa Ser/Thr protein kinase homologous to myotonic dystrophy kinase. *Embo J* 15 (1996) 1885-93.
- Issels, R.D., Schlemmer, M. und Lindner, L.H.: The role of hyperthermia in combined treatment in the management of soft tissue sarcoma. *Curr Oncol Rep* 8 (2006) 305-9.

- Jacobs, J.F., Brasseur, F., Hulsbergen-van de Kaa, C.A., van de Rakt, M.W., Figdor, C.G., Adema, G.J., Hoogerbrugge, P.M., Coulie, P.G. und de Vries, I.J.: Cancer-germline gene expression in pediatric solid tumors using quantitative real-time PCR. *Int J Cancer* 120 (2007) 67-74.
- Jager, D., Taverna, C., Zippelius, A. und Knuth, A.: Identification of tumor antigens as potential target antigens for immunotherapy by serological expression cloning. *Cancer Immunol Immunother* 53 (2004) 144-7.
- Jager, E., Chen, Y.T., Drijfhout, J.W., Karbach, J., Ringhoffer, M., Jager, D., Arand, M., Wada, H., Noguchi, Y., Stockert, E., Old, L.J. und Knuth, A.: 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 (1998) 265-70.
- Jager, E., Karbach, J., Gnjatic, S., Jager, D., Maeurer, M., Atmaca, A., Arand, M., Skipper, J., Stockert, E., Chen, Y.T., Old, L.J. und Knuth, A.: Identification of a naturally processed NY-ESO-1 peptide recognized by CD8⁺ T cells in the context of HLA-B51. *Cancer Immun* 2 (2002) 12.
- Jager, E., Nagata, Y., Gnjatic, S., Wada, H., Stockert, E., Karbach, J., Dunbar, P.R., Lee, S.Y., Jungbluth, A., Jager, D., Arand, M., Ritter, G., Cerundolo, V., Dupont, B., Chen, Y.T., Old, L.J. und Knuth, A.: Monitoring CD8 T cell responses to NY-ESO-1: correlation of humoral and cellular immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (2000) 4760-5.
- Jager, E., Ringhoffer, M., Altmannsberger, M., Arand, M., Karbach, J., Jager, D., Oesch, F. und Knuth, A.: Immunoselection in vivo: independent loss of MHC class I and melanocyte differentiation antigen expression in metastatic melanoma. *Int J Cancer* 71 (1997) 142-7.
- Jager, E., Stockert, E., Zidianakis, Z., Chen, Y.T., Karbach, J., Jager, D., Arand, M., Ritter, G., Old, L.J. und Knuth, A.: Humoral immune responses of cancer patients against "Cancer-Testis" antigen NY-ESO-1: correlation with clinical events. *Int J Cancer* 84 (1999) 506-10.
- Jandl, T.: Identifizierung und Charakterisierung von Tumorantigenen eines Neuroblastoms Stadium 3 ohne MYCN-Genamplifikation mittels autologer serologischer Analyse einer Tumor-cDNS-Expressionsbibliothek. Dissertation an der Medizinischen Fakultät der TU München (2007).
- Janeway, C.A., jr., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M.J.: The humoral immune response. In: "Immunobiology: The Immune System in Health and Disease". Garland Science Publishing, New York and London 6th Edition (2005) 387-408.
- Ji, L., Arcinas, M. und Boxer, L.M.: The transcription factor, Nm23H2, binds to and activates the translocated c-myc allele in Burkitt's lymphoma. *J Biol Chem* 270 (1995) 13392-8.
- Jiang, Z.Y., Zhou, Q.L., Holik, J., Patel, S., Leszyk, J., Coleman, K., Chouinard, M. und Czech, M.P.: Identification of WNK1 as a substrate of Akt/protein kinase B and a negative regulator of insulin-stimulated mitogenesis in 3T3-L1 cells. *J Biol Chem* 280 (2005) 21622-8.
- Juszczynski, P., Ouyang, J., Monti, S., Rodig, S.J., Takeyama, K., Abramson, J., Chen, W., Kutok, J.L., Rabinovich, G.A. und Shipp, M.A.: The AP1-dependent secretion of galectin-1 by Reed Sternberg cells fosters immune privilege in classical Hodgkin lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (2007) 13134-9.
- Kaatsch, P., Spix, C., Schütz, J.: Epidemiologie, Ätiologie, Prävention. In: "Pädiatrische Hämatologie und Onkologie", Sektion III. Gadner, H., Gaedicke, G., Niemeyer, C., Ritter, J. (Hrsg.), Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 1. Auflage (2006) 421-30.
- Kager, L., Zoubek, A., Potschger, U., Kastner, U., Flege, S., Kempf-Bielack, B., Branscheid, D., Kotz, R., Salzer-Kuntschik, M., Winkelmann, W., Jundt, G., Kabisch, H.,

- Reichardt, P., Jurgens, H., Gadner, H. und Bielack, S.S.: Primary metastatic osteosarcoma: presentation and outcome of patients treated on neoadjuvant Cooperative Osteosarcoma Study Group protocols. *J Clin Oncol* 21 (2003) 2011-8.
- Kahle, K.T., Wilson, F.H., Lalioti, M., Toka, H., Qin, H. und Lifton, R.P.: WNK kinases: molecular regulators of integrated epithelial ion transport. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 13 (2004) 557-62.
- Kai, M., Nakatsura, T., Egami, H., Senju, S., Nishimura, Y. und Ogawa, M.: Heat shock protein 105 is overexpressed in a variety of human tumors. *Oncol Rep* 10 (2003) 1777-82.
- Karre, K.: NK cells, MHC class I molecules and the missing self. *Scand J Immunol* 55 (2002) 221-8.
- Kaste, S.C., Pratt, C.B., Cain, A.M., Jones-Wallace, D.J. und Rao, B.N.: Metastases detected at the time of diagnosis of primary pediatric extremity osteosarcoma at diagnosis: imaging features. *Cancer* 86 (1999) 1602-8.
- Kelleher, D.J. und Gilmore, R.: An evolving view of the eukaryotic oligosaccharyltransferase. *Glycobiology* 16 (2006) 47R-62R.
- Kempf-Bielack, B., Bielack, S.S., Jurgens, H., Branscheid, D., Berdel, W.E., Exner, G.U., Gobel, U., Helmke, K., Jundt, G., Kabisch, H., Kevric, M., Klingebiel, T., Kotz, R., Maas, R., Schwarz, R., Semik, M., Treuner, J., Zoubek, A. und Winkler, K.: Osteosarcoma relapse after combined modality therapy: an analysis of unselected patients in the Cooperative Osteosarcoma Study Group (COSS). *J Clin Oncol* 23 (2005) 559-68.
- Khanna, C., Khan, J., Nguyen, P., Prehn, J., Caylor, J., Yeung, C., Trepel, J., Meltzer, P. und Helman, L.: Metastasis-associated differences in gene expression in a murine model of osteosarcoma. *Cancer Res* 61 (2001) 3750-9.
- Khatib, Z.A., Matsushime, H., Valentine, M., Shapiro, D.N., Sherr, C.J. und Look, A.T.: Coamplification of the CDK4 gene with MDM2 and GLI in human sarcomas. *Cancer Res* 53 (1993) 5535-41.
- Kilpatrick, S.E., Geisinger, K.R., King, T.S., Sciarrotta, J., Ward, W.G., Gold, S.H. und Bos, G.D.: Clinicopathologic analysis of HER-2/neu immunoexpression among various histologic subtypes and grades of osteosarcoma. *Mod Pathol* 14 (2001) 1277-83.
- Kitagawa, K., Wang, X., Hatada, I., Yamaoka, T., Nojima, H., Inazawa, J., Abe, T., Mitsuya, K., Oshimura, M., Murata, A. et al.: Isolation and mapping of human homologues of an imprinted mouse gene U2af1-rs1. *Genomics* 30 (1995) 257-63.
- Kitchin, F.D. und Ellsworth, R.M.: Pleiotropic effects of the gene for retinoblastoma. *J Med Genet* 11 (1974) 244-6.
- Klebanoff, C.A., Khong, H.T., Antony, P.A., Palmer, D.C. und Restifo, N.P.: Sinks, suppressors and antigen presenters: how lymphodepletion enhances T cell-mediated tumor immunotherapy. *Trends Immunol* 26 (2005) 111-7.
- Kleinerman, E.S., Gano, J.B., Johnston, D.A., Benjamin, R.S. und Jaffe, N.: Efficacy of liposomal muramyl tripeptide (CGP 19835A) in the treatment of relapsed osteosarcoma. *Am J Clin Oncol* 18 (1995) 93-9.
- Kloen, P., Gebhardt, M.C., Perez-Atayde, A., Rosenberg, A.E., Springfield, D.S., Gold, L.I. und Mankin, H.J.: Expression of transforming growth factor-beta (TGF-beta) isoforms in osteosarcomas: TGF-beta3 is related to disease progression. *Cancer* 80 (1997) 2230-9.
- Knuth, A., Jager, D. und Jager, E.: Cancer immunotherapy in clinical oncology. *Cancer Chemother Pharmacol* 46 Suppl (2000) S46-51.
- Kolb, H.J., Mittermuller, J., Clemm, C., Holler, E., Ledderose, G., Brehm, G., Heim, M. und Wilmanns, W.: Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. *Blood* 76 (1990) 2462-5.

- Kolb, H.J., Schmid, C., Barrett, A.J. und Schendel, D.J.: Graft-versus-leukemia reactions in allogeneic chimeras. *Blood* 103 (2004) 767-76.
- Koulova, L., Novik, Y., Caliendo, G., Wiernik, P. und Dutcher, J.: A phase 2 study of moderate dose interleukin-2 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with metastatic or unresectable renal cell carcinoma. *J Immunother* 28 (2005) 576-81.
- Kreibich, G., Czako-Graham, M., Grebenau, R., Mok, W., Rodriguez-Boulan, E. und Sabatini, D.D.: Characterization of the ribosomal binding site in rat liver rough microsomes: ribophorins I and II, two integral membrane proteins related to ribosome binding. *J Supramol Struct* 8 (1978) 279-302.
- Kruzelock, R.P., Murphy, E.C., Strong, L.C., Naylor, S.L. und Hansen, M.F.: Localization of a novel tumor suppressor locus on human chromosome 3q important in osteosarcoma tumorigenesis. *Cancer Res* 57 (1997) 106-9.
- Kubista, B., Trieb, K., Blahovec, H., Kotz, R. und Micksche, M.: Hyperthermia increases the susceptibility of chondro- and osteosarcoma cells to natural killer cell-mediated lysis. *Anticancer Res* 22 (2002) 789-92.
- Leen, A.M., Rooney, C.M. und Foster, A.E.: Improving T cell therapy for cancer. *Annu Rev Immunol* 25 (2007) 243-65.
- Lehmann, A.R.: The role of SMC proteins in the responses to DNA damage. *DNA Repair (Amst)* 4 (2005) 309-14.
- Liao, W.M., Chiu, K.Y., Li, F.B., Qiu, J.S., Han, S.Y. und Chow, S.P.: Expression of nm23 protein in human osteosarcoma in relationship with early metastasis. *Orthopedics* 23 (2000) 1175-8.
- Liao, W.T., Song, L.B., Zhang, H.Z., Zhang, X., Zhang, L., Liu, W.L., Feng, Y., Guo, B.H., Mai, H.Q., Cao, S.M., Li, M.Z., Qin, H.D., Zeng, Y.X. und Zeng, M.S.: Centromere protein H is a novel prognostic marker for nasopharyngeal carcinoma progression and overall patient survival. *Clin Cancer Res* 13 (2007) 508-14.
- Liebau, C., Merk, H., Schmidt, S., Roesel, C., Karreman, C., Prisack, J.B., Bojar, H. und Baltzer, A.W.: Interleukin-12 and interleukin-18 change ICAM-I expression, and enhance natural killer cell mediated cytolysis of human osteosarcoma cells. *Cytokines Cell Mol Ther* 7 (2002) 135-42.
- Link, M.P., Gebhardt, M.C., Meyers, P.A. : Osteosarcoma. In: "Principles and Practice of Pediatric Oncology", Section IV. Pizzo, P.A., Poplack, D.G. (Editors), Lippincott Williams & Wilkins, New York, 5th Edition (2006) 1074-1107.
- Linnebacher, M., Gebert, J., Rudy, W., Woerner, S., Yuan, Y.P., Bork, P. und von Knebel Doeberitz, M.: Frameshift peptide-derived T-cell epitopes: a source of novel tumor-specific antigens. *Int J Cancer* 93 (2001) 6-11.
- Liu, F.T.: Regulatory roles of galectins in the immune response. *Int Arch Allergy Immunol* 136 (2005) 385-400.
- Liu, F.T. und Rabinovich, G.A.: Galectins as modulators of tumour progression. *Nat Rev Cancer* 5 (2005) 29-41.
- Loffler, C., Rao, V.V. und Hansmann, I.: Mapping of the ribophorin II (RPN II) gene to human chromosome 20q12-q13.1 by in-situ hybridization. *Hum Genet* 87 (1991) 221-2.
- Lonardo, F., Ueda, T., Huvos, A.G., Healey, J. und Ladanyi, M.: p53 and MDM2 alterations in osteosarcomas: correlation with clinicopathologic features and proliferative rate. *Cancer* 79 (1997) 1541-7.
- Lu, H., Knutson, K.L., Gad, E. und Disis, M.L.: The tumor antigen repertoire identified in tumor-bearing Neu transgenic mice predicts human tumor antigens. *Cancer Res* 66 (2006) 9754-61.

- Lu, Y., Ye, P., Chen, S.L., Tan, E.M. und Chan, E.K.: Identification of kinectin as a novel Behcet's disease autoantigen. *Arthritis Res Ther* 7 (2005) R1133-9.
- Lum, L.G., Davol, P.A. und Lee, R.J.: The new face of bispecific antibodies: targeting cancer and much more. *Exp Hematol* 34 (2006) 1-6.
- Mace, G., Miaczynska, M., Zerial, M. und Nebreda, A.R.: Phosphorylation of EEA1 by p38 MAP kinase regulates mu opioid receptor endocytosis. *Embo J* 24 (2005) 3235-46.
- Maekawa, M., Ishizaki, T., Boku, S., Watanabe, N., Fujita, A., Iwamatsu, A., Obinata, T., Ohashi, K., Mizuno, K. und Narumiya, S.: Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science* 285 (1999) 895-8.
- Maelandsmo, G.M., Berner, J.M., Florenes, V.A., Forus, A., Hovig, E., Fodstad, O. und Myklebost, O.: Homozygous deletion frequency and expression levels of the CDKN2 gene in human sarcomas--relationship to amplification and mRNA levels of CDK4 and CCND1. *Br J Cancer* 72 (1995) 393-8.
- Maitra, A., Roberts, H., Weinberg, A.G. und Geradts, J.: Loss of p16(INK4a) expression correlates with decreased survival in pediatric osteosarcomas. *Int J Cancer* 95 (2001) 34-8.
- Makarova, O.V., Makarov, E.M. und Luhrmann, R.: The 65 and 110 kDa SR-related proteins of the U4/U6.U5 tri-snRNP are essential for the assembly of mature spliceosomes. *Embo J* 20 (2001) 2553-63.
- Mao, Y., Desai, A. und Cleveland, D.W.: Microtubule capture by CENP-E silences BubR1-dependent mitotic checkpoint signaling. *J Cell Biol* 170 (2005) 873-80.
- Marcove, R.C.: A clinical trial of autogenous vaccines in the treatment of osteogenic sarcoma. *Beitr Pathol* 153 (1974) 65-72.
- Marcove, R.C., Mike, V., Huvos, A.G., Southam, C.M. und Levin, A.G.: Vaccine trials for osteogenic sarcoma. A preliminary report. *CA Cancer J Clin* 23 (1973) 74-80.
- Mariani, E., Meneghetti, A., Tarozzi, A., Cattini, L. und Facchini, A.: Interleukin-12 induces efficient lysis of natural killer-sensitive and natural killer-resistant human osteosarcoma cells: the synergistic effect of interleukin-2. *Scand J Immunol* 51 (2000) 618-25.
- Marina, N., Gebhardt, M., Teot, L. und Gorlick, R.: Biology and therapeutic advances for pediatric osteosarcoma. *Oncologist* 9 (2004) 422-41.
- Marsh, B., Flynn, L. und Enneking, W.: Immunologic aspects of osteosarcoma and their application to therapy. A preliminary report. *J Bone Joint Surg Am* 54 (1972) 1367-97.
- Masuda, H., Miller, C., Koeffler, H.P., Battifora, H. und Cline, M.J.: Rearrangement of the p53 gene in human osteogenic sarcomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84 (1987) 7716-9.
- Matarrese, P., Tinari, A., Mormone, E., Bianco, G.A., Toscano, M.A., Ascione, B., Rabinovich, G.A. und Malorni, W.: Galectin-1 sensitizes resting human T lymphocytes to Fas (CD95)-mediated cell death via mitochondrial hyperpolarization, budding, and fission. *J Biol Chem* 280 (2005) 6969-85.
- Mayet, W.J., Hermann, E., Csernok, E., Knuth, A., Poralla, T., Gross, W.L. und Meyer zum Buschenfelde, K.H.: A human renal cancer line as a new antigen source for the detection of antibodies to cytoplasmic and nuclear antigens in sera of patients with Wegener's granulomatosis. *J Immunol Methods* 143 (1991) 57-68.
- McClay, E.F. und Slovin, S.F.: Immunotherapeutic approaches to the treatment of bone and soft tissue sarcomas. *Semin Oncol* 16 (1989) 328-32.
- McGary, E.C., Heimberger, A., Mills, L., Weber, K., Thomas, G.W., Shtivelband, M., Lev, D.C. und Bar-Eli, M.: A fully human antimelanoma cellular adhesion molecule/MUC18 antibody inhibits spontaneous pulmonary metastasis of osteosarcoma cells in vivo. *Clin Cancer Res* 9 (2003) 6560-6.

- Meyers, P.A., Schwartz, C.L., Krailo, M., Kleinerman, E.S., Betcher, D., Bernstein, M.L., Conrad, E., Ferguson, W., Gebhardt, M., Goorin, A.M., Harris, M.B., Healey, J., Huvos, A., Link, M., Montebello, J., Nadel, H., Nieder, M., Sato, J., Siegal, G., Weiner, M., Wells, R., Wold, L., Womer, R. und Grier, H.: Osteosarcoma: a randomized, prospective trial of the addition of ifosfamide and/or muramyl tripeptide to cisplatin, doxorubicin, and high-dose methotrexate. *J Clin Oncol* 23 (2005) 2004-11.
- Miller, C.W., Aslo, A., Won, A., Tan, M., Lampkin, B. und Koeffler, H.P.: Alterations of the p53, Rb and MDM2 genes in osteosarcoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 122 (1996) 559-65.
- Milosevic, S., Behrends, U., Adhikary, D. und Mautner, J.: 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 (2006) 10357-64.
- Milosevic, S., Behrends, U., Christoph, H. und Mautner, J.: Direct mapping of MHC class II epitopes. *J Immunol Methods* 306 (2005) 28-39.
- Miniero, R., Brach del Prever, A., Vassallo, E., Nesi, F., Busca, A., Fagioli, F., Albiani, R., Picci, P., Bacci, G. und Madon, E.: Feasibility of high-dose chemotherapy and autologous peripheral blood stem cell transplantation in children with high grade osteosarcoma. *Bone Marrow Transplant* 22 Suppl 5 (1998) S37-40.
- Miyazaki, M., Nakatsura, T., Yokomine, K., Senju, S., Monji, M., Hosaka, S., Komori, H., Yoshitake, Y., Motomura, Y., Minohara, M., Kubo, T., Ishihara, K., Hatayama, T., Ogawa, M. und Nishimura, Y.: DNA vaccination of HSP105 leads to tumor rejection of colorectal cancer and melanoma in mice through activation of both CD4 T cells and CD8 T cells. *Cancer Sci* 96 (2005) 695-705.
- Modak, S., Kramer, K., Gultekin, S.H., Guo, H.F. und Cheung, N.K.: Monoclonal antibody 8H9 targets a novel cell surface antigen expressed by a wide spectrum of human solid tumors. *Cancer Res* 61 (2001) 4048-54.
- Mollet, I., Barbosa-Morais, N.L., Andrade, J. und Carmo-Fonseca, M.: Diversity of human U2AF splicing factors. *Febs J* 273 (2006) 4807-16.
- Momand, J., Zambetti, G.P., Olson, D.C., George, D. und Levine, A.J.: The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* 69 (1992) 1237-45.
- Morel, S., Levy, F., Bulet-Schiltz, O., Brasseur, F., Probst-Kepper, M., Peitrequin, A.L., Monsarrat, B., Van Velthoven, R., Cerottini, J.C., Boon, T., Gairin, J.E. und Van den Eynde, B.J.: Processing of some antigens by the standard proteasome but not by the immunoproteasome results in poor presentation by dendritic cells. *Immunity* 12 (2000) 107-17.
- Moretta, L. und Moretta, A.: Unravelling natural killer cell function: triggering and inhibitory human NK receptors. *Embo J* 23 (2004) 255-9.
- Mori, K., Redini, F., Gouin, F., Cherrier, B. und Heymann, D.: Osteosarcoma: current status of immunotherapy and future trends (Review). *Oncol Rep* 15 (2006) 693-700.
- Morrow, C.J., Tighe, A., Johnson, V.L., Scott, M.I., Ditchfield, C. und Taylor, S.S.: Bub1 and aurora B cooperate to maintain BubR1-mediated inhibition of APC/CCdc20. *J Cell Sci* 118 (2005) 3639-52.
- Mu, F.T., Callaghan, J.M., Steele-Mortimer, O., Stenmark, H., Parton, R.G., Campbell, P.L., McCluskey, J., Yeo, J.P., Tock, E.P. und Toh, B.H.: EEA1, an early endosome-associated protein. EEA1 is a conserved alpha-helical peripheral membrane protein flanked by cysteine "fingers" and contains a calmodulin-binding IQ motif. *J Biol Chem* 270 (1995) 13503-11.

- Nabeta, Y., Kawaguchi, S., Sahara, H., Ikeda, H., Hirohashi, Y., Goroku, T., Sato, Y., Tsukahara, T., Torigoe, T., Wada, T., Kaya, M., Hiraga, H., Isu, K., Yamawaki, S., Ishii, S., Yamashita, T. und Sato, N.: Recognition by cellular and humoral autologous immunity in a human osteosarcoma cell line. *J Orthop Sci* 8 (2003) 554-9.
- Nagarajan, R., Clohisy, D. und Weigel, B.: New paradigms for therapy for osteosarcoma. *Curr Oncol Rep* 7 (2005) 410-4.
- Nakatsura, T., Senju, S., Yamada, K., Jotsuka, T., Ogawa, M. und Nishimura, Y.: Gene cloning of immunogenic antigens overexpressed in pancreatic cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 281 (2001) 936-44.
- Nathrath, M.H., Kuosaite, V., Rosemann, M., Kremer, M., Poremba, C., Wakana, S., Yanagi, M., Nathrath, W.B., Hofler, H., Imai, K. und Atkinson, M.J.: Two novel tumor suppressor gene loci on chromosome 6q and 15q in human osteosarcoma identified through comparative study of allelic imbalances in mouse and man. *Oncogene* 21 (2002) 5975-80.
- Neff, J.R. und Enneking, W.F.: Adoptive immunotherapy in primary osteosarcoma. An interim report. *J Bone Joint Surg Am* 57 (1975) 145-8.
- Nimmerjahn, F. und Ravetch, J.V.: Fcgamma receptors: old friends and new family members. *Immunity* 24 (2006) 19-28.
- Noble-Topham, S.E., Burrow, S.R., Eppert, K., Kandel, R.A., Meltzer, P.S., Bell, R.S. und Andrulis, I.L.: SAS is amplified predominantly in surface osteosarcoma. *J Orthop Res* 14 (1996) 700-5.
- Noguera, R., Navarro, S. und Triche, T.J.: Translocation (11;22) in small cell osteosarcoma. *Cancer Genet Cytogenet* 45 (1990) 121-4.
- Nozawa, K., Casiano, C.A., Hamel, J.C., Molinaro, C., Fritzler, M.J. und Chan, E.K.: Fragmentation of Golgi complex and Golgi autoantigens during apoptosis and necrosis. *Arthritis Res* 4 (2002) R3.
- O'Brien, S.L., Fagan, A., Fox, E.J., Millikan, R.C., Culhane, A.C., Brennan, D.J., McCann, A.H., Hegarty, S., Moyna, S., Duffy, M.J., Higgins, D.G., Jirstrom, K., Landberg, G. und Gallagher, W.M.: CENP-F expression is associated with poor prognosis and chromosomal instability in patients with primary breast cancer. *Int J Cancer* 120 (2007) 1434-43.
- O'Connell, J., O'Sullivan, G.C., Collins, J.K. und Shanahan, F.: The Fas counterattack: Fas-mediated T cell killing by colon cancer cells expressing Fas ligand. *J Exp Med* 184 (1996) 1075-82.
- O'Neill, E. und Kolch, W.: Taming the Hippo: Raf-1 controls apoptosis by suppressing MST2/Hippo. *Cell Cycle* 4 (2005) 365-7.
- O'Neill, E., Rushworth, L., Baccarini, M. und Kolch, W.: Role of the kinase MST2 in suppression of apoptosis by the proto-oncogene product Raf-1. *Science* 306 (2004) 2267-70.
- O'Neill, E.E., Matallanas, D. und Kolch, W.: Mammalian sterile 20-like kinases in tumor suppression: an emerging pathway. *Cancer Res* 65 (2005) 5485-7.
- Oda, Y., Naka, T., Takeshita, M., Iwamoto, Y. und Tsuneyoshi, M.: Comparison of histological changes and changes in nm23 and c-MET expression between primary and metastatic sites in osteosarcoma: a clinicopathologic and immunohistochemical study. *Hum Pathol* 31 (2000) 709-16.
- Oda, Y., Walter, H., Radig, K., Rose, I., Neumann, W. und Roessner, A.: Immunohistochemical analysis of nm23 protein expression in malignant bone tumors. *J Cancer Res Clin Oncol* 121 (1995) 667-73.
- Ogihara, Y., Takeda, K., Yanagawa, T. und Hirasawa, Y.: Spontaneous regression of lung metastases from osteosarcoma. *Cancer* 74 (1994) 2798-803.

- Ohkura, T., Taniguchi, S., Yamada, K., Nishio, N., Okamura, T., Yoshida, A., Kamijou, K., Fukata, S., Kuma, K., Inoue, Y., Hisatome, I., Senju, S., Nishimura, Y. und Shigemasa, C.: Detection of the novel autoantibody (anti-UACA antibody) in patients with Graves' disease. *Biochem Biophys Res Commun* 321 (2004) 432-40.
- Okabe-Kado, J., Kasukabe, T. und Honma, Y.: Expression of cell surface NM23 proteins of human leukemia cell lines of various cellular lineage and differentiation stages. *Leuk Res* 26 (2002) 569-76.
- Old, L.J.: Cancer immunology: the search for specificity--G. H. A. Clowes Memorial lecture. *Cancer Res* 41 (1981) 361-75.
- Onda, M., Bruland, O.S. und Pastan, I.: TP-3 immunotoxins improve antitumor activity in mice with osteosarcoma. *Clin Orthop Relat Res* (2005) 142-8.
- Onda, M., Matsuda, S., Higaki, S., Iijima, T., Fukushima, J., Yokokura, A., Kojima, T., Horiuchi, H., Kurokawa, T. und Yamamoto, T.: ErbB-2 expression is correlated with poor prognosis for patients with osteosarcoma. *Cancer* 77 (1996) 71-8.
- Onda, M., Wang, Q.C., Guo, H.F., Cheung, N.K. und Pastan, I.: In vitro and in vivo cytotoxic activities of recombinant immunotoxin 8H9(Fv)-PE38 against breast cancer, osteosarcoma, and neuroblastoma. *Cancer Res* 64 (2004) 1419-24.
- Ong, L.L., Lin, P.C., Zhang, X., Chia, S.M. und Yu, H.: Kinectin-dependent assembly of translation elongation factor-1 complex on endoplasmic reticulum regulates protein synthesis. *J Biol Chem* 281 (2006) 33621-34.
- Ozaki, T., Neumann, T., Wai, D., Schaefer, K.L., van Valen, F., Lindner, N., Scheel, C., Bocker, W., Winkelmann, W., Dockhorn-Dworniczak, B., Horst, J. und Poremba, C.: Chromosomal alterations in osteosarcoma cell lines revealed by comparative genomic hybridization and multicolor karyotyping. *Cancer Genet Cytogenet* 140 (2003) 145-52.
- Ozaki, T., Schaefer, K.L., Wai, D., Buerger, H., Flege, S., Lindner, N., Kevric, M., Diallo, R., Bankfalvi, A., Brinkschmidt, C., Juergens, H., Winkelmann, W., Dockhorn-Dworniczak, B., Bielack, S.S. und Poremba, C.: Genetic imbalances revealed by comparative genomic hybridization in osteosarcomas. *Int J Cancer* 102 (2002) 355-65.
- Pakos, E.E. und Ioannidis, J.P.: The association of P-glycoprotein with response to chemotherapy and clinical outcome in patients with osteosarcoma. A meta-analysis. *Cancer* 98 (2003) 581-9.
- Pardoll, D.M.: Paracrine cytokine adjuvants in cancer immunotherapy. *Annu Rev Immunol* 13 (1995) 399-415.
- Patino-Garcia, A. und Sierrasesumaga, L.: Analysis of the p16INK4 and TP53 tumor suppressor genes in bone sarcoma pediatric patients. *Cancer Genet Cytogenet* 98 (1997) 50-5.
- Paz, A., Haklai, R., Elad-Sfadia, G., Ballan, E. und Kloog, Y.: Galectin-1 binds oncogenic H-Ras to mediate Ras membrane anchorage and cell transformation. *Oncogene* 20 (2001) 7486-93.
- Pegram, M.D., Konecny, G.E., O'Callaghan, C., Beryt, M., Pietras, R. und Slamon, D.J.: Rational combinations of trastuzumab with chemotherapeutic drugs used in the treatment of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 96 (2004) 739-49.
- Perillo, N.L., Pace, K.E., Seilhamer, J.J. und Baum, L.G.: Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. *Nature* 378 (1995) 736-9.
- Pfreundschuh, M.: Exploitation of the B cell repertoire for the identification of human tumor antigens. *Cancer Chemother Pharmacol* 46 Suppl (2000) S3-7.
- Pfreundschuh, M., Shiku, H., Takahashi, T., Ueda, R., Ransohoff, J., Oettgen, H.F. und Old, L.J.: Tumor-specific antigens. *Recent Results Cancer Res* 75 (1980) 1-9.
- Picci, P.: Osteosarcoma (osteogenic sarcoma). *Orphanet J Rare Dis* 2 (2007) 6.

- Pieper, R., Christian, R.E., Gonzales, M.I., Nishimura, M.I., Gupta, G., Settlage, R.E., Shabanowitz, J., Rosenberg, S.A., Hunt, D.F. und Topalian, S.L.: Biochemical identification of a mutated human melanoma antigen recognized by CD4(+) T cells. *J Exp Med* 189 (1999) 757-66.
- Pinon, V.P., Millot, G., Munier, A., Vassy, J., Linares-Cruz, G., Capeau, J., Calvo, F. und Lacombe, M.L.: Cytoskeletal association of the A and B nucleoside diphosphate kinases of interphasic but not mitotic human carcinoma cell lines: specific nuclear localization of the B subunit. *Exp Cell Res* 246 (1999) 355-67.
- Postel, E.H.: Multiple biochemical activities of NM23/NDP kinase in gene regulation. *J Bioenerg Biomembr* 35 (2003) 31-40.
- Postel, E.H., Berberich, S.J., Flint, S.J. und Ferrone, C.A.: Human c-myc transcription factor PuF identified as nm23-H2 nucleoside diphosphate kinase, a candidate suppressor of tumor metastasis. *Science* 261 (1993) 478-80.
- Preiss, S., Kammertoens, T., Lampert, C., Willimsky, G. und Blankenstein, T.: Tumor-induced antibodies resemble the response to tissue damage. *Int J Cancer* 115 (2005) 456-62.
- Print, C.G., Leung, E., Harrison, J.E., Watson, J.D. und Krissansen, G.W.: Cloning of a gene encoding a human leukocyte protein characterised by extensive heptad repeats. *Gene* 144 (1994) 221-8.
- Printz, C.: Spontaneous regression of melanoma may offer insight into cancer immunology. *J Natl Cancer Inst* 93 (2001) 1047-8.
- Prives, C. und Hall, P.A.: The p53 pathway. *J Pathol* 187 (1999) 112-26.
- Probst-Kepper, M., Stroobant, V., Kridel, R., Gaugler, B., Landry, C., Brasseur, F., Cosyns, J.P., Weynand, B., Boon, T. und Van Den Eynde, B.J.: An alternative open reading frame of the human macrophage colony-stimulating factor gene is independently translated and codes for an antigenic peptide of 14 amino acids recognized by tumor-infiltrating CD8 T lymphocytes. *J Exp Med* 193 (2001) 1189-98.
- Quelle, D.E., Zindy, F., Ashmun, R.A. und Sherr, C.J.: Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell* 83 (1995) 993-1000.
- Rabinovich, G.A.: Galectin-1 as a potential cancer target. *Br J Cancer* 92 (2005) 1188-92.
- Ragazzini, P., Gamberi, G., Benassi, M.S., Orlando, C., Sestini, R., Ferrari, C., Molendini, L., Sollazzo, M.R., Merli, M., Magagnoli, G., Bertoni, F., Bohling, T., Pazzagli, M. und Picci, P.: Analysis of SAS gene and CDK4 and MDM2 proteins in low-grade osteosarcoma. *Cancer Detect Prev* 23 (1999) 129-36.
- Ragland, B.D., Bell, W.C., Lopez, R.R. und Siegal, G.P.: Cytogenetics and molecular biology of osteosarcoma. *Lab Invest* 82 (2002) 365-73.
- Rane, S.G., Cosenza, S.C., Mettus, R.V. und Reddy, E.P.: Germ line transmission of the Cdk4(R24C) mutation facilitates tumorigenesis and escape from cellular senescence. *Mol Cell Biol* 22 (2002) 644-56.
- Rao, P.N., Yu, H., Hodge, R., Pettenati, M.J. und Sheetz, M.P.: Assignment of the human kinectin gene (KTN1), encoding a kinesin-binding protein, to chromosome 14 band q22.1 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 79 (1997) 196-7.
- Rattner, J.B., Rees, J., Arnett, F.C., Reveille, J.D., Goldstein, R. und Fritzler, M.J.: The centromere kinesin-like protein, CENP-E. An autoantigen in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 39 (1996) 1355-61.
- Restifo, N.P., Esquivel, F., Kawakami, Y., Yewdell, J.W., Mule, J.J., Rosenberg, S.A. und Bennink, J.R.: Identification of human cancers deficient in antigen processing. *J Exp Med* 177 (1993a) 265-72.
- Restifo, N.P., Kawakami, Y., Marincola, F., Shamamian, P., Taggarse, A., Esquivel, F. und Rosenberg, S.A.: Molecular mechanisms used by tumors to escape immune

- recognition: immunogenotherapy and the cell biology of major histocompatibility complex class I. *J Immunother* 14 (1993b) 182-90.
- Riddell, S.R. und Greenberg, P.D.: Therapeutic reconstitution of human viral immunity by adoptive transfer of cytotoxic T lymphocyte clones. *Curr Top Microbiol Immunol* 189 (1994) 9-34.
- Riddell, S.R. und Greenberg, P.D.: Principles for adoptive T cell therapy of human viral diseases. *Annu Rev Immunol* 13 (1995) 545-86.
- Rivoltini, L., Arienti, F., Orazi, A., Cefalo, G., Gasparini, M., Gambacorti-Passerini, C., Fossati-Bellani, F. und Parmiani, G.: Phenotypic and functional analysis of lymphocytes infiltrating paediatric tumours, with a characterization of the tumour phenotype. *Cancer Immunol Immunother* 34 (1992) 241-51.
- Roden, R. und Wu, T.C.: How will HPV vaccines affect cervical cancer? *Nat Rev Cancer* 6 (2006) 753-63.
- Rodriguez, J.L., Gelpi, C., Thomson, T.M., Real, F.J. und Fernandez, J.: Anti-golgi complex autoantibodies in a patient with Sjogren syndrome and lymphoma. *Clin Exp Immunol* 49 (1982) 579-86.
- Rooney, C.M., Smith, C.A., Ng, C.Y., Loftin, S., Li, C., Krance, R.A., Brenner, M.K. und Heslop, H.E.: Use of gene-modified virus-specific T lymphocytes to control Epstein-Barr-virus-related lymphoproliferation. *Lancet* 345 (1995) 9-13.
- Rooney, C.M., Smith, C.A., Ng, C.Y., Loftin, S.K., Sixbey, J.W., Gan, Y., Srivastava, D.K., Bowman, L.C., Krance, R.A., Brenner, M.K. und Heslop, H.E.: Infusion of cytotoxic T cells for the prevention and treatment of Epstein-Barr virus-induced lymphoma in allogeneic transplant recipients. *Blood* 92 (1998) 1549-55.
- Rosengard, A.M., Krutzsch, H.C., Shearn, A., Biggs, J.R., Barker, E., Margulies, I.M., King, C.R., Liotta, L.A. und Steeg, P.S.: Reduced Nm23/Awd protein in tumour metastasis and aberrant *Drosophila* development. *Nature* 342 (1989) 177-80.
- Roskrow, M.A., Zibert, A., Souquet, M. und Dilloo, D.: Tumor vaccines--application to childhood cancer. *Klin Padiatr* 211 (1999) 336-46.
- Rößler, S.: Identifikation von Antigenen eines großzelligen Medulloblastoms mit Hilfe der autologen serologischen Analyse einer Tumor cDNA-Expressionsbibliothek (SEREX). Dissertation an der Medizinischen Fakultät der TU München (2006).
- Rowe, M., Khanna, R., Jacob, C.A., Arguet, V., Kelly, A., Powis, S., Belich, M., Croom-Carter, D., Lee, S., Burrows, S.R. et al.: Restoration of endogenous antigen processing in Burkitt's lymphoma cells by Epstein-Barr virus latent membrane protein-1: coordinate up-regulation of peptide transporters and HLA-class I antigen expression. *Eur J Immunol* 25 (1995) 1374-84.
- Rubinstein, N., Alvarez, M., Zwirner, N.W., Toscano, M.A., Ibarregui, J.M., Bravo, A., Mordoh, J., Fainboim, L., Podhajcer, O.L. und Rabinovich, G.A.: Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-mediated rejection; A potential mechanism of tumor-immune privilege. *Cancer Cell* 5 (2004) 241-51.
- Sabate, J.M., Llauger, J., Torrubia, S., Amores, S. und Franquet, T.: Osteosarcoma of the abdominal wall with spontaneous regression of lung metastases. *AJR Am J Roentgenol* 171 (1998) 691-2.
- Sabourin, L.A. und Rudnicki, M.A.: Induction of apoptosis by SLK, a Ste20-related kinase. *Oncogene* 18 (1999) 7566-75.
- Sabourin, L.A., Tamai, K., Seale, P., Wagner, J. und Rudnicki, M.A.: Caspase 3 cleavage of the Ste20-related kinase SLK releases and activates an apoptosis-inducing kinase domain and an actin-disassembling region. *Mol Cell Biol* 20 (2000) 684-96.
- Saeter, G., Alvegard, T.A., Elomaa, I., Stenwig, A.E., Holmstrom, T. und Solheim, O.P.: Treatment of osteosarcoma of the extremities with the T-10 protocol, with emphasis

- on the effects of preoperative chemotherapy with single-agent high-dose methotrexate: a Scandinavian Sarcoma Group study. *J Clin Oncol* 9 (1991) 1766-75.
- Sahin, U., Tureci, O., Schmitt, H., Cochlovius, B., Johannes, T., Schmits, R., Stenner, F., Luo, G., Schobert, I. und Pfreundschuh, M.: Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (1995) 11810-3.
- Saito, M., Yu, R.K. und Cheung, N.K.: Ganglioside GD2 specificity of monoclonal antibodies to human neuroblastoma cell. *Biochem Biophys Res Commun* 127 (1985) 1-7.
- Salassidis, K., Bruch, J., Zitzelsberger, H., Lengfelder, E., Kellerer, A.M. und Bauchinger, M.: Translocation t(10;14)(q11.2;q22.1) fusing the kinetin to the RET gene creates a novel rearranged form (PTC8) of the RET proto-oncogene in radiation-induced childhood papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res* 60 (2000) 2786-9.
- Salmaggi, A., Luksch, R., Forno, M.G., Pozzi, A., Silvani, A., Boiardi, A., Gasparini, M. und Nemni, R.: Antineuronal antibodies in patients with neuroblastoma: relationships with clinical features. *Tumori* 83 (1997) 953-7.
- Salzer-Kuntschik, M., Brand, G. und Delling, G.: [Determination of the degree of morphological regression following chemotherapy in malignant bone tumors]. *Pathologe* 4 (1983) 135-41.
- Sandberg, A.A. und Bridge, J.A.: Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors: osteosarcoma and related tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 145 (2003) 1-30.
- Sauerbrey, A., Bielack, S., Kempf-Bielack, B., Zoubek, A., Paulussen, M. und Zintl, F.: High-dose chemotherapy (HDC) and autologous hematopoietic stem cell transplantation (ASCT) as salvage therapy for relapsed osteosarcoma. *Bone Marrow Transplant* 27 (2001) 933-7.
- Scanlan, M.J., Chen, Y.T., Williamson, B., Gure, A.O., Stockert, E., Gordan, J.D., Tureci, O., Sahin, U., Pfreundschuh, M. und Old, L.J.: Characterization of human colon cancer antigens recognized by autologous antibodies. *Int J Cancer* 76 (1998) 652-8.
- Scanlan, M.J., Gure, A.O., Jungbluth, A.A., Old, L.J. und Chen, Y.T.: Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy. *Immunol Rev* 188 (2002) 22-32.
- Scanlan, M.J., Simpson, A.J. und Old, L.J.: The cancer/testis genes: review, standardization, and commentary. *Cancer Immun* 4 (2004) 1.
- Schafer-Hales, K., Iaconelli, J., Snyder, J.P., Prussia, A., Nettles, J.H., El-Naggar, A., Khuri, F.R., Giannakakou, P. und Marcus, A.I.: Farnesyl transferase inhibitors impair chromosomal maintenance in cell lines and human tumors by compromising CENP-E and CENP-F function. *Mol Cancer Ther* 6 (2007) 1317-28.
- Schmits, R., Cochlovius, B., Treitz, G., Regitz, E., Ketter, R., Preuss, K.D., Romeike, B.F. und Pfreundschuh, M.: Analysis of the antibody repertoire of astrocytoma patients against antigens expressed by gliomas. *Int J Cancer* 98 (2002) 73-7.
- Schneider, I.: Identifikation von Antigenen eines kleinzelligen, metastasierten Medulloblastoms mit Hilfe der autologen serologischen Analyse einer Tumor cDNA-Expressionsbibliothek (SEREX). Dissertation an der Medizinischen Fakultät der TU München (2006).
- Scotlandi, K., Manara, M.C., Hattinger, C.M., Benini, S., Perdichizzi, S., Pasello, M., Bacci, G., Zanella, L., Bertoni, F., Picci, P. und Serra, M.: Prognostic and therapeutic relevance of HER2 expression in osteosarcoma and Ewing's sarcoma. *Eur J Cancer* 41 (2005) 1349-61.
- Selak, S., Braun, J.E. und Fritzler, M.J.: Characterization of early endosome antigen 1 in neural tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 323 (2004) 1334-42.

- Serra, M., Maurici, D., Scotlandi, K., Barbanti-Brodano, G., Manara, M.C., Benini, S., Picci, P., Bertoni, F., Bacci, G., Sottili, S. und Baldini, N.: Relationship between P-glycoprotein expression and p53 status in high-grade osteosarcoma. *Int J Oncol* 14 (1999) 301-7.
- Serra, M., Pasello, M., Manara, M.C., Scotlandi, K., Ferrari, S., Bertoni, F., Mercuri, M., Alvegard, T.A., Picci, P., Bacci, G. und Smeland, S.: May P-glycoprotein status be used to stratify high-grade osteosarcoma patients? Results from the Italian/Scandinavian Sarcoma Group 1 treatment protocol. *Int J Oncol* 29 (2006) 1459-68.
- Shibatani, T., David, L.L., McCormack, A.L., Frueh, K. und Skach, W.R.: Proteomic analysis of mammalian oligosaccharyltransferase reveals multiple subcomplexes that contain Sec61, TRAP, and two potential new subunits. *Biochemistry* 44 (2005) 5982-92.
- Shinkoda, Y., Ijichi, O., Tanabe, T., Nishikawa, T., Manago, K., Ishikawa, S., Kodama, Y., Okamoto, Y., Ikarimoto, N. und Kawano, Y.: Rapid progression of metastatic osteosarcoma after initiation of a reduced-intensity conditioning regimen with immunosuppressive fludarabine. *Pediatr Transplant* 10 (2006) 822-5.
- Simons, A., Schepens, M., Forus, A., Godager, L., van Asseldonk, M., Myklebost, O. und van Kessel, A.G.: A novel chromosomal region of allelic loss, 4q32-q34, in human osteosarcomas revealed by representational difference analysis. *Genes Chromosomes Cancer* 26 (1999) 115-24.
- Singh-Jasuja, H., Emmerich, N.P. und Rammensee, H.G.: The Tübingen approach: identification, selection, and validation of tumor-associated HLA peptides for cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother* 53 (2004) 187-95.
- Skipper, J.C., Hendrickson, R.C., Gulden, P.H., Brichard, V., Van Pel, A., Chen, Y., Shabanowitz, J., Wolfel, T., Slingluff, C.L., Jr., Boon, T., Hunt, D.F. und Engelhard, V.H.: An HLA-A2-restricted tyrosinase antigen on melanoma cells results from posttranslational modification and suggests a novel pathway for processing of membrane proteins. *J Exp Med* 183 (1996) 527-34.
- Slingluff, C.L., Jr., Hunt, D.F. und Engelhard, V.H.: Direct analysis of tumor-associated peptide antigens. *Curr Opin Immunol* 6 (1994) 733-40.
- Slovin, S.F., Lackman, R.D., Ferrone, S., Kiely, P.E. und Mastrangelo, M.J.: Cellular immune response to human sarcomas: cytotoxic T cell clones reactive with autologous sarcomas. I. Development, phenotype, and specificity. *J Immunol* 137 (1986) 3042-8.
- Smith, E.S., Mandokhot, A., Evans, E.E., Mueller, L., Borrello, M.A., Sahasrabudhe, D.M. und Zauderer, M.: Lethality-based selection of recombinant genes in mammalian cells: application to identifying tumor antigens. *Nat Med* 7 (2001) 967-72.
- Smith, E.S., Shi, S. und Zauderer, M.: Construction of cDNA libraries in vaccinia virus. *Methods Mol Biol* 269 (2004) 65-76.
- Soares, L.M., Zanier, K., Mackereth, C., Sattler, M. und Valcarcel, J.: Intron removal requires proofreading of U2AF/3' splice site recognition by DEK. *Science* 312 (2006) 1961-5.
- Sobin, L.H.: TNM, sixth edition: new developments in general concepts and rules. *Semin Surg Oncol* 21 (2003) 19-22.
- Soiffer, R., Lynch, T., Mihm, M., Jung, K., Rhuda, C., Schmollinger, J.C., Hodi, F.S., Lieber, L., Lam, P., Mentzer, S., Singer, S., Tanabe, K.K., Cosimi, A.B., Duda, R., Sober, A., Bhan, A., Daley, J., Neuberger, D., Parry, G., Rokovich, J., Richards, L., Drayer, J., Berns, A., Clift, S., Cohen, L.K., Mulligan, R.C. und Dranoff, G.: Vaccination with irradiated autologous melanoma cells engineered to secrete human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor generates potent antitumor immunity in patients with metastatic melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998) 13141-6.

- Staeger, M.S., Lee, S.P., Frisan, T., Mautner, J., Scholz, S., Pajic, A., Rickinson, A.B., Masucci, M.G., Polack, A. und Bornkamm, G.W.: MYC overexpression imposes a nonimmunogenic phenotype on Epstein-Barr virus-infected B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2002) 4550-5.
- Stahl, J.A., Leone, A., Rosengard, A.M., Porter, L., King, C.R. und Steeg, P.S.: Identification of a second human nm23 gene, nm23-H2. *Cancer Res* 51 (1991) 445-9.
- Stenner-Liewen, F., Luo, G., Sahin, U., Tureci, O., Koslovski, M., Kautz, I., Liewen, H. und Pfreundschuh, M.: Definition of tumor-associated antigens in hepatocellular carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9 (2000) 285-90.
- Strander, H.: Interferons and osteosarcoma. *Cytokine Growth Factor Rev* 18 (2007) 373-80.
- Strander, H., Bauer, H.C., Brosjo, O., Fernberg, J.O., Kreicbergs, A., Nilsson, U., Silfversward, C., Signomklao, T. und Soderlund, V.: Long-term adjuvant interferon treatment of human osteosarcoma. A pilot study. *Acta Oncol* 34 (1995) 877-80.
- Strander, H. und Einhorn, S.: Effect of human leukocyte interferon on the growth of human osteosarcoma cells in tissue culture. *Int J Cancer* 19 (1977) 468-73.
- Sudo, T., Kuramoto, T., Komiya, S., Inoue, A. und Itoh, K.: Expression of MAGE genes in osteosarcoma. *J Orthop Res* 15 (1997) 128-32.
- Sun, X., Gao, L., Yu, R.K. und Zeng, G.: Down-regulation of WNK1 protein kinase in neural progenitor cells suppresses cell proliferation and migration. *J Neurochem* 99 (2006) 1114-21.
- Suyama, E., Kawasaki, H., Kasaoka, T. und Taira, K.: Identification of genes responsible for cell migration by a library of randomized ribozymes. *Cancer Res* 63 (2003) 119-24.
- Sztan, M., Papai, Z., Szendroi, M., Looij, M. und Olah, E.: Allelic Losses from Chromosome 17 in Human Osteosarcomas. *Pathol Oncol Res* 3 (1997) 115-120.
- Szumliński, K.K., Kalivas, P.W. und Worley, P.F.: Homer proteins: implications for neuropsychiatric disorders. *Curr Opin Neurobiol* 16 (2006) 251-7.
- Szymanska, J., Mandahl, N., Mertens, F., Tarkkanen, M., Karaharju, E. und Knuutila, S.: Ring chromosomes in parosteal osteosarcoma contain sequences from 12q13-15: a combined cytogenetic and comparative genomic hybridization study. *Genes Chromosomes Cancer* 16 (1996) 31-4.
- Takahashi, N., Tuiki, H., Saya, H. und Kaibuchi, K.: Localization of the gene coding for ROCK II/Rho kinase on human chromosome 2p24. *Genomics* 55 (1999) 235-7.
- Tanaka, T., Nishimura, D., Wu, R.C., Amano, M., Iso, T., Kedes, L., Nishida, H., Kaibuchi, K. und Hamamori, Y.: Nuclear Rho kinase, ROCK2, targets p300 acetyltransferase. *J Biol Chem* 281 (2006) 15320-9.
- Tanudji, M., Shoemaker, J., L'Italien, L., Russell, L., Chin, G. und Schebye, X.M.: Gene silencing of CENP-E by small interfering RNA in HeLa cells leads to missegregation of chromosomes after a mitotic delay. *Mol Biol Cell* 15 (2004) 3771-81.
- Taylor-Papadimitriou, J., Burchell, J., Miles, D.W. und Dalziel, M.: MUC1 and cancer. *Biochim Biophys Acta* 1455 (1999) 301-13.
- Testa, J.R., Zhou, J.Y., Bell, D.W. und Yen, T.J.: Chromosomal localization of the genes encoding the kinetochore proteins CENPE and CENPF to human chromosomes 4q24-->q25 and 1q32-->q41, respectively, by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* 23 (1994) 691-3.
- Thomas, D.G., Giordano, T.J., Sanders, D., Biermann, J.S. und Baker, L.: Absence of HER2/neu gene expression in osteosarcoma and skeletal Ewing's sarcoma. *Clin Cancer Res* 8 (2002) 788-93.
- Thomas, L.: On immunosurveillance in human cancer. *Yale J Biol Med* 55 (1982) 329-33.
- Thumann, P., Moc, I., Humrich, J., Berger, T.G., Schultz, E.S., Schuler, G. und Jenne, L.: Antigen loading of dendritic cells with whole tumor cell preparations. *J Immunol Methods* 277 (2003) 1-16.

- Trieb, K., Gerth, R., Holzer, G., Grohs, J.G., Berger, P. und Kotz, R.: Antibodies to heat shock protein 90 in osteosarcoma patients correlate with response to neoadjuvant chemotherapy. *Br J Cancer* 82 (2000a) 85-7.
- Trieb, K., Lechleitner, T., Lang, S., Windhager, R., Kotz, R. und Dirnhofer, S.: Evaluation of HLA-DR expression and T-lymphocyte infiltration in osteosarcoma. *Pathol Res Pract* 194 (1998) 679-84.
- Trieb, K., Thurnher, D., Bakroeva, M., Kotz, R. und Kornfehl, J.: Reversible downregulation of telomerase activity by hyperthermia in osteosarcoma cells. *Int J Hyperthermia* 16 (2000b) 445-8.
- Tronchere, H., Wang, J. und Fu, X.D.: A protein related to splicing factor U2AF35 that interacts with U2AF65 and SR proteins in splicing of pre-mRNA. *Nature* 388 (1997) 397-400.
- Tsuda, N., Murayama, K., Ishida, H., Matsunaga, K., Komiya, S., Itoh, K. und Yamada, A.: Expression of a newly defined tumor-rejection antigen SART3 in musculoskeletal tumors and induction of HLA class I-restricted cytotoxic T lymphocytes by SART3-derived peptides. *J Orthop Res* 19 (2001) 346-51.
- Tsukahara, T., Kawaguchi, S., Torigoe, T., Asanuma, H., Nakazawa, E., Shimosawa, K., Nabeta, Y., Kimura, S., Kaya, M., Nagoya, S., Wada, T., Yamashita, T. und Sato, N.: Prognostic significance of HLA class I expression in osteosarcoma defined by anti-pan HLA class I monoclonal antibody, EMR8-5. *Cancer Sci* 97 (2006) 1374-80.
- Tsukahara, T., Nabeta, Y., Kawaguchi, S., Ikeda, H., Sato, Y., Shimosawa, K., Ida, K., Asanuma, H., Hirohashi, Y., Torigoe, T., Hiraga, H., Nagoya, S., Wada, T., Yamashita, T. und Sato, N.: Identification of human autologous cytotoxic T-lymphocyte-defined osteosarcoma gene that encodes a transcriptional regulator, papillomavirus binding factor. *Cancer Res* 64 (2004) 5442-8.
- Tu, J.C., Xiao, B., Yuan, J.P., Lanahan, A.A., Leoffert, K., Li, M., Linden, D.J. und Worley, P.F.: Homer binds a novel proline-rich motif and links group 1 metabotropic glutamate receptors with IP3 receptors. *Neuron* 21 (1998) 717-26.
- Tureci, O., Sahin, U. und Pfreundschuh, M.: Serological analysis of human tumor antigens: molecular definition and implications. *Mol Med Today* 3 (1997) 342-9.
- Tureci, O., Sahin, U., Zwick, C., Neumann, F. und Pfreundschuh, M.: Exploitation of the antibody repertoire of cancer patients for the identification of human tumor antigens. *Hybridoma* 18 (1999) 23-8.
- Tureci, O., Usener, D., Schneider, S. und Sahin, U.: Identification of tumor-associated autoantigens with SEREX. *Methods Mol Med* 109 (2005) 137-54.
- Turner, M.S., Fen Fen, L., Trauger, J.W., Stephens, J. und LoGrasso, P.: Characterization and purification of truncated human Rho-kinase II expressed in Sf-21 cells. *Arch Biochem Biophys* 405 (2002) 13-20.
- Uemura, M., Nouse, K., Kobayashi, Y., Tanaka, H., Nakamura, S., Higashi, T., Ono, T., Nakayama, E., Hanafusa, T. und Shiratori, Y.: Identification of the antigens predominantly reacted with serum from patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer* 97 (2003) 2474-9.
- Valabrega, G., Fagioli, F., Corso, S., Madon, E., Brach del Prever, A., Biasin, E., Linari, A., Aglietta, M. und Giordano, S.: ErbB2 and bone sialoprotein as markers for metastatic osteosarcoma cells. *Br J Cancer* 88 (2003) 396-400.
- Valenta, R., Natter, S., Seiberler, S., Wichlas, S., Maurer, D., Hess, M., Pavelka, M., Grote, M., Ferreira, F., Szeffalusi, Z., Valent, P. und Stingl, G.: Molecular characterization of an autoallergen, Hom s 1, identified by serum IgE from atopic dermatitis patients. *J Invest Dermatol* 111 (1998) 1178-83.
- Valmori, D., Dutoit, V., Lienard, D., Rimoldi, D., Pittet, M.J., Champagne, P., Ellefsen, K., Sahin, U., Speiser, D., Lejeune, F., Cerottini, J.C. und Romero, P.: Naturally occurring

- human lymphocyte antigen-A2 restricted CD8+ T-cell response to the cancer testis antigen NY-ESO-1 in melanoma patients. *Cancer Res* 60 (2000) 4499-506.
- Valmori, D., Souleimanian, N.E., Hesdorffer, C.S., Old, L.J. und Ayyoub, M.: Quantitative and qualitative assessment of circulating NY-ESO-1 specific CD4+ T cells in cancer-free individuals. *Clin Immunol* 117 (2005) 161-7.
- van den Brule, F., Califice, S. und Castronovo, V.: Expression of galectins in cancer: a critical review. *Glycoconj J* 19 (2004) 537-42.
- van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van den Eynde, B., Knuth, A. und Boon, T.: A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254 (1991) 1643-7.
- van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van den Eynde, B.J., Knuth, A. und Boon, T.: A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *J Immunol* 178 (2007) 2617-21.
- Verissimo, F. und Jordan, P.: WNK kinases, a novel protein kinase subfamily in multi-cellular organisms. *Oncogene* 20 (2001) 5562-9.
- Vitari, A.C., Deak, M., Collins, B.J., Morrice, N., Prescott, A.R., Phelan, A., Humphreys, S. und Alessi, D.R.: WNK1, the kinase mutated in an inherited high-blood-pressure syndrome, is a novel PKB (protein kinase B)/Akt substrate. *Biochem J* 378 (2004) 257-68.
- Vogelstein, B. und Kinzler, K.W.: Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 10 (2004) 789-99.
- Vyakarnam, A., Dagher, S.F., Wang, J.L. und Patterson, R.J.: Evidence for a role for galectin-1 in pre-mRNA splicing. *Mol Cell Biol* 17 (1997) 4730-7.
- Wagner, D.S., Gan, L. und Klein, W.H.: Identification of a differentially expressed RNA helicase by gene trapping. *Biochem Biophys Res Commun* 262 (1999) 677-84.
- Waite, R.L., Sentry, J.W., Stenmark, H. und Toh, B.H.: Autoantibodies to a novel early endosome antigen 1. *Clin Immunol Immunopathol* 86 (1998) 81-7.
- Wang, H.C., Su, Y.R., Han, K.J., Pang, X.W., Peng, J.R., Liang, B., Wang, S. und Chen, W.F.: Multiple variants and a differential splicing pattern of kinectin in human hepatocellular carcinoma. *Biochem Cell Biol* 82 (2004) 321-7.
- Wang, H.C., Yang, M.H., Shi, Y.Y., Pang, X.W., Yang, X.A., Peng, J.R., Leng, X.S. und Chen, W.F.: [Screening and analysis of genes encoding hepatocellular carcinoma associated tumor antigens.]. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 13 (2005) 343-6.
- Wang, R.F.: Identification of MHC class II-restricted tumor antigens recognized by CD4+ T cells. *Methods* 29 (2003) 227-35.
- Wang, R.F., Wang, X., Johnston, S.L., Zeng, G., Robbins, P.F. und Rosenberg, S.A.: Development of a retrovirus-based complementary DNA expression system for the cloning of tumor antigens. *Cancer Res* 58 (1998) 3519-25.
- Wang, X.F., Cohen, W.M., Castelli, F.A., Almunia, C., Lethe, B., Pouvell-Moratille, S., Munier, G., Charron, D., Menez, A., Zarour, H.M., van der Bruggen, P., Busson, M. und Maillere, B.: Selective identification of HLA-DP4 binding T cell epitopes encoded by the MAGE-A gene family. *Cancer Immunol Immunother* 56 (2007) 807-18.
- Weaver, B.A., Bonday, Z.Q., Putkey, F.R., Kops, G.J., Silk, A.D. und Cleveland, D.W.: Centromere-associated protein-E is essential for the mammalian mitotic checkpoint to prevent aneuploidy due to single chromosome loss. *J Cell Biol* 162 (2003) 551-63.
- Weaver, B.A., Silk, A.D., Montagna, C., Verdier-Pinard, P. und Cleveland, D.W.: Aneuploidy acts both oncogenically and as a tumor suppressor. *Cancer Cell* 11 (2007) 25-36.
- Weber, J.D., Taylor, L.J., Roussel, M.F., Sherr, C.J. und Bar-Sagi, D.: Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53. *Nat Cell Biol* 1 (1999) 20-6.

- Wheatley, A.P., Bolland, D.J., Hewitt, J.E., Dewar, J.C. und Hall, I.P.: Identification of the autoantigen SART-1 as a candidate gene for the development of atopy. *Hum Mol Genet* 11 (2002) 2143-6.
- Willems, R., Van Bockstaele, D.R., Lardon, F., Lenjou, M., Nijs, G., Snoeck, H.W., Berneman, Z.N. und Slegers, H.: Decrease in nucleoside diphosphate kinase (NDPK/nm23) expression during hematopoietic maturation. *J Biol Chem* 273 (1998) 13663-8.
- Wilson, F.H., Disse-Nicodeme, S., Choate, K.A., Ishikawa, K., Nelson-Williams, C., Desitter, I., Gunel, M., Milford, D.V., Lipkin, G.W., Achard, J.M., Feely, M.P., Dussol, B., Berland, Y., Unwin, R.J., Mayan, H., Simon, D.B., Farfel, Z., Jeunemaitre, X. und Lifton, R.P.: Human hypertension caused by mutations in WNK kinases. *Science* 293 (2001) 1107-12.
- Winkler, K., Bielack, S.S., Delling, G., Jurgens, H., Kotz, R. und Salzer-Kuntschik, M.: Treatment of osteosarcoma: experience of the Cooperative Osteosarcoma Study Group (COSS). *Cancer Treat Res* 62 (1993) 269-77.
- Witke, W., Podtelejnikov, A.V., Di Nardo, A., Sutherland, J.D., Gurniak, C.B., Dotti, C. und Mann, M.: In mouse brain profilin I and profilin II associate with regulators of the endocytic pathway and actin assembly. *Embo J* 17 (1998) 967-76.
- Woerner, S.M., Gebert, J., Yuan, Y.P., Sutter, C., Ridder, R., Bork, P. und von Knebel Doeberitz, M.: Systematic identification of genes with coding microsatellites mutated in DNA mismatch repair-deficient cancer cells. *Int J Cancer* 93 (2001) 12-9.
- Wolfel, T., Hauer, M., Schneider, J., Serrano, M., Wolfel, C., Klehmann-Hieb, E., De Plaen, E., Hankeln, T., Meyer zum Buschenfelde, K.H. und Beach, D.: A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science* 269 (1995) 1281-4.
- Wolfel, T., Van Pel, A., De Plaen, E., Lurquin, C., Maryanski, J.L. und Boon, T.: Immunogenic (tum-) variants obtained by mutagenesis of mouse mastocytoma P815. VIII. Detection of stable transfectants expressing a tum- antigen with a cytolytic T cell stimulation assay. *Immunogenetics* 26 (1987) 178-87.
- Wrzesinski, C. und Restifo, N.P.: Less is more: lymphodepletion followed by hematopoietic stem cell transplant augments adoptive T-cell-based anti-tumor immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 17 (2005) 195-201.
- Wu, J.X., Carpenter, P.M., Gresens, C., Keh, R., Niman, H., Morris, J.W. und Mercola, D.: The proto-oncogene c-fos is over-expressed in the majority of human osteosarcomas. *Oncogene* 5 (1990) 989-1000.
- Wu, X., Bayle, J.H., Olson, D. und Levine, A.J.: The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev* 7 (1993) 1126-32.
- Wunder, J.S., Czitrom, A.A., Kandel, R. und Andrulis, I.L.: Analysis of alterations in the retinoblastoma gene and tumor grade in bone and soft-tissue sarcomas. *J Natl Cancer Inst* 83 (1991) 194-200.
- Xiao, B., Tu, J.C., Petralia, R.S., Yuan, J.P., Doan, A., Breder, C.D., Ruggiero, A., Lanahan, A.A., Wenthold, R.J. und Worley, P.F.: Homer regulates the association of group 1 metabotropic glutamate receptors with multivalent complexes of homer-related, synaptic proteins. *Neuron* 21 (1998) 707-16.
- Xu, B.E., Stippec, S., Lenertz, L., Lee, B.H., Zhang, W., Lee, Y.K. und Cobb, M.H.: WNK1 activates ERK5 by an MEKK2/3-dependent mechanism. *J Biol Chem* 279 (2004) 7826-31.
- Xu, W. und Neckers, L.: Targeting the molecular chaperone heat shock protein 90 provides a multifaceted effect on diverse cell signaling pathways of cancer cells. *Clin Cancer Res* 13 (2007) 1625-9.

- Yamada, E., Tsujikawa, K., Itoh, S., Kameda, Y., Kohama, Y. und Yamamoto, H.: Molecular cloning and characterization of a novel human STE20-like kinase, hSLK. *Biochim Biophys Acta* 1495 (2000) 250-62.
- Yamada, K., Senju, S., Nakatsura, T., Murata, Y., Ishihara, M., Nakamura, S., Ohno, S., Negi, A. und Nishimura, Y.: Identification of a novel autoantigen UACA in patients with panuveitis. *Biochem Biophys Res Commun* 280 (2001) 1169-76.
- Yamagishi, N., Ishihara, K., Saito, Y. und Hatayama, T.: Hsp105 family proteins suppress staurosporine-induced apoptosis by inhibiting the translocation of Bax to mitochondria in HeLa cells. *Exp Cell Res* 312 (2006) 3215-23.
- Yamaguchi, T., Toguchida, J., Yamamuro, T., Kotoura, Y., Takada, N., Kawaguchi, N., Kaneko, Y., Nakamura, Y., Sasaki, M.S. und Ishizaki, K.: Allelotype analysis in osteosarcomas: frequent allele loss on 3q, 13q, 17p, and 18q. *Cancer Res* 52 (1992) 2419-23.
- Yen, T.J., Compton, D.A., Wise, D., Zinkowski, R.P., Brinkley, B.R., Earnshaw, W.C. und Cleveland, D.W.: CENP-E, a novel human centromere-associated protein required for progression from metaphase to anaphase. *Embo J* 10 (1991) 1245-54.
- Yen, T.J., Li, G., Schaar, B.T., Szilak, I. und Cleveland, D.W.: CENP-E is a putative kinetochore motor that accumulates just before mitosis. *Nature* 359 (1992) 536-9.
- Ying, H., Biroc, S.L., Li, W.W., Alicke, B., Xuan, J.A., Pagila, R., Ohashi, Y., Okada, T., Kamata, Y. und Dinter, H.: The Rho kinase inhibitor fasudil inhibits tumor progression in human and rat tumor models. *Mol Cancer Ther* 5 (2006) 2158-64.
- Yokomine, K., Nakatsura, T., Minohara, M., Kira, J., Kubo, T., Sasaki, Y. und Nishimura, Y.: Immunization with heat shock protein 105-pulsed dendritic cells leads to tumor rejection in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 343 (2006) 269-78.
- Yoshinaga, K., Inoue, H., Tanaka, F., Mimori, K., Utsunomiya, T. und Mori, M.: Platelet-derived endothelial cell growth factor mediates Rho-associated coiled-coil domain kinase messenger RNA expression and promotes cell motility. *Ann Surg Oncol* 10 (2003) 582-7.
- Yu, H., Nicchitta, C.V., Kumar, J., Becker, M., Toyoshima, I. und Sheetz, M.P.: Characterization of kinectin, a kinesin-binding protein: primary sequence and N-terminal topogenic signal analysis. *Mol Biol Cell* 6 (1995) 171-83.
- Yu, Y., Khan, J., Khanna, C., Helman, L., Meltzer, P.S. und Merlino, G.: Expression profiling identifies the cytoskeletal organizer ezrin and the developmental homeoprotein Six-1 as key metastatic regulators. *Nat Med* 10 (2004) 175-81.
- Yu, Z., Ma, B., Zhou, Y., Zhang, M., Qiu, X. und Fan, Q.: Activation of antitumor cytotoxic T lymphocytes by fusion of patient-derived dendritic cells with autologous osteosarcoma. *Exp Oncol* 27 (2005) 273-8.
- Zendman, A.J., Ruiters, D.J. und Van Muijen, G.N.: Cancer/testis-associated genes: identification, expression profile, and putative function. *J Cell Physiol* 194 (2003) 272-88.
- Zhao, Z. und Rivkees, S.A.: Rho-associated kinases play a role in endocardial cell differentiation and migration. *Dev Biol* 275 (2004) 183-91.
- Zou, W.: Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer* 5 (2005) 263-74.
- Zou, W.: Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 6 (2006) 295-307.
- Zoubek, A., Windhager, R., Bielack, S.: Osteosarkome. In: "Pädiatrische Hämatologie und Onkologie", Sektion IV. Gadner, H., Gaedicke, G., Niemeyer, C., Ritter, J. (Hrsg.), Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 1. Auflage (2006) 882-91.
- Zwang, Y. und Yarden, Y.: p38 MAP kinase mediates stress-induced internalization of EGFR: implications for cancer chemotherapy. *Embo J* 25 (2006) 4195-206.

VIII. DANKSAGUNG

Ich bedanke mich bei allen, die das Zustandekommen dieser Arbeit ermöglicht und mich dabei unterstützt haben.

Ganz besonders bedanke ich mich bei PD Dr. Uta Behrends, die mir mit ihrer aufmerksamen und konstruktiven Kritik stets ermutigend zur Seite stand, und Dr. Josef Mautner für die ausgezeichnete Betreuung und gute Zusammenarbeit.

Weiterhin bedanke ich mich bei Prof. Dr. Stefan Burdach, dem Leiter der Kinderklinik der TUM, und bei Prof. Dr. Stephan Müller-Wehrich, dem ehemaligem Leiter der Abteilung für pädiatrische Onkologie und Hämatologie, der diese Arbeit ermöglicht und bis zu seinem frühen Tod mitbetreut hat.

Allen Mitarbeitern im Labor, insbesondere meinen Mitdotorandinnen Anne-Katrin Zimmermann und Carola Götz, Frau Lechner, Colette Zobywalski, Gerhard Eigenstetter, Dinesh Adhikary und Falk Nimmerjahn danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Dr. Gerhard Laux danke ich für seine Hilfsbereitschaft und Unterstützung im Umgang mit Computer-Datenbanken.