

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin

Identifikation von Wilmstumor-Antigenen mittels serologischer Analyse einer rekombinanten Tumor-cDNA-Expressionsbibliothek

Anne-Katrin Zimmermann

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. Th. Meitinger

Die Dissertation wurde am 13.08.2008 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 21.01.2009 angenommen.

*Für meine Eltern
Gerda und Gerhard Zimmermann.*

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1.	Einführung in das Arbeitsthema.....	1
1.2.	Fragestellung der Arbeit.....	1
1.3.	Der Wilmstumor	2
1.3.1.	Epidemiologie.....	2
1.3.2.	Histopathologie.....	3
1.3.3.	Molekularpathologie.....	3
1.3.4.	Klinische Symptome und Diagnose.....	4
1.3.5.	Klinische Stadieneinteilung	5
1.3.6.	Prognose	6
1.3.7.	Therapie.....	8
1.4.	Tumorantigene und Tumorimmuntherapie	9
1.4.1.	Definition und Klassifizierung von Tumorantigenen	9
1.4.2.	Bekannte Tumorantigene des Wilmstumors	13
1.4.3.	Identifizierung von Tumorantigenen	13
1.4.4.	Tumorimmunerkennung und CD4+ T-Zellen.....	15
1.4.5.	Tumorimmuntherapie	16
2.	Material.....	19
2.1.	Biologisches Material.....	19
2.1.1.	Tumor-cDNA-Expressionsbibliothek.....	19
2.1.2.	Bakterien.....	19
2.1.3.	Phagen	20
2.1.4.	Serumproben.....	20
2.1.5.	Sekundärantikörper.....	21
2.2.	Verbrauchsmaterial	21
2.3.	Chemikalien	22
2.4.	Enzyme.....	23
2.5.	Antikörper	23
2.6.	Kits.....	23
2.7.	Geräte	24
2.8.	Software und Datenbanken	24
3.	Methoden	25
3.1.	Serumpräabsorption	25
3.1.1.	Herstellung von Absorptionssäulen und -folien	25
3.1.2.	Serumabsorption.....	26
3.2.	SEREX.....	27
3.2.1.	Bakterienanzucht	28
3.2.2.	Transfektion mit λ -Phagen	29
3.2.3.	Kultur der transfizierten Bakterien auf Agarplatten	29

3.2.4.	Übertragung der Proteine auf Nitrozellulose-Folien.....	29
3.2.5.	Inkubation der Folien mit Patientenserum.....	30
3.2.6.	Inkubation der Folien mit ALP-markiertem Zweitantikörper.....	30
3.2.7.	Alkalische Phosphatase-Färbung.....	30
3.2.8.	Isolation positiver Klone	31
3.2.9.	Ausschluss von IgG-Klonen und Färbeartefakten	32
3.2.10.	Vereinzelung positiver Klone.....	33
3.2.11.	Bestimmung des Phagentiters.....	33
3.2.12.	Vermehrung der positiven Phagen.....	33
3.2.13.	Blue-White-Test	34
3.3.	DNA-Präparation.....	34
3.3.1.	Subklonierung durch „ <i>in vivo</i> “ Exzision	34
3.3.2.	Mini-Präparation von Plasmid-DNA	37
3.3.3.	Maxi-Präparation von Plasmid-DNA	38
3.3.4.	Konzentrationsbestimmung von DNA	39
3.3.5.	DNA-Analyse.....	39
3.3.6.	Sequenzanalyse.....	41
3.4.	Differentielle Serumanalyse	41
4.	Ergebnisse.....	43
4.1.	SEREX-Screening	43
4.2.	Differentielle Serumanalyse	43
4.3.	Sequenzanalyse und Homologierecherche	47
5.	Diskussion	77
5.1.	Potentielle Tumorantigene.....	77
5.2.	Fragliche Tumorantigene.....	82
5.3.	Autoantigene.....	83
5.3.1.	Autoantigene mit cDNA-Homologen in der SEREX-Datenbank.....	83
5.3.2.	Autoantigene ohne cDNA-Homolog in der SEREX-Datenbank.....	89
5.4.	Zum Mechanismus der Immunogenität von Tumorproteinen.....	92
5.5.	Die Rolle von Autoantigenen im Kontext von malignen Erkrankungen.....	93
5.6.	Ausblick.....	93
6.	Zusammenfassung	95
7.	Literaturverzeichnis	96
8.	Anhang	111
8.1.	Verzeichnis der Abkürzungen	111
8.2.	Vektorkarten.....	116
8.3.	Lebenslauf	118
8.4.	Danksagung	119

1. Einleitung

1.1. Einführung in das Arbeitsthema

Der Wilmstumor (WT) ist einer der häufigsten bösartigen Tumoren des Kindesalters und geht von embryonalem Nierengewebe aus. Während er bei lokalisiertem Wachstum dank verbesserter operativer sowie konservativer Therapieoptionen eine relativ gute Prognose hat, kann ein Großteil der Kinder mit metastasiertem WT nicht geheilt werden. Ergänzende therapeutische Ansätze sind daher dringend wünschenswert.

Antigenspezifische, immuntherapeutische Strategien werden für viele Tumoren des Erwachsenen- und Kindesalters als viel versprechende neue Behandlungsansätze angesehen. Sie sind vor allem im Stadium der minimalen Resterkrankung (MRD), also bei geringer Tumorlast z.B. nach konventioneller Therapie viel versprechend. Eine Grundvoraussetzung für ihren Erfolg ist die Identifikation von geeigneten Antigenen.

Sogenannte Tumorantigene, die ausschließlich oder vorzugsweise in malignen Geweben vorkommen, bieten eine optimale Grundlage für die Entwicklung von aktiven und passiven, antigenspezifischen Tumorimpfstoffen. Allerdings sind in den typischen Tumoren des Kindesalters im Gegensatz zu den bei Erwachsenen häufigen Tumorentitäten erst wenige Tumorantigene bekannt. Dies liegt in erster Linie daran, dass die systematische Suche nach Tumorantigenen erst kürzlich auf die typisch pädiatrischen Malignome ausgedehnt wurde.

Zur Identifikation von Tumorantigenen werden derzeit T-Zell-basierte und serologische Verfahren eingesetzt. Zu letzteren zählt die serologische Analyse von rekombinanten Tumor-cDNA-Expressionsbibliotheken (SEREX). Das SEREX-Verfahren erlaubt die unmittelbare, molekulare Identifizierung von Antigenen, die nach rekombinanter, bakterieller Expression mit Hilfe von Serumantikörpern (Ak) detektiert werden können. Mit SEREX wurden inzwischen zahlreiche Antigene von Karzinomen des Erwachsenenalters und erste Antigene neuroektodermaler Tumoren von Kindern identifiziert. Diese Antigene schlossen methodenbedingt neben Tumorantigenen auch Autoantigene ein. Für einige der SEREX-definierten Antigene konnte nicht nur eine immuntherapeutische Relevanz, sondern darüber hinaus eine Bedeutung für Diagnose, Prognose, Verlaufskontrolle und biologisches Verständnis von malignen Erkrankungen belegt werden.

1.2. Fragestellung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe von SEREX neue WT-Antigene zu suchen und ihre mögliche Bedeutung für ergänzende therapeutische und diagnostische Ansätze zu analysieren. Zu diesem Zweck sollte die cDNA-Sequenz der Antigene analysiert, eine Datenbank-gestützte Homologierecherche durchgeführt und die Spezifität der Ak-Produktion durch differentielle Analyse von Serumproben verschiedener pädiatrischer Tumorpatienten und gesunder Kontrollen geklärt werden. Durch Literaturrecherche sollten darüber hinaus weitere Informationen zur möglichen biologischen, diagnostischen und therapeutischen Bedeutung der Antigene zusammengetragen und vor diesem Hintergrund die mögliche klinische Bedeutung der gefundenen Antigene diskutiert werden.

1.3. Der Wilmstumor

1.3.1. Epidemiologie

WT gehören mit 6% zu den häufigsten bösartigen Tumoren von Kindern. Eines von 8.000 Kindern im Alter von 0-15 Jahren erkrankt weltweit an einem WT. Meist sind Kinder im Vorschulalter betroffen. Ca. 83% der Patienten sind jünger als sechs Jahre, wobei Mädchen häufiger als Jungen erkranken (Graf, 2007). Selten tritt der WT auch bei Erwachsenen auf. In 95% der Fälle kommt er einseitig vor. Von den beidseitigen Tumoren treten drei Viertel gleichzeitig und ein Viertel zeitlich versetzt auf. Dabei werden zum Teil sehr lange Latenzzeiten beobachtet. Das mediane Diagnosealter für sporadisch vorkommende, unilaterale Tumoren ist 40 Monate, bei hereditären, meist bilateralen Fällen liegt der Altersgipfel jedoch niedriger (Breslow et al., 1993; Pastore et al., 2006). Auch die Patientin, mit deren Tumormaterial und Serum in dieser Arbeit gearbeitet wurde, hatte zeitlich versetzt einen kontralateralen WT entwickelt.

Die meisten WT entstehen durch spontane, somatische Mutationen, die nur im Tumorgewebe nachzuweisen sind. Wenige WT basieren auf hereditären oder *de novo* erworbenen Keimzellmutationen (Dome and Coppes, 2002). Knapp 10% der WT treten bei Patienten mit kongenitalen Anomalien oder Syndromen auf. Zu diesen Syndromen und Anomalien gehören unter anderem das Beckwith-Wiedemann-Syndrom (BWS), das *Wilmstumor-Aniridia-Genitourinary Anomalies-Mental Retardation* (WAGR)-Syndrom und das Denys-Drash-Syndrom (Dome and Coppes, 2002). Patienten mit diesen Syndromen haben ein erhöhtes Risiko an einem WT zu erkranken (s. **Tab. 1-1**). Das frühe Auftreten von WT im Zusammenhang mit bestimmten Syndromen ließ darauf schließen, dass regulatorische Elemente, die in die pränatale Entwicklung von Iris und Urogenitaltrakt involviert sind, eine Rolle bei der Regulation des Zellzyklus in Nierenstammzellen spielen (Coppes et al., 1999).

Syndrom (Genetik)	Leitsymptome	WT-Risiko (Referenz)
WAGR-Syndrom (Deletion im <i>WT1</i> -Gen)	WT, Aniridie, urogenitale Missbildungen, geistige Retardierung	30% (Dome and Coppes, 2002)
Denys-Drash-Syndrom (autosomal-dominant; Punktmutation im <i>WT1</i> -Gen)	WT (meist bilateral), nephrotisches Syndrom, Niereninsuffizienz vor dem 3. Lebensjahr., Pseudohermaphroditismus masculinus, Gonadoblastome	90% (Dome and Coppes, 2002)
Perlman-Syndrom (autosomal-rezessiv; Verlust im Chromosom 11p)	WT, Nephroblastomatose, bilaterale renale Hamartome, Makrosomie, Mikrognathie, Langerhanszellhyperplasie (Hyperinsulinismus), Hydrops fetalis, Agenesie des Corpus callosum, unterbrochener Aortenbogen	Erhöht (Gutjahr, 1999)
Beckwith-Wiedemann-Syndrom (autosomal-dominant; Imprinting von Chr. 11p15.5)	WT, Hepatoblastom, Gonadoblastom, Hemihypertrophie, Makroglossie, Omphalozele, neonatale Hypoglykämie, Kardiomyopathie	5% (Dome and Coppes, 2002)

Tab. 1-1 Mit Wilmstumoren assoziierte Syndrome

1.3.2. Histopathologie

WT entstehen als hochmaligne, embryonale Mischgeschwülste der Niere und wurden deshalb auch als Nephroblastome bezeichnet. Von einem „klassischen“ WT spricht man, wenn er aus Anteilen aller drei Keimblätter besteht. Die Zusammensetzung des Tumors aus den drei Gewebstypen (Blastem, Epithel und Stroma) ist prognostisch relevant und bestimmt in entscheidendem Maß den Malignitätsgrad und damit die Klassifikation. Üblicherweise erfolgt die Klassifikation an primär chemotherapeutisch vorbehandeltem Gewebe im Rahmen der Internationalen Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie (SIOP) gemäß der im Jahr 2002 überarbeiteten Stockholm-Working-Classification von 1995 (Vujanic et al., 2002; s. **Tab. 1-2**). Die Histologie primär operierter Tumoren richtet sich nach der Stockholm-Working-Classification von 1995 (niedrige, intermediäre und hohe Malignität) oder der Klassifikation der National Wilms Tumor Study Group der USA (NWTS; günstige („*favourable*“) und ungünstige („*unfavourable*“) Histologie) (Graf, 2007). Die Tumoren mit niedrigem oder intermediärem Malignitätsgrad entsprechen weitgehend denen mit günstiger Histologie der NWTS.

Anaplasie kommt bei Kindern unter zwei Jahren selten vor, bei Kindern über fünf Jahren wird sie in 13% der Fälle gefunden (Coppes et al., 1999). Anaplasie der Tumorzellen deutet auf eine mögliche Chemotherapieresistenz hin. Tumoren ohne Anaplasie werden als prognostisch günstig eingestuft (Coppes et al., 1999).

Etwa 1% aller obduzierten Nieren von Kindern zeigen eine Persistenz von primitiven, metanephritischen Blastemzellen, die als nephrogene Reste oder Nephroblastomatose bezeichnet werden. Aus dem persistierenden, metanephritischen Blastem können WT hervorgehen. Nephrogene Reste gehen mit einer Reihe von kongenitalen Syndromen einher, darunter auch das BWS (Lonergan et al., 1998).

WT metastasieren vorwiegend in die Lunge, die Leber und verschiedene Abdominalorgane. Das histologische Bild der Metastasen kann sich vom Primärtumor unterscheiden (Coppes et al., 1999). Das Klarzellsarkom und der Rhabdoidtumor der Niere wurden früher als WT mit ungünstiger Histologie eingestuft. Heute werden sie als eigenständige Tumorentitäten behandelt. Ihre Prognose ist wesentlich schlechter als die von WT (Coppes et al., 1999).

1.3.3. Molekularpathologie

Bei der Entstehung des WT spielen genetische Faktoren eine entscheidende Rolle. Exogene, karzinogene Einflüsse sind als Ursache eher unwahrscheinlich (Breslow et al., 1993).

Eine Mutation auf Chromosom 11p13 wurde zuerst bei Patienten mit dem WAGR-Syndrom entdeckt. Sie wird bei hereditären und sporadisch auftretenden WT diskutiert. In dieser Region ist das WT-Suppressor-Gen *WT1* lokalisiert (Dome and Coppes, 2002). Als Transkriptionsfaktor und Tumorsuppressor spielt das WT1-Genprodukt eine Rolle bei der Differenzierung der Niere und einiger hämatopoetischer Zellen. Interessanterweise wird dem WT1-Genprodukt auch eine onkogene Wirkung zugeschrieben, da funktionsmindernde Mutationen nur in ca. 10-30% der WT gefunden werden und eine Überexpression des Wildtyps in verschiedenen anderen Malignomen identifiziert wurde (reviewed in Yang et al., 2007). Durch Interaktion mit p53 inhibiert es dessen

Niedriger Malignitätsgrad (günstige Histologie)
<ul style="list-style-type: none"> • Zystisches, partiell differenziertes Nephroblastom • Komplettnekrotisches Nephroblastom (nach präoperativer Chemotherapie) • Hochdifferenziertes, epitheliales Nephroblastom
Intermediärer Malignitätsgrad (Standardhistologie)
<ul style="list-style-type: none"> • Epithelreiches Nephroblastom • Stromareiches Nephroblastom • Nephroblastom vom Mischtyp • Nephroblastom mit totaler/subtotaler Regression • Nephroblastom mit fokaler Anaplasie
Hoher Malignitätsgrad (ungünstige Histologie)
<ul style="list-style-type: none"> • Nephroblastom mit diffuser Anaplasie • Blastemreiches Nephroblastom (<u>cave</u>: entspricht intermediärer Malignität bei primärer Operation)

Tab. 1-2 Aktuelle SIOP-Klassifikation der WT nach präoperativer Chemotherapie (Vujanic et al., 2002).

Zelltod-induzierende Wirkung (Coppes et al., 1999). Für die Entwicklung eines WT scheint die Inaktivierung des Gens auf beiden Allelen oder eine heterozygote Mutation, die dominant negativ wirkt, also das gesunde Allel unterdrückt, nötig zu sein. Diese Variante wird z.B. beim Denys-Drash-Syndrom beobachtet und resultiert in einem wesentlich schwereren Verlauf als bei anderen Mutationen (Coppes et al., 1999).

Bei der Mehrzahl der sporadisch auftretenden WT und beim BWS spielt meist eine Mutation in der Region 11p15.5, im putativen *WT2*-Gen, die entscheidende Rolle. Das *WT2*-Gen selbst konnte noch nicht identifiziert werden. In der betroffenen Region liegen unter anderen das Gen für den „*Insulin like growth factor 2*“ (*IGF 2*) und das *H19*-Gen sowie die *KIP2/LIT1*-Domäne (Sato et al., 2006). Diese Gene unterliegen im normalen Gewebe dem Imprinting: das heißt, sie werden entweder vom väterlichen oder mütterlichen Gen exprimiert. Ein Funktionsverlust des aktiven Gens kann also nicht vom anderen Allel kompensiert werden (Dome and Coppes, 2002).

Der Entstehungsmechanismus des WT entspricht wahrscheinlich nur zum Teil der Zwei-Mutationen-Hypothese (Knudson and Strong, 1972), da er wesentlich komplexer ist und wahrscheinlich mehr als ein Gen einbezieht. Hierbei handelt es sich neben *WT1* (Chr. 11p13) und *WT2* (Chr. 11p15) um Gene auf den Chromosomen 16q, 1p und 7p (Dome and Coppes, 2002). Letztere scheinen nicht ursächlich an der Entstehung des WT beteiligt zu sein, aber dessen Phänotyp und Prognose zu beeinflussen (s. Kapitel 1.3.6).

1.3.4. Klinische Symptome und Diagnose

Bei den meisten betroffenen Kindern wird der WT bei einer Routineuntersuchung oder zufällig von den Eltern als derbe abdominale Resistenz palpirt. Die häufigsten Symptome sind eine Volumenzunahme des Bauches, Hämaturie und/oder arterielle Hypertonie. Seltener fallen die

Kinder wegen Obstipation, Diarrhoe, Harnwegsinfekten oder Schmerzen auf. Allgemeinsymptome wie Fieber, Schwäche und Müdigkeit finden sich ebenfalls selten und meist in späteren Stadien.

Differentialdiagnostisch müssen andere raumfordernde Prozesse in der Nierengegend, wie z.B. ein Neuroblastom, Lymphom, Nierenzellkarzinom und Hepatoblastom ausgeschlossen werden. Die wichtigste Differentialdiagnose ist das Neuroblastom, ein maligner embryonaler Tumor der Nebenniere. WT und Neuroblastome treten ungefähr gleich häufig auf und lassen sich durch ihre ähnliche Lokalisation initial oft schwer unterscheiden.

Die Diagnostik umfasst mehrere Schritte. Meist liefert die Palpation den ersten Hinweis auf den Tumor. Im Anschluss folgen bildgebende Verfahren wie Sonographie, Computertomographie (CT), Magnetresonanztomographie (MRT) und Szintigraphie. Die zweite Niere muss bezüglich eines kontralateralen WT oder einer kontralateralen Nephroblastomatose, aber auch bezüglich ihrer Funktion untersucht werden. Einen spezifischen serologischen Tumormarker gibt es für den WT nicht. Allerdings kann der Nachweis von Tumormarkern des Neuroblastoms (erhöhte Blut- und/oder Urinkonzentrationen von Katecholaminen) oder des Hepatoblastoms (erhöhte Serumkonzentration des Alpha-1-Fetoproteins, AFP) die Differenzialdiagnose erleichtern. Erhöhte Konzentrationen der Neuronenspezifischen Enolase (NSE) werden vor allem beim Neuroblastom beobachtet, können aber auch beim Wilmstumor vorkommen und sind somit nicht sicher wegweisend. Die J^{131} -MIBG-Szintigraphie hilft bei der Unterscheidung zwischen einem Jod-speichernden Neuroblastom und den grundsätzlich nicht speichernden WT, versagt allerdings bei der Abgrenzung von einem nicht speichernden Neuroblastom. Mit Hilfe eines CTs, Skelettszintigramms und Schädel-MRTs wird nach Metastasen gesucht.

Von einer initialen Tumorbiopsie oder -punktion zum Zweck einer histologischen Diagnose wird von der SIOP einschließlich der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH) abgeraten, da sie ein hohes Risiko für die Verschleppung von Tumorzellen birgt. In der NWTS der USA wird die initiale Histologie im Rahmen einer primären Operation empfohlen (Graf, 2007).

1.3.5. Klinische Stadieneinteilung

Die Einstufung in einzelne Stadien ist abhängig von der Tumorgröße, den Beziehungen des Tumors zur Umgebung und dem Vorhandensein von Metastasen. Nach diesen Kriterien wird das präoperative SIOP-Stadium festgelegt und die initiale Chemotherapie geplant. Postoperativ bestimmt der histologische Befund die endgültige Diagnose. Diese kann von der initialen Diagnose abweichen und bestimmt die weitere Therapie. In seltenen Fällen wird wider Erwarten ein Neuroblastom oder ein anderer Tumor diagnostiziert. Üblicherweise wird die postoperative Stadieneinteilung nach den Richtlinien der SIOP/NWTS durchgeführt (Neville and Ritchey, 2000) (s. **Tab. 1-3**). Das TNM-System existiert im Kontext von WT ebenfalls, ist aber weniger verbreitet.

Stadium I	Der Tumor ist auf die Niere innerhalb der Kapsel beschränkt und ohne Ruptur operativ vollständig entfernt.
Stadium II	Der Tumor hat die Nierenkapsel überschritten (direkte Invasion des perirenaln Weichgewebes, extrarenaler GefäÙe oder lokale Tumorzellaussaat); komplette chirurgische Entfernung. <u>Auch</u> biopsierter Tumor.
Stadium III	Unvollständige operative Entfernung mit Resttumor im Abdomen ohne hämatogene Metastasen. Lymphknotenmetastasen, erhebliche Tumorzellaussaat oder peritoneale Tumorzellimplantation.
Stadium IV	Hämatogene Fernmetastasen.
Stadium V	Bilateraler WT (Jede Seite sollte zudem noch getrennt eine Staging-Beurteilung erhalten)

Tab. 1-3 Postoperative Stadieneinteilung der Wilmstumoren nach der NWTS der USA (Neville and Ritchey, 2000).

1.3.6. Prognose

Anfang des 20. Jahrhunderts starben die meisten der betroffenen Patienten. Dagegen werden heute Heilungsraten von ca. 90% erreicht (Pastore et al., 2006; Weirich et al., 2004). Von Dauerheilung wird nach zweijähriger Rezidivfreiheit gesprochen, da das Risiko für einen Krankheitsrückfall nach dieser Zeit sehr klein ist. Einige der geheilten Patienten leiden allerdings unter den Spätfolgen der Therapie, darunter vor allem Funktionsstörungen der verbliebenen Einzelniere, aber auch Wachstumsstörungen, Herzversagen und sekundäre Neoplasien (Merguerian and Chang, 2002; Neville and Ritchey, 2000; Weirich et al., 2004).

Klassische prognostische Parameter

Die wichtigsten prognostischen Parameter ergeben sich nach wie vor aus der Histologie, wie z.B. dem Vorliegen von Anaplasie (Coppes et al., 1999). Infiltration der Nierenkapsel und Ruptur, Infiltration des Nierenbeckenkelchsystems und Tumoreinbrüche in größere Venen gehen mit einer schlechteren Prognose einher. Das Tumolvolumen nach präoperativer Chemotherapie korreliert ebenfalls mit der Prognose (Vujanic et al., 2002).

Neue prognostische Parameter

Wegen der insgesamt hohen Heilungsraten für WT hat sich der Fokus der Therapieoptimierungsstudien von der Steigerung der Überlebensrate auf eine Minimierung der Therapietoxizität verlagert. Einen Beitrag dazu könnten neue prognostische Marker leisten, die eine noch differenziertere Risikostratifizierung erlauben. Innerhalb der letzten Jahre wurden auf dem Gebiet der alternativen, neuen prognostischen Marker für den WT viel versprechende Ergebnisse erzielt. Allerdings hat bisher keiner, der im Folgenden erwähnten, neuen Marker das experimentelle Stadium überschritten.

Die Fettsäure-Synthetase (*fatty acid synthase*, FAS) wird in vielen Normalgeweben auf niedrigem, in verschiedenen Malignomen jedoch auf hohem Niveau exprimiert. In WT korrelierte eine hohe Expression mit einer schlechteren Prognose (Camassei et al., 2003). Eine Inhibition von FAS könnte folglich einen neuen Therapieansatz darstellen (Slade et al., 2003) (s. Kapitel 1.3.7).

Der *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und sein Rezeptor Flt-1 wurden bei chemotherapeutisch vorbehandelten Patienten mit WT als möglicher Gewebemarker für eine schlechte Prognose identifiziert (Ghanem et al., 2003). Auch steigende VEGF-Serumspiegel können eine ungünstige Prognose anzeigen (Blann et al., 2001).

CD44 steht für eine Gruppe von transmembranösen Glykoproteinen, die durch alternatives Spleißen entsteht und in verschiedenen Malignomen mit abnormalem Muster exprimiert wird. Eine gesteigerte Expression von CD44v5 im blastemreichen Teil des WT könnte ebenfalls der Identifikation von Hochrisiko-Patienten dienen (Ghanem et al., 2002). Ob Anti-CD44-Ak einen therapeutischen Nutzen haben, bleibt abzuwarten (Gadhoum et al., 2004) (s. Kapitel 1.4.5).

Das *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) ist ein nukleäres Protein, das im Komplex mit der Polymerase Delta an der DNA-Replikation und Regulation des Zellzyklus beteiligt ist. PCNA wurde bereits bei verschiedenen Tumoren als prognostischer Faktor herangezogen. In chemotherapeutisch vorbehandelten WT korrelierte die PCNA-Expression mit dem postoperativen Stadium, dem histologischen Typ und der Mortalität (Skotnicka-Klonowicz et al., 2002).

Wachstumsfaktoren (*growth factors*, GF) und ihre Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation des Zellwachstums und sind an der Progression verschiedener Malignome beteiligt. Beim WT geht die Expression des *transforming growth factor- α* (TGF- α) im Blastemanteil sowie die Koexpression mit dem *epithelial growth factor*-Rezeptor (EGF-R) mit einer ungünstigen Prognose einher. Die Expression dieser Faktoren bietet möglicherweise auch therapeutische Angriffspunkte z.B. für monoklonale Ak (mAk) (Ghanem et al., 2001a). Erhöhte Konzentrationen des angiogenetischen Peptids *basic fibroblast growth factor* (bFGF) wurden im Urin von Patienten mit verschiedenen urogenitalen Tumoren gefunden. Beim WT deuten eine präoperativ erhöhte bFGF-Konzentration im Urin auf eine aggressive Erkrankung, postoperativ erhöhte Konzentrationen auf Persistenz oder ein Rezidiv des Tumors hin (Lin et al., 1995).

Mutationen im *p53*-Gen wurden bei diversen Malignomen festgestellt, sind aber in pädiatrischen, malignen, soliden Tumoren eher ungewöhnlich. Nichts desto weniger zeigte sich der Nachweis einer *p53* Expression in WT mit einem aggressiven Verlauf assoziiert (Sredni et al., 2001).

Für die Blastemexpression der *WT-1*- und *early growth response-1* (*EGR-1*)-Genprodukte wurde eine Assoziation mit klinischer Progression gefunden, während die epitheliale Expression der Proteine keinen prognostischen Wert hatte. Die blastemale *WT-1*-Expression wurde sogar als ein vom klinischen Stadium unabhängiger prognostischer Marker identifiziert (Ghanem et al., 2000).

BCL-2 und *BAX* sind Regulatorproteine der Apoptose. Die *BCL-2*-Expression und das Verhältnis der *BCL-2/BAX*-Expression in chemotherapeutisch vorbehandelten WT fand sich mit einem ungünstigen klinischen Verlauf assoziiert (Ghanem et al., 2001b).

Der Neurotrophin-Rezeptor B (*TrkB*) wird in verschiedenen, gesunden Geweben einschließlich Niere exprimiert und spielt eine wichtige Rolle bei Proliferation und Überleben von Tumorzellen. Eine Überexpression von *TrkB* in WT war mit schlechteren Überlebensraten assoziiert (Eggert et al., 2001).

Hitzeschockproteine (HSP) wirken als molekulare Chaperone und schützen die Zellen vor Stress. Das Expressionsniveau einzelner HSP hat wahrscheinlich bei verschiedenen Tumorentitäten prognostische Bedeutung. Eine erhöhte Expression von *HSP70* in chemotherapeutisch

vorbehandelten WT wurde als günstiger, eine Herunterregulation als ungünstiger prognostischer Marker postuliert (Efferth et al., 2001).

65-83% der WT-Patienten zeigen chromosomale Aberrationen. Einige davon wurden als prognostische Marker diskutiert. Ein Zugewinn von Material am langen Arm des Chromosoms 1 (1q gain) und eine Monosomie 22 wurden beispielsweise mit einer ungünstigen Prognose assoziiert (Bown et al., 2002). *Loss of heterozygosity* (LOH) von Chromosom 1p und 16p kann bei 11,3% bzw. 17,4% der WT nachgewiesen werden und geht mit einem erhöhten Rückfallrisiko einher (Grundy et al., 2005). Aus diesem Grund wurde der Nachweis dieser molekularbiologischen Veränderungen in die Therapieprotokolle der Children's Oncology Group (COG) zur Risikostratifizierung aufgenommen (reviewed in Driscoll et al., 2007).

1.3.7. Therapie

Die konventionelle Therapie besteht weltweit aus Chemotherapie und Operation ggf. kombiniert mit externer Bestrahlung. Entscheidende Unterschiede bestehen bzgl. der Empfehlungen zum optimalen Zeitpunkt der Tumoroperation. Andere Therapieansätze sind noch experimentell.

Konventionelle Behandlungsverfahren

Es gibt derzeit weltweit im Wesentlichen zwei konventionelle Therapie-Protokolle: auf der einen Seite das der NWTS, die eine primäre Tumoroperation vertritt, auf der anderen Seite das der SIOP, die die präoperative Chemotherapie befürwortet. In Deutschland richtet man sich nach der SIOP-Strategie.

Als Standardchemotherapeutika werden Actinomycin D, Vincristin und Adriamycin eingesetzt. In schweren Fällen wird zusätzlich Cyclophosphamid verwendet. Die präoperative Chemotherapie mit Vincristin und Actinomycin D erstreckt sich über einen Zeitraum von vier bis sechs Wochen in Abhängigkeit vom Vorliegen von Metastasen. Die postoperative Therapie beginnt frühestmöglich nach der Operation und läuft über einen Zeitraum von 6-9 Monaten (Graf, 2007).

Bei der Operation wird in der Regel eine radikale Tumornephrektomie angestrebt, weswegen die Funktionsfähigkeit der anderen Niere gesichert sein muss. In fortgeschrittenen Stadien soll die präoperative Chemotherapie dazu beitragen, die Operabilität zu verbessern. Bei Tumorthromben ist eine Venotomie vorzunehmen. Für das Lymphknotenstaging werden die paraaortalen und parakavalen Lymphknoten entfernt (Graf, 2007).

Die Radiotherapie wird präoperativ kaum noch durchgeführt. Postoperativ erfolgt eine externe Bestrahlung meist in fortgeschrittenen Stadien (Stadium III und IV) oder bei hoher Malignität des Tumors jenseits des Stadium I. Die Gesamtdosis beträgt dann 15Gy bei intermediärer und 30Gy bei hoher Malignität. Makroskopische Tumorreste im Operationsbett werden mit zusätzlichen 10-15Gy bestrahlt (Graf, 2007).

Das Mädchen, deren Tumorgewebe in der eigenen Arbeit untersucht wurde, musste notfallmäßig primär operiert werden, da der Tumor rupturierte und es zu einer Einblutung in die Harnwege kam. Das verwendete Tumormaterial war also bemerkenswerter Weise nicht durch eine Chemo- oder Radiotherapie verändert.

Experimentelle Behandlungsansätze

Die experimentellen Behandlungsansätze zielen auf eine Reduktion von Nebenwirkungen und Spätschäden ab. Die Inhibition der Angiogenese, Eingriffe in den Krebszell-Metabolismus und die Krebszell-spezifische Aktivierung des Immunsystems stellen viel versprechende Optionen dar.

Der mögliche Therapieeffekt von Inhibitoren des Multienzyms FAS wurde bereits angesprochen (s. Kapitel 1.3.6). In einer Studie an verschiedenen Zelllinien von neuroektodermalen, pädiatrischen Tumoren konnte eine hemmende Wirkung des FAS-Inhibitors Cerulenin dokumentiert werden (Slade et al., 2003), allerdings wurden WT-Zellen bislang nicht untersucht.

VEGF ist ein Promoter der Angiogenese, der in vielen Tumoren vorkommt (s. Kapitel 1.3.6). Gegen VEGF165, eine von vier Isoformen, wurde ein Aptamer entwickelt, das im WT-Tiermodell das Tumorstadium unterdrückte und keine unerwünschten Wirkungen aufwies (Frischer et al., 2004; Huang et al., 2001). Auch der Topoisomerase-Inhibitor Topotecan wurde auf seine antiangiogenetische Wirkung hin überprüft und zeigte im WT-Tiermodell therapeutische Effekte (Soffer et al., 2001). In einer ersten Phase II Studie konnte seine Wirksamkeit bei rezidierten WT mit günstiger Histologie und primären oder rezidierten WT mit anaplastischer Histologie belegt werden (Metzger et al., 2007).

In einer Phase I Studie wurde der Inhibitor der EGFR-assoziierten intrazellulären Tyrosinkinase Gefitinib bei WT-Patienten angewendet und es konnte eine Tumorstabilisierung erreicht werden (Daw et al., 2005). Mit an Pseudomonas-Exotoxin gekoppeltem TGF- α (TP-38) (s. Kapitel 1.3.6), konnten bei Patienten mit Hirntumorrezidiven erste klinische Teilerfolge beobachtet werden (Sampson et al., 2003; Sampson et al., 2005), bislang gibt es jedoch noch keine Untersuchungen an WT.

Erste immuntherapeutische Ansätze gegen WT werden nach einer kurzen allgemeinen Einführung in Ansatzpunkte und Möglichkeiten der Immuntherapie dargelegt (s. Kapitel 1.4.2 und 1.4.5).

1.4. Tumorantigene und Tumormimmuntherapie

1.4.1. Definition und Klassifizierung von Tumorantigenen

Tumorantigene sind Genprodukte von Tumoren, die vom Immunsystem erkannt werden können. Unter tumorspezifischen Antigenen (TSA) versteht man Antigene, die in Normalgeweben nicht vorkommen. TSA können aufgrund einer tumorspezifischen Geninduktion oder tumorspezifischen, molekularen Alteration entstehen. Letztere kann auf chromosomalen Rearrangements, Mutationen, alternativer mRNA-Prozessierung, alternativer Translation oder alternativer posttranslativ Modifikation beruhen (Comito et al., 2004; Rosenberg, 2001; s. **Tab. 1-4**).

Als tumorassoziiert (TAA) werden Antigene bezeichnet, die prinzipiell auch in gesunden Geweben vorkommen, deren Expression in Normalgeweben aber geringer ist (überexprimierte TAA), nur in bestimmten Entwicklungsphasen beobachtet wird (onkofetale TAA und sogenannte *cancer-testis* Antigene, CTA) oder im Sinne einer Fremdanigenexpression bei Virusinfektionen vorkommt (onkovirale Antigene; s. **Tab. 1-4**).

Die Präsentation von Peptiden der Tumorantigene im Kontext von *major-histocompatibility-complex*- (MHC-) Klasse-I- oder -II-Molekülen auf Tumorzellen und/oder professionellen Antigen-

präsentierenden Zellen (pAPC) kann eine Aktivierung von CD8+ bzw. CD4+ T-Lymphozyten auslösen und sekundär zu einer spezifischen IgG-Ak-Antwort führen.

Tumorspezifische Antigene

Wenn das immunogene Epitop nur in malignen Zellen vorkommt, spricht man von TSA. Aufgrund ihrer Tumorspezifität sind sie prinzipiell besonders gut für die Entwicklung sicherer Tumorimpfstoffe geeignet. Da die meisten Mutationen jedoch selten oder sogar nur individuell vorkommen, bieten TSA nur in Ausnahmefällen lohnende Ansatzpunkte für therapeutische Strategien. Beispiele für TSA geben der mutierte Zellzyklusregulator CDK₄ (*cyclin dependent kinase 4*) und das mutierte β -Catenin, denen beiden darüber hinaus eine Rolle in der Onkogenese zugeschrieben wird (Robbins et al., 1996; Van den Eynde and Boon, 1997). Auch Fusionsproteine wie etwa BCR-ABL und PML-RAR α , die aufgrund von Translokationen in Leukämiezellen entstehen, können Neopeptide tragen (Renkvist et al., 2001)

Cancer-Testis-Antigene

CTA werden in einer Reihe von Tumoren, nicht jedoch in normalen Geweben - außer in den immunologisch geschützten (*immuno privileged*) Hoden - exprimiert (Li et al., 2004). Die CTA-Gene sind überwiegend auf dem X-Chromosom lokalisiert und werden dort durch CpG-Hypomethylierung und/oder Histon-Acetylierung, wie sie häufig in Tumoren, sonst aber nur in Keimzellen vorkommt, aktiviert (De Smet et al., 1996). CTA kommen typischerweise in verschiedenen Tumorentitäten vor (*shared TAA*) und zeigen manchmal eine Assoziation mit der Tumorprogression (Li et al., 2004). Klassische Vertreter der CTA sind die Mitglieder der MAGE- (*melanoma antigen genes*), BAGE- und GAGE-Familien aber auch das mit SEREX identifizierte Antigen NY-ESO-1. Diese Antigene sind aufgrund ihres restringierten Expressionsmusters viel versprechende Zielstrukturen für eine Tumorimmuntherapie (Nicholaou et al., 2006).

Differenzierungsantigene

Auch Differenzierungsantigene haben bereits Einzug in klinische Immuntherapieprotokolle gefunden. Antigene dieser Gruppe kommen auch in gesunden Zellen vor, sind aber charakteristisch für eine bestimmte Entwicklungsstufe des Zelltyps. Es scheint keine strenge Toleranz gegen diese Autoantigene zu existieren. Beispiele für Differenzierungsantigene des Melanoms sind Tyrosinase, Melan-A/MART-1, gp75 und gp100 (Van den Eynde and Boon, 1997). Melanom-Zellen können bei Progression diese Antigenität verlieren, was zum sogenannten *immune escape* durch Dedifferenzierung führt (Sahin et al., 1995).

Überexprimierte Antigene

Eine vierte, klinisch bedeutsame Gruppe stellen die in Tumorzellen aufgrund verstärkter Transkription oder Genamplifikation überexprimierten Antigene dar. Wenn die Überexpression die immunologische Toleranzschwelle für ein bestimmtes Protein überschreitet, kann es zu einer spezifischen Immunreaktion kommen (Renkvist et al., 2001). Das epitheliale Antigen Her2/neu im

Mammakarzinom ist ein Beispiel, gegen das der Ak Herzeptin erfolgreich eingesetzt wird (Zarour et al., 2003).

Tumorassoziierte Autoantigene

Für diese von einigen Autoren postulierte Sondergruppe ist der verantwortliche, tumorassoziierte, immunogene Mechanismus noch unverstanden. Sie kommen ubiquitär vor, werden in Tumoren nicht stärker als in Normalgeweben exprimiert und zeigen keine genetisch fixierten molekularen Alterationen. Trotzdem findet sich eine spezifische Ak-Antwort nur in Tumorpatienten und nicht in gesunden Personen. Ein Beispiel hierfür ist das CEBP γ (Li et al., 2004). Möglicherweise verantwortlich, aber schwer nachzuweisen sind tumorassoziierte, posttranslationale Modifikationen oder Änderungen der Antigenprozessierung/-präsentation an T-Zellen (Skipper et al., 1996). Wenn die verantwortlichen Mechanismen aufgeklärt werden könnten, würden diese Antigene wahrscheinlich zu den TSA zu zählen sein.

Solange das Antigenexpressionsmuster von SEREX-definierten Wild-Typ-Antigenen nicht quantitativ untersucht wird, erfolgt die Eingruppierung in die Kategorie Tumor- oder Autoantigen wie in der eigenen Arbeit ausschließlich nach immunologischen Kriterien, d.h. von Autoantigenen wird nur dann gesprochen, wenn spezifische Ak auch bei Personen ohne maligne Erkrankung nachgewiesen werden.

Antigengruppe	Beispiel	Vorkommen
Onkofetale Antigene	CEA	Kolorektales Karzinom
	<i>Immature laminin receptor</i>	Nierenzellkarzinom
	TAG-72	Prostatakarzinom
(Onko-) Virale Antigene	HPV E6, E7	Zervixkarzinom
Überexprimierte Antigene	BING-4	Melanom
	Ca ²⁺ aktivierter Cl ⁻ -Kanal	Lungenkarzinom
	Cyklin-D1	Verschiedene
	9D7	Nierenzellkarzinom
	Ep-CAM	Mammakarzinom
	EphA3	Verschiedene
	Her2/neu	Mammakarzinom u.a.
	Telomerase	Verschiedene
	Mesothelin	Duktales Pankreaskarzinom
	SAP-1	Kolorektales Karzinom
	Survivin	Verschiedene
Cancer/Testis-Antigene	BAGE-Familie	Verschiedene
	CAGE-Familie	Verschiedene
	GAGE-Familie	Verschiedene
	MAGE-Familie	Verschiedene
	SAGE-Familie	Verschiedene
	XAGE-Familie	Verschiedene
	CT9, CT10	Verschiedene
	NY-ESO-1/LAGE-1	Verschiedene
	PRAME	Verschiedene
	SSX-2	Verschiedene
Differenzierungsantigene	Melan-A/MART-1	Melanom
	Gp100/pmel17	Melanom
	Tyrosinase	Melanom
	TRP-1/-2	Melanom
	P. Polypeptid	Melanom
	MC1R	Melanom
	Prostata spezifisches Antigen (PSA)	Prostatakarzinom
Mutierte Antigene	β-Katenin	Melanom, Prostata-, Leberzellkarzinom
	BRCA1/2	Mamma-, Ovarialkarzinom
	CDK4	Verschiedene
	CML66	CML
	Fibronektin	Verschiedene
	MART-2	Verschiedene
	p53	Verschiedene
	Ras	Verschiedene
	TGF-βRII	Kolorektales Karzinom
Posttranslational alterierte Antigene	MUC1	Pankreas-, Nierenzellkarzinom
Idiotypische Antigene	Ig, TCR	B-, T-Zell-Leukämien, Lymphome, Myelome

Tab. 1-4 Einteilung von Tumorantigenen (modifiziert nach Zarour et al., 2003)

1.4.2. Bekannte Tumorantigene des Wilmstumors

Trotz rasant wachsender Datensätze zur Expression klinisch interessanter CTA in malignen Geweben von Erwachsenen und Kindern sind bis heute nur zwei Arbeiten anderer Arbeitsgruppen bekannt, die die Expression von CTA in WT-Zellen untersucht hatten. Ishida und Kollegen hatten mit Hilfe der Reversen Transkription und nachfolgender Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) in den WT-Zelllinien G401 und SCMC-WI eine Expression verschiedener MAGE-Antigene dokumentiert (Ishida et al., 1996). Li und Kollegen hatten mit Hilfe von Oligonukleotid-Microarrays die Expression von *PRAME* im WT beschrieben (Li et al., 2002). Parallel zur eigenen SEREX-Analyse waren in der eigenen Arbeitsgruppe Transkripte der GAGE- und SSX-Familien sowie des XAGE- und HAGE-Antigens in WT nachgewiesen worden (Behrends, 2007; Golbeck, 2006).

Nur einzelne andere Tumorantigene waren bislang auf eine Expression in WT untersucht worden. Ein kleiner Teil der WT zeigt p53-Mutationen (Malkin et al., 1994). Außerdem war eine Expression der humanen Telomerase (hTR) im WT nachgewiesen worden. hTR ist ein Enzym, das mit der zellulären Immortalität assoziiert ist und in verschiedenen malignen Tumoren, jedoch in wenig Normalgeweben exprimiert wird (Yashima et al., 1998). Therapeutisch interessant war das Vorkommen des TAA Her-2/neu (erbB-2) (Ghanem et al., 2001a), denn eine Blockade des Her2/neu mit dem spezifischen Ak Herceptin konnte das Tumorwachstum von Her-2/neu-positiven WT-Zelllinien hemmen (Yokoi et al., 2003) (s. Kapitel 1.4.5). Kürzlich wurde gezeigt, dass der Apoptose-Inhibitor Survivin als Vertreter der überexprimierten TAA in WT vorkommt, und zwar mit höherem Expressionsniveau als in normalem Nierengewebe (Miller et al., 2005).

Mit der eigenen Arbeit wurde erstmals eine systematische Suche nach neuen Tumorantigenen des Wilmstumors eingeleitet.

1.4.3. Identifizierung von Tumorantigenen

Tumorantigene können gleichzeitig Zielstrukturen für T-Lymphozyten und Ak sein und lösen im optimalen Falle eine integrierte, komplexe Immunantwort aus. Entsprechend gibt es grundsätzlich zwei verschiedene Ansätze, um Tumorantigene zu identifizieren. Der eine basiert auf dem Einsatz tumorspezifischer T-Zellen, der andere auf dem Tumorantigennachweis mit Hilfe von Serum-Ak.

T-Zell-basierte Verfahren

Zu Beginn der 90er Jahre wurde die molekulare Identifikation von Tumorantigenen mit Hilfe tumorspezifischer T-Zellen möglich. Bei den T-Zell-basierten Ansätzen wird der ‚genetische‘ vom ‚biochemischen‘ unterschieden.

Für den ‚genetischen‘ Ansatz muss cDNA aus einer Tumorzelllinie gewonnen werden, die von den T-Zellen erkannt wird. Eine Indikatorzelllinie wird dann mit Fraktionen der Tumorzell-cDNA transfiziert, die Erkennung durch die tumorspezifischen T-Zellen jeweils in Zytokinsekretions-Assays geprüft, und die relevante Tumorzell-cDNA nach Subklonierung sequenziert. Für Antigene, die von CD8+ T-Zellen erkannt werden, ist der T-Zell-basierte genetische Ansatz gut etabliert (De Plaen et al., 1988; van der Bruggen et al., 1991; Yannelli and Wroblewski, 2004). Dagegen waren

die genetischen Strategien mit Hilfe von CD4+ T-Zellen zunächst extrem aufwändig und nicht sicher zielführend (Pieper et al., 1999; Somasundaram et al., 2004; Wang et al., 1996).

Auch bei den ‚biochemischen‘ Verfahren waren Ansätze auf der Basis von CD8+ T-Zellen wegweisend. Hier werden die gebundenen Peptide aus den MHC-Molekülen der Tumorzellen eluiert, einzelne Peptidfraktionen auf pAPC mit passenden MHC-Molekülen gepulst, und schließlich die Fähigkeit der beladenen Zellen getestet, die tumorspezifischen T-Zellen zu stimulieren. Durch Subfraktionierung der Eluate lassen sich schließlich die verantwortlichen Peptide identifizieren (Cox et al., 1994; Mandelboim et al., 1994).

Voraussetzung aller T-Zell-basierten Ansätze ist die Verfügbarkeit von tumorspezifischen T-Zellklonen, die wiederum nur durch repetitive *ex vivo* Stimulation mit Tumorzelllinien generiert werden können. Die Generierung von Tumorzelllinien ist jedoch bei vielen Tumorarten schwierig oder gar unmöglich, weshalb die T-Zell-basierten Verfahren in erster Linie bei den gut kultivierbaren Melanomen und Nierenzellkarzinomen Anwendung gefunden haben.

Serologische Verfahren

Die Identifikation von Tumorantigenen mit Hilfe von Serum-Ak wurde von Lloyd Old und Kollegen unter dem Namen „Autologe Typisierung“ eingeführt. Mit Hilfe von Serum und Tumorzellen desselben Patienten konnten Antigene der Zelloberfläche detektiert und durch nachfolgende Absorptionsanalysen Spezifität und Expressionsmuster der Antigene ermittelt werden. Allerdings war ihre Aufreinigung und Strukturanalyse schwierig (Old, 1981). Dies gelang erst Michael Pfreundschuh und seinen Kollegen Ugur Sahin und Özlem Türeci, die die autologe Typisierung durch molekulare Klonierungstechniken zum SEREX-Verfahren erweiterten (Sahin et al., 1995). Das SEREX-Verfahren führt unmittelbar zur cDNA-Sequenz des Antigens und kann auf alle Tumorarten angewandt werden, da keine Tumorzelllinien etabliert werden müssen.

Das SEREX-Verfahren basiert auf der Detektion von rekombinant von einer Tumor-cDNA-Bibliothek exprimierten Antigenen mit Hilfe von Serum-Ak. Zusammenfassend wird aus frischem Tumorgewebe eine cDNA-Bibliothek erstellt, in λ -Phagen kloniert und in *E. coli*-Bakterien rekombinant exprimiert. Die rekombinanten Proteine werden von den lytischen Plaques im Bakterienrasen auf Nitrozellulosemembranen transferiert und Membran-gebunden mit Serum inkubiert. Mit Hilfe eines Enzym-gekoppelten Sekundär-Ak gegen humanes IgG können Klone, die Serum-IgG-Ak gebunden haben, identifiziert werden. Nach Subklonierung kann das verantwortliche Antigen-cDNA-Insert direkt sequenziert werden (Türeci et al., 1997).

Methodenimmanent detektiert man mit SEREX neben Tumorantigenen in der Regel auch klassische Autoantigene, die unabhängig vom Tumor immunogen sind. Insgesamt konnten bereits über 2000 Antigene mit Hilfe von SEREX definiert werden (Li et al., 2004). Sie werden von den international mit diesem Verfahren arbeitenden Gruppen in einer speziellen Datenbank gesammelt [<http://ludwig-sun5.unil.ch/CancerImmunomeDB/>] und sind dort öffentlich zugänglich. Die nachfolgende Tabelle zeigt, dass Vertreter aller Tumorantigengruppen mit SEREX kloniert werden konnten (s. **Tab. 1-5**).

Ein alternativer, serologischer Ansatz basiert auf der Proteomics-Technik. Bei Proteomics werden die Proteine des Testgewebes mit hoher Auflösung durch eine zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese getrennt. Nach Transfer auf geeignete Membranen wird dann wie bei SEREX

mit Serum von Krebspatienten nach reaktiven Antigenen gesucht. Diese können aus dem Gel extrahiert und mittels Massenspektrometrie oder Sequenzierung identifiziert werden (Le Naour, 2001). Eine spezielle Form dieses Vorgehens wurde *autoantibody-mediated identification of antigens* (AMIDA) genannt (Gires et al., 2004). Hauptlimitation dieses Ansatzes ist die verfügbare Tumorzellmenge, so dass auch hier in der Regel auf Tumorzelllinien zurückgegriffen und somit die *ex vivo*-Situation verlassen werden muss.

1.4.4. Tumorumerkennung und CD4+ T-Zellen

CD4+ T-Zellen nehmen eine zentrale und vielseitige Rolle bei der Tumorumerkennung ein. Naive CD4+ T-Zellen erkennen Komplexe aus Tumorpeptid und MHC Klasse-II, die sich auf der Oberfläche von pAPC befinden. Nach Aktivierung differenzieren die CD4+ T-Zellen entweder zu zytotoxischen Effektoren, die in der Lage sind MHC Klasse-II tragende Tumorzellen zu vernichten (reviewed in Appay, 2004; Heller et al., 2006), oder häufiger in Th1- und Th2-Helferzellen, die die Initiation und Aufrechterhaltung von anderen Immunantworten vermitteln (Pardoll and Topalian, 1998). Über die Sekretion von Interleukin 2 (IL-2) und Interferon-gamma (IFN- γ) unterstützen die Th1-Zellen die Differenzierung von CD8+ T-Zellen in zytotoxische Effektoren. Die Sekretion von IFN- γ führt außerdem zu einer Aktivierung von Monozyten, Makrophagen und natürlichen Killerzellen (NK) und beeinflusst wahrscheinlich auch direkt, z.B. über eine Inhibition der Angiogenese, das Tumorstadium. Th2-Zellen sezernieren die Zytokine IL-4, IL-5 und IL-10 und aktivieren so eosinophile Granulozyten, die ebenfalls zur Destruktion der Tumorzellen beitragen. Zudem können Th2-Zellen tumorspezifische B-Zellen zur Sekretion von Ak anregen, die ebenfalls die Elimination des Tumors fördern (Velders et al., 2003). Nur durch CD4+ T-Zell-Hilfe kann der Immunglobulin (Ig)-Switch in B-Zellen stattfinden und damit die Produktion der mit SEREX gemessenen, hochtitrigen IgG eingeleitet werden (Li et al., 2004). Aus dem Letztgenannten ergibt sich, dass mit Hilfe des SEREX-Verfahrens indirekt nach Antigenen gesucht wird, die von CD4+ T-Zellen erkannt wurden. Dies ist umso wichtiger, als die direkten Antigensuchverfahren auf der Basis von CD4+ T-Zellen noch problematisch sind.

Antigengruppen	Beispiel	Tumorquelle
Cancer-Testis-Antigen	NY-ESO-1	Ösophaguskarzinom
	MAGE-1	Melanom
Differenzierungsantigen	Tyrosinase	Melanom
Überexprimierte Genprodukte	<i>Carbonic anhydrase</i>	Nierenzellkarzinom
	MTA1	Prostatakarzinom
	eIF-4 γ	Lungenkarzinom
Molekular alterierte Genprodukte	p53	Kolonkarzinom
	Restin	Morbus Hodgkin
	TACC1	Magenkarzinom
Tumorassoziiertes Autoantigen	CEBP γ	Melanom

Tab. 1-5 Zuordnung SEREX-definierter humaner Tumorantigene zu den klassischen Gruppen (modifiziert nach Li et al., 2004)

1.4.5. Tumorimmuntherapie

Prinzipiell ist zwischen nicht-antigenspezifischen und antigenspezifischen sowie zwischen passiven und aktiven Konzepten der Tumorimmuntherapie zu unterscheiden. Wegen des Mangels an geeigneten Tumorantigenen haben nicht-antigenspezifische Ansätze bis heute größere klinische Bedeutung. Um möglichst nebenwirkungsarm und effizient therapieren zu können, wären jedoch antigenspezifische Ansätze wünschenswert. Diese sollten optimalerweise auf einem komplexen Set von Antigenen beruhen, um der Selektion von Antigen-defizienten Tumorzellen entgegenzuwirken.

Nicht-antigenspezifische Tumorimmuntherapie

Schon früh war der immunstimulierende Effekt von parenteral verabreichten Zytokinen, vor allem von hochdosiertem IL-2 untersucht worden. Rosenberg und Kollegen hatten Remissionen metastasierter Melanome und Nierenzellkarzinome unter hochdosiertem IL-2 beschrieben. IL-2 hatte keinen direkten Einfluss auf die Tumorzellen, da sie *in vitro* auch in Anwesenheit hoher IL-2 Konzentrationen wuchsen. Es wurde vielmehr vermutet, dass IL-2 *in vivo* zur Expansion von Lymphozyten mit Anti-Tumor-Aktivität geführt hatte (Rosenberg, 2001).

Eine zweite nicht-antigenspezifische Strategie beruht auf der aktiven Vakzinierung mit Tumorzellen oder Tumorzellderivaten. Die Vakzine basieren auf bestrahlten, autologen oder allogenen, zum Teil genmodifizierten Tumorzellen, auf Tumorlysaten, auf Fusionsprodukten von Tumorzellen mit pAPC oder auf pAPC, die mit Tumorlysaten beladen wurden (Rosenberg, 2001). Als pAPC werden überwiegend dendritische Zellen (DC) eingesetzt, da sie besonders gute antigenpräsentierende Eigenschaften aufweisen. Reife DC können aus CD34+ Zellen und peripheren Monozyten generiert werden (Figdor et al., 2004). Problematisch ist bei dieser wie bei anderen nicht-antigenspezifischen Strategien, dass prinzipiell Autoimmunreaktionen ausgelöst werden können. Außerdem erweisen sich viele nicht-antigenspezifischen Zellvakzine als wenig effizient. Dass dieser Ansatz dennoch viel versprechend sein kann, zeigt u.a. eine jüngere Studie zur Tumorzellvakzinierung gegen Glioblastome (Rutkowski et al., 2004).

Auch passive, nicht-antigenspezifische Strategien wurden beschrieben. Zu diesen zählt der adoptive Transfer von autologen Lymphozyten, die *ex vivo* mit Hilfe von IL-2 unspezifisch expandiert und als sogenannte Lymphokin-aktivierte Killerzellen (LAK-Zellen) reinfundiert wurden. Die Aktivität dieser LAK-Zellen, die sich aus T-Lymphozyten und NK-Zellen zusammensetzten war nicht tumorspezifisch (Rosenberg et al., 1987), und die klinischen Ergebnisse dieses Vorgehens waren enttäuschend (Rosenberg, 2001). Darüber hinaus gibt es verschiedene Ansätze zum adoptiven Transfer von autologen, Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TIL) oder autologen Lymphozyten aus Tumor-drainierenden Lymphknoten, die *ex vivo* mit Hilfe von IL2-expandiert worden waren (June, 2007).

Antigenspezifische Tumorimmuntherapie

Eine klassische Form der antigenspezifischen Tumorimmuntherapie ist die Ak-Therapie. Dabei wurden die Ak zum Teil an Toxine gekoppelt. Beispiele für erfolgreiche Tumorimmuntherapien mit Ak liefern die Behandlung des Mammakarzinoms mit dem anti-Her-2/neu-mAk Trastuzumab (Herceptin) und die Therapie CD20-positiver Lymphome mit dem anti-CD20-mAk Rituximab

(MabThera). Neuere Strategien basieren auf bispezifischen mAk, die Bindungstellen für zwei unterschiedliche Antigene enthalten. Auf diese Weise sollen die Zielzellen gleichzeitig mit Effektorzellen verbunden werden (Booy et al., 2006; Lum et al., 2006).

Eine antigenspezifische, passive Immuntherapie kann auch durch adoptiven T-Zelltransfer erfolgen. Durch wiederholte Stimulation mit einem Antigen werden *ex vivo* antigenspezifische T-Zelllinien expandiert und diese dem Patienten reinfundiert (Comito et al., 2004). Der antigenspezifische T-Zelltransfer wurde bereits zur Prävention und Behandlung von *human-immunodeficiency virus* (HIV)-infizierten Patienten und von Zytomegalievirus (CMV)-Infektionen bei immunsupprimierten Patienten eingesetzt (Van den Bosch et al., 2006). Es gibt auch antigenspezifische Ansätze zum adoptiven T-Zelltransfer bei Epstein-Barr-Virus (EBV)-assoziierten, malignen Erkrankungen (Burns and Crawford, 2004). Analog wird die Therapie mit tumorantigenspezifischen T-Zellklonen versucht. Aus TIL konnten beispielsweise Tumorantigenspezifische T-Zelllinien generiert werden, die zusammen mit systemisch appliziertem IL-2 Melanomremissionen induzierten (Rosenberg, 2001; Rosenberg et al., 1987). Im Tiermodell sind vielfältige Erfolge dieses Ansatzes beschrieben. Der klinische Erfolg hängt unter anderem von der Identifizierung möglichst vieler geeigneter Antigene für polyvalente Impfstoffe ab (Rosenberg, 2001). In den letzten Jahren wurde deutlich, dass der adoptive Transfer von tumorspezifischen T-Zellen wahrscheinlich nach einer gezielten immunsuppressiven Vorbehandlung effizienter ist. Man erklärt sich diesen Effekt mit einer Ausschaltung sogenannter regulatorischer T-Zellen (Treg) (Gattinoni et al., 2006; Muranski et al., 2006).

Prinzipiell erscheinen aktive Vakzinierungsansätze bei den meisten Tumorpatienten aufgrund der medikamenten- oder tumorbedingten Immunsuppression weniger erfolgversprechend als passive Strategien. In der Literatur finden sich jedoch auch bei den antigenspezifischen Vorgehensweisen aktive Ansätze. Neben der wenig effizienten Vakzinierung mit Tumorantigen-Peptiden, -DNA oder -RNA wurde vor allem die Therapie mit antigenbeladenen DC untersucht. Es wurden RNA, DNA, Peptide, Proteine oder rekombinante Viren zur Antigenbeladung der DC eingesetzt, und die beladenen DC sub- oder intrakutan oder intranodal appliziert. An Patienten mit unterschiedlichen Tumoren, darunter das maligne Melanom, Nierenzellkarzinom, Non-Hodgkin Lymphom, Plasmozytom und Prostatakarzinom, wurden bereits Studien mit z.T. viel versprechenden Ergebnissen durchgeführt (Nestle, 2000).

Tumorimmuntherapie des Wilmstumors

Bis September 2007 fanden sich in der internationalen Literatur nur wenige Immuntherapieansätze gegen den WT, was die Dringlichkeit der Suche nach geeigneten Antigenen unterstreicht.

In einer Phase-I-Studie an fünfzehn Kindern mit Rezidiven verschiedener, typisch pädiatrischer, solider Tumoren, einschließlich des WT, wurden Tumorlysat-gepulste DC untersucht. Bei fünf Patienten, darunter auch die einzige WT-Patientin, musste die Studie wegen Tumorprogress abgebrochen werden. Von den zehn anderen zeigten sieben Überempfindlichkeitsreaktionen vom Typ IV gegen das immunogene Markerprotein KLH (*keyhole-limpet hemocyanin*), aber nur drei gegen den autologen Tumor. Bei einer Patientin mit einem Fibrosarkom war eine Regression des Tumors zu beobachten, bei fünf Kindern eine stabile Erkrankung und bei den restlichen Patienten

eine Krankheitsprogredienz (Geiger et al., 2001). Bislang wurde keine weitere klinische Studie zur Immuntherapie im Kontext des WT publiziert.

Im Tiermodell gibt es erste Evidenzen für eine mögliche Wirkung von anti-Her-2/neu-mAk im Kontext von WT. Der mAk supprimierte die Tumorangio-genese (Yokoi et al., 2003) und konnte das Wachstum von WT-Xenografts *in vivo* hemmen und zum Teil sogar verhindern (Pinthus et al., 2004).

Noch gänzlich spekulativ sind Behandlungsansätze auf der Basis von mAK gegen den in WT exprimierten Oberflächenrezeptor CD44 (Gadhoum et al., 2004); sie wurden bislang weder im Zellkulturmodell noch tierexperimentell oder klinisch untersucht.

2. Material

2.1. Biologisches Material

2.1.1. Tumor-cDNA-Expressionsbibliothek

Die komplementäre DNA (cDNA)-Expressionsbibliothek aus WT-Gewebe wurde von Frau PD Dr. Behrends zur Verfügung gestellt. cDNA-Expressionsbibliotheken repräsentieren die Information von Boten-RNA (mRNA) aus Geweben oder Organismen. mRNA-Moleküle sind besonders labil und deshalb schwierig in ihrer natürlichen Form zu amplifizieren und zu klonieren. Aus diesem Grund war die mRNA mit Hilfe der retroviralen reversen Transkriptase (RT) in wesentlich stabilere cDNA umgewandelt, in dieser Form in λ -Phagen-DNA-Vektoren eingebracht und zu λ -Phagen verpackt worden. Zur Isolation der mRNA war der Poly (A) Quik[®] *mRNA Isolation Kit* und zur Herstellung der Tumor-cDNA-Expressionsbibliothek der *ZAP-cDNA[®] Gigapack[®] III Gold Cloning Kit* der Firma Stratagene verwendet worden.

2.1.2. Bakterien

XL1-Blue MRF'

XL1-Blue MRF' ist ein Tetrazyklin-resistenter *E. coli*-Stamm, der nicht humanpathogen ist. Er trägt das F' Episom, das folgende drei Eigenschaften auf das Bakterium überträgt:

Zum einen kodiert es die *AM15 lacZ*-Domäne des Enzyms β -Galaktosidase, die zusammen mit der α -Domäne ein funktionsfähiges Enzym bildet. Letztere wird im Falle des eingesetzten Kits der Firma Stratagene vom eingesetzten DNA-Vektor kodiert. Nur bei Produktion eines funktionsfähigen β -Galaktosidase-Proteins aus beiden Einheiten kommt es im sogenannten *Blue-White-Test* (s. Kapitel 3.2.13) zur blauen Farbreaktion.

Auf dem F' Episom liegt ausserdem die Geninformation für sogenannte F' Pili, die für die Adhäsion der im Stratagene-Kit eingesetzten f1-Helferphagen (f1-Hp) nötig sind (s. Kapitel 3.3.1). Das F' Episom enthält schliesslich den *lac* Repressor (*lacIq* Gen), der die Transkription des *lac* Promoters in Abwesenheit von Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) inhibiert. Bei Zugabe von IPTG wird die Blockade des *lac* Repressors aufgehoben, so dass das β -Galaktosidase-Gen bzw. die Sequenzen im Bereich der Multiplen Klonierstelle (MCS) innerhalb des β -Galaktosidase-Gens, abgelesen werden können.

SOLRTM

Ein zweiter *E. coli*-Bakterienstamm, der SOLR-Stamm, wurde für die Aufreinigung der DNA rekombinanter Phagemide verwendet. Dieser Stamm ist resistent gegen λ -Phagen. Nicht-rekombinante f1-Hp können im SOLR-Stamm nicht replizieren, weil ihr Genom eine sogenannte *amber*-Mutation (UAG) trägt, die während der Translation der mRNA den Abbruch der Protein-

Biosynthese bewirkt. Der SOLR-Stamm kann im Gegensatz zu XL1-Blue MRF⁺ den Effekt dieser Mutation nicht unterdrücken (*non suppressor*).

2.1.3. Phagen

λ-Phagen

In der Wildform ist der Phage mit einem linearen, doppelsträngigen Genom von 48,5kb Länge versehen, das von einer Proteinhülle umgeben ist. Der *λ*-Phage kann *E. coli* infizieren, sich darin vermehren und das Bakterium schließlich lysieren. Er kann Fremd-DNA aufnehmen und diese in das Bakterium einschleusen.

Das Uni-ZAP[®] XR-Vektor-System der Firma Stratagene ermöglicht die Konstruktion von rekombinanten *λ*-Phagen-Bibliotheken. Die Uni-ZAP[®] XR Sequenzen der *λ*-Phagen enthalten Sequenzen des pBluescript[®] Phagemids (pB), die eine MCS zur Einklonierung von Fremd-DNA enthalten, über Bindestellen für Replikationsproteine von f1-Hp die Kopie und letztlich Sequenzierung der einklonierten Fremd-DNA erlauben („*in vivo*“ Exzision des pB) sowie außerdem über das Gen des Enzyms β -Galaktosidase eine blau-weiß Farbselektion zur Unterscheidung rekombinanter von nicht-rekombinanten Klonen ermöglichen. Die MCS, die unter anderem Schnittstellen für die Restriktionsenzyme EcoR I und Xho I enthält, kann cDNA-Inserts bis zu einer Länge von 10kb fassen und ist von t3 und t7 Promotoren flankiert, deren bekannte Sequenzen als Ausgangspunkt für die Sequenzierung der Fremd-DNA dienen können.

f1-Helferphagen

Der f1-Helferphage *ExAssist*[™] *interference resistant helper phage* (f1-Hp) der Firma Stratagene besitzt die Fähigkeit, das pB „*in vivo*“ aus dem Uni-ZAP[®] XR Vektor „auszuschneiden“, zu pB-Phagen zu verpacken und als solche in den SOLR Stamm zu transferieren. Er trägt die sogenannte „*amber*-Mutation“, durch die er sich nur in „*suppressing*“ *E. coli* Stämmen vermehren kann, also nicht in SOLR-Bakterien. Dadurch wird eine Koproduktion von f1-Hp und den pB-Phagen im SOLR-Stamm verhindert (s. Kapitel 3.3.1).

2.1.4. Serumproben

Alle Serumproben von pädiatrisch-onkologischen Patienten wurden mit Einverständnis der Sorgeberechtigten und Genehmigung durch die Ethikkommission der Technischen Universität München (TUM) zum Zeitpunkt der jeweiligen Diagnosestellung entnommen und - wie beschrieben - gegen Bestandteile des verwendeten Vektorsystems präabsorbiert (Behrends et al., 2002; Behrends et al., 2003; Sahin et al., 1995).

Um die Effizienz der Antigensuche zu steigern, wurde mit gepooltem Serum von vier verschiedenen Patienten mit WT gescreent. Der Pool enthielt eine Serumprobe von dem einjährigen Mädchen (Patient #59), dessen Gewebe mit dem SEREX-Verfahren untersucht wurde,

in einer Konzentration von 1:800. Die anderen drei Seren lagen in einer Konzentration von je 1:300 vor. Sie stammten von einem fünfjährigen Jungen, sowie einem sechs- und 14-jährigem Mädchen. Für die differentielle Serumanalyse wurden präabsorbierte Seren von 20 jungen, gesunden Personen und von 20 pädiatrisch-onkologischen Patienten, einschließlich der vier oben genannten WT-Patienten, verwendet. Die Serumproben lagen in Konzentrationen von 1:300 bis 1:800 vor. Alle Seren wurden nach der Präabsorption mit 1xTBS 1:100 verdünnt, mit 10%igem Natrium-Azid und 10%igem Thimerosal haltbar gemacht und bei 4°C konserviert.

2.1.5. Sekundärantikörper

Als Sekundär-Ak wurde Alkalische Phosphatase (ALP)-gekoppelter anti-human-IgG-Fc-Ak aus der Ziege verwendet (Dianova, Hamburg). Dieser Ak ist gegen den Fc-Teil humaner IgG gerichtet und macht diese mit Hilfe der gekoppelten ALP und den Farbstoffen 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat (BCIP) und Nitroblau-Tetrazolium (NBT) durch eine blaue Farbreaktion sichtbar.

2.2. Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Firma, Bestellnummer	Ort der Firma
Eppendorf-Gefäße 1,5ml	Greiner (#616201)	Frickenhausen
Falcon-Röhrchen 50ml	Greiner (#227261)	Frickenhausen
Kryoröhrchen	Nunc (#377267)	Wiesbaden
Nitrozellulosemembranen (0,45 µm)	Sartorius (11306-41BL)	Göttingen
Parafilm "M" (Laboratory Film)	American National Can (PM-996)	Chicago, IL
PCR-Softtubes	Biozym (#711080)	Hess. Oldendorf
Petrischalen	M&B Stricker (#639102)	München
Pipetten 25ml	Greiner (#GRE-760180)	Frickenhausen
Pipettenspitzen 10µl, gestopft	Eppendorf (#0030067002)	Hamburg
Pipettenspitzen 1000µl	Abimed (#10770)	Langenfeld
Pipettenspitzen 20µl	Gibco BRL (#14862-015)	Eggenstein
Pipettenspitzen 200µl	Abimed (#10761) und Gibco BRL (#14867-014)	Langenfeld Eggenstein
Pipettenspitzen 30µl	Abimed (#10751)	Langenfeld
Polypropylen-Röhrchen	Falcon (#F-352059)	Heidelberg
Snapcup	Greiner (#35-2059)	Frickenhausen

Tab. 2-1 Verbrauchsmaterial

2.3. Chemikalien

Substanz	Firma (Nr.)	Ort
Agarose (Top-Agar)	SERVA (#11404)	Heidelberg
Ampizillin	Roche (#835269)	Mannheim
BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-Indolyphosphat)	Biomol (#02291)	Hamburg
Chloroform p.a.	Merck	Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, #6580	Darmstadt
DMSO	Serva, #20385	Heidelberg
Essigsäure (98%, p.a.)	Merck	Darmstadt
Ethanol absolut	Merck (#1.00983.2500)	Darmstadt
Ethidiumbromid 1%ige Lösung in Wasser	Merck (#1.11608.0030)	Darmstadt
Formamid RNA-Ladepuffer	Sigma (#Sigma P-040.1)	München
BAM HI Puffer	MBI Fermentas (#B-57)	St. Leon-Rot
Gelatine	Merck	Darmstadt
Gene Ruler™ 1kb DNA Ladder	MBI Fermentas (#SM0311)	St. Leon-Rot
Glyzerol	ICN Aurora, #800689	Ohio, USA
IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid)	MBI Fermentas (#R0392)	St.Leon-Rot
Isopropanol	Merck (#1.00547)	Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, #4936	Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, #4873	Darmstadt
Kanamycin	Sigma (#K0879)	München
Kieselgel (Affinity Adsorbent, Glutarialdehyde activated)	Roche (#669580)	Mannheim
Magermilchpulver	Merck, #1.15363	Darmstadt
Maltose	Sigma (#M-5885)	München
Methanol	Merck (#1.06009.2500)	Darmstadt
Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl ₂ x 6H ₂ O)	Merck	Darmstadt
Magnesiumsulfat-Heptahydrat (MgSO ₄ -7H ₂ O)	Sigma (# M-5921)	München
MOPS (4-Morpholine-propanesulfonic acid)	Roche (#1124684)	Mannheim
Natriumchlorid (NaCl)	Merck (#1.06404)	Darmstadt
Natronlauge (NaOH)	Merck (# 6498)	Darmstadt
Natriumacid (NaN ₃)	Merck	Darmstadt
NBT (Nitroblau-Tetrazolium-chlorid)	Biomol (#06428)	Hamburg
N-N-Dimethylformamid (DMF)	Sigma (#D-4551)	München
Polyoxyethylene-Sorbitan Monolaurate (Tween 20)	Sigma (#P-1379)	München
Primer p(dT) ₁₅ , 8 nmol	Roche (#814270)	Mannheim
RNA Ladder, High Range	MBI Fermentas (#SM0421)	St. Leon-Rot

Tab. 2-2 Chemikalien alphabetisch von A-R

Substanz	Firma (Nr.)	Ort
Salzsäure (HCl) 32%	Merck (#1.00319)	Darmstadt
Seakem-Agarose	Cambrex (#50004)	Maine, USA
Select Agar	Gibco BRL (#30391-023)	Eggenstein
Select Peptone	Gibco BRL (#Q-04-05)	Eggenstein
Select Peptone 140	Gibco BRL (#30392-021)	Eggenstein
Select Yeast Extract	Gibco BRL (#30393-020)	Eggenstein
TAE-Puffer	Sigma, #T-9650	München
Tetrazyklin	Sigma (#T7660)	München
Thimerosal	Sigma	München
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck (#1.08382.2500)	Darmstadt
TRIZOL® Reagent	Life Technologies (#15596)	Karlsruhe
X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactopyranosid)	Biomol (#02249)	Hamburg
Xho I	MBI-Fermentas, #ER-069-2	St. Leon-Rot

Tab. 2-3 Chemikalien alphabetisch von S-Z

2.4. Enzyme

Enzyme	Firma (Nr.)	Ort
Pfu-DNA-Polymerase	Promega (#11070205)	Mannheim
Restriktionsenzyme	New England Biolabs und MBI Fermentas	Schwalbach St. Leon-Rot
Taq-DNA-Polymerase	Promega (#15756305)	Mannheim

Tab. 2-4 Enzyme

2.5. Antikörper

Antikörper	Firma (Nr.)	Ort
ALP-gekoppelter Anti hlgG-Fc-Ak aus der Ziege (Sekundär-Ak)	Dianova (#109-055-098)	Hamburg

Tab. 2-5 Antikörper

2.6. Kits

Kit	Firma (Nr.)	Ort
Jetstar (Plasmid Mini/Maxiprep Kit/20)	Genomed (#220020)	Bad Oeynhausen

Tab. 2-6 Kits

2.7. Geräte

Geräte	Firma	Ort
Beheiztes Wasserbad (Typ WB 22)	Memert	Schwabach
Brutschrank (Memert Modell 400)	Heraeus	Hanau
Dampfsterilisator (Varioklav 300 E)	H+P	Oberschleißheim
Gelelektrophoresekammer (OWL)	Peqlab	Erlangen
Kühlzentrifuge (Sigma 2K15)	Sigma Laborzentrifugen	Osterode am Harz
ml-Pipetierhilfe (Pipetus-Akku)	Hirschmann Laborgeräte	Eberstadt
µl-Pipetierhilfe (Pipetman)	Gilson S.A.S.	Villiers le Bel, Frankreich
Magnetrührer RCT-basic	IKA Labortechnik	Staufen
Mikrowelle Privileg 9024E	Quelle	Fürth
Milli-Q-Wasseraufbereitungsanlage	Millipore	Essen
Netzgerät (Bio Rad Power PAC 300)	Bio Rad	München
PH Meter pH538	Wissenschaftlich Technische Werkstätten	Weilheim
Photometer (Uvikon-Spectrophotometer 922)	Bio-Tek Kontron	Neufahrn
Rührer (IKAMAG RET, Nr. 225004)	Jahnke & Kinkel	Staufen
Rüttler (Vortex-Genie 2)	Scientific Industries	Bohemia, NY, 11716, U.S.A
Rüttler beheizt (Innova 4000)	New Brunswick Scientific Co.	Edison, NJ, USA
Sicherheitswerkbank (Mobilen 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)	Berthold Hermele	Gosheim
UV-Transilluminator (Bio Rad Gel Doc 2000)	Bio Rad	München
Vortexer (REAX 2000)	Heidolph	Schwabach
Waage (Precisa 3100C IP65)	Instruments-AG, Dietikon	Schweiz
Zentrifuge (Rotina 35R, Typ 1710)	Hettich	Tuttlingen

Tab. 2-7 Geräte

2.8. Software und Datenbanken

Clone Manager 7.04, Sci Ed Central (NC, USA)

Gentool 1.0, BioTools (Edmonton, Canada)

BCM searchlauncher: <http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-search/gene-search.html>

BLAST: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

SEREX-Database: <http://ludwig-sun5.unil.ch/CancerImmunomeDB/>

PubMed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez/>

HPRD: <http://www.hprd.org/>

Ensembl (SNP-Suche): http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/index.html

3. Methoden

3.1. Serumpräabsorption

Um unerwünschte Bindungen von Patienten-IgG an Bakterienbestandteile oder nicht-rekombinante Proteine der λ -Phagen zu vermeiden, musste das verwendete Serum vor den Screening-Experimenten von IgG mit entsprechender Spezifität gereinigt werden. Zu diesem Zweck wurde das Serum vor der SEREX-Analyse mit Absorptionssäulen und -folien präabsorbiert.

3.1.1. Herstellung von Absorptionssäulen und -folien

Die Absorptionssäulen bestanden aus Kieselgel, an das Bakterien- und Phagenproteine absorbiert wurden, um unspezifische Ak gegen das Vektorsystem abzufangen.

Lytische Säulen

Pro Säule wurden 50ml Flüssigkultur mit jeweils einer Kolonie XL-1 Blue MRF⁺ angeimpft und bis zu einer optischen Dichte bei einer Wellenlänge von $\lambda=600$ (OD₆₀₀) von ca. 0,5 gezüchtet (s. Kapitel 3.2.1). Die 50ml Flüssigkultur wurden zentrifugiert und der Überstand verworfen. Für die Präparation der „lytischen“ Säulen (L-Säulen) wurde das Bakterienpellet in jeweils 2ml 0,01M MgSO₄ resuspendiert. Zu 5ml Transfektionsmedium (LB-Tet-MM-Medium) wurden 200 μ l der Bakteriensuspension und 500 μ l von 1:10 mit 0,01M MgSO₄ verdünnten, nicht-rekombinanten λ -Phagen gegeben, die die Bakterien lysierten. Die restlichen 1,8ml der Bakteriensuspension wurden aufgehoben. Das Gemisch inkubierte nun 4h bei 37°C im Wasserbad. Nach dieser Inkubationszeit wurden die zurückgelegten 1,8ml der Bakteriensuspension und weitere 5ml Transfektionsmedium dazugegeben und alles erneut 2h bei 37°C kultiviert. Die Bakteriensuspension wurde nun ca. 1min sonifiziert, um Bakterien und Phagen mit Hilfe des Ultraschalls zu zertrümmern. Zwischendurch wurden immer wieder kleine Pausen eingelegt, um die Bakteriensuspension nicht zu stark zu erhitzen und die Proteine nicht zu denaturieren. In 15ml Falcons wurde 2ml Glutaraldehyd-aktiviertes Kieselgel abgemessen

LB-Medium	
• Natriumchlorid	10g
• Select Peptone	10g
• Select Yeast Extract	5g
• ddH ₂ O	ad 1000ml
Mit 5N NaOH auf pH 7,0 einstellen und autoklavieren.	

Tetrazyklin-Stammlösung (10mg/ml)	
• Tetrazyklin	10mg
• Ethanol (70%)	ad 1ml
Bei -20°C und lichtgeschützt lagern.	

LB-Tet-MM-Medium	
• LB-Medium	5ml
• Maltose (20%)	50 μ l
• MgSO ₄ (1M)	50 μ l
• Tetrazyklin-Stammlösung (10mg/ml)	7,5 μ l

Natriumazid-Stammlösung (10%ig)	
• Natriumazid	1g
• ddH ₂ O	ad 10ml

Natriumazid-haltiges TBS (0,1%ig)	
• Natriumazid-Stammlösung	1ml
• TBS	ad 10ml

und mit der Bakterien-Phagen-Suspension vermischt. Die Falcons wurden nun über Nacht bei 4°C im Überkopffrotor inkubiert. Die Säulen wurden entweder gleich verwendet (s. Kapitel 3.1.2) oder mit 10ml 0,1% Natriumazid-haltigem TBS (*tris-buffer-saline*) überschichtet und bei 4°C für maximal drei Monate gelagert.

Tris-Buffer-Saline (TBS)	
10x Stammlösung:	
• NaCl	87,5g
• Tris-Base	60g
In wenig ddH ₂ O lösen und mit 32% HCl auf pH 7,5 einstellen.	
1x Gebrauchslösung:	
• 10xTBS	100ml
• ddH ₂ O	900ml

Mechanische Säulen

Für die „mechanischen“ Säulen (M-Säulen) wurde das Bakterienpellet mit 5ml PBS (*phosphate-buffer-saline*) resuspendiert und ebenfalls ca. 1min mit kleinen Pausen sonifiziert. Wie für die L-Säulen wurden in 15ml-Falcons 2ml Kieselgel abgemessen und mit der sonifizierten Bakteriensuspension über Nacht bei 4°C im Überkopffrotor inkubiert. Nach der Rotation wurden schließlich beide Säulenarten wieder gleich behandelt. Die Säulen wurden bei 500g 3min abzentrifugiert und anschließend gewaschen. Dazu wurden sie dreimal 30min im Überkopffrotor mit 0,1% Natriumazid-haltigem TBS gewaschen, jeweils danach abzentrifugiert, vom Überstand befreit und mit neuem Puffer aufgefüllt. Nach dem dritten Waschschrift wurde das TBS abgenommen.

Phosphate-Buffer-Saline (PBS)	
• Aqua dest.	z.B. 10lml
• Kaliumchlorid	2g
• Kaliumdihydrogenphosphat	2g
• Natriumchlorid	80g
• Dinatriumhydrogenphosphat	14,3g
PBS steril filtrieren, pH auf 7,2 bis 7,4 einstellen.	

Absorptionsfolien

Für die „lytischen“ (L)-Absorptionsfolien galt das gleiche Prinzip wie für die Säulen: Bakterien- und Phagenbestandteile sollten an die Folien binden, um bei einer späteren Inkubation mit dem Serum die reaktiven Ak heraus zu filtern.

Mit nicht-rekombinanten λ-Phagen infizierte Bakterien des Stammes XL-1 Blue MRF' wurden ausplattiert und über Nacht im Brutschrank herangezüchtet (s. Kapitel 3.2.1 bis 3.2.3). Volumen und Verdünnung der Phagensuspension wurden so gewählt, dass die Platten fast durchlysiert waren. Nach Übertragung der Bakterien- und Phagenproteine auf die Folien (s. Kapitel 3.2.4) wurden diese gewaschen, mit Magermilch 1h inkubiert und zum Trocknen ausgelegt.

3.1.2. Serumabsorption

Die Reinigung der Seren verlief in mehreren Schritten. Das Serum lief in der angegebenen Reihenfolge über eine M-Säule, eine L-Säule und über fünf bis sechs L-Folien bis es gebrauchsfertig war.

2ml des zu reinigenden Serums wurden aufgetaut und in ein beschriftetes 50ml Falcon gegeben. Das Falcon wurde mit 20ml 1xTBS, 25 μ l 10%igem Natriumazid und 25 μ l 10%igem Thimerosal aufgefüllt. Natriumazid und Thimerosal verhinderten Bakterien- und Pilzwachstum. Die Lösung wurde auf die abzentrifugierte M-Säule gegeben, mit dem Kieselgel vermischt und über Nacht bei 4°C im Überkopfrorator inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die M-Säule bei 500g 3min abzentrifugiert, und der Serumüberstand auf die ebenfalls abzentrifugierte L-Säule gegeben, die wiederum im Überkopfrorator über Nacht bei 4°C inkubiert. Am dritten Morgen wurde das Serum von der L-Säule abgenommen und über L-Folien weiter gereinigt. Dazu wurden die L-Folien in Petrischalen gelegt und mit doppelt destilliertem Wasser (ddH₂O) angefeuchtet. Der Serumüberstand aus der L-Säule wurde auf die erste L-Folie gegeben und inkubiert für ca. 3h bei Raumtemperatur unter sanftem Schütteln. Dieser Vorgang wurde insgesamt fünf- bis sechsmal wiederholt. Das gereinigte Serum wurde 1:100 mit 1xTBS verdünnt, zur Stabilisierung mit 250 μ l 10%igem Natriumazid, 250 μ l 10%igem Thimerosal und 0,2% Magermilch pro 20ml versetzt und bei 4°C gelagert.

Die M- und L-Säulen konnten pro Patient je dreimal für je 20ml 1:10 verdünntes Serum verwendet werden. Zu diesem Zweck wurde jede Säule nach der ersten und zweiten Seruminkubation regeneriert. Die Regeneration erfolgte durch Waschen über dreimal 30min mit je 35ml 0,1M Tris-HCl (pH 3) und dann dreimal 30min mit je 35ml 0,1% Natriumazid-haltigem 1xTBS.

Tris-HCl (0,1M; pH 3)

- | | |
|------------------------------|-------|
| • Tris-Base | 12g |
| • ddH ₂ O | ad 1l |
| Mit HCl auf pH 3 einstellen. | |

Thimerosal-Stammlösung (10%ig)

1g Thimerosal ad 10ml ddH ₂ O
--

3.2. SEREX

Ziel der SEREX-Untersuchungen war die Identifikation neuer Tumorantigene. Mit Hilfe rekombinanter λ -Phagen, die cDNA aus dem WT trugen, und gepooltem Serum von vier Patienten mit WT wurde nach immunogenen Proteinen gesucht. Die Seren wurden gepoolt, um die Effizienz der Antigensuche zu steigern. Sie lagen jeweils in einer Verdünnung von 1:300, bzw. das Serum der Patientin, deren Tumor untersucht wurde, auf Grund von Materialknappheit in einer Verdünnung von 1:800 vor.

Die Anzahl der unterschiedlichen mRNAs in einer Zelle wird auf ca. 20-30.000 geschätzt. Um eine repräsentative Aussage über das Vorkommen von Tumorantigenen in einem bestimmten Zelltyp machen zu können, sollten aufgrund der möglichen Einklonierung der cDNA in jeweils drei unterschiedliche offene Leserahmen (ORF) und mit Berücksichtigung niedrig exprimierter Gene ca. eine Million verschiedener rekombinanter Phagen gescreent werden. Bei einer optimalen Plaquezahl von ca. 3000 pro Platte entsprachen etwa 300 Platten einer Million rekombinanter Phagen. Für eine Screening-Runde, die sich über drei Tage erstreckte, war eine Anzahl von 20 Platten angemessen. Pro Woche wurden etwa drei Runden durchgeführt, so dass das Screening nach ca. fünf Wochen abgeschlossen war.

Zusammenfassend wurden *E. coli*-Bakterien mit den rekombinanten Phagen infiziert, und durch Zugabe von IPTG zum Transfektionsansatz die Expression der rekombinanten Proteine induziert.

Der Transfektionsansatz wurde auf Agarplatten ausplattiert, so dass ein homogener Bakterienrasen entstand, der nach einigen Stunden von erkennbaren lytischen Plaques durchsetzt war. Jeder dieser Plaques entsprach einem rekombinanten Phagen und damit einem rekombinanten Tumorprotein. Von den Agarplatten wurden Nitrozellulose-Abzüge erstellt, auf denen die rekombinanten Proteine gebunden waren. Die Nitrozellulose-Abzüge wurden zunächst mit dem gepoolten Tumors serum, dann mit dem ALP-gekoppelten Sekundär-Ak und schließlich mit einer Entwicklerlösung inkubiert, die alle Plaques mit Sekundär-Ak-Bindung blau anfärbte. Die einzelnen Arbeitsschritte sind im Folgenden genauer beschrieben.

3.2.1. Bakterienanzucht

Plattenkultur

Aus dem XL-1 Blue MRF⁺ Glyzerolstock (-80°C) wurde, ohne dass dieser dabei auftaute, ca. 1µl der Bakterien gekratzt, diese auf einer frischen LB-Tet-Agarplatte ausgestrichen, über Nacht bei 37°C kultiviert und anschließend bei 4°C für eine Woche aufgehoben. Diese XL-1 Blue MRF⁺-Stammplatte wurde jede Woche neu angesetzt, indem von der alten LB-Tet-Platte eine Kolonie gepickt und neu ausgestrichen wurde. Nach 1 Monat wurde eine neue Kultur mit frischen Bakterien aus dem Glyzerolstock angelegt.

LB-Tet-Platten (15µg Tet/ml)	
• LB-Medium	400ml
• Select Agar	8g
Autoklavieren, auf 52°C abkühlen lassen.	
• Tetrazyklin-Stammlösung (10mg/ml)	600µl
Platten (Ø 14cm) gießen, bei 4°C und lichtgeschützt lagern.	

Flüssigkultur

Von der XL-1 Blue MRF⁺-Stammplatte wurden zehn Kolonien mit sterilen Holzstäbchen gepickt und zu 50ml Transfektionsmedium (LB-Tet-MM-Medium) gegeben. Die Suspension wurde mit 500µl Maltose und 500µl 1M MgSO₄ versetzt, was später die Bindungsfähigkeit der Phagen an die Bakterien unterstützen sollte. Außerdem wurden 75µl Tetrazyklinlösung dazu gegeben, um das Wachstum anderer Bakterien zu unterdrücken. Der Kulturansatz wurde bei 37°C auf dem Schüttler bei ca. 200 Umdrehungen pro Minute (rpm) kultiviert bis die OD₆₀₀ ungefähr bei 0,5 lag und die Kultur geerntet werden konnte. Bei einer OD₆₀₀ von ca. 0,5 befinden sich die Bakterien in ihrer exponentiellen Wachstumsphase, in der die Transfektion am effizientesten gelang. Die Flüssigkultur wurde bei 500g 10min zentrifugiert, der Überstand verworfen, und das Pellet in soviel sterilem 0,01M MgSO₄ resuspendiert, dass die OD₆₀₀ 0,5 ergab. 600µl des Transfektionsmediums ergaben einen dichten Bakterienrasen auf einer Agarplatte mit einem Durchmesser von ca. 14cm.

3.2.2. Transfektion mit λ -Phagen

Das Volumen der Phagensuspension wurde so gewählt, dass auf einer Agarplatte (\varnothing 14cm) ca. 3000 Plaque bildende Einheiten (*plaque forming units*, pfu) entstanden. Die Anzahl der Plaques sollte so dicht sein, dass das Screening so effizient wie möglich wurde, es aber nicht zu einer Überlappung der Plaques kam, was die Identifikation von Tumorantigenen erschwert hätte.

Das berechnete Phagenvolumen (s. Kapitel 3.2.11) für 3000 pfu wurde zu 600 μ l des Transfektionsmediums gegeben und 5min bei Raumtemperatur sowie anschließend 15min im 37°C Wasserbad inkubiert. Danach war es bereit, auf den vorgewärmten Agarplatten ausplattiert zu werden.

3.2.3. Kultur der transfizierten Bakterien auf Agarplatten

Vor dem Ausplattieren wurden die benötigten Agarplatten im 37°C Brutschrank warmgestellt. Der Topagar wurde hergestellt, autoklaviert und bis zur Verwendung im 52°C Wasserbad warmgehalten.

Zum Ausplattieren wurden zu jedem Transfektionsansatz 30 μ l 1M IPTG-Stammlösung und 6ml vorgewärmter Topagar gegeben, und dieser Ansatz gleichmäßig auf den vorgewärmten LB-Tet-Platten verteilt. Der Topagar war nach ca. 10min fest, und die Platten wurden zur Inkubation über Nacht in den 37°C Brutschrank gestellt. Sie wurden kopfüber in den Schrank gelegt, um den Wasserverlust durch

Verdunstung zu reduzieren. Als Kontrolle wurde eine Platte mit nicht-infizierten Bakterien und eine Platte mit IgG-DNA tragenden Phagen ausplattiert. Durch die Kontrollen sollten Kontaminationen ausgeschlossen bzw. der erfolgreiche IgG-Ak-Nachweis belegt werden.

Topagar (Plattendurchmesser 14cm)	
• LB-Medium	200ml
• Agarose	1,4g
Autoklavieren, bis zum Ausplattieren im 52°C Wasserbad warmstellen.	

IPTG	
• IPTG	2g
• ddH ₂ O	8ml
Aliquotieren à 750 μ l, bei -20°C lagern, kurz vor Gebrauch auftauen (1 Aliquot reicht für ca. 24 Platten).	

3.2.4. Übertragung der Proteine auf Nitrozellulose-Folien

Die Nitrozellulose-Membranen wurden der Reihe nach durchnummeriert (1-300) und auf die ebenfalls nummerierten Agarplatten gelegt. Zur späteren Orientierung wurde die Lage der Folien auf der Platte mit drei asymmetrischen Nadeleinstichen markiert. Die Platten inkubierten weitere 2h bei 37°C im Brutschrank, um eine optimale Haftung der Proteine zu gewährleisten. Um die Folien besser vom Topagar abziehen zu können, war es hilfreich, die Platten der Entfernung für 30min bei 4°C abkühlen zu lassen.

TBS-T	
10x Stammlösung:	
• 10xTBS	1l
• Tween 20	5ml
1x Gebrauchslösung:	
• 10xTBS-T	100ml
• ddH ₂ O	900ml

Magermilch-Stammlösung (10%ig)	
Magermilchpulver	1g
H ₂ O	10ml

Danach wurden die Membranen vorsichtig von den Platten gelöst, in einer Schale mit TBS-T (20ml/Folie) gesammelt und 30min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler gewaschen. Anschließend wurden die Folien mit rauen Handschuhen von Agarresten befreit und erneut in frischem TBS-T 15min gewaschen. Die Membranen wurden einzeln mit je 20ml 0,5% Magermilch-haltigem TBS in Petrischalen überschichtet, um unspezifische Bindungen zu blocken, und inkubierten 1h bei sanftem Schütteln. Dann wurden die Membranen erneut in TBS (20ml/Folie) gesammelt und dreimal 10min in jeweils frischem TBS gewaschen. Die Folien waren jetzt sauber genug, um mit Patientenserum zu inkubieren.

Magermilch-haltiges TBS

TBS mit 0,5% Magermilchpulver mischen.
--

3.2.5. Inkubation der Folien mit Patientenserum

Jede gereinigte Folie wurde mit 20ml des gepoolten Patientenserums überschichtet und inkubierte über Nacht bei sanftem Schütteln bei Raumtemperatur. Spezifische Ak aus dem Serum konnten nun mit rekombinanten Antigenen Bindungen eingehen. Am nächsten Morgen wurde das Serum mit möglichst geringem Verlust wieder abgenommen. Die Folien wurden in TBS gesammelt und dreimal 10min mit jeweils frischem TBS gewaschen.

3.2.6. Inkubation der Folien mit ALP-markiertem Zweitantikörper

Die Folien wurden einzeln in Petrischalen mit dem Sekundär-Ak für 1h inkubiert. Pro Folie benötigte man 8µl ALP-gekoppelten anti-human-IgG-Fc-Ak aus der Ziege (in Wasser/Glyzerol) in 20ml 0,5% Magermilch-haltigem TBS. Nach der Inkubation wurde die Ak-Lösung verworfen und die Membranen in TBS zweimal 15min gewaschen.

Alkalische Phosphatase gekoppelter anti-human-IgG-Fc-Ak aus der Ziege (Stammlösung)
--

Ak-Pulver in 1ml ddH ₂ O lösen und mit 1ml Glyzerol vermischen.
--

Verdünnte Ak-Lösung

Stammlösung (0,03%) 1:2500 in 0,5% Magermilchpulver-haltigem TBS verdünnen.

3.2.7. Alkalische Phosphatase-Färbung

Die Entwicklerlösung bestand aus 1xCDS (20ml/Folie) plus BCIP- und NBT-Stammlösung (je 20µl/Folie). Durch eine enzymatische Reaktion der ALP mit den beiden Substraten BCIP und NBT wurden Antigen-Ak-Komplexe auf der Nitrozellulosefolie durch eine blaue Farbe sichtbar gemacht. Die Entwicklerlösung war lichtempfindlich, deshalb wurden die überschichteten Folien während der Färbung ins Dunkle gestellt. Nach ca. 1h waren die Folien gut gefärbt, so dass man positive Farbreaktionen identifizieren und markieren konnte.

3.2.8. Isolation positiver Klone

Mit Hilfe der gefärbten Folien konnten die reaktiven Plaques auf der Agarplatte identifiziert werden. Die Einstichstellen auf der entsprechenden Platte wurden mit schwarzem Edding-Stift auf dem Boden der Platte markiert und die Löcher der Folie passend über den Markierungen positioniert. Mit einer 20G-Nadel wurden die positiven Plaques auf der Membran durchstochen, und die Einstichkerbe auf dem Plattenboden mit einem roten Edding markiert.

Pro Klon wurde nun ein 1,5ml Eppendorf-Gefäß mit Namen der Phagenbibliothek (Ph059), Nummer der gescreenten Platte, eventuell Nummer des Klons auf der Platte und Datum des Ausstichs beschriftet. Der Plaque über der roten Markierung wurde polyklonal, also mit nicht reaktiven Plaques, ausgestochen, in das beschriftete Eppendorf-Gefäß überführt und mit 500µl SM-Puffer überschichtet.

Die Eluate inkubierten über Nacht im Kühlschrank bei 4°C oder 1h bei Raumtemperatur unter heftigem Schütteln, damit die Phagen aus dem Agar in den SM-Puffer diffundieren konnten. Danach wurden sie kurz bei maximaler Geschwindigkeit abzentrifugiert und der Phagen-haltige Überstand in ein frisches, beschriftetes Eppendorf-Gefäß überführt, mit 20µl Chloroform versetzt, kurz gevortext und bei 4°C aufbewahrt. Vor der späteren Entnahme der Phagenlösung musste das Chloroform kurz abzentrifugiert werden, da es für Bakterien giftig war. Das Eluat war bei 4°C bis zu sechs Monaten haltbar, der Titer konnte allerdings auch vorher schon abfallen. Deshalb war es sinnvoll, möglichst bald nach Bestimmung des Phagentiters mit dem Ausschluss von IgG und Artefakten fortzufahren (s. Kapitel 3.2.9).

CDS-Puffer	
5x Stammlösung:	
• NaCl (2M)	250ml
• Tris (1M)	500ml
• MgCl ₂ x 6H ₂ O	5,083g
• ddH ₂ O	ad 1000ml
Auf pH 9,5 einstellen.	
1xCDS-Gebrauchslösung	
• 5xCDS-Stammlösung	100ml
• ddH ₂ O	400ml

5-Brom-4-Chlor-3-Indolyolphosphat (BCIP)	
Stammlösung:	
• BCIP	50mg
• DMF (100%)	1ml
Gebrauchslösung:	
Stammlösung 1:2000 in 1xCDS verdünnen.	

Nitroblau-Tetrazolium (NBT)	
Stammlösung:	
• NBT	100mg
• DMF (70%)	1ml
Gebrauchslösung:	
Stammlösung 1:2000 in 1xCDS verdünnen.	

SM-Puffer	
• NaCl	5,8g
• MgSO ₄ 7H ₂ O	2,0g
• Tris-HCl (1M, pH 7,5)	50ml
• Gelatine (2% W/V in H ₂ O)	5ml
• ddH ₂ O	ad 1000ml
Alles sterilfiltrieren.	

Entwicklerlösung	
• 1xCDS	200ml
• BCIP-Stammlösung	20µl
• NBT-Stammlösung	20µl

3.2.9. Ausschluss von IgG-Klonen und Färbeartefakten

In jedem durchbluteten Gewebe kommen B-Lymphozyten vor, die die genetische Information für IgG tragen. Bei der Gewinnung von mRNA aus Tumorgewebe war daher eine Mischung mit mRNA aus B-Lymphozyten wahrscheinlich. Da der eingesetzte Sekundär-Ak IgG band, wurden nicht nur Serum-Ak, die an Antigene des Tumors gebunden hatten, sondern auch rekombinantes IgG in den Plaques angefärbt, was für diesen Plaque im Sinne des Antigen-Screenings ein falsch positives Ergebnis bedeutete. Positive Ergebnisse konnten darüber hinaus durch artefizielle lokale Anfärbung auf Grund von Luftblasen, Randeffecten und Falten auf der Folie sowie durch Farbkümmel verursacht werden.

Der Ausschluss von IgG-Klonen und Färbeartefakten diente der Identifikation der Antigen-cDNA-tragenden Klone und erfolgte durch eine Kontrollinkubation mit serumfreiem Puffer. Die ersten Schritte entsprachen denen des Screenings (s. Kapitel 3.2.2 bis 3.2.7), nur dass anstelle der cDNA-Bibliothek der polyklonale Testklon im Transfektionsansatz enthalten war. Es wurden 10 µl der 1:10² und 1:10³ mit 0,01M MgSO₄ verdünnten Phagenlösung mit IPTG ausplattiert, vorbereitend Nitrozellulosefolien halbiert, und jede Hälfte mit der Plattennummer und einem Vermerk über Serum- bzw. TBS-Inkubation beschriftet. Am nächsten Tag wurden die Platten mit den halben Folien belegt, und diese nach Reinigung von überschüssigem Agar mit TBS bzw. Serum überschichtet. Die nachfolgenden Schritte erfolgten wie für SEREX beschrieben. Bei der Färbung wurden die beiden Folienhälften (Serum/TBS) für einen Klon in einer gemeinsamen Schale gefärbt, um Unregelmäßigkeiten zu vermeiden. Drei mögliche Ergebnisse waren zu erwarten (s. **Abb. 3-1**) und folgendermaßen zu bewerten: A) Ein rekombinanter Klon mit Antigen-cDNA färbte sich nur bei Bindung eines Serum-Ak an das rekombinante Protein, nicht aber nach Inkubation in TBS, B) ein IgG-kodierender-Klon färbte sich unabhängig von einer Seruminkubation auch mit TBS und C) ein Färbeartefakt zeigte keine Plaque-assoziierte Anfärbung.

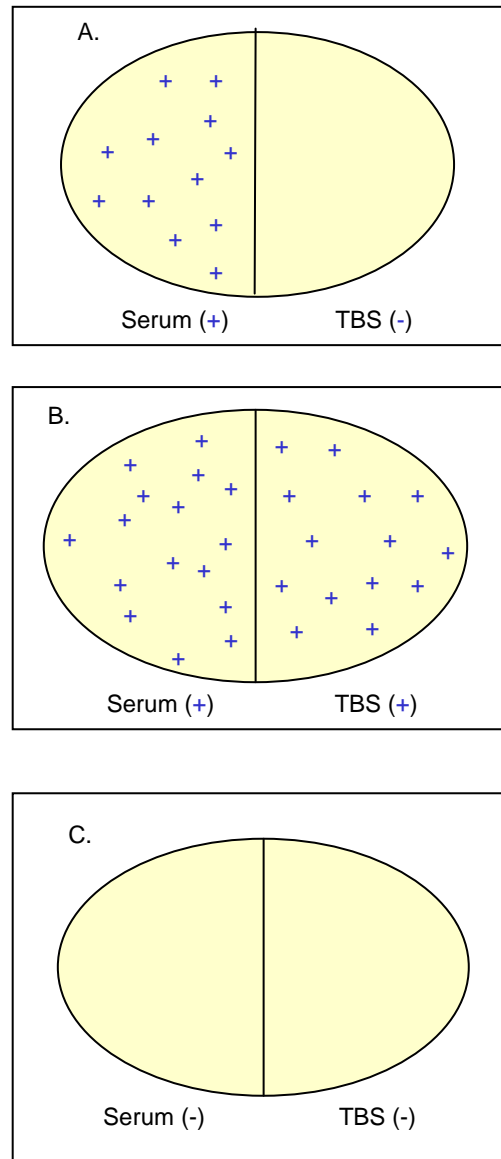


Abb. 3-1 Ergebnisse des IgG-Ausschlussverfahrens

A) Folie mit rekombinanten Antigenen. Die Antigene färben sich nur nach Seruminkubation. B) Folie mit rekombinantem IgG. Das IgG wird serumunabhängig erkannt, beide Folien färben sich. C) Färbeartefakt, keine Folie färbt sich.

3.2.10. Vereinzeln positiver Klone

Um einzelne seroreaktive Klone aus einem polyklonalen Phagengemisch zu isolieren, oder um einen bereits vereinzelt Klon auf Monoklonalität zu überprüfen, musste die Phagenlösung erneut ausplattiert werden. Die Plaquedichte wurde so gewählt werden, dass die einzelne Klone deutlich voneinander getrennt lagen, z.B. 200 pfu/Platte (s. Kapitel 3.2.11). Das Phagengemisch wurde mit den Verdünnungen 1:10² und 1:10³ ausplattiert. In der Regel ließen sich dabei mindestens drei monoklonale Plaques isolieren. Die Ausstiche wurden einzeln in Eppendorf-Gefäßen mit 500µl SM-Puffer überschichtet, um die Phagen in den Puffer diffundieren zu lassen. Die Agarreste wurden am nächsten Tag abzentrifugiert, der Phagen-haltige SM-Puffer abgenommen und jeweils mit 20µl Chloroform haltbar gemacht.

3.2.11. Bestimmung des Phagentiters

Es wurde eine Bakterienkultur mit einer OD₆₀₀ von 0,5 hergestellt (s. Kapitel 3.2.1). In der Zwischenzeit wurde mit der Phagenlösung eine Verdünnungsreihe in 0,01M MgSO₄ aufgestellt (z.B. 1:10 bis 1:10¹⁰). Zu jeweils 10µl der Phagenlösung einer bestimmten Verdünnung wurden 600µl der Flüssigkultur gegeben und wie beschrieben ausplattiert. Am nächsten Morgen wurde die Anzahl der Phagenplaques pro ausplattiertem Phagenvolumen bestimmt und der Phagentiter (pfu/ml) nach folgender Formel berechnet:

$$\text{pfu/ml} = \frac{\text{Anzahl der Plaques (pfu)} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{Ausplattiertes Volumen (}\mu\text{l)}} \times 1000$$

3.2.12. Vermehrung der positiven Phagen

Für das SEREX-Screening ist ein möglichst hoher und stabiler Phagentiter der Bibliothek wünschenswert. Trotzdem sollen die Phagen nicht mehr als etwa tausendfach, d.h. über eine Vermehrungsrunde, amplifiziert werden, da ansonsten langsam wachsende Klone unterrepräsentiert sein könnten.

Am Morgen wurde eine XL-1-Blue MRF'-Flüssigkultur mit einer OD₆₀₀ von 0,5 (s. Kapitel 3.2.1) und die benötigte Zahl von LB-Tet-Platten frisch hergestellt. Pro Platte wurden 600µl der Flüssigkultur mit der Phagenverdünnung gemischt, bei 37°C 15min inkubiert und mit Topagar auf die frischen LB-Tet-Platten ausplattiert. Das Phagenvolumen wurde so berechnet, dass sich pro Platte möglichst ca. 5x10⁴ pfu ergaben, das Volumen aber 200 µl pro 600µl Bakterien nicht überschritt. Am nächsten Morgen wurden die Platten mit 8-10ml SM-Puffer überschichtet, so dass sie mit Flüssigkeit bedeckt waren, und die Phagen bei leichtem Schwenken bei 4°C bis zum nächsten Morgen in den Puffer diffundierten. Der SM-Puffer wurde abgenommen, in sterilen Polypropylenbehältern gesammelt, und die Platte mit 2ml SM-Puffer nachgespült. Um die Phagenlösung haltbar zu machen, wurde sie von Bakterien und Verunreinigungen befreit. Dazu wurde sie mit 5% Chloroform versetzt, gut durchmischt, 15min bei Raumtemperatur inkubiert und

10min bei 500g zentrifugiert. Der Überstand wurde möglichst rein abgenommen. Abhängig vom Grad der Verunreinigung wurde der Vorgang so oft wiederholt bis die Lösung klar war. Anschließend wurde die Lösung mit 0,3% Chloroform versetzt und bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt oder, um sie für längere Zeit zu lagern, mit 7% DMSO versetzt und bei -80°C weggefroren. DMSO verhindert die Ausdehnung von Wasser beim Gefrieren und dadurch die Beschädigung der Phagen.

3.2.13. Blue-White-Test

Der *Blue-White-Test* wurde verwendet, um das Verhältnis von nicht-rekombinanten zu rekombinanten Phagen zu ermitteln. Dieses Verhältnis war ein Maß für die Effizienz der Ligation, es sollte

5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-GAL)-Lösung	
X-GAL	25mg
ddH ₂ O	ad 100 μ l

unter 1:10 liegen. IPTG ist als Galaktoseanalogon ein starker Induktor der β -Galaktosidase-Transkription (IPTG blockiert den Transkriptionsrepressor), wird aber selbst nicht abgebaut. 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid (X-GAL) hingegen wird von der β -Galaktosidase abgebaut, wobei ein blauer Farbstoff entsteht. Diese Reaktion kann nur ablaufen, solange das *β -Galaktosidase*-Gen intakt ist, also nur bei nicht-rekombinanten Bakterien, da durch Insertion der Tumor-cDNA in die MCS das Gen unterbrochen wird.

Ein kleines Volumen des Verpackungsansatzes (s. Kapitel 2.1.1) wurde in verschiedenen Verdünnungsstufen zu 15 μ l 0,5M IPTG (in Wasser) und 50 μ l X-Gal (250mg/ml in DMF) pro 6ml Topagar und 600 μ l Bakterien zugegeben. Am nächsten Morgen konnte das Verhältnis von blauen zu weißen Phagenklonen bestimmt werden.

3.3. DNA-Präparation

3.3.1. Subklonierung durch „*in vivo*“ Exzision

Um das Tumorantigeninsert weiter analysieren und sequenzieren zu können, benötigte man die DNA des rekombinanten Vektors in reiner Form. Bisher befand sich die Tumor-cDNA im λ -Vektor (Uni-ZAP[®]XR), der durch seine Größe für die Konstruktion einer cDNA-Bibliothek besonders gut geeignet war. Von Nachteil war allerdings, dass sich der große λ -Vektor für die Aufreinigung der DNA schlecht eignete, da die Aufreinigung so großer extrachromosomaler DNA-Moleküle sehr aufwändig ist, die Ausbeute aber auch bei optimierten Protokollen gering bleibt.

Um diese Nachteile zu umgehen, wurde das cDNA-Insert vom λ -Vektor in einen kleineren Plasmid-Vektor transferiert, der sich mit hoher Ausbeute und ohne großen Aufwand von der bakteriellen DNA trennen ließ. Von der Firma Stratagene wird ein solches Kloniersystem als Kit angeboten. Dieses Kit arbeitet mit dem f1-Hp ExAssist[™], der in der Lage ist, das Fremdgen (in diesem Falle die Tumor-cDNA) zusammen mit den flankierenden pB-DNA-Sequenzen im lebenden Bakterium („*in vivo*“) zu kopieren bzw. *quasi* auszuschneiden („Exzision“) und letztere

zu pB-Phagen zu verpacken. Außerdem arbeitet es mit einem zweiten *E. coli*-Stamm (SOLR), der f1-Hp und pB-Phagen aufnehmen kann, aber resistent gegen λ -Phagen ist, und in dem sich zwar pB-Phagen, nicht aber f1-Hp vermehren können.

f1-Hp replizieren im XL-1 Blue MRF' Gastbakterium mit Hilfe von f1-Replikationsproteinen (s. **Abb. 3-2**). Diese Proteine binden an spezielle Startsignale auf der f1-Hp-DNA und lesen eine einzelsträngige DNA-Kopie bis hin zum Stoppsignal ab. Die DNA-Kopie wird dann mit f1-Hüllproteinen verpackt, die vom f1-Hp-Genom kodiert und mit Hilfe der bakteriellen Ribosomen synthetisiert werden.

Im Uni-ZAP[®]XR Vektor flankieren f1-Start- bzw. Stoppsignale den Bereich, in dem die pB-Sequenzen mit der MCS bzw. mit der einklonierten Fremd-DNA liegen. Bei Koinfektion von XL-1-Bakterien mit rekombinanten λ -Phagen mit f1-Hp können die f1-Proteine nicht nur eine Kopie der f1-Hp-DNA, sondern auch eine Kopie der rekombinanten pB-Sequenzen vermitteln und somit das rekombinante pB mit der Fremd-DNA quasi aus dem λ -Vektor ausschneiden (s. Vektorkarten **Abb. 8-1** bis **Abb. 8-3**). Das rekombinante pB wird von den f1-Hüllproteinen verpackt und nach Lyse des Bakteriums durch die λ -Phagen in den Überstand freigesetzt. Im Überstand befinden sich dann der λ -Phage, der f1-Hp und der pB-Phage (s. **Abb. 3-3**).

Um die DNA der rekombinanten pB sauber aufzureinigen zu können, muss sie von der DNA des λ -Vektors und des f1-Hp getrennt werden. Dies erlaubte eine Passage im SOLR-Stamm (s. **Abb. 3-4**). Dazu wurden die SOLR-Bakterien mit dem Überstand der koinfizierten XL1-Blue MRF' Bakterien infiziert. Die λ -Phagen konnten nicht in den SOLR-Stamm eindringen, da der Bakterienstamm resistent war. Die f1-Hp konnten zwar in das Bakterium eindringen, konnten sich darin aber nicht vermehren, da die Synthese essentieller f1-Proteine aufgrund der sogenannten *amber*-Mutation in den SOLR-Bakterien nicht möglich war. Als einziges infektiös und replikationsfähig im SOLR-Bakterium blieben nur die rekombinanten pB-Phagen. Die sichere Selektionierung infizierter SOLR-Klone wurde durch das *Ampizillin-Resistenz-Gen* im pB gewährleistet. Die rekombinanten pB-Phagen konnten als einzige Kolonien auf Ampizillin-behandeltem LB-Agar auswachsen und so einzeln für die Plasmidpräparation gepickt werden (s. **Abb. 3-5**).

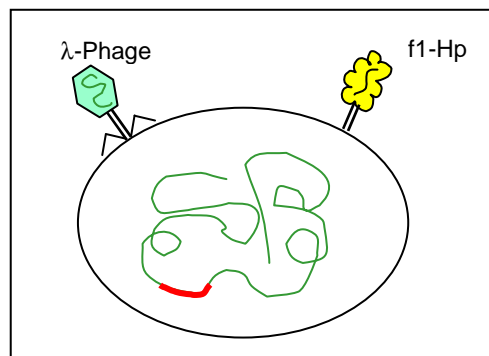


Abb. 3-2 XL-1 Blue MRF' Bakterium.

Infektion des XL-1 Blue MRF' Bakteriums durch den λ -Phagen (grün) und den f1-Hp (gelb). Das cDNA-Insert ist rot dargestellt.

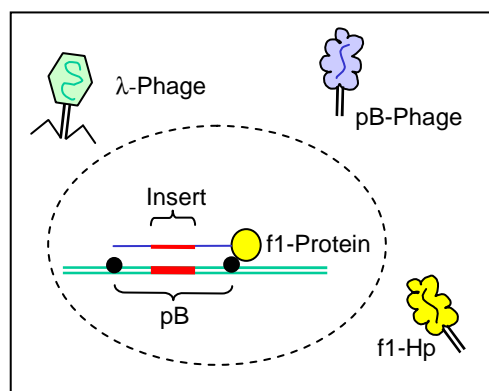


Abb. 3-3 Lysiertes XL-1 Blue MRF' Bakterium.

Die f1-Hp (gelb) replizieren im Bakterium mit Hilfe der f1-Proteine (gelb), die an Replikationssignale (•) auf der λ -DNA binden (hellblau). Der entstehende pB-Phage (blau) enthält das vollständige pB (blau) mit dem Tumor-cDNA-Insert (rot).

Im Einzelnen wurde sowohl vom XL1-Blue MRF' als auch vom SOLR-Stamm eine Flüssigkultur angesetzt (s. Kapitel 3.2.1). Dazu wurden in einen 5ml Ansatz je 5ml LB-Medium, 50µl 20%ige Maltose, 50µl MgSO₄, je eine Kolonie XL-1 Blue MRF' bzw. SOLR und 7,5µl Tetrazyklin bzw. 25µl Kanamyzin gegeben. Die Bakterien wurden über Nacht bei nur 30°C kultiviert, damit sie nicht überwuchsen. Am nächsten Morgen wurden die Schüttelkulturen bei 500g 10min abzentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 0,01M MgSO₄ resuspendiert, so dass die OD₆₀₀ bei 1 lag. Zu 200µl XL1-Blue MRF' wurden 250µl des positiven Phagenklons (>10⁵ pfu) und 1µl des f1-Hp (>10⁶ pfu) gefügt. Das Gemisch inkubierte für ca. 15min im Wasserbad bei 37°C, damit die Phagen sich an die Bakterienwand anheften konnten. Anschließend wurden 3ml LB-Tet-MM-Medium hinzugefügt, und der Ansatz für weitere 3h im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Bakterien im 70°C-Wasserbad während 20min abgetötet. Der Überstand, in dem sich die Phagen befanden, wurde 15min bei 1000g abzentrifugiert und in einem sterilen Falcon-Röhrchen aufgefangen. Bei unbekanntem Phagentiter wurden zu 200µl der SOLR-Suspension einmal 100µl und einmal 10µl des Überstandes gegeben.

Das Bakteriengemisch inkubierte für weitere 15min bei 37°C, damit die Phagen an die Bakterien anheften konnten und wurde anschließend auf LB-Amp-Platten ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank herangezüchtet. Auf den LB-Amp-Platten waren am nächsten Morgen Ampizillin-resistente Kolonien zu erkennen, die das Fremd-DNA-Insert trugen. Bis zur Mini-Präparation der Plasmid-DNA wurden die Platten mit Parafilm luftdicht verschlossen und im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

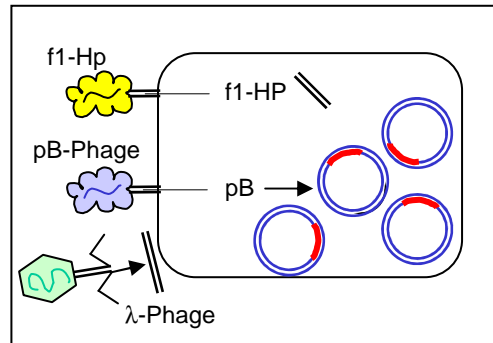


Abb. 3-4 Selektion der rekombinanten pB-Phagen durch eine Passage im SOLR.

Der SOLR-Stamm ist resistent gegen λ-Phagen (grün); die f1-Hp (gelb) können das Bakterium zwar infizieren, durch die *amber*-Mutation kommt es jedoch nicht zur Replikation. Einzig infektiös und replikationsfähig bleibt pB-Phage (blau).

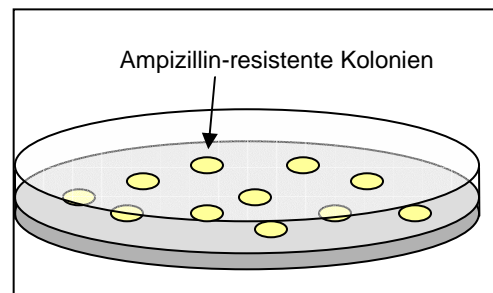


Abb. 3-5 LB-Ampizillin-Platten.

Auf der Platte wachsen nur Ampizillin-resistente Kolonien, in denen das pB repliziert wird.

Ampizillin-Lösung	
Stammlösung:	
• Ampizillin	100mg
• Ethanol (70%)	10ml
Gebrauchslösung:	
• Ampizillin-Stammlösung	5µl
• Ethanol (70%)	ad 1ml
Bei -20°C und dunkel lagern.	

Kanamyzin- Stammlösung	
• Kanamyzin	375mg
• Ethanol (70%)	ad 50ml
Bei -20°C und dunkel lagern.	

LB-Amp-Platten (0,1mg Amp/ml)	
• LB-Medium	400ml
• Select Agar	8g
Autoklavieren, im Wasserbad auf 55°C abkühlen.	
• Ampizillin Stammlösung (10mg/ml)	4ml
In Petrischalen (Ø 14cm) ausbringen.	

SOLR Bakterienkultur	
• SOLR	1 Kolonie
• LB-Medium	5ml
• MgSO ₄ (1M)	50µl
• Maltose (20%)	50µl
• Kanamycin	25µl

3.3.2. Mini-Präparation von Plasmid-DNA

Dieses Verfahren diente der Schnellaufreinigung von Plasmid-DNA (modifizierte „Alkalische Lyse“) (Birnboim and Doly, 1979). Die DNA war sauber genug für Restriktionsanalysen, nicht aber für Klonierung und Sequenzierung.

Chromosomale Bakterien-DNA haftet an Bakterien-Proteinen. Deshalb kann sie, solange sie intakt ist, gemeinsam mit diesen abzentrifugiert werden. Zu grobe Behandlung führt zu einer Beschädigung der chromosomalen DNA. Dabei freigesetzte kleine DNA-Fragmente lassen sich dann nicht mehr vollständig von der Plasmid-DNA (pDNA) trennen. Deshalb muss mit dem DNA-Gemisch vorsichtig umgegangen werden, z.B. durfte es nicht gevortext werden, solange es noch nicht getrennt war.

Nach der „*in vivo*“ Exzision wurden von je drei Ampizillin-resistenten Kolonien Flüssigkulturen hergestellt, aus denen die pDNA gewonnen werden sollte. 1,5ml von jeder Kultur wurden in Eppendorfgefäße überführt und bei Raumtemperatur bei ca. 18000rpm 5min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 100µl Lösung I resuspendiert und vorsichtig gemischt. Dieser Puffer enthielt Ribonukleasen, um vorhandene RNAs abzubauen. Anschließend wurden zur Zelllyse 100µl Lösung II dazugegeben, gemischt und für 5min inkubiert. Schließlich wurden 100µl der Lösung III, die Zelltrümmer von der pDNA trennen sollte, hinzu gegeben, untergemischt und die Eppendorfgefäße bei 13000rpm für 10-20 min zentrifugiert. Der Überstand (ca. 300µl) wurde in ein frisches Eppendorfröhrchen überführt, mit 750µl 100%igem Ethanol aufgefüllt, um die pDNA auszufällen, und kurz gevortext. Die Lösung wurde erneut bei 4°C bei 15000rpm für 20-30 min zentrifugiert, so dass sich die pDNA als kleines, milchig-weißes Pellet am Boden absetzte. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde kurz an der Luft getrocknet und dann in 100µl ddH₂O resuspendiert. Die verdünnte pDNA wurde im nächsten Schritt in der Restriktionsanalyse (s. Kapitel 3.3.5) weiterverarbeitet. Bis dahin war sie ohne weiteres im Kühlschrank bei 4°C haltbar.

Lösung I

• Sucrose	50mM
• TRIS (pH 8)	25mM
• EDTA	10mM
• RNase A (10mg/ml)	1µl

Lösung II

SDS 1% w/v in 0,2M NaOH.

Lösung III

• KOAc (5 M, 5,3)	600ml
• Eisessig	115ml
• ddH ₂ O	ad 1000ml

3.3.3. Maxi-Präparation von Plasmid-DNA

Dieses Verfahren diente der Gewinnung von pDNA aus Bakterien in ausreichender Menge und Reinheit, um sie zu klonieren und/oder zu sequenzieren. Ausgangsmaterial waren diejenigen „Übernachtskulturen“ aus der Mini-Präparation, die in der Restriktionsanalyse (s. Kapitel 3.3.5) ein eindeutiges Insert zeigten.

In autoklavierten Kolben wurden 400ml LB-Medium mit 4ml Ampizillin und 1ml der „Übernachtskultur“ aus der Mini-Präparation versetzt. Die Kolben wurden über Nacht bei 37°C auf den Schüttler gestellt. Am nächsten Morgen wurden die Schüttelkulturen bei 5000rpm 10min abzentrifugiert, so dass sich die Bakterien am Boden absetzten. Der Überstand wurde verworfen, und das Pellet in 10ml Puffer I resuspendiert. Bei diesem und bei den folgenden Schritten war vorsichtig mit der Suspension umzugehen, um die Vektor-DNA nicht zu beschädigen.

800µl dieser Bakteriensuspension wurden mit 1ml LB-Medium und 100µl DMSO versetzt, und in Nunc-Gefrierhörchen bei -80°C weggefroren, um bei Bedarf mehr Plasmid aufzureinigen zu können. Im nächsten Schritt wurde die Bakteriensuspension in 50ml Falcons überführt. 10ml Puffer II wurden zugegeben, vorsichtig mit der Bakteriensuspension gemischt und die Falcons 5min bei Raumtemperatur inkubiert.

Schließlich wurden 10ml des Puffers III zugefügt. Die Falcons wurden anschließend bei 7000rpm für 10min abzentrifugiert. Im Überstand befand sich die pDNA. Die weitere Lysatreinigung erfolgte mit Hilfe der Anionenaustauschchromatographie. Die stark negativ geladene DNA band an das Säulenmaterial, weniger negativ geladene Proteine liefen durch die Säule hindurch. Die Säulen wurden zuvor mit dem Puffer

QBT equilibriert. Der Überstand aus den Falcons wurde nach der Zentrifugation über Verbandsmüll auf die Säulen gegeben und dadurch von groben Verunreinigungen gesäubert. Die Säulen mit gebundener DNA wurden dann dreimal mit 20ml Puffer QC gewaschen. Dann wurde die DNA mit 15ml Puffer QF aus den Säulen eluiert und in frischen Falcons aufgefangen. Das

Puffer I	
• Tris-HCl (pH 8)	50mM
• EDTA	10mM
• RNase A	100µg/ml

Puffer II	
1% SDS in 200mM NaOH.	

Puffer III	
3M Kaliumacetat mit pH 5,5.	

Puffer QBT	
• NaCl	750mM
• MOPS (pH 7)	50mM
Je 15% Isopropanol und Triton X-100 zugeben.	

Puffer QC	
• NaCl	1M
• MOPS (pH 7)	50mM
15% Isopropanol zugeben.	

Puffer QF	
• NaCl	1,25M
• Tris-Cl (pH 8,5)	50mM
15% Isopropanol zugeben.	

TAE-Puffer	
50 x Stammlösung	
• Trisbase	242g
• Eisessig	57,1g
• Na ₂ EDTA x 2H ₂ O	37,2g
• H ₂ O	ad 1000ml
1 x Gebrauchslösung	
10ml Stammlösung mit 490ml H ₂ O verdünnen.	

Eluat wurde zur alkoholischen Fällung der DNA mit 11ml Isopropanol versetzt und vermischt. Durch die Zentrifugation bei 7000rpm über 15min bei 4°C setzte sich die DNA am Falconboden ab. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet luftgetrocknet. Das trockene Pellet wurde in 1ml ddH₂O gelöst.

3.3.4. Konzentrationsbestimmung von DNA

10µl der pDNA wurden in einer Küvette mit 190µl ddH₂O verdünnt (1:20). Die Extinktion wurde in einem Kontron-Photometer bei λ 260 und λ 280 gemessen. Der Wert bei λ 260 war das Maß für die DNA-Menge, der Wert bei λ 280 für die Menge an Proteinen, also für den Grad der Verunreinigung. Der Quotient aus λ 260/λ 280 gab die Reinheit der DNA an, er sollte nicht unter 1,3 liegen. Die DNA-Konzentration ließ sich aus diesen Angaben mit unten genannter Formel berechnen. Wenn sowohl DNA-Reinheit als auch die Konzentration (> 0,5µg/µl) ausreichend waren, wurde die DNA in einer Restriktionsanalyse eingesetzt, um die Größe des Inserts zu bestimmen.

$$\mu\text{g}/\mu\text{l DNA} = \frac{\text{Eingesetztes Volumen } (\mu\text{l}) \times \text{Extinktion } (\lambda 260)}{\text{Verdünnungsfaktor } (20)}$$

3.3.5. DNA-Analyse

Um die Größe des Inserts zu beurteilen, wurde die cDNA mit Endonukleasen geschnitten. Mit dem Enzym BamHI wurde der rekombinante Phagenvektor linearisiert, und es entstand, soweit das Insert keine BamHI-Schnittstelle trug, ein Fragment mit der Größe von Vektor (2,9kb) plus Insert. Um das Insert auszuschneiden, wurden die Enzyme EcoRI und XhoI eingesetzt, die stromaufwärts bzw. stromabwärts des Inserts in der MCS schnitten. Über diese Enzyme war das Insert ursprünglich in den Uni-ZAP[®]XR Vektor hineinkloniert worden.

Restriktionsanalyse

Bei allen Restriktionsanalysen sollte das Volumen zugegebener Enzyme nicht größer als 1/10 des Restriktionsansatzes sein, da mit den Enzymen störendes Glycerol übertragen wurde. Für jedes Enzym wurde der vom Hersteller empfohlene bzw. mitgelieferte, zehnfach konzentrierte Puffer eingesetzt. Grundsätzlich war davon auszugehen, dass 1Unit Enzym 1µg DNA in 1h schnitt.

In der Restriktionsanalyse wurden 20µl DNA aus der Mini-Präparation mit 22µl autoklaviertem ddH₂O, 3µl eines Enzyms und 5µl des entsprechenden 10xPuffer oder je 1,5µl von zwei verschiedenen Enzymen, die im selben Puffer schnitten, zusammengegeben. Der Restriktionsansatz der Maxi-DNA enthielt 1µg DNA in 17µl autoklaviertem Wasser, 2µl 10xRestriktionspuffer und 1µl Restriktionsenzym. Die Spaltung mit EcoRI und XhoI wurde im doppelten Volumen durchgeführt. Jeder Ansatz inkubierte 1h bei 37°C im Wasserbad. Die Größenauftrennung der geschnittenen DNA erfolgte in der Gelelektrophorese (s. S. 40 Agarose-Gelelektrophorese).

Herstellung des Gels

Das Gel setzte sich aus 400ml 1xTAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA) und 4mg Agarose zusammen. Der Puffer wurde in der Mikrowelle zum Kochen gebracht bis sich die Agarose vollständig aufgelöst hatte. Dabei wurde die Flasche regelmäßig geschwenkt, um ein Überkochen durch Siedeverzug zu vermeiden. Nachdem sich die Agarose vollständig gelöst hatte, wurde die Lösung unter ständigem Rühren bis auf ca. 50°C abgekühlt. Bei dieser Temperatur wurden 4µl Ethidiumbromid zugegeben, gründlich unter das Gel

gemischt, und das Gel in die dafür vorgesehene Kammer gegossen. Beim Gießen sollten möglichst keine Blasen entstehen. Große Blasen konnten mit einer Pipettenspitze zerstoßen, kleine mit der Spitze an den Rand gezogen werden. Eingeschlossene Blasen hindern den Lauf der DNA im Gel und verfälschen die Ergebnisse. Die Kämme wurden in das noch flüssige Gel gesteckt, das dann ca. 30-60min abkühlte. Sobald es fest war, wurden die Seitenbegrenzungen entfernt, und das Gel mit TAE-Puffer überschichtet. So war das Gel auch bis zum folgenden Tag haltbar.

TAE-Agarose-Gel (1%)	
• Agarose	4mg
• TEA-Puffer	400ml
In der Mikrowelle Puffer zum Kochen bringen und Agarose auflösen. Gel unter ständigem Rühren auf 50°C abkühlen lassen.	
• Ethidiumbromid	4µl
Gel mischen, gießen und abkühlen lassen. Mit TEA-Puffer überschichten.	

Agarose-Gelelektrophorese

Um die DNA für die Gelelektrophorese zu beschweren und zu markieren, wurde jeder Restriktionsansatz mit 3µl DNA-Ladepuffer versetzt, bevor er auf das Agarosegel aufgetragen wurde.

In jede Tasche wurden ca. 20µl des mit Ladepuffer versetzten Restriktionsansatzes gegeben. In die äußersten Taschen und in die mittlere wurden je 15µl der 1kb DNA-Leiter (Gene Ruler) gefüllt, die als

Größenmarker dienen. Die Elektrophorese lief abhängig von der Größe des Gels 1-2h bei 110 bis 150 Volt. Nach dieser Zeit wurde das Gel unter der UV-Lampe ausgewertet. Das Ethidiumbromid, das mit der DNA interkalierte, fluoreszierte unter dem UV-Licht. Das Gel wurde zur Dokumentation fotografiert.

DNA-Ladepuffer	
10 x Stammlösung	
• Tris-Hcl (pH 7,5)	50mM
• EDTA	50mM
• Bromphenolblau	25% w/v
• Glycerin	40% v/v
1 x Gebrauchslösung	
Stammlösung 1:10 verdünnen.	

3.3.6. Sequenzanalyse

Durch die Maxi-Präparation wurde DNA in ausreichender Menge und Reinheit für die Sequenzierung gewonnen und mit der Restriktionsanalyse und Gelelektrophorese die Größe des Inserts geprüft. Nur die DNAs, die erkennbare Inserts enthielten, wurden zum Sequenzieren geschickt.

Die nicht-radioaktive Sequenzierung der pDNA wurde bei der Firma Sequiserve in Auftrag gegeben. Für die Sequenzierung wurden 4µg Template-DNA in 20µl ddH₂O eingeschickt. Als Primer dienten Oligonukleotide aus der t3- (5' AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG 3') und t7-Promotorregion (5' CGG GAT ATC ACT CAG CAT AAT G 3') des pB-Vektors, die die MCS (657-759bp) und damit die inserierte DNA stromaufwärts bzw. stromabwärts flankierten (s. **Abb. 8-3** Vektorkarten). Die Leseweite einer Reaktion lag bei ca. 500 Nukleotiden. Für Sequenzen, die länger als 1000 Basen waren, mussten deshalb eigens Primer synthetisiert werden (100 pmol/µl, 18bp). Diese 18bp langen Primer wurden mit mindestens 30 Basen Abstand vom Ende der bereits sequenzierten cDNA in einem gut lesbaren Bereich ausgewählt, wobei darauf zu achten war, dass der Primer nicht an sich selbst binden konnte und zu etwa 50% aus den Basen Cytosin und Guanin bestand, was eine ausreichende Bindung an die Vorlage gewährleistete.

Alle identifizierten Klone wurden mit dem t3-Primer, also vom 5' Ende der Antigen-cDNA aus, ansequenziert. Der längste Klon jeder Gruppe wurde vollständig durchsequenziert und in der differentiellen Serumanalyse (DSA) getestet.

Mit Hilfe des kommerziell erhältlichen *Gene-Tool*-Programms (BIOTOOLS) wurden die neuen cDNA-Sequenzen auf Homologien untereinander überprüft. Mit dem frei zugänglichen Suchprogramm BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) der Genbibliothek des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov) wurden Homologien zu bereits bekannten cDNA- und genomischen DNA-Sequenzen gesucht. In der frei zugänglichen SEREX-Datenbank [<http://ludwig-sun5.unil.ch/CancerImmunomeDB/>] wurden Homologien zu Sequenzen gesucht, die bereits mit dem SEREX-Verfahren identifiziert wurden.

3.4. Differentielle Serumanalyse

Für die klinische Relevanz neuer Tumorantigene bedeutsam ist die Frage, ob antigenspezifische Ak auch bei anderen Patienten mit demselben Tumor, bei Patienten mit anderen Tumoren und bei Gesunden vorkommen. Tumorantigene sollten definitionsgemäß bei Gesunden zu negativen und bei Patienten mit Krebs zu positiven Ergebnissen führen.

Um die Klone mit den verschiedenen Serumgruppen testen zu können, musste der Hintergrund sicher negativ sein. Einen geeigneten Hintergrund liefert die Phagenbibliothek, da sie nicht allzu viele IgG enthielt (< 3/Platte), und die weit überwiegende Mehrheit der Klone weder vom Serum gesunder Spender noch dem von Tumorpatienten erkannt wurde.

Das Verhältnis der Plaques auf der Agarplatte sollte ca. 1 positiven Klon zu 10 negativen Klonen ergeben. Insgesamt sollten sich auf der Platte nicht mehr als 1000 pfu bilden, damit die einzelnen Plaques gut und deutlich erkennbar wären.

Um Zeit und Material zu sparen, wurde mit halben Membranen gearbeitet. Alle Membranen wurden vollständig mit Klon- und Serumnummer beschriftet. So konnte ein bestimmtes Serum in einer Petrischale mit zwei halben Membranen bzw. zwei Testklonen untersucht werden. Nach der Färbung war auf einer Folienhälfte entweder jeder oder kein Testklon (je nach Aussaat 25-50 pfu) angefärbt.

Die differentielle Serumanalyse wurde mit Seren von je 20 jungen, gesunden Kontrollpersonen und 20 pädiatrischen Patienten mit malignen Erkrankungen durchgeführt. Als Repräsentant jeder der durch Sequenzanalyse definierten Antigenfamilien wurde derjenige Klon verwendet, der in der Restriktionsanalyse am längsten war. Dabei wurden zunächst vier Klone parallel mit je 5 der 20 Normalseren getestet. Sobald ein Klon mit zwei oder mehr Normalseren positiv reagierte, wurde die differentielle Serumanalyse für diesen Klon abgebrochen, und die Proteine der Familie als Autoantigene gewertet. Nur die Klone, die mit keinem oder einem Normalserum positiv reagierten, wurden mit allen 20 Tumorseren getestet. Da jeder zehnte Mensch in Deutschland im Laufe seines Lebens an einem Malignom erkrankt, bestand die Möglichkeit, dass sich auch unter den „gesunden“ Testpersonen jemand mit einer klinisch unauffälligen Krebserkrankung befand, der Ak gegen Tumorproteine induzierte. Aus diesem Grund wurde eine positive Reaktion des Antigens mit einem einzigen Normalserum nicht als Abbruchskriterium gewertet.

4. Ergebnisse

4.1. SEREX-Screening

Um Tumorantigene zu identifizieren wurde eine cDNA-Expressionsbibliothek aus WT-Gewebe mit gepoolten Seren von vier Patienten mit WT gescreent. Unter diesen Patienten befand sich auch das einjährige Mädchen (Patientin #59), dessen Tumor mit SEREX untersucht wurde. Das Serum der Patientin #59 lag aufgrund knappen Materials in einer Konzentration von 1:800, die der anderen drei Patienten in einer Konzentration von 1:300 im Serumpool vor.

Von ca. 1×10^6 serologisch getesteten Klonen banden 70 Klone direkt oder indirekt den Zweitantikörper gegen humanes IgG. Einer dieser Klone exprimierte IgG-Sequenzen (s. Kapitel 3.2.9). Die anderen 69 Klone exprimierten Antigene, die sich nach Ansequenzierung der cDNA-Inserts am 5' Ende 21 verschiedenen Genen zuordnen ließen.

In Anlehnung an die Nomenklatur anderer international anerkannter SEREX-Arbeitsgruppen wurden die gefundenen Antigene mit Bezug auf den Identifikationsort, die untersuchte Tumorentität und die individuelle Tumorseite mit ‚MU-WT-59‘ bezeichnet. ‚MU‘ stand dabei für die Stadt München, ‚WT‘ für den pädiatrischen Nierentumor und ‚59‘ für die interne Labornummer der Patientin. Die Zusatzbezeichnungen ‚I‘ bis ‚XXI‘ repräsentierten die 21 verschiedenen Gene, die die Antigene kodierte. Der Übersicht halber wurden die verschiedenen cDNAs, die vom selben Gen kodiert worden waren, in alphabetischer Reihenfolge benannt (‚a‘ bis ‚o‘). Falls nicht genauer erläutert, beziehen sich alle Basenangaben im Folgenden auf die angegebenen, in den Datenbanken gefundenen cDNA-Homologe.

4.2. Differentielle Serumanalyse

Zur Klassifizierung der identifizierten Kandidaten in Tumor- oder Autoantigene sowie zur Untersuchung der Immunogenität von Tumorantigenen bei Tumorpatienten wurde jede Antigenfamilie mit präabsorbierten und 1:100 verdünnten Seren von gesunden Probanden bzw. von pädiatrischen Patienten mit bösartigen Erkrankungen getestet (s. Kapitel 3.1.2 und 3.4). Als Repräsentant einer Antigenfamilie wurde der Phagenklon mit dem längsten cDNA-Insert ausgewählt. Beispiele für positive und negative Ergebnisse der differentiellen Serumanalyse sind auf **Abb. 4-1** zu sehen. Die Ergebnisse der differentiellen Serumanalyse wurden tabellarisch zusammengestellt (s. **Tab. 4-1** und **Tab. 4-2**).

Wegen der fehlenden Reaktion mit Serum von 20 klinisch gesunden Probanden wurden die Antigene der Familien V, IX und XIII als Tumorantigene klassifiziert. Die zwei Antigene MU-WT-59.VI und -59.VII reagierten nur mit einem der 20 Kontrollseren, so dass streng genommen Autoantigene diagnostiziert werden mussten. Theoretisch war jedoch bei sehr seltenem Ak-Vorkommen innerhalb der Kontrollpopulation auch eine serologische Antwort auf ein klinisch okkultes Malignom zu diskutieren, weshalb diese Antigenkandidaten wie Tumorantigene auch mit Seren von pädiatrischen Krebspatienten untersucht wurden. Alle anderen Antigene reagierten mit zwei oder mehr Kontrollseren und wurden deshalb als Autoantigene klassifiziert.

Die Tumorantigene der Familien MU-WT-59.V, -59.IX und -59.XIII sowie die Kandidaten der Familien MU-WT-59.VI und -59.VII wurden zusätzlich mit jeweils 20 Seren von pädiatrischen Patienten mit verschiedenen Malignomen getestet. Letztere schlossen je zwei Patienten mit Neuroblastom, Medulloblastom, Ewingtumor, Rhabdomyosarkom, Osteosarkom, Hodgkin-Lymphom und ‚gewöhnlicher‘ (*common*) akuter lymphatischer Leukämie (cALL) sowie sechs Patienten mit WT ein. Proben von vier der sechs Patienten mit WT waren auch in den Serumpool eingegangen. Wenn unter letzteren bei der differentielle Serumanalyse keines reaktiv war, wurde mindestens ein reaktives Serum angenommen, welches das positive Screening-Ergebnis herbeigeführt haben musste. Sehr wahrscheinlich lag die Diskrepanz der Befunde für die Screening-Seren in einem Titerverlust der Ak während der Lagerungszeit vom SEREX-Screening bis zur differentiellen Serumanalyse.

Im Sinne eines *proof of principle* war das Serum der Patientin #232, deren Probe auch in den Serumpool eingegangen war, bei der differentiellen Serumanalyse für ein Tumorantigen (MU-WT-59.V) positiv; weitere Seren waren mit dem untersuchten Klon nicht reaktiv. Das Tumorantigen der Familie MU-WT-59.XIII war bemerkenswerter Weise mit dem Serum eines zusätzlichen, nicht im Pool getesteten Patienten mit WT reaktiv, so dass eine relativ ausgeprägte Immunogenität des Antigens bei WT-Patienten postuliert werden durfte (2/6 bzw. 33%). Das Tumorantigen der Familie MU-WT-59.IX wurde dagegen von keinem zusätzlichen Serum erkannt. Die Tumorantigenkandidaten der Familien MU-WT-59.VI und -59.VII reagierten jeweils mit Proben einer zusätzlichen Patientin mit WT, und das Antigen der Familie MU-WT-59.VII darüber hinaus mit dem Serum einer Patientin mit Neuroblastom. Letzteres hatte damit bei mindestens 3/20 (15%) Krebspatienten und 2/6 (33%) Patienten mit WT eine detektierbare Ak-Antwort ausgelöst.

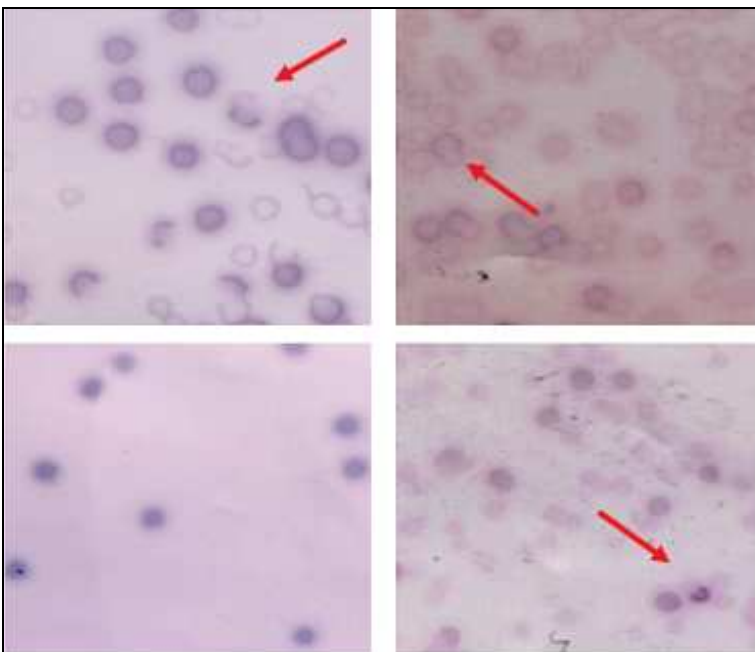


Abb. 4-1 Differentielle Serumanalyse

Auf drei der vier Abbildungen (unten rechts und oben) ist eine Erkennung des Testklons (dunkle Kreise), nicht aber der untergemischten, unselektionierten Klone der Phagenbibliothek (hellere Kreise) durch das jeweils untersuchte Serum zu erkennen. Die vierte Abbildung zeigt das Ergebnis für ein Serum, das den Testklon nicht erkannte (alle Plaques sind gleich stark angefärbt).

Diagnose	Patienten- Nummer	Antigenfamilie / Phagenklon				
		V	VI	VII	IX	XIII
		72	80	92	110	117.3
Neuroblastom	043-2	-	-	-	-	-
	062-1	-	-	+	-	-
Medulloblastom	155-1	-	-	-	-	-
	144-1	-	-	-	-	-
Ewingtumor	119-1	-	-	-	-	-
	174-1	-	-	-	-	-
Wilmstumor	059-1	-	-	-	-	-
	136-1	-	+	+	-	-
	205-2	-	-	-	-	-
	218-1	-	-	-	-	-
	232-1	+	-	-	-	-
	246	-	-	-	-	+
Rhabdomyosarkom	156-1	-	-	-	-	-
	196	-	-	-	-	-
Osteosarkom	192-1	-	-	-	-	-
	158-2	-	-	-	-	-
Hodgkin-Lymphom	011-1	-	-	-	-	-
	044-1	-	-	-	-	-
cALL	063	-	-	-	-	-
	137	-	-	-	-	-
Positive unter 20 getesteten Seren		1	1 + 1 = 2	2 + 1 = 3	0 + 1 = 1	1 + 1 = 2

Tab. 4-1 Differentielle Serumanalyse der putativen Tumorantigene mit Proben von pädiatrischen Patienten mit maligner Erkrankung.

„+“ und „-“ stehen für ein positives (seroreaktiver Klon) bzw. negatives (nicht-seroreaktiver Klon) Ergebnis. Die Zahlen unterhalb der Antigenfamilie stehen für den untersuchten Phagenklon bzw. das korrespondierende Plasmid. Hellgrau unterlegt wurden die vier Patienten mit WT, deren Serum auch in den Serumpool gemischt worden war. Wenn keine der Proben von diesen vier Patienten mit WT positiv reagierte, wurde mindestens eine positive Probe angenommen, die initial mit der Phagenbibliothek reagiert hatte (+1). Hellgelb unterlegt sind die Antigene, die jeweils eine positive Reaktion mit Normalserum zeigten.

Antigen-Familien / Plasmide	I		II		III		IV		V		VI		VII		VIII		IX		X		XI		XII		XIII		XIV		XV		XVI		XVII		XVIII		XIX		XX		XXI			
	43.2	62	64.3	68.2	72	80	92	98	110	105.2	114	117.1	117.3	118	131.1	158.1	173.2	174.2	176.1	176.3	206																							
035	n.u.	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	n.u.	n.u.			
037	n.u.	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	n.u.	n.u.	
038	n.u.	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	n.u.	n.u.	
048	n.u.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	n.u.	n.u.		
050	n.u.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	n.u.	n.u.		
051	n.u.	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	n.u.	n.u.		
052	n.u.	-	-	-	-	-	n.u.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	n.u.	n.u.		
053	n.u.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	n.u.	n.u.		
054	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	n.u.	n.u.	
055	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	n.u.	n.u.	
056	+	+	+	n.u.	-	-	n.u.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	n.u.	n.u.
057	+	-	-	n.u.	-	-	n.u.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	n.u.	n.u.
058	+	+	-	n.u.	-	-	n.u.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	n.u.	n.u.
067	n.u.	+	-	n.u.	-	-	n.u.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	n.u.	n.u.
068	n.u.	-	+	n.u.	-	-	n.u.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	n.u.	n.u.
069	n.u.	-	-	n.u.	-	-	n.u.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	n.u.	n.u.
070	n.u.	-	-	n.u.	-	-	n.u.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	n.u.	n.u.
064	n.u.	-	-	n.u.	-	-	n.u.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	n.u.	n.u.
041	n.u.	+	-	n.u.	-	-	n.u.	-	-	n.u.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	n.u.	n.u.
062	n.u.	+	-	n.u.	-	-	n.u.	-	-	n.u.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	n.u.	n.u.
Positive/Getestete Seren		5/5	6/20	3/20	4/9	1/20	1/20	2/18	0/20	2/18	4/15	3/20	0/20	2/20	3/10	5/20	2/15	3/10	2/5	4/15	2/5	4/15	2/5	2/5																				

Tab. 4-2 Differentielle Serumanalyse der mit SEREX identifizierten Antigene mit Proben von gesunden Probanden (s. S. 46).

„+“ und „-“ stehen für ein positives (seroreaktiver Klon) bzw. negatives Ergebnis (nicht-seroreaktiver Klon). „n.u.“ ist gleichbedeutend mit ‚nicht untersucht‘. Die Zahlen unterhalb der Antigenfamilie stehen für den untersuchten Phagenklon bzw. das korrespondierende Plasmid. Gelb unterlegt wurden die Ergebnisse, die Tumorantigene (dunkel) oder Tumorantigenkandidaten (hell) identifizierten.

4.3. Sequenzanalyse und Homologierecherche

Die cDNA-Inserts der 69 isolierten Phagenklone waren durch die Datenbankrecherchen bis August 2006 insgesamt 21 verschiedenen Genfamilien zuzuordnen. 19 von diesen kodierten Proteine mit bekannter Funktion und eine ein vorbeschriebenes, hypothetisches Protein. Zur cDNA des Tumorantigens MU-WT-59.VII fand sich keine Homologie in den verfügbaren cDNA-Bibliotheken. Neue molekulare Charakteristika enthielten die putativen Antigene der Familien MU-WT-59.I, -II, -III, -IV, -XI, -XVI, -XVII, -XVIII -XIX und -XX. Die molekularen Abweichungen zum bekannten Homolog kamen mutmaßlich durch Basenaustausche und alternatives Spleißen zustande.

Im Folgenden wurden die kodierenden Plasmide sowie deren beste cDNA-Homologe in der GenBank des NCBI bzw. in der SEREX-Datenbank, die chromosomale Lokalisation der verantwortlichen Gene und gegebenenfalls neue molekulare Charakteristika der mit SEREX klonierten Antigene tabellarisch aufgelistet (s. **Tab. 4-3** bis **Tab. 4-7**). Eine detailliertere Beschreibung findet sich im ergänzenden Text und in den schematischen Abbildungen (s. **Abb. 4-2** bis **Abb. 4-22**). Als ORF der Antigen-cDNAs wurde der erste und längste ORF in den klonierten Sequenzen angenommen; dieser korrespondierte regelmäßig mit dem des cDNA-Homologs. Von den cDNA-Inserts, die identische 5' Enden aufwiesen, wurde jeweils nur ein Exemplar vollständig, alle anderen ausschließlich mit t3-Promoter-spezifischen Oligonukleotiden sequenziert.

Antigenfamilie	Plasmid	Länge	Sequenz	Bestes cDNA-Homolog		Differenzen zum GenBank-Homolog		Chromosom
				GenBank (Zugangsnummer)	SEREX- Antigene (GenBank-Nr.)	cDNA	Protein	
MU-WT-59.	fett → DSA	kb	bp					
I	163.1	3,7	3545	MYH3 (NM_002470)	MU-RMS-40.3 (AY517555.1)	a-o) 5' ORF inkomplett 13 SNP 9 neue bp-Austausche	a-o) N-Terminus inkomplett 1 bek. AS-Austausche 8 neue AS-Austausche	17p13.1
a	106	3	3028					
b	172	3	t3					
b	86	2,5	t3					
c	140	1,5	2809					
d	185	2,7	2642					
e	55.1	3	2537					
e	81.1	2,7	t3					
f	254.2	1,2	2446					
g	61.2	2,5	2469					
h	43.2	3	2248					
h	177.1	2,7	t3					
h	284	2,2	t3					
h	60.1	2,4	t3					
i	235	2,2	2140					
k	43.1	2	1944					
l	136	1,7	1777					
m	176.2	3	1765					
n	57.2	1,7	1709					
n	112	1,7	t3					
o	232	1,5	1694					

Tab. 4-3 Molekulare Charakteristika von MU-WT-59.I

Neue Differenzen auf cDNA- oder Proteinebene sind rot hervorgehoben.

Antigenfamilie	Plasmid	Länge	Sequenz	Bestes cDNA-Homolog		Differenzen zum GenBank-Homolog		Chromosom
				GenBank (Zugangsnummer)	SEREX-Antigene	cDNA	Protein	
MU-WT-59.	fett → DSA	kb	bp					
II	62 280 99.2 174.1	2,5 2,5 2,5 2,5	2379 t3 2408 t3	HSF2 (NIM_004506.2)	Keines	a, b) 5' UTR inkomplett, 54bp-Deletion b) 30bp im 3'UTR	a, b) 18 AS-Deletion	6q22.32
III	64.3 139	4,3 1,5	4677 t3	I) LRRFIP2 (NIM_017724.1) II) APP (NIM_000484)	Keines	I) 72bp-Insertion, erweiterter 5' UTR II) 5' ORF inkomplett, 3'UTR inkomplett	I) 24 AS-Insertion II) N-Terminus inkomplett	I) 3p22.1 II) 21q21.3
IV	68.2	3	2757	CCDC46 (NIM_145036.2)	Keines	2 SNPs, 3bp-Deletion	1 bek. AS-Austausch, 1 AS-Deletion	17q24.3
V	72 265 75.2 231 279 117.2	2 3 3 3 2 2	3185 t3 3149 t3 2658 2554	MSH2 (NIM_000251.1)	Keines	b-d) 5' ORF inkomplett	b-d) N-Terminus inkomplett	2p22-21
VI	80 257 283 286	1,5 2 2,3 2,2	2125 t3 t3 t3	GNPAT (NIM_014236.1)	Keines	5' ORF inkomplett	N-Terminus inkomplett	1q42.11-3

Tab. 4-4 Molekulare Charakteristika von MU-WT-59.II-VI

Neue Differenzen auf cDNA- oder Proteinebene sind rot hervorgehoben.

Antigenfamilie	Plasmid	Länge	Sequenz	Bestes cDNA-Homolog		Differenzen zum GenBank-Homolog		Chromosom
				GenBank (Zugangsnummer)	SEREX-Antigene (SEREX ID.)	cDNA	Protein	
MU-WT-59.	fett → DSA	kb	bp					
VII	92	0,5	553	Keines	Keines	Entfällt	Entfällt	17p13.3
VIII	98 117.4 216	0,7 0,7 0,5	650 664 682	NM23B (NM_002512.1)	HOM-Gliom-GT 3 (212) NW-F 102a (2047)	5' UTR inkomplett	Keine	17q21.22
IX	110	1,8	1694	NARG2 (NM_024611.1)	Keines	5' ORF inkomplett	N-Terminus inkomplett	15q22.2
X	105.2 105.1	1,2 1	961 t3	DHX38 (NM_014003.2)	NGO-Br-2 (802)	5' ORF inkomplett	N-Terminus inkomplett	16q21-22.3
XI	59.1 114 203	2,5 3,4 2,3	2236 3193 2306	MYH8 (NM_002472.1)	Keines	5' ORF inkomplett, 11 SNP	N-Terminus inkomplett, 8 einzelne AS	17p13.1
XII	117.1	3	789	DACH1 (NM_080759.1)	Keines	5' ORF inkomplett	N-Terminus inkomplett	13q21-22
XIII	117.3	2,3	2377	SSRP1 (NM_003146.2)	NY-Co-19 (28) NGO-St-119 (1330)	5' ORF inkomplett	N-Terminus inkomplett	11q12
XIV	118	0,5	548	RPL30 (NM_000989.2)	NW-F 130 (2048)	keine	Keine	8q22
XV	131.1	0,4	297	RPL13 (NM_000977.2)	Keines	5' ORF inkomplett	N-Terminus inkomplett	16q24.3

Tab. 4-5 Molekulare Charakteristika von MU-WT-59.VII-XV.

Neue Differenzen auf cDNA- oder Proteinebene sind rot hervorgehoben.

Antigenfamilie	Plasmid	Länge	Sequenz	Bestes cDNA-Homolog		Differenzen zum GenBank-Homolog		Chromosom
				GenBank (Zugangsnummer)	SEREX-Antigene (SEREX-ID.)	cDNA	Protein	
MU-WT-59.	fett → DSA	kb	bp					
XVI	a	5	4911	Nebulin (NM_004543)	Keines	5' ORF inkomplett, 279 und 186bp-Deletion oder 186bp-Deletion oder 93 und 93bp-Deletion oder 93bp Deletion	N-Terminus inkomplett, 93 und 62 AS-Deletion oder 62 AS-Deletion oder 31 und 31 AS-Deletion oder 31 AS-Deletion	2q22
	a	5	t3					
	a	5	t3					
	158.1	5	4694					
	c	3	2851					
	d	3	2680					
XVII	163.2 (a)	3	2980	a) IQWD1.2 (NM_001017977)	HOM-TSMa4-9 (742)	5' ORF inkomplett, a) 60bp-Deletion	N-Terminus inkomplett, a) 20 AS-Deletion	1q24.23
	173.2 (b)	3	3036	b) IQWD1.1 (NM_018442)	HOM-TES-95 (AF124434.1)			
XVIII	173.2	5	3898	GCC2 (NM_014635.3)	Se1-1 (2017)	5' ORF inkomplett, Insertion von 217bp, 710bp und 441bp	N-Terminus inkomplett, C-Terminus inkomplett	2q12.3
	278	4	t3		NGO-St-38 (261) NGO-Pr-1 (594) CLL-assoc. Antigen KW-11 (AF432211.1)			

Tab. 4-6 Molekulare Charakteristika von MU-WT-59.XVI-XVIII

Neue Differenzen auf cDNA- oder Proteinebene sind rot hervorgehoben.

Antigenfamilie	Plasmid	Länge	Sequenz	Bestes cDNA-Homolog		Differenzen zum GenBank-Homolog		Chromosom
				GenBank (Zugangsnummer)	SEREX-Antigene (SEREX-ID bzw. GenBank-Nr.)	cDNA	Protein	
MU-WT-59.	fett → DSA	kb	bp					
XIX	176.1	1,5	2235	a) ROCK1 (NM_005406.1) b) FLJ32476 fis (AK057038.1)	NY-REN-35 (444)	1bp-Insertion b) 5' UTR inkomplett 1bp	C-terminus inkomplett b) N-Terminus inkomplett 1 AS	18q11.1
XX	176.3	4	4019	ROCK2 (NM_004850.2)	NW-Twe 37 (2069) NY-TLU-54-T3 (2726)	5' ORF inkomplett Einzelne bp im 3'UTR	N-Terminus inkomplett	2p24
XXI	206	3	2682	CEP290 (NM_025114)	Se2-2 (2019) CTCL tumor antigen se2-2 (AF273044.1)	5' ORF inkomplett	N-Terminus inkomplett	12q21.33

Tab. 4-7 Molekulare Charakteristika von MU-WT-59.XIX-XXI

Neue Differenzen auf cDNA- oder Proteinebene sind rot hervorgehoben.

Die putativen, N-terminal inkompletten Antigene der Familie **Mu-WT-59.I** waren mit bekannten **MYH3-Varianten** identisch oder zeigten diesen gegenüber neue Aminosäureaustausche.

Die MU-WT-59.I-cDNAs zeigten eine hohe Homologie zur 5' längeren cDNA der *myosin heavy chain 3* (MYH3) aus embryonalem Skelettmuskel (NM_002470; Eller et al., 1989; s. **Abb. 4-2**) und zur cDNA des *rhabdomyosarcoma antigens* MU-RMS-40.3 (AY517555.1), welches in der eigenen Arbeitsgruppe mittels SEREX aus embryonalem Rhabdomyosarkomgewebe kloniert worden war (Behrends, 2007; Götz, 2006). In der SEREX-Datenbank fand sich kein cDNA-Homolog.

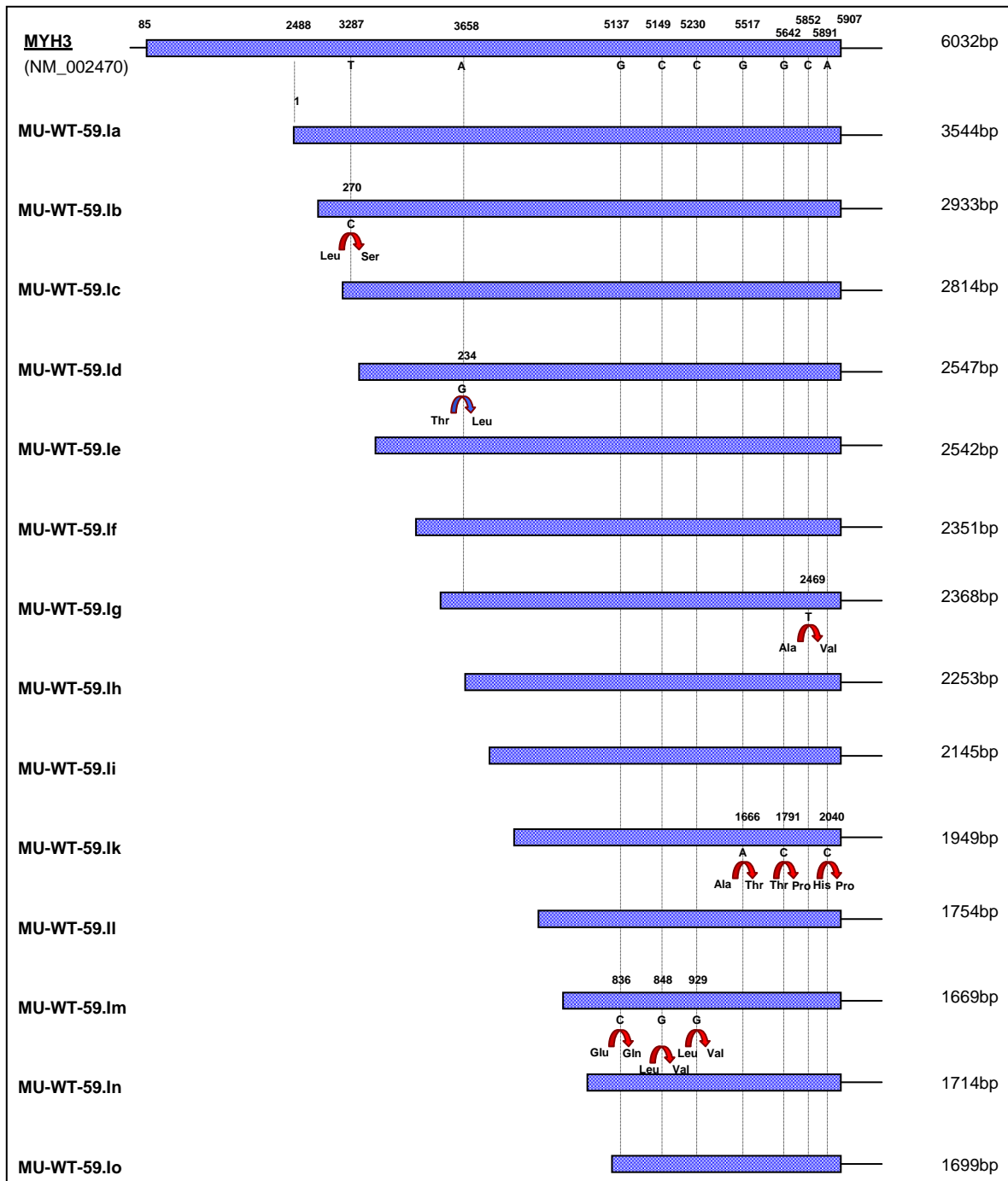
Die cDNAs waren entweder vollständig homolog zur MYH3-cDNA (NM_002470) oder unterschiedenen sich durch einzelne Basenaustausche. Die putativen Antigene MU-WT-59.Ib, -Id, -Ig, Ik und Im zeigten gegenüber MYH3 (X13100.1) insgesamt 9 AS-Austausche, von denen einer auf einem bekannten *single nucleotide polymorphism* (SNP) beruhte und acht neu waren (s. **Abb. 4.2**).

Das MYH3-Gen war auf Chromosom 17p13.1 lokalisiert worden (Eller et al., 1989; UniGene hs.440895). Die MYH3-cDNA-Expression ist normalerweise auf die embryonale Phase der Skelettentwicklung begrenzt, kann aber im Rahmen von genetisch bedingten Muskelerkrankungen wie der Myskeldystrophie Duchenne und Malignomen mit muskulärer Differenzierung wie Rhabdomyosarkomen und WT reaktiviert werden (Bandman, 1985; Eller et al., 1989; Fitzsimons and Hoh, 1981; Garvin et al., 1985; Karsch-Mizrachi et al., 1989; Miyagawa et al., 1998; Schiaffino et al., 1982; Tonin et al., 1991; Webster et al., 1988; Whalen et al., 1981).

Myosin ist ein ubiquitär vorkommendes Protein, das im Zusammenspiel mit Aktin und ATP chemische Energie in mechanische umwandelt. Es ist an verschiedenen Bewegungsprozessen von Zellen beteiligt, wie z.B. Kontraktion, Zytokinese, Transport von Vesikeln und zellulärer Fortbewegung. Das Protein besteht aus zwei schweren Ketten und zwei Paaren leichter Ketten. Die Familie der *myosin heavy chain* (MyHC)-Proteine besteht aus mindestens zehn Isoformen, die während der Entwicklung in räumlich und zeitlich verschiedenen Mustern exprimiert werden.

Abb. 4-2 cDNA-Homologie von MU-WT-59.I zu MYH3 (NM_002470) (s. S. 54).

MU-WT-59.I wurde von insgesamt 21 Plasmiden kodiert; die cDNA-Inserts von 14 Plasmiden sind stellvertretend gezeigt (p163.1, p106, p140, p185, p55.1, p254.2, p61.2, p43.2, p235, p43.1, p136, p176.2, p57.2, p232). Der ORF der MYH3-cDNA (NM_002470) war für bp 85-5907 angegeben. Die korrespondierenden ORFs der MU-WT-59.I cDNAs wurden vom stromaufwärts *in frame* gelegenen Vektor-ATG aus abgelesen. Es lagen an verschiedenen Positionen der MU-WT-59.I cDNAs einzelne Basenaustausche gegenüber der MYH3 cDNA vor (NM_002470). 13 davon entsprachen bekannten SNPs [bp 2616 (g→a; Ala), bp 2694 (g→a; Lys), bp 2739 (a→g; Lys), bp 3000 (g→a; Thr), bp 3036 (c→t; Ser), bp 3222 (c→a; Arg), bp 3432 (t→c; Ile), bp 3594 (t→g; Ala), bp 3658 (a→g; Thr→Ala), bp 4815 (t→c; Ile), bp 5073 (a→g; Arg), bp 5778 (g→a; Arg), bp 5781 (a→g; Lys)], 9 waren neu [bp 3287 (t→c; Leu→Ser), bp 3678 (g→a; Ala), bp 5137 (g→c; Glu→Gln), bp 5149 (c→g; Leu→Val), bp 5230 (c→g; Leu→Val), bp 5517 (g→a; Ala→Thr), bp 5642 (a→c; Thr→Pro), bp 5852 (c→t; Ala→Val), bp 5891 (a→c; His→Pro)]. Der Übersichtlichkeit halber sind nur diejenigen Basenaustausche eingezeichnet, die eine Änderung der AS-Sequenz bewirkten (neu: rote Pfeile, bekannt: blaue Pfeile). Mindestens ein Ak-Epitop lag stromabwärts von bp 4350, da auch die kurze Sequenz von MU-WT-59.Io von Serum-Ak gebunden worden war.



Das putative, N-terminal eventuell inkomplette Antigen **MU-WT-59.II** war eine in Tumor- und Mausgewebe vorbeschriebene Spleißvariante des **HSF2**.

Die MU-WT-59.II-cDNA war homolog zu der 5' längeren, aus T-Lymphozyten klonierten cDNA des *heat shock transcription factor 2* (HSF2; NM_004506.2; s. **Abb. 4-3**). Sie unterschied sich von dieser durch eine Deletion von Exon 11, die im putativen Antigen in eine Deletion von 18 AS resultierte. Die im WT identifizierte Spleißvariante war bereits in der Maus als Spleißvariante β vorbeschrieben (Goodson et al., 1995) und kürzlich mit Hilfe von SEREX aus Plattenepithelkarzinomgewebe (SCC) des Kopf-Hals-Bereichs kloniert worden (Heubeck et al., 2006).

Das *HSF2*-Gen ist auf Chromosom 6q22.32 lokalisiert und wird von vielen gesunden und maligne transformierten Geweben exprimiert (UniGene hs.158195; Goodson et al., 1995). Eine Expression in WT wurde bislang nicht beschrieben. Bislang sind nur die beiden genannten Spleißvarianten bekannt.

HSF2 gehört zu einer Proteinfamilie, die bei Hitzeeinwirkung oder anderem Stress spezifisch an das *heat shock element* (HSE) bindet und *heat shock response*-Gene aktiviert. HSF2 nimmt in dieser Familie eine Sonderrolle ein, weil es während der Zelldifferenzierung und -entwicklung wesentlich stärker aktiviert wird als durch anderen zellulären Stress (Nykanen et al., 2001).

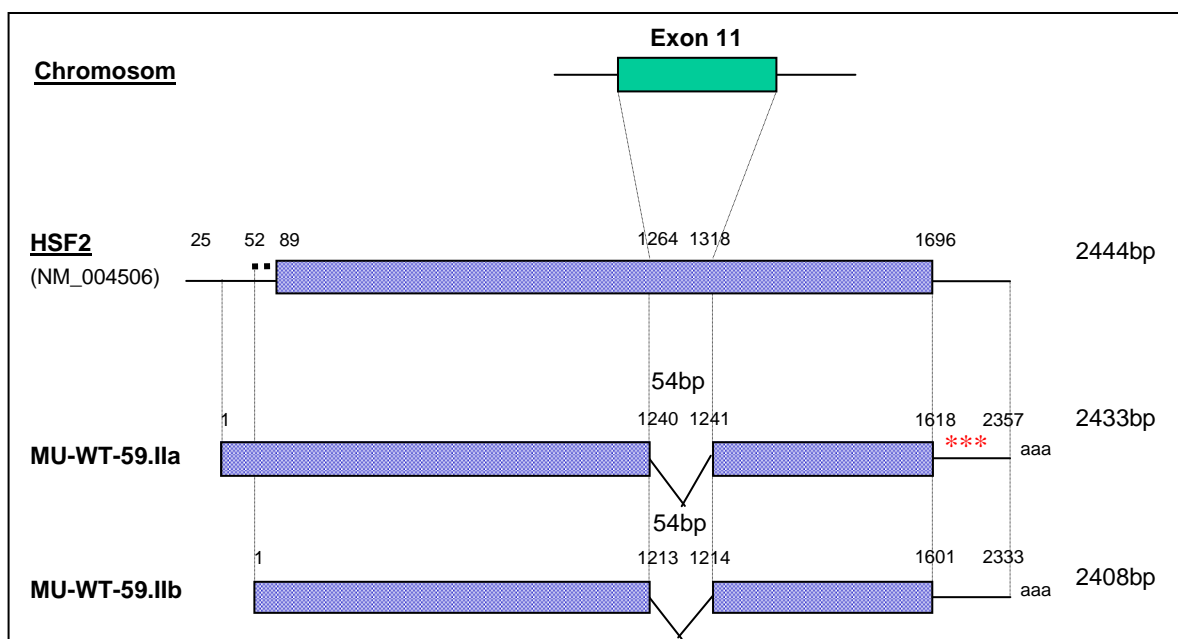


Abb. 4-3 cDNA-Homologie von MU-WT-59.II zu HSF2 (NM_004506.2).

MU-WT-59.II wurde von insgesamt vier Plasmiden kodiert; die cDNA-Inserts von zwei Plasmiden sind stellvertretend gezeigt (p62 und p99.2). Der ORF der HSF2-mRNA (NM_004506.2) war für bp 89-1696 angegeben; stromaufwärts findet sich kein *in frame* gelegenes Stopkodon, so dass der N-Terminus des Proteins nicht sicher definiert ist. Der korrespondierende ORF von MU-WT-59.II wurde in allen Plasmiden vom Vektor-ATG aus abgelesen. Die beiden komplett sequenzierten Plasmide p62 (a) und p99.2 (b) wiesen gegenüber der HSF2-cDNA eine Deletion von 54 bp (bp 1264-1318, NM_004506.2) auf, die dem Exon 11 des *HSF2*-Gens entsprach und in murinem und humanem Plattenepithelkarzinomgewebe als Spleißvariante β vorbeschrieben war. Stromabwärts des eingetragenen ORF waren in p99.2 (b) 30 Austausch einzelner Basen detektiert worden (angedeutet durch rote Kreuze). Da es sich bei den Plasmidpaaren p62 und p280 bzw. p99.2 und p174.1 aufgrund exakt übereinstimmender 5' Enden am ehesten um Amplifikate handelte, wurde auf die Sequenzierung des 3'Terminus von je einem Amplifikat verzichtet.

Das/die putative(n) Antigen(e) **MU-WT-59.III** entsprachen einer neuen Spleißvariante des **LRRFIP2** und/oder einer N-terminal inkompletten Form des **APP**.

Die MU-WT-59.III-cDNA war im ersten Abschnitt homolog zur 5' etwas kürzeren cDNA des *leucine rich repeat (in FLII) interacting protein 2* (LRRFIP2) aus Kolonmukosa (NM_017724.1) und im zweiten Teil zu einem Fragment der cDNA des *amyloid A4 precursor protein of Alzheimer's disease* (APP; NM_000484) identisch (s. **Abb. 4-4**). Die Tatsache, dass der erste Abschnitt stromabwärts von einer poly-A-Sequenz flankiert war, sprach dafür, dass es sich bei der heterogenen cDNA eher um ein Klonierartefakt als um das Resultat einer Gentranslokation handelte. Welches der beiden möglichen, langen Genprodukte (LRRFIP2 oder APP) im WT-Gewebe synthetisiert worden war, blieb offen; wahrscheinlicher war die Nutzung des stromaufwärts gelegenen ORF bzw. dessen vorcharakterisierten Translationsstartsignals.

Im ersten zur LRRFIP2-cDNA homologen Abschnitt der MU-WT-59.III-cDNA fand sich eine neue Insertion von 72bp, die mit genomischer Sequenz aus dem Intron 5 korrespondierte. Somit handelte es sich bei dem SEREX-definierten putativen LRRFIP2-Homolog um eine neue Spleißvariante (s. **Abb. 4.4**).

Das *LRRFIP2*-Gen liegt auf Chromosom 3p22.1 und wird in verschiedenen gesunden Geweben, einschließlich Niere, und einigen malignen Geweben exprimiert (UniGene hs.475319). Mit Northern-Blot-Analysen war eine Expression in verschiedenen adulten Geweben mit einer Prädominanz in Herz- und Skelettmuskulatur nachgewiesen worden (Fong and de Couet, 1999). Eine Expression in WT war bislang nicht beschrieben. Das Genprodukt LRRFIP2 ist durch eine mögliche Interaktion mit der *leucine rich repeat* (LLR) Domäne des *flightless-I (FLI)* -Gens charakterisiert. Seine genaue Funktion ist jedoch noch nicht geklärt (Fong and de Couet, 1999).

Das *APP*-Gen war auf Chromosom 21q21.3 lokalisiert worden (Robakis et al., 1987) und wird in verschiedenen gesunden und malignen Geweben exprimiert, darunter auch Gewebe aus normaler Niere und Nierentumoren (UniGene hs.434980). Das Genprodukt APP ist an der Kupfer-Reduktion beteiligt und hat bei der Alzheimer-Erkrankung und Demenz bei älteren M. Down-Patienten Bedeutung, bei denen sich Amyloidfibrillen im Gehirn ablagern (Simons et al., 2002).

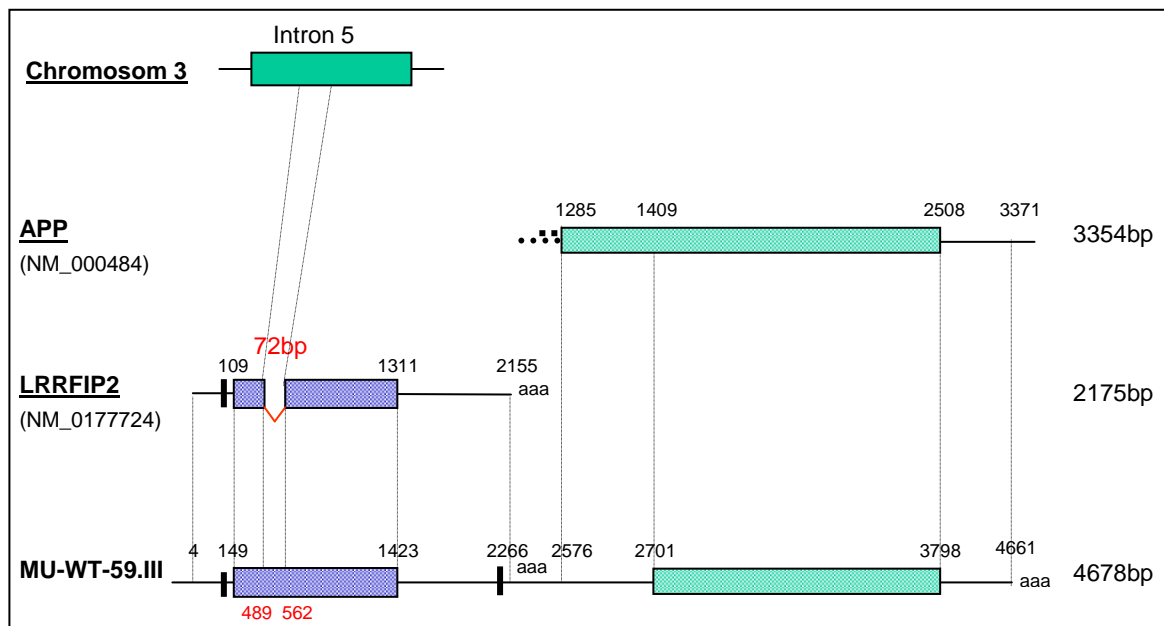


Abb. 4-4 cDNA-Homologie von Mu-WT-59.III zu LRRFIP2 (NM_017724.1) und APP (NM_000484).

MU-WT-59.III wurde von zwei Plasmiden kodiert; gezeigt ist das cDNA-Insert von p64.3. Der LRRFIP2-ORF war für bp 109-1311 angegeben (NM_017724.1), er wird stromaufwärts von einem *in frame* gelegenen Stopkodon flankiert (dicker, vertikaler Balken). Der korrespondierende ORF der MU-WT-59.III-cDNAs unterschied sich durch die neue Insertion von 72 bp (rot) (bp 446/447, NM_017724.1), die zu genomischer Sequenz des Intron 5 im LRRFIP2-Gen korrespondierte. Der vom Vektor-ATG ausgehende ORF wurde bei bp 40 mit einem Stopkodon beendet. Es fanden sich zwei einzelne Basendeletionen in der Sequenz von p64.3 (bp 1971 und bp 2103) stromaufwärts des ORF im 5' untranslatierten Bereich (UTR). Der APP-ORF ist für bp 195-2508 (NM_000484) angegeben. Der APP-ORF zeigt erst ab bp 1285 eine signifikante Homologie zu den MU-WT-59.III-cDNA; diese war bis auf das verkürzte 3'Ende der WT-cDNAs vollständig. Der korrespondierende ORF in p64.3 zeigte keine Veränderungen der Sequenz. Er wurde allerdings im Bakterium von einem stromabwärts gelegenen Startkodon aus abgelesen (z.B. ATG, bp 2701), da sich kurz vor dem poly-A-Ende der stromaufwärts gelegene LRRFIP2-cDNA ein *in frame* gelegenes Stopkodon befand (dicker, vertikaler Balken).

Das putative, N-terminal inkomplette Antigen MU-WT-59.IV unterschied sich von CCDC46 durch eine neue Insertion und einzelne Aminosäureaustausche.

Die 5' inkomplette MU-WT-59.IV-cDNA unterschied sich von der Isoform a der Transkriptionsvariante 1 des cDNA-Homologen *coiled-coil domain containing 46* (CCDC46; NM_145036.2) durch zwei bekannte Basenaustausche (SNP) und eine neue Insertion von 3 bp (s. **Abb. 4-5**). Das kodierende Gen liegt auf Chromosom 17q24.3 und wird in verschiedenen gesunden und malignen Geweben exprimiert (UniGene hs.408676). In der Literatur finden sich keine weiteren Expressionsdaten. Über die Funktion des Genproduktes ist bisher nichts bekannt.

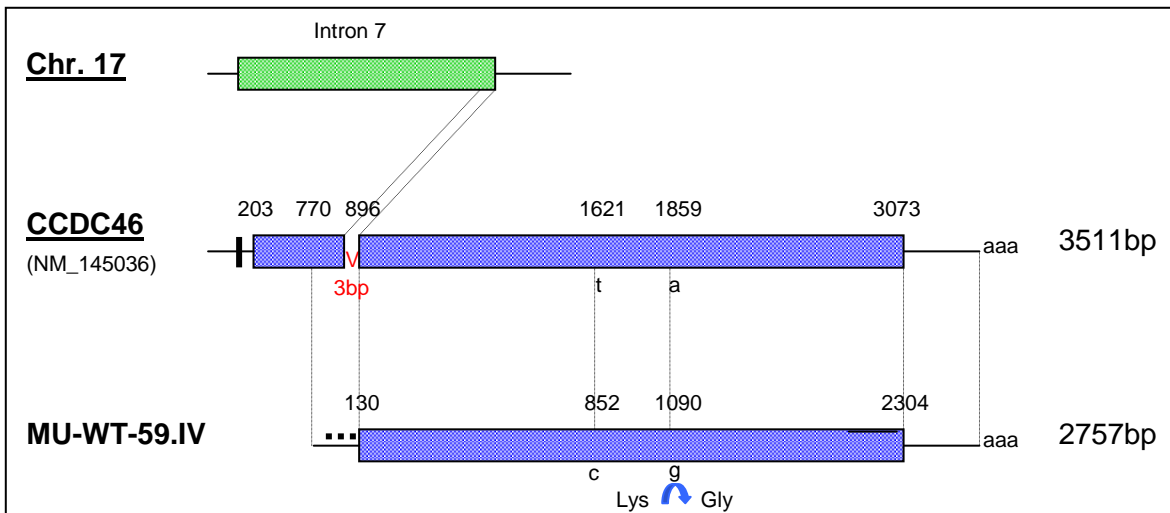


Abb. 4-5 cDNA-Homologien von MU-WT-59.IV zu CCDC46 (NM_145036.2).

MU-WT-59.IV wurde von p68.2 kodiert. Der CCDC46-ORF ist von bp 203-3073 angegeben und stromaufwärts von einem *in frame* gelegenen Stopkodon flankiert (dicker, vertikaler Balken). Der korrespondierende ORF von p68.2 (bp 130-2304) lag nicht *in frame* mit dem Vektor-ATG und wurde deshalb im Bakterium von einem stromabwärts gelegenen Startkodon abgelesen (z.B. ATG, bp 130). Er wurde stromaufwärts nicht von einem Stopkodon flankiert, so dass der Translationsstart *in vivo* möglicherweise stromaufwärts lag. Unmittelbar vor Beginn des MU-WT-59.IV-ORF befand sich eine neue Insertion von 3bp (bp 895/896, NM_145036), die in der Insertion einer AS resultierte und zu den letzten drei Basen aus Intron 7 des CCDC46-Gens korrespondierte. Wahrscheinlich wurde demnach ein alternatives Spleißsignal genutzt. Ausserdem zeigten sich zwei SNP (t→c; Asn; bp 1621) (a→g; Lys→Glu; bp 1859). Der vom Vektor-ATG ausgehende ORF wurde bei bp 38 terminiert. Es gab drei, maximal 131bp lange, alternative ORF.

Das putative Antigen MU-WT-59.V war identisch mit MSH2.

Die MU-WT-59.V-cDNAs waren 100% homolog und 5' kürzer als die cDNA des *mutS homolog 2* (MSH2; NM_000251.1; s. **Abb. 4-6**). In der SEREX-Datenbank fanden sich keine Homologien, jedoch wurde MSH2 beim Screening einer cDNA-Bibliothek aus Pankreaskarzinomgewebe mit entsprechenden Seren identifiziert (Okada et al., 2005).

Das *MSH2*-Gen liegt auf Chromosom 2p22-p21 (Fishel and Wilson, 1997) und wird in diversen gesunden und malignen Geweben exprimiert (UniGene hs.146519). Eine *MSH2*-Genexpression wurde auch in WT gefunden (Idikio, 2001). Hohe Level an *MSH2* wurden in stark proliferierenden Geweben wie z.B. Kolon nachgewiesen (Fishel and Wilson, 1997). Durch RT-PCR konnte seine Expression in Gehirn, Lunge, Magen, Niere, Hoden, Plazenta, Pankreas und Pankreaskarzinomen nachgewiesen werden (Okada et al., 2005).

MSH2 gehört zur Familie der *mismatch repair*-Proteine, die an der Reparatur von Mutationen beteiligt sind. *MSH2* bildet mit *MSH3* oder *MSH6* Heterodimere, die die Stabilität von nukleärer DNA erhalten. Diese Heterodimere nehmen an der transkriptionsgebundenen Reparatur teil und induzieren als Antwort auf bestimmte DNA-Schäden Apoptose (Seifert and Reichrath, 2006).

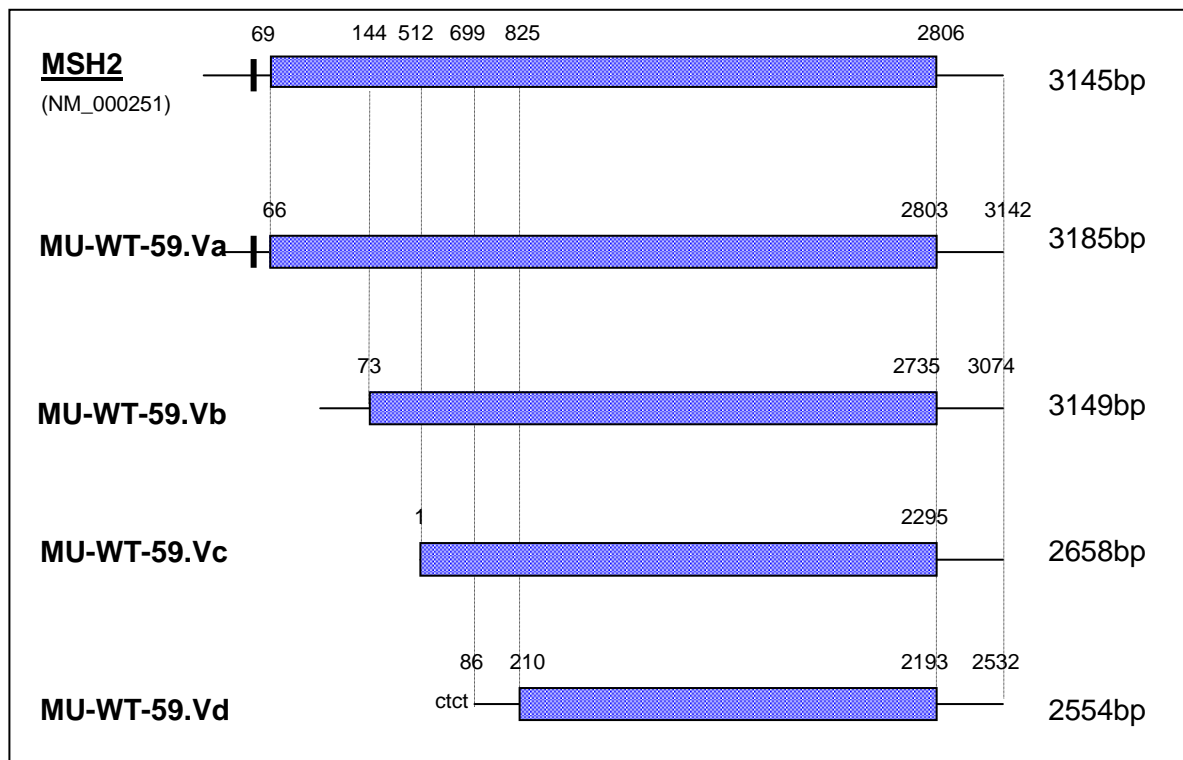


Abb. 4-6 cDNA-Homologie von MU-WT-59.V zu MSH2 (NM_000251.1).

MU-WT-59.V wurde von insgesamt 6 Plasmiden kodiert; stellvertretend gezeigt sind die cDNA-Inserts von p72 (a), p75.2 (b), p279 (c) und p117.2 (d). Der MSH2-ORF war für bp 69-2806 angegeben (NM_000251.1) und mit dem von MU-WT-59.Va identisch. Er wird stromaufwärts von einem *in frame* gelegenen Stopkodon (dicker, vertikaler Balken) flankiert. Alle WT-cDNA-Inserts waren 5' inkomplett. In p279 (c) wurde das Antigen wahrscheinlich vom stromaufwärts in *frame* gelegenen Vektor-ATG aus abgelesen. Die poly-ct-Sequenz in p117.2 (bp 1-85 des Inserts) entsprach vermutlich einem Klonierartefakt. Die vom stromaufwärts gelegenen Vektor-ATG abgelesenen ORF von p72 und p265 wurden an bp 51, von p75.2 und p231 an bp 284 und von p117.2 bei bp 143 terminiert. Zehn alternative ORF wurden detektiert: bp 412-586 (58 AS), bp 610-704 (27 AS), bp 662-758 (32 AS), bp 1315-1378 (21 AS), bp 1747-1834 (29 AS), bp 1876-1969 (31 AS), bp 1924-2059 (45 AS), bp 2357-2423 (33 AS), bp 2323-2401 (18 AS), bp 2656-2740 (26 AS).

Das putative, N-terminal inkomplette Antigen MU-WT-59.VI war 100% homolog zu GNPAT.

Die MU-WT-59.VI-cDNAs zeigten eine 100%ige Homologie zu der cDNA des Enzyms Glyceronephosphat-O-Acyltransferase (GNPAT; NM_014236.1) aus Gehirn (s. **Abb. 4-7**). Allerdings war der GNPAT-ORF in den WT-cDNAs inkomplett. In der SEREX-Datenbank fanden sich keine Homologien.

Das *GNPAT*-Gen liegt auf Chromosom 1q42.11-3 (Thai et al., 2001) und wird in verschiedenen gesunden und malignen Geweben einschließlich Nierenzellkarzinom nachgewiesen (UniGene hs.498028). Eine Expression in Wilmstumoren ist in der Literatur bisher nicht beschrieben.

Das Enzym ist auch als Dihydroxyacetonphosphat-Acyltransferase (DAP-AT) bekannt. Es ist ausschließlich in Peroxisomen lokalisiert und an der Biosynthese von Ätherlipiden und Plasmalogenen (Phospholipide mit einem α,β -ungesättigten Äther am C-1) beteiligt. Eine der Funktionen der Plasmalogene ist wahrscheinlich der Schutz der Zellen vor oxidativem Stress (Nagan and O'Kane, 2001).

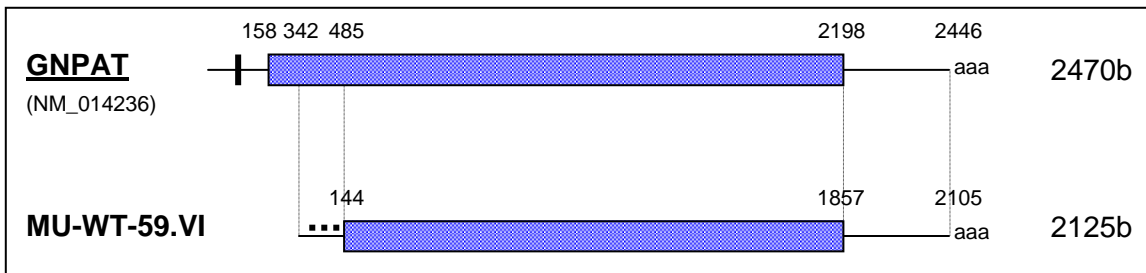


Abb. 4-7 cDNA-Homologie von MU-WT-59.VI zu GNPAT (NM_014236.1).

MU-WT-59.VI wurde von vier Plasmiden mit identischen 5' Ende kodiert (p80, p257, p283 und p286); gezeigt ist stellvertretend das Insert von p80. Der GNPAT-ORF war für die bp 158-2198 angegeben (NM_014236.1). Er wurde stromaufwärts von einem in *frame* gelegenen Stopkodon (dicker, vertikaler Balken) flankiert. Der korrespondierende ORF aller Plasmide konnte im Bakterium von einem stromabwärts gelegenen ATG (z.B. ATG bei bp 144) aus abgelesen worden sein. Der vom Vektor-ATG ausgehende ORF wurde stromabwärts von einem *in frame* gelegenen Stopkodon bei bp 16 beendet. Es wurden sechs alternative ORF detektiert: bp 64-126 (21 AS), 235-372 (46 AS), 514-576 (21 AS), 904-966 (21 AS), 1046-1096 (27 AS), 1342-1416 (25 AS).

Das Antigen MU-WT-59.VII wurde von einem unbekanntem Gen kodiert.

Die cDNA des Tumorantigens MU-WT-59.VII zeigte zwar eine 100%ige Homologie zu genomischer DNA auf Chromosom 17p13.3 (AF258545.2; s. **Abb. 4-8**), war aber zu keiner der eingetragenen cDNA-Sequenzen der GenBank oder SEREX-Datenbank homolog. Daten zur Expression dieses Gens finden sich bisher in der Literatur nicht.

Es wurden zwei ORF detektiert, von denen der kürzere, erste 26 AS und der längere, zweite 56 AS, also außerordentlich kurze putative Antigene kodierte.

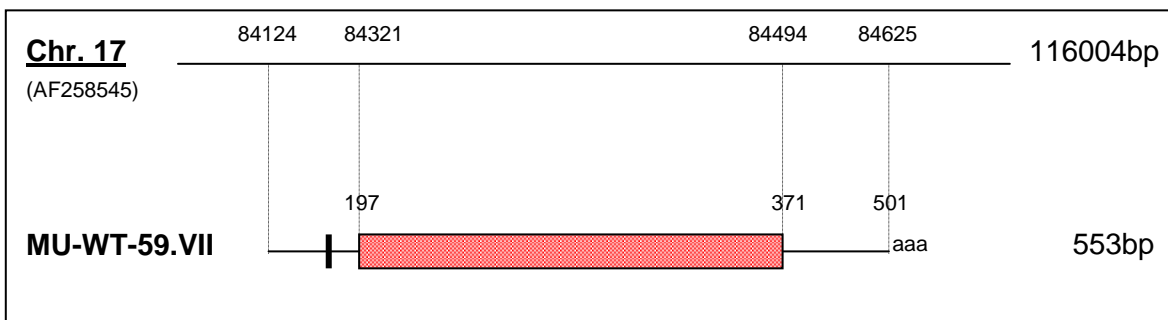


Abb. 4-8 Homologie von MU-WT-59.VII zu genomischer DNA (AF258545.2).

MU-WT-59.VII wurde von p92 kodiert. Die vorhergesagten ORF lagen bei bp 180-264 (26 AS) und bp 197-371 (56 AS) (roter Kasten); letzterer wurde von einem stromaufwärts gelegenen Stopkodon (dicker, vertikaler Balken) flankiert. Der am stromaufwärts gelegenen Vektor-ATG initiierte ORF wurde bei bp 2 terminiert. Von den beiden putativen ORF zeigte der kürzere eine bessere Kozak-Sequenz im Bereich des Startkodons (GTTCATATGG versus AATTATATGG).

Das putative Antigen **Mu-WT-59.VIII** war identisch mit **NM23B**.

Die **MU-WT-59.VIII**-cDNAs waren 100% homolog zur NM23B-cDNA (NM_002512.1; s. **Abb. 4-9**). In der SEREX-Datenbank fanden sich cDNA-Homologien zu den Antigenen Hom-Gliom-GT 3 aus Gliomgewebe (ID 212) und NW-F 102a aus der Kolonkarzinomzelllinie MZ-Co 1 (ID 2047). Das NM23B-kodierende Gen *NME2* liegt auf Chromosom 17q21-22 (Kelsell et al., 1993) und wird in verschiedenen adulten und malignen Geweben exprimiert, darunter auch normale Niere und Nierentumoren einschließlich WT (UniGene hs.463456). Durch Northern-Blot-Untersuchungen konnte die Expression von NM23B-mRNA in fast allen normalen Geweben und in verschiedenen Tumoren nachgewiesen werden (Schmits et al., 2002).

NM23B (Synonyme: nm23-H2, NME2) ist eine Untereinheit der heterodimeren NDP-Kinasen nm23, die an der Synthese von Nukleosidtriphosphaten beteiligt sind. Zudem wurde es als Transkriptionsfaktor PuF identifiziert, der unter anderem die Aktivität des Protoonkogens *c-myc* positiv reguliert (Postel et al., 1993). C-MYC spielt eine Rolle bei der Zellproliferation und -differenzierung sowie bei der Tumorentstehung.

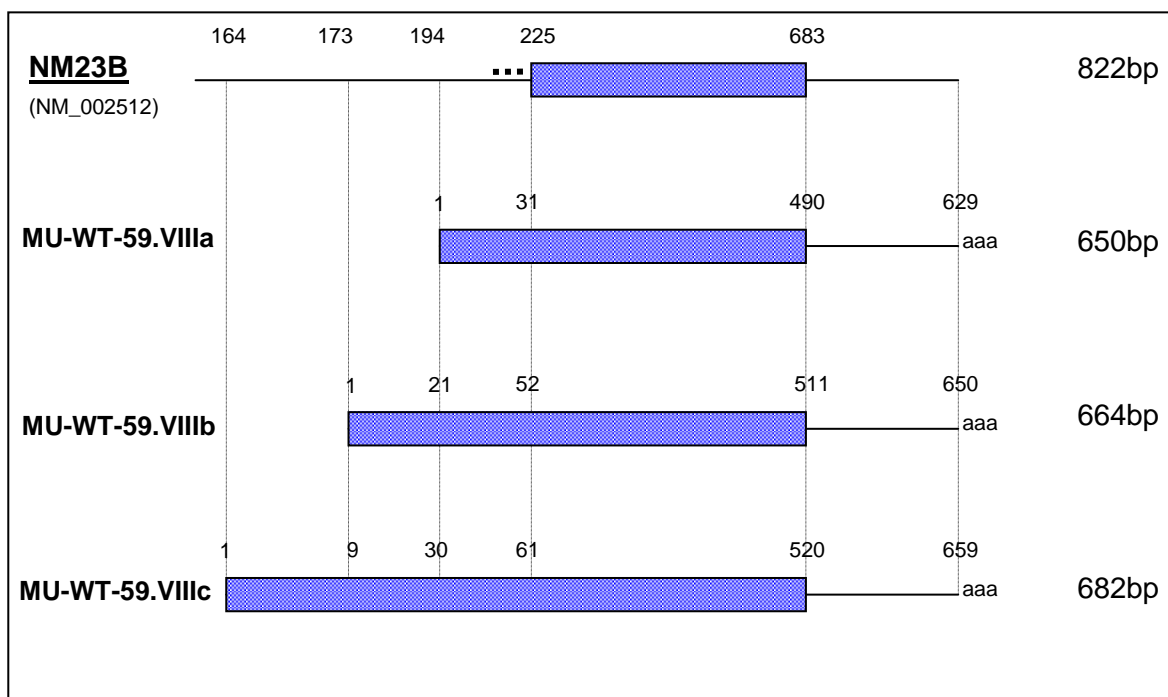


Abb. 4-9 cDNA-Homologie von MU-WT-59.VIII zu NM23B (NM_002512.1).

MU-WT-59.VIII wurde von p98 (a), p117.4 (b) und p216 (c) kodiert. Der NM23B-ORF war für bp 225-683 angegeben und stromaufwärts nicht von einem *in frame* gelegenen Stopkodon flankiert, so dass der N-Terminus des Proteins *in vivo* noch nicht sicher definiert ist. Der korrespondierende ORF könnte im Bakterium vom stromaufwärts *in frame* gelegenen Vektor-ATG aller Plasmide abgelesen worden sein.

Das putative Antigen **Mu-WT-59.IX** war identisch mit **NARG2**.

Die cDNA des Tumorantigens MU-WT-59.IX zeigte eine 100%ige Homologie zu der cDNA der längeren Transkriptionsvariante 1 des *NMDA receptor regulated 2* (NARG2; NM_024611.4; s. **Abb. 4-10**). In der SEREX-Datenbank fand sich kein Homolog.

Das NARG2-Gen liegt auf Chromosom 15q22.2 und wird in verschiedenen gesunden und malignen Geweben einschließlich WT nachgewiesen (UniGene hs.200943). Mittels Northern-Blot-Analysen war eine signifikante Expression von NARG2-mRNA in fetalem Lungen-, Nieren-, Leber- und Gehirn- sowie in adultem Hodengewebe nachgewiesen worden. In adultem Leber-, Nieren-, Gehirn- und anderen Geweben konnte keine oder nur eine geringe Expression festgestellt werden (Sugiura et al., 2004).

Die genaue Funktion von NARG2 ist bislang nicht bekannt. Die exzitatorische Aminosäure Glutamat ist das Substrat des N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptors (NMDAR), der bei der neuronalen Entwicklung und Reizweiterleitung eine Rolle spielt. Durch Aktivierung des NMDAR1 wird die Expression der NARG1-3 mRNA unterdrückt. Im Tierversuch mit NMDAR1-*knock-out*-Mäusen kam es zu einer letalen Überexpression der Transkripte NARG1-3 (Sugiura et al., 2001).

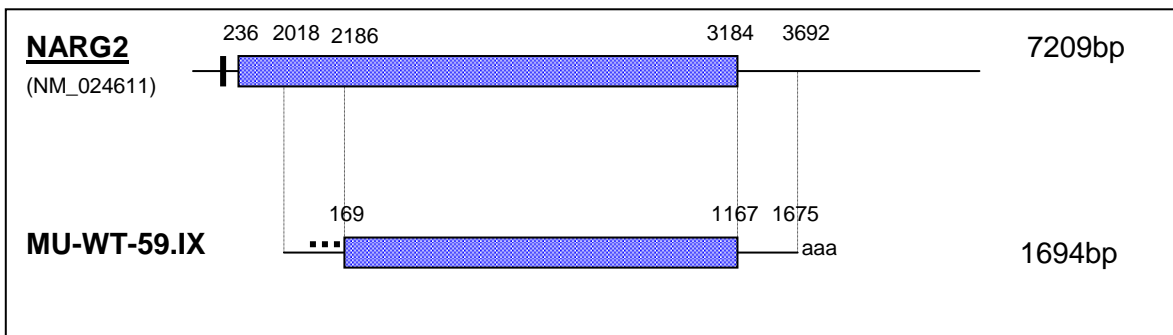


Abb. 4-10 cDNA-Homologie von MU-WT-59.IX zu NARG2 (NM_024611.1).

Mu-WT-59.IX wurde von p110 kodiert. Der NARG2-ORF war für bp 236-3184 angegeben, wurde stromaufwärts von einem *in frame* gelegenen Stopkodon flankiert und war am 5' Ende nicht komplett im klonierten Plasmid enthalten. Der vom stromaufwärts gelegenen Vektor-ATG abgelesene ORF wurde bei bp 16 terminiert, so dass das putative Antigen im Bakterium wahrscheinlich von einem alternativen, stromabwärts gelegenen Startkodon aus abgelesen worden war (z.B. ATG bei bp 169). Daneben fanden sich fünf alternative, kleinere ORF: bp 2656-2724 (23 AS), bp 2869-2964 (32 AS), bp 2998-3180 (61 AS), bp 3315-3383 (23 AS) und bp 3521-3589 (23 AS).

Das N-terminal inkomplette, putative Antigen **Mu-WT-59.X** war 100% homolog zu **DHX38**.

Die 5' inkompletten MU-WT-59.X-cDNAs waren 100% homolog zur cDNA des *DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 38* (DHX38; NM_014003.3; s. **Abb. 4-11**), welches mit dem pre-mRNA Spleißfaktor hPrp16 identisch ist. In der SEREX-Datenbank fand sich eine cDNA-Homologie zu dem Antigen NGO-Br-2 (ID 802) aus Mammakarzinomgewebe.

Das DHX38-Gen ist auf Chromosom 16q21-q22.3 lokalisiert und wird in verschiedenen gesunden und malignen Geweben, darunter auch Nierenzellkarzinom, exprimiert. Besonders hoch ist die Expression in normalem Mamma- und Lungengewebe (UniGene hs.570079). Weitere Daten zur Expression des Gens fanden sich in der Literatur nicht.

DHX38/Prp16 ist zusammen mit anderen Spleißfaktoren am zweiten katalytischen Schritt des Spleißvorgangs beteiligt ist (Zhou and Reed, 1998). Es gehört zur Familie der DEAD/H-Box Proteine, die durch das konservierte Motiv Asp-Glu-Ala-Asp/His (DEAD/H) charakterisiert sind und wahrscheinlich als RNA-Helikasen wirken. DEAD-Box-Proteine sind in die Veränderung der RNA-Sekundärstruktur, wie z.B. Initiation der Translation, nukleäres und mitochondriales Spleißen und die Ansammlung von Ribosomen und Spleißomen involviert. Einige dieser Proteine sind an Embryogenese, Spermatogenese, Zellwachstum und -teilung beteiligt (Wang and Guthrie, 1998).

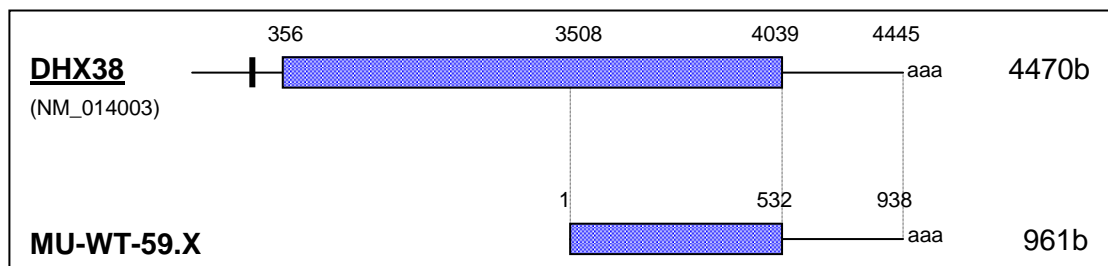


Abb. 4-11 cDNA-Homologie von MU-WT-59.X zu DHX38 (NM_014003.2).

MU-WT-59.X wurde von den zwei 5'-identischen Plasmiden (p105.1 und p105.2) kodiert; gezeigt ist stellvertretend das cDNA-Insert von p105.2. Der ORF ist für bp 356-4039 angegeben und stromaufwärts von einem *in frame* gelegenen Stopkodon (dicker, vertikaler Balken) flankiert. Der korrespondierende ORF in den klonierten Plasmiden war 5' inkomplett und könnte im Bakterium vom stromaufwärts *in frame* gelegenen Vektor-ATG aus abgelesen worden sein (bp 1-532). Es gab zwei alternative ORF: bp 4062-4103 (15 AS) und bp 4218-4307 (30 AS).

Das N-terminal inkomplette, putative Antigen *Mu-WT-59.XI* zeigte gegenüber dem klassischen *MYH8* an acht Aminosäurepositionen bekannte Polymorphismen

Die MU-WT-59.XI-cDNAs waren im sequenzierten Abschnitt bis auf elf bekannte *SNPs* homolog zur cDNA einer Isoform der *myosin heavy chain* (MYH8, gtMHC-F; NM_002472.1), die aus fetalem Skelettmuskel gewonnen worden war (s. **Abb. 4.12**).

Das *MYH8*-Gen war auf Chromosom 17p13.1 lokalisiert und in gesunden Geweben (Niere, Prostata, Herz) sowie Nierentumoren nachgewiesen worden (UniGene hs.534028). Eine Expressionsanalyse mit Hilfe von Northern-Blot-Hybridisierungen hatte ergeben, dass *MYH8*/gtMHC-F in fetalen Skelettmuskelzellen hoch, in adulten Skelettmuskelzellen niedrig und in Herzmuskel sowie Lebergewebe nicht exprimiert wird (Bober et al., 1990; Feghali and Leinwand, 1989).

Vom Myosin existieren mindestens zehn Isoformen, die von unterschiedlichen Genen kodiert werden und in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium und Muskeltyp exprimiert werden (s. S. 53 MU-WT-59.I). *MYH8* gilt als perinatale Form des Myosins, die vor allem während der Entwicklung des Skelettmuskels exprimiert wird, in bestimmten Muskeln persistiert und bei der Regeneration von Muskelverletzungen reexprimiert wird (Weiss et al., 1999).

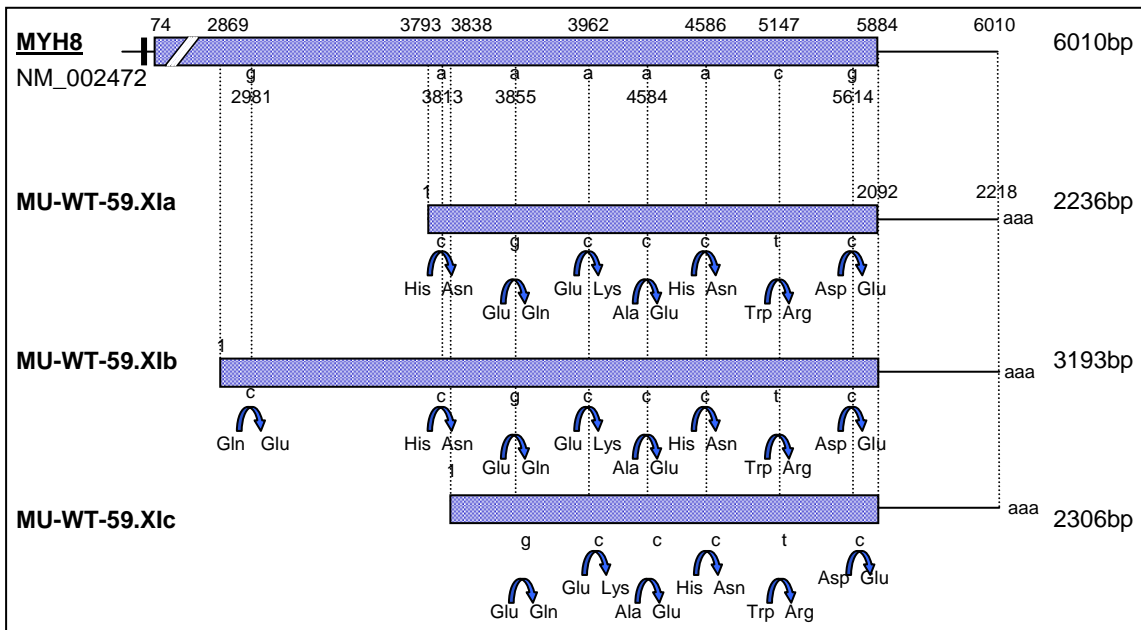


Abb. 4-12 cDNA-Homologien von MU-WT-59.XI zu MYH8 (NM_002472).

MU-WT-59.XI wurde von den Plasmiden p59.1 (a), p114 (b) und p203 (c) kodiert. Der MYH8-ORF war für bp 74-5887 angegeben (NM_002472) und stromaufwärts durch ein *in frame* gelegenes Stopkodon (dicker, vertikaler Balken) flankiert. Der korrespondierende ORF war in allen Plasmide 5' inkomplett und könnte im Bakterium vom stromaufwärts *in frame* gelegenen Vektor-ATG abgelesen worden sein. Innerhalb dieses ORF fanden sich drei konservative und acht nicht-konservative, bekannte SNPs: bp 2981 (c→g; Gln→Glu), bp 3344 (t→c; Ile), bp 3811 (a→c; Gly), bp 3813 (c→a; His→Asn), bp 3855 (g→a; Glu→Gly), bp 3962 (c→a; Gln→Lys), bp 4584 (c→a; Ala→Glu), bp 4586 (c→a; His→Asn), bp 5147 (t→c; Trp→Arg), bp 5281 (c→t; Asp), bp 5613 (c→g; Asp→Glu). Die nicht-konservativen SNPs wurden eingezeichnet (blaue Pfeile).

Das N-terminal inkomplette, putative Antigen *Mu-WT-59.XII* war 100% homolog zu *DACH1*.

Die MU-WT-59.XII-cDNA war im sequenzierten Abschnitt 100% homolog zur cDNA der Isoform a (Transkriptionsvariante 1) des *dachshund homolog* (*Drosophila*) (*DACH1*; NM_080759.3; s. **Abb. 4-13**). In der SEREX-Datenbank lagen keine Homologien vor.

Das *DACH*-Gen war auf Chromosom 13q21-22 lokalisiert (Hammond et al., 1999; Kozmik and Cvekl, 1999) und in verschiedenen gesunden Geweben, einschließlich Niere, sowie malignen Geweben, darunter auch WT, nachgewiesen worden (UniGene hs.129452). Northern Blot Analysen zeigten eine verstärkte Expression in Niere, Herz und Plazenta sowie eine geringere Expression in Gehirn, Skelettmuskel, Lunge und Pankreas (Kozmik et al., 1999). Es sind vier verschiedene Spleißvarianten des *DACH* beschrieben, die für unterschiedliche Isoformen kodieren. Die Variante 1 ist das vorherrschende Transkript und kodiert für die Isoform A, sie ist die längste Form (NCBI, Nucleotide, NM_080759.3).

DACH ist ein für das Zellschicksal in Auge, Bein und Nervensystem der Fliege wichtiger Kernfaktor. Es ist ein Mitglied der Familie der *Ski*-Protoonkogene und vermutlich in die Entwicklung des Auges involviert (Ayres et al., 2001).

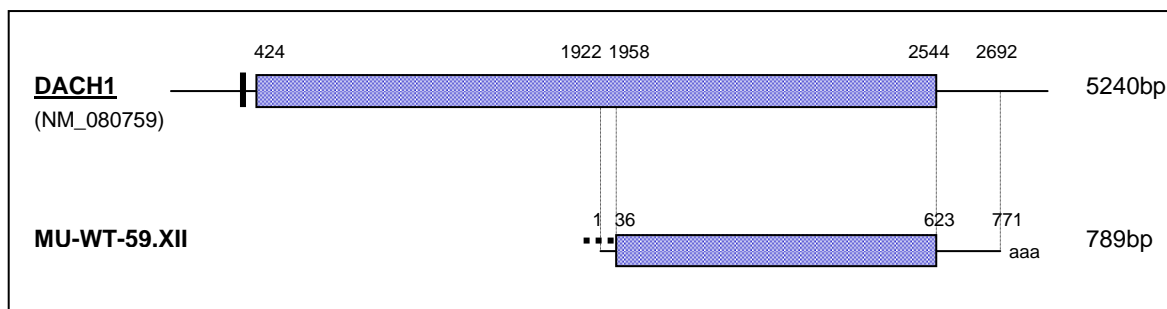


Abb. 4-13 cDNA-Homologie von MU-WT-59.XII zu DACH1 (NM_080759.1).

MU-WT-59.XII wurde von p117.1 kodiert. Der DACH1-ORF läuft von bp 424 bis 2544 (NM_080759.1) und ist stromaufwärts von einem *in frame* gelegenen Stopkodon flankiert. Der korrespondierende ORF des klonierten Plasmids wurde möglicherweise ab dem ATG an Position 36 (bp 36) abgelesen, er wurde stromaufwärts nicht von einem *in frame* gelegenen Stopkodon flankiert. Der vom Vektor-ATG ausgehende ORF wurde bei bp 34 durch ein Stopkodon beendet. Es gibt zwei alternative ORF: bp 1953-2051 (33 AS) und 2058-2135 (26 AS).

Das N-terminal inkomplette, putative Antigen **Mu-WT-59.XIII** war 100% homolog zu **SSRP1**.

Die cDNA des Tumorantigens MU-WT-59.XIII war bis auf ein inkomplettes 5' Ende mit der cDNAs des *structure specific recognition protein 1* (SSRP1; NM_003146.2) identisch (s. **Abb. 4-14**). In der SEREX-Datenbank fanden sich Homologien zu NGO-St-119 (ID 1330) aus Magenkarzinom- und zu NY-Co-19 (ID 28) aus Kolonkarzinomgewebe. Es fanden sich zehn alternative ORF mit einer Länge von 21-72 AS.

Das *SSRP1*-Gen liegt auf Chromosom 11q12 und wird ubiquitär exprimiert. Es wurde auch in normaler Niere, WT und Nierenzell-Karzinom nachgewiesen (UniGene hs.523680). Northern Blot Analysen konnte die Expression von SSRP1 in verschiedenen Normalgeweben vom Pavian sowie in humanen Blasen- und Hodenkrebszelllinien nachweisen (Bruhn et al., 1992).

SSRP1 bildet eine Untereinheit des Heterodimers FACT (*facilitates chromatin transcription*) (Orphanides et al., 1999), einem Chromatin-spezifischen Elongationsfaktor, ohne den die RNA-Polymerase II proximal des Promoters und somit auch die Transkription blockiert wäre. FACT interagiert spezifisch mit den Histonen H2A/H2B, um das Auseinanderdriften der Nukleosomen (*nucleosome disassembly*) und die Elongation der Transkription zu erreichen.

Das putative Antigen **Mu-WT-59.XIV** war 100% homolog zu **RPL30**.

Die **MU-WT-59.XIV**-cDNA zeigte eine 100%ige Homologie zu der am 5' Ende etwas kürzeren cDNA des *ribosomal protein L30* (RPL30; NM_000989.2; s. **Abb. 4-15**). In der SEREX-Datenbank fand sich eine Homologie zu NW-F 130 (ID 2048) aus der Kolonkarzinom-Zelllinie MZ-Co 1.

Das Gen RPL30 liegt auf Chromosom 8q22 (Feo et al., 1992) und wird ubiquitär exprimiert, auch in normaler Niere und Nierentumorgewebe (UniGene hs.400295). Eine Expression in WT ist in der Literatur jedoch nicht beschrieben.

RPL30 gehört als Bestandteil der 60S Untereinheit zur L30E-Familie der ribosomalen Proteine (NM_000989; Stand 24.09.2007). Die ribosomalen Proteine katalysieren die Proteinsynthese und bestehen aus einer kleinen 40S und einer großen 60S Untereinheit. Gemeinsam sind diese

Untereinheiten aus ca. 80 strukturell verschiedenen Proteinen zusammengesetzt, die von vier Genen kodiert werden.

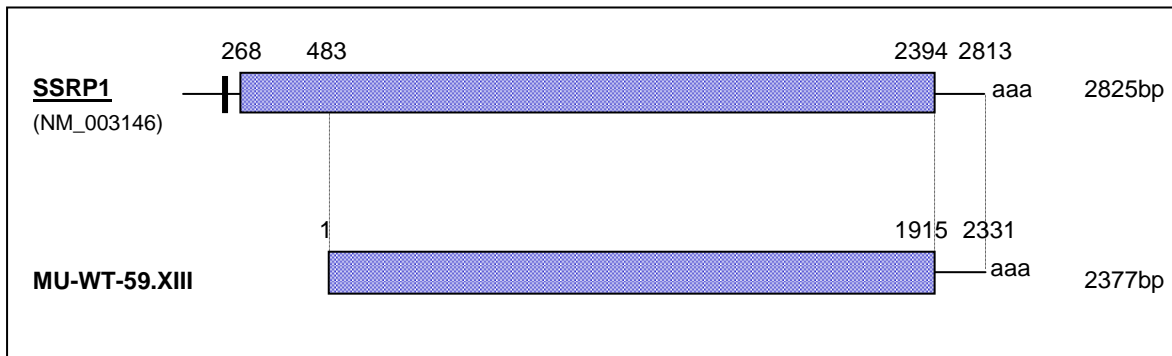


Abb. 4-14 c-DNA-Homologie von MU-WT-59.XIII zu SSRP1 (NM_003146.2)

MU-WT-59.XIII wurde von p117.3 kodiert. Der SSRP1-ORF ist für bp 268-2394 (NM_003146.2) angegeben, stromaufwärts ist er von einem *in frame* gelegenen Stopkodon (kurzer schwarzer, vertikaler Balken) flankiert. Der korrespondierende ORF in p117.3 (bp 1-1915) wurde im Bakterium möglicherweise vom stromaufwärts *in frame* gelegenen Vektor-ATG aus abgelesen. Es fanden sich neun kleine, alternative ORF: bp 492-560 (23 AS), bp 729-842 (38 AS), bp 909-597 (43 AS), bp 1383-1559 (59 AS), bp 1665-1883 (73 AS), bp 1902-2102 (67 AS), bp 2274-2348 (25 AS), bp 2391-2697 (69 AS) und bp 2584-2676 (31 AS).

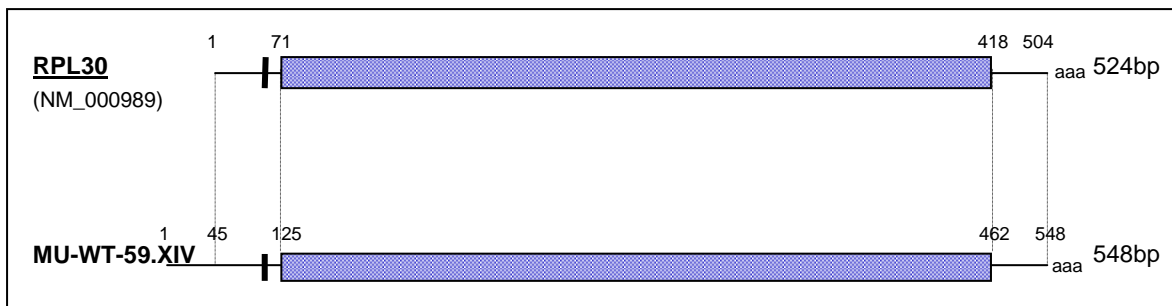


Abb. 4-15 cDNA-Homologie von MU-WT-59.XIV zu RPL 30 (NM_000989.2).

MU-WT-59.XIV wurde von p118 kodiert. Der RPL30-ORF ist für bp 71-418 (NM_000989.2) angegeben und wird wie der korrespondierende ORF in p118 stromaufwärts von einem *in frame* gelegenen Stopkodon (kurzer schwarzer, vertikaler Balken) flankiert. Der vom Vektor-ATG ausgehende ORF wird bei bp 181 beendet. Es gibt einen alternativen ORF: bp 258-455 (66 AS).

Das N-terminal inkomplette, putative Antigen **Mu-WT-59.XV** war 100% homolog zu **RPL13**.

Die 5' inkomplette **MU-WT-59.XV**-cDNA zeigte eine 100%ige Homologie zu der cDNA des *ribosomal protein L13* (RPL13; NM_000977.2; s. **Abb. 4-16**). In der SEREX-Datenbank fand sich kein cDNA-Homolog.

Das *RPL13*-Gen ist auf Chromosom 16q24.3 lokalisiert (Kenmochi et al., 1998) und wird ubiquitär exprimiert, auch in normaler Niere, WT und anderen Nierentumoren (UniGene hs.410817).

RPL13 gehört wie RPL30 zur 60S Untereinheit ribosomaler Proteine (s. S. 65 RPL30).

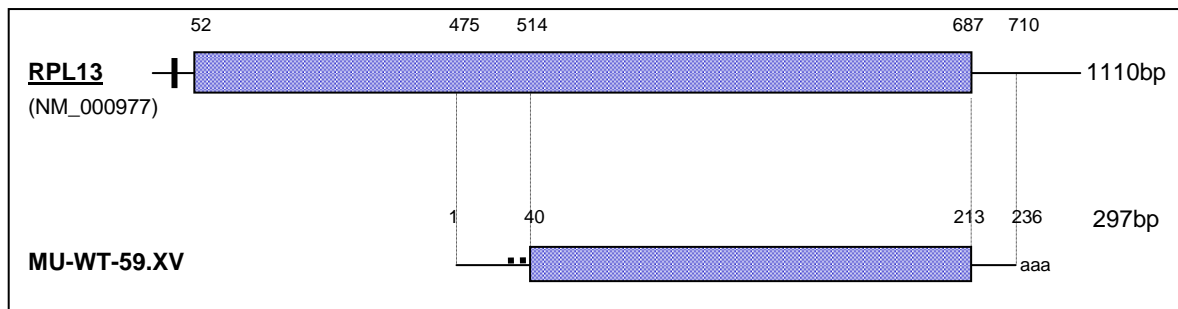


Abb. 4-16 cDNA-Homologien von MU-WT-59.XV zu RPL13 (NM_000977.2)

MU-WT-59.XV wurde von p131.1 kodiert. Der RPL13-ORF ist für bp 52-687 (NM_000977.2) angegeben und stromaufwärts von einem *in frame* gelegenen Stopkodon (kurzer schwarzer, vertikaler Balken) flankiert. Der korrespondierende ORF in p131.1 lag nicht mit dem stromaufwärts gelegenen Vektor-ATG *in frame* und wurde deshalb im Bakterium wahrscheinlich vom stromabwärts nächstgelegenen Startkodon aus abgelesen (z.B. ATG, bp 40). Der vom Vektor-ATG ausgehende ORF wurde bei bp 10 durch ein Stopkodon beendet. Es gab keine alternativen ORF.

Die N-terminal inkompletten, putativen Antigene der Familie **Mu-WT-59.XVI** waren wahrscheinlich Spleißvarianten von **Nebulin**.

Die 5' inkomplette Familie der MU-WT-59.XVI-cDNAs unterschied sich von der Nebulin (NEB)-cDNA aus Skelettmuskel (NM_004543; s. **Abb. 4-17**) durch zahlreiche Basenaustausche und Deletionen, die wahrscheinlich durch alternatives Spleißen generiert wurden. Laut SEREX-Datenbank wurde Nebulin bisher noch nicht mit SEREX identifiziert.

Das *NEB*-Gen liegt auf Chromosom 2q22 in der NEM2 Region und wird in diversen gesunden und malignen Geweben nachgewiesen (UniGene hs.555882). Die Expression ist anscheinend nicht muskelspezifisch, da Joo und Kollegen Nebulin durch RT-PCR Analysen in Gehirn-, Herz-, Magen- und Lebergewebe eines Hühnerembryos nachweisen konnten (Joo et al., 2004). Eine Expression in WT ist in der Literatur nicht beschrieben.

Nebulin ist ein sehr großes Strukturprotein des Muskels (≈ 800 kDa), das mit dem C-Terminus in der Z-Scheibe des Sarkomers verankert ist und dort die Länge und Architektur der dünnen Filamente reguliert (Wang et al., 1996). Seine Größe variiert abhängig von Gewebeart, Spezies und Entwicklungsstadium (Stedman et al., 1988).

Das N-terminal inkomplette, putative Antigen **Mu-WT-59.XVII** war homolog zu **IQWD1**.

Die **MU-WT-59.XVII**-cDNAs zeigten im sequenzierten Abschnitt eine 100%ige Homologie zu den cDNAs der Transkriptionsvarianten 1 (NM_018442) und 2 (NM_001017977) des *IQ motif and WD repeats 1* (IQWD1). Der Transkriptionsvariante 2 fehlt im Vergleich zur Variante 1 ein *in-frame* gelegenes Exon (Exon 12, 60bp; s. **Abb. 4-18**). Synonym verwendete Namen sind *human nuclear receptor interaction protein* (NRIP), MSTP055, PC326 und andere. Unter den durch SEREX identifizierten Antigenen fand sich eine Homologie zu HOM-TSMa4-9 (ID 742) und zu dem als Tumorantigen klassifizierten HOM-TEs-95 (AF124434.1) aus Hodengewebe.

Das *IQWD1*-Gen liegt auf Chromosom 1q24.23 und wird ubiquitär exprimiert (UniGene hs.435741). Eine Expression in WT ist in der Literatur nicht beschrieben. Tsai et al. fanden in ihren Untersuchungen Hinweise, dass das NRIP als Liganden-abhängiger Koaktivator von Steroidrezeptoren (Androgen- und Glukokortikoidrezeptoren) agiert (Tsai et al., 2005).

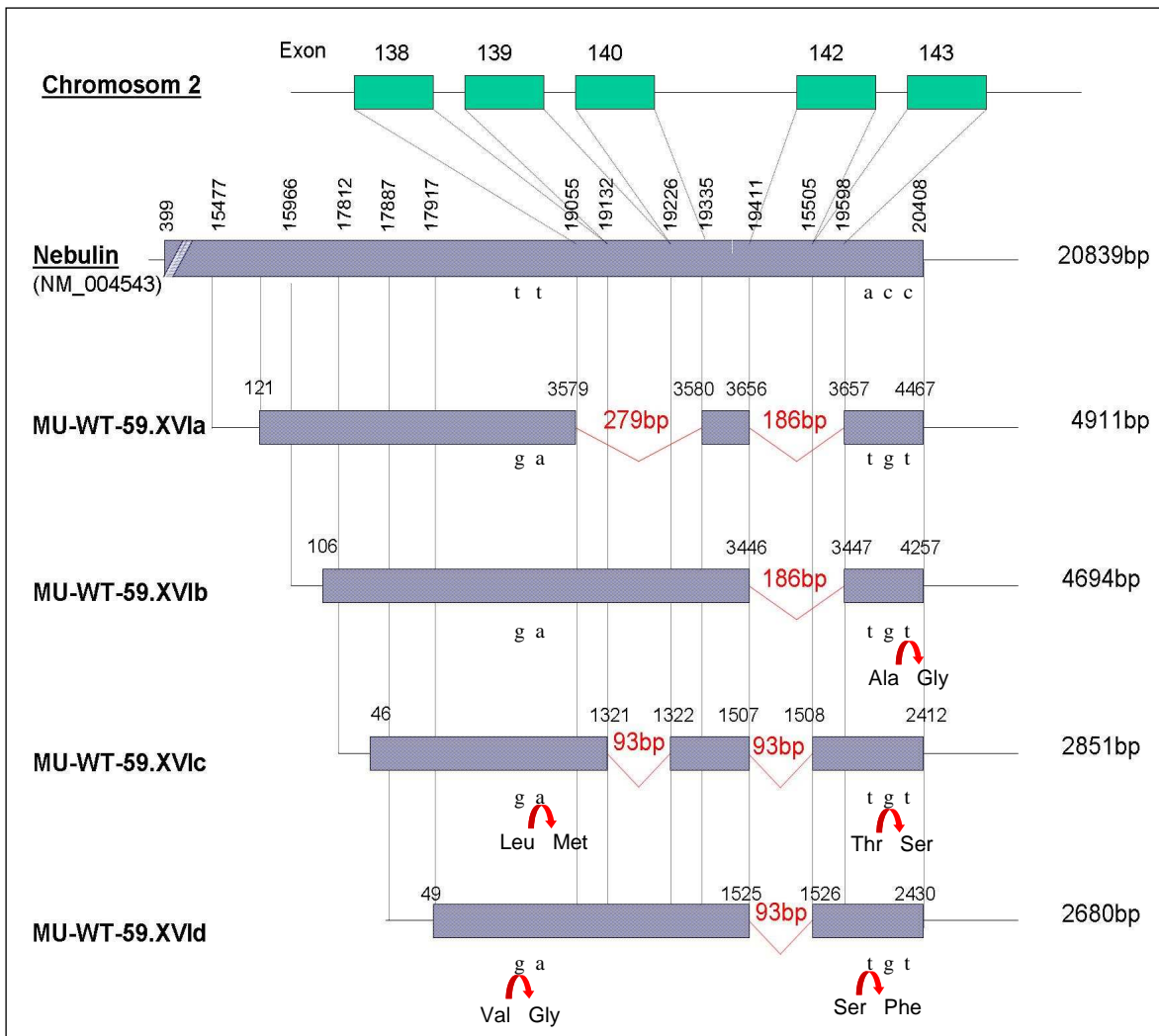


Abb. 4-17 cDNA-Homologie von MU-WT-59.XVI zu Nebulin (NM_004543).

MU-WT-59.XVI wurde von p49, p52.1, p64.1, p64.2, p94.1, p113, p115.2, p121, p141.1 und p158.1 kodiert. Der ORF des Nebulin (NM_004543) ist für bp 399-20408 angegeben. Der korrespondierende ORF aller Plasmide wurde in keinem Plasmid stromabwärts durch ein Stopkodon flankiert. Die vom Vektor-ATG ausgehenden ORF wurden in allen Plasmiden nach maximal 88 Basen durch ein Stopkodon beendet. Es lagen vier verschiedene Spleißvarianten vor, die entsprechenden fehlenden Exons sind in der Grafik eingetragen. Es fanden sich außerdem 14 alternative ORF, von denen der längste 89 AS entsprach. Im translatierten Bereich fanden sich fünf neue nicht-konservative Basenaustausche (SNP): bp 18590 (t→g; Val→Gly), bp 19042 (t→a; Leu→Met), bp 20225(c→t; Ser→Phe), bp 20228 (c→g; Thr→Ser) und bp 20231 (c→t; Ala→Gly). Vier weitere neue SNP lagen im 3' untranslatierten Bereich vor.

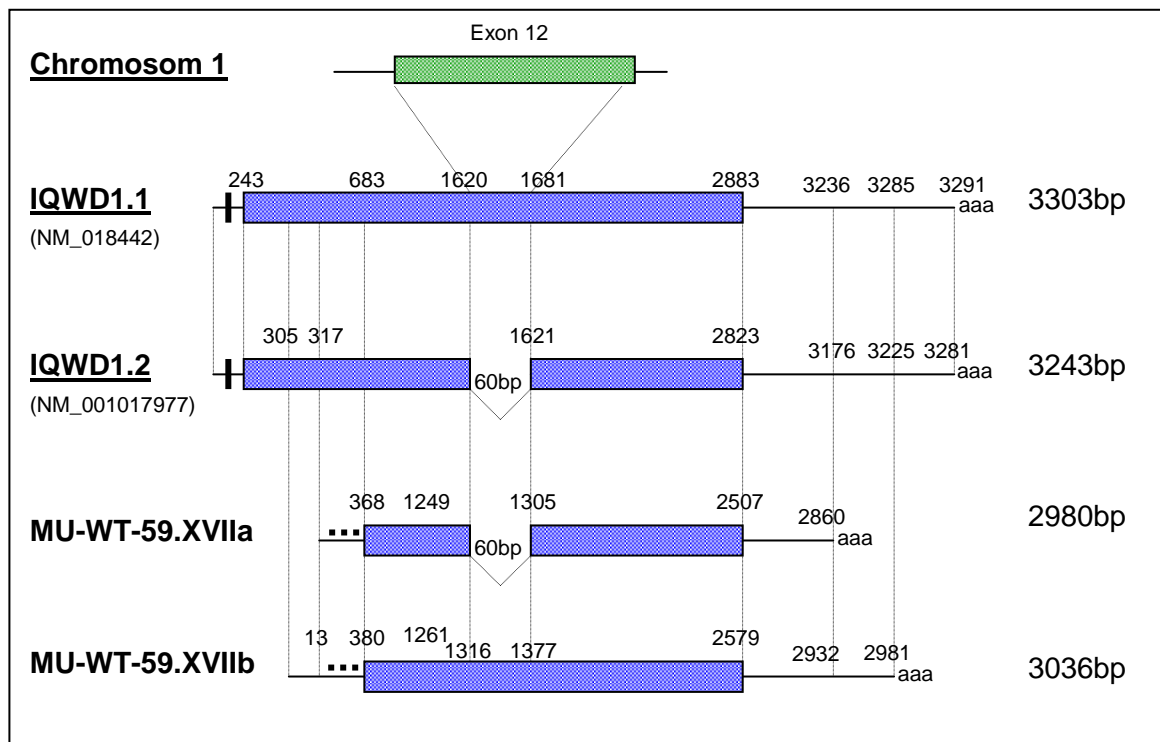


Abb. 4-18 cDNA-Homologien von MU-WT-59.XVII zu IQWD1, Transkriptionsvariante 1 und 2 (NM_018442, NM_001017977).

MU-WT-59.XVII wurde von p163.2 (a) und p173.2 (b) kodiert. Der IQWD1-ORF ist für bp 243-2883 angegeben und wird stromaufwärts von einem *in frame* gelegenen Stopkodon (kurzer schwarzer, vertikaler Balken) flankiert. Der korrespondierende ORF von MU-WT-59.XVII wurde im Bakterium wahrscheinlich vom ATG bei bp 368 in p163.2 bzw. bp 380 in p173.2 aus abgelesen, die stromaufwärts nicht von einem Stopkodon flankiert waren. Der vom Vektor-ATG ausgehende ORF wurde bei bp 62 (p173.2) und bp 40 (p163.2) beendet. Es gab sieben alternative ORF: bp 81-164 (28 AS), bp 393-500 (36 AS), bp 594-707 (38 AS), bp 729-869 (47 AS), bp 1752-1988 (79 AS), bp 2678-2788 (37 AS) und bp 2853-2960 (36 AS). Ein Basenaustausch in der p163.2-cDNA an Position 1249 (c→t; Asp) führt zu keiner Änderung der AS-Sequenz. Es lagen zwei Spleißvarianten vor, das entsprechende Exon 12 ist in der Grafik eingetragen (grün).

Das N-terminal inkomplette, putative Antigen *Mu-WT-59.XVIII* war eine Spleißvariante des *GCC2*.

Die **MU-WT-59.XVIII**-cDNA war homolog zur cDNA der Transkriptionsvariante 2 des *GRIP coiled-coil protein* (*GCC2*; NM_014635.3) aus Gehirn (s. **Abb. 4.19**). Die ersten 217 bp der MU-WT-59.XVIII cDNA waren 100% homolog zur genomischen Sequenz auf Chromosom 2 (AC012487.12), die bei *GCC2* heraus gespleißt worden war. Ebenso verhielt es sich mit den Sequenzabschnitten bp 2685-3396 und bp 3467-3880. Das alternative 3'Ende enthielt nach 14bp ein Stopkodon, so dass das MU-WT-59.XVIII-Antigen durch einen kurzen alternativen C-Terminus charakterisiert war. Zusätzlich fanden sich Homologien zu den cDNAs der SEREX-Antigene *CTCL sel-1* cDNA (AF273042.1; ID2017) aus Hodengewebe, NGO-St-38 (ID 261) aus Magengewebe, NGO-Pr-1 (ID 594) aus Prostatakarzinomgewebe sowie des *CLL-associated antigen KW-11* (AF432211.1). Die Spleißvariante aus WT-Gewebe war neu.

Das *GCC2*-Gen liegt auf Chromosom 2q12.3 und wird in adulten Geweben ubiquitär exprimiert (Eichmüller et al., 2001). Es gibt in der Literatur keine Daten über die Expression von *GCC2* in WT.

GCC2 ist ein Membranprotein des trans-Golgiapparates, dessen Funktion noch nicht geklärt ist. Das Protein enthält eine GRIP-Domäne, die wahrscheinlich als Zielstruktur für Vesikel dient (Luke et al., 2003).

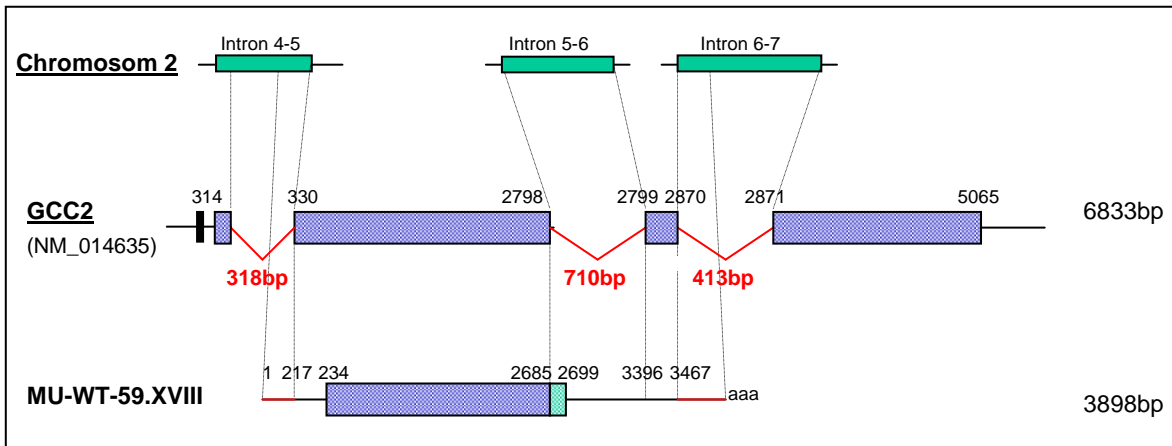


Abb. 4-19 Homologien der MU-WT-59.XVIII-cDNA zur cDNA des *GCC2* (NM_014635.3).

MU-WT-59.XVIII wurde p174.2 und p278 kodiert. Der *GCC2*-ORF ist für bp 314-5065 angegeben (NM_014635.3) und stromaufwärts von einem *in frame* gelegenen Stopkodon flankiert. Der korrespondierende ORF in den MU-WT-59.XVIII cDNAs war aufgrund alternativen Spleißens different. An drei Positionen lagen Insertionen von Introns vor (Intron 4-5, bp 1-217; Intron 5-6, bp 2685-3396 und Intron 6-7, bp 3467-3880). Durch die Insertion des Introns 5-6 kam es zu einem *frameshift* des MU-WT-59.XVIII-ORF und zu einer vorzeitigen Termination (grüner Kasten). Die zu den differenten cDNA-Abschnitten korrespondierenden Introns wurden in der genomischen DNA markiert. Der vom Vektor-ATG ausgehende ORF wurde bei bp 191 beendet. Es gab neun alternative ORF: bp 433-513 (27 AS), 526-630 (35 AS), 1447-1509 (21 AS), 2137-2277 (47 AS), 2916-2990 (25 AS), 2977-3102 (42 AS), 3302-3394 (31 AS), 3474-3545 (26 AS), 3798-3866 (23 AS). Die Inserts von p174.2 und p278 sind bei identischen 5' Ende höchstwahrscheinlich Amplifikate derselben Primär-cDNA, so dass lediglich eine der beiden cDNAs komplett sequenziert wurde.

Das putative Antigen *Mu-WT-59.XIX* war identisch mit *FLJ32476/ROCK1*.

Die MU-WT-59.XIX-cDNA war im sequenzierten Abschnitt bis auf die Insertion einer Base 100% homolog zu der cDNA der *Rho associated, coiled-coil containing protein kinase p160^{ROCK}* (ROCK1; NM_005406.1), die sich von der cDNA des hypothetischen Proteins FLJ32476 fis (AK057038.1) durch ein längeres 3'- und kürzeres 5'-Ende sowie einzelne Basenaustausche unterschied. Aufgrund der oben genannten Insertion wies MU-WT-59.XIX einen kürzeren ORF auf (s. **Abb. 4-19**). In der SEREX-Datenbank fand sich eine Homologie zu NY-REN-35 (ID 444) aus Nierenkarzinom.

Das *ROCK1*-Gen liegt auf Chromosom 18q11.1 und wird in verschiedenen gesunden Geweben, einschließlich Niere, und malignen Geweben, einschließlich Nierenkarzinom, exprimiert (UniGene hs.306307). *ROCK1* wurde durch *immunoblotting* und Immunhistochemie in 18 von 21

Pankreaskarzinom-Gewebe nachgewiesen (85,7%), nicht jedoch in normalem Pankreasgewebe (Kaneko et al., 2002). Eine Expression in WT wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben. ROCK1 (ROK β) ist eine Serin/Threonin-Proteinkinase, die durch Bindung an die GTP-gebundene Form der kleinen GTPase Rho aktiviert wird und so die Rho-vermittelte Zytokinese, Kontraktion der glatten Muskelzellen, Bildung von Aktinfilamenten, fokale Zelladhäsion und Aktivierung des *c-fos serum response element* reguliert. ROCK1 greift außerdem durch Phosphorylierung und Inhibition der *myosin light chain (MLC) phosphatase* in die Muskelkontraktion ein. Therapeutisch wird dieser zweite Signalweg zur Behandlung zerebraler Vasospasmen durch Inhibition der kleinen GTPase Rho unterbrochen (Maekawa et al., 1999).

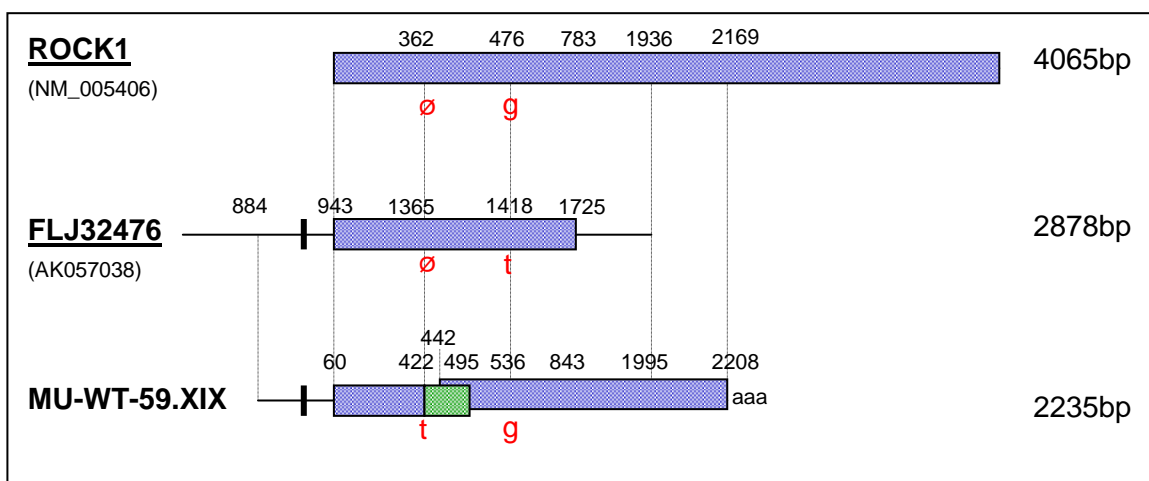


Abb. 4-20 cDNA-Homologie von MU-WT-59.XIX zu ROCK1 (NM_005406.1) und FLJ32476 (AK057038.1).

MU-WT-59.XIX wurde von p176.1 kodiert. Der 5' ROCK1-ORF ist von bp 1-4065 (ATG bei bp1, TAA bei bp 4065) angegeben (NM_005406.1). Der korrespondierende ORF der FLJ32476-cDNA (ATG bei bp 943) wurde durch den Austausch von Guanin durch Alanin an Position bp 1725 vorzeitig beendet. Der korrespondierende ORF (ATG bei bp 60) von MU-WT-59.XIX zeigte durch die Insertion einer Base bei bp 422 einen *frameshift* (grün markiert), der zu einem vorzeitigen Stop bei bp 495 führte. Beide ORF wurden stromaufwärts von einem Stopkodon flankiert (kurzer schwarzer, vertikaler Balken). Ein stromabwärts der Insertion in der p176.1-cDNA *in frame* gelegenes Startkodon bei bp 442 setzt den korrespondierenden ORF fort (blau). Er wird nicht von einem Stopkodon beendet. Der vom Vektor-ATG ausgehende ORF wurde bei bp 3 durch TGA beendet. Es gibt drei alternative ORF: bp 579-665 (29 AS), bp 1166-1246 (27 AS) und bp 1295-1396 (34 AS). Ein Basenaustausch bei bp 1418 (g→t; Gly→Val) führt zu einer Änderung der Proteinsequenz von FLJ32476.

Das putative Antigen *Mu-WT-59.XX* war identisch mit *ROCK2*.

Die 5' inkomplette MU-WT-59.XX-cDNA zeigte im sequenzierten Abschnitt eine fast 100%ige Homologie zu der cDNA der *Rho associated, coiled-coil containing protein kinase 2* (ROCK2; NM_004850.2; s. **Abb. 4-21**). In der SEREX-Datenbank fand sich eine Homologie zu NW-Twe 37 (ID 2069) aus Testis und NY-TLU-54-T3 (ID 2726).

Das *ROCK2*-Gen war auf Chromosom 2p24 lokalisiert worden (Takahashi et al., 1999) und wird in verschiedenen gesunden und malignen Geweben, darunter auch Nierenzellkarzinomgewebe, exprimiert (UniGene hs.58617). Durch RT-PCR-Untersuchungen wurde die Expression von

ROCK-mRNA in verschiedenen normalen Geweben gefunden (Ishikawa et al., 1998). Eine Expression in WT wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben.

ROCK2 (ROK α) ist ein Isoenzym von ROCK1 und hat ähnliche Funktionen inne. Die beiden Isoformen ROCK1 (p160^{ROCK}) und ROCK2 sind zu 60% identisch (Trauger et al., 2002).

Zusammenfassend war das putative Antigen MU-WT-59.XX mit der Proteinkinase ROCK2 identisch.

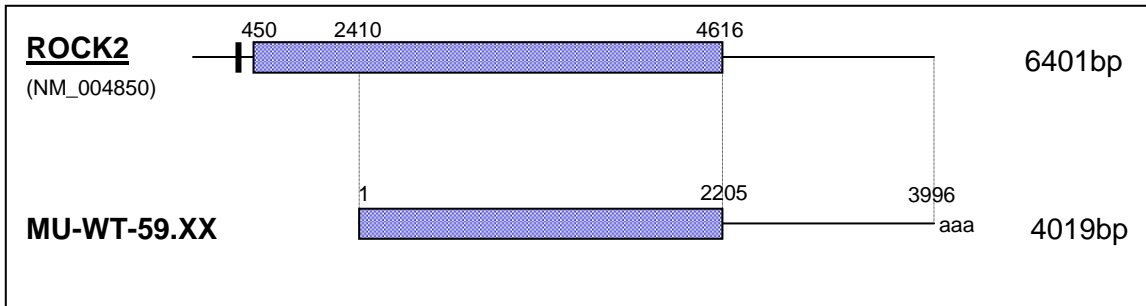


Abb. 4-21 cDNA-Homologie von MU-WT-59.XX zu ROCK2 (NM_004850.1).

MU-WT-59.XX wurde von p176.3 kodiert. Der ROCK2-ORF ist für bp 450-4616 (NM_004850) angegeben und wird stromaufwärts von einem *in frame* gelegenen Stopkodon (kurzer schwarzer, vertikaler Balken) flankiert. Der korrespondierende ORF in p176.3 wurde 5' inkomplett kloniert und möglicherweise vom Vektor-ATG aus abgelesen.

Im 3'UTR stromabwärts lagen ein Basenaustausch (a→g) bei bp 2494 und eine Deletion von zwei Basen in einer poly-TA-Sequenz vor. Die ROCK2-cDNA zeigte zum 3' Ende hin in einer poly-T-Sequenz den Verlust von einer Guanin- und mehreren Thyminbasen. Nur die TA-Deletion in p176.3 führte zu der Verlängerung eines alternativen ORF (bp 2593-2802; 70 AS). Es lagen zehn weitere alternative ORF vor: bp 1202-1268 (22 AS), bp 1660-1873 (71 AS), bp 2217-2367 (50 AS), bp 2783-2942 (53 AS), bp 2919-3099 (60 AS), bp 3144-3219 (25 AS), bp 3368-3439 (24 AS), bp 3550-4019 (156 AS), bp 3648-3783 (45 AS).

Das putative Antigen **Mu-WT-59.XXI** war identisch mit **CEP290**.

Die 5' inkomplette MU-WT-59.XXI-cDNA zeigte im sequenzierten Bereich eine 100%ige Homologie zu der cDNA des *centrosomal protein 290kDa* (CEP290; NM_025114; s. **Abb. 4-22**). Dieses Protein ist identisch mit dem Tumor-assoziierten Antigen 3H11, das durch den monoklonalen Ak 3H11 spezifisch auf verschiedenen Tumorgeweben identifiziert worden war (Guo et al., 2004). In der SEREX-Datenbank fand sich eine Homologie zum *SEREX-Antigen se2-2* aus Hodengewebe (AF273044.1; ID 2019).

Das *CEP290*-Gen liegt auf Chromosom 12q21.33 (UniGene Hs.150444). Durch RT-PCR wurde seine ubiquitär Expression nachgewiesen (Eichmuller et al., 2001). Chen und Shou konnten in Northern Blot- und RT-PCR-Untersuchungen das Vorkommen von mRNA des 3H11-Antigens in verschiedenen malignen Geweben, darunter Kolon-, Ovarial- und Lungenkarzinom. Keine Expression fanden sie in den untersuchten gesunden Geweben (Kolon-, Rektum-, Herz-, Ösophagus und endotheliale Zellen) (Chen and Shou, 2001).

Anderson et al. identifizierten das oben genannte Protein als einen Bestandteil des Zentromers (Andersen et al., 2003). Guo et al. bestätigten seine zytoplasmatische und nukleäre Lokalisation (Guo et al., 2004) und konnten außerdem Bereiche mit verschiedenen Funktionen (N-Glycosilierung, Tyrosin-Sulfatierung, Phosphorylierung und andere) nachweisen. CEP290

interagiert mit und moduliert den Transkriptionsfaktor ATF4, der mit der cAMP-abhängigen Bildung renaler Zysten in Verbindung steht (Sayer et al., 2006).

Mutationen im *CEP290*-Gen sind mit dem Joubert-Syndrom assoziiert (Sayer et al., 2006; Valente et al., 2006), einer Erkrankung, die mit Nephrophthisis, Retinadegeneration und einer Aplasie des Kleinhirnwurms einher geht. Auch können Mutationen im *CEP290*-Gen zur kongenitalen Amaurosis Leber (*Leber congenital amaurosis*), einem häufigen Grund für die Erblindung im Kindesalter, führen (den Hollander et al., 2006).

Zusammenfassend war das putative Antigen MU-WT-59.XXI mit dem Antigen CEP290/se2-2 identisch.

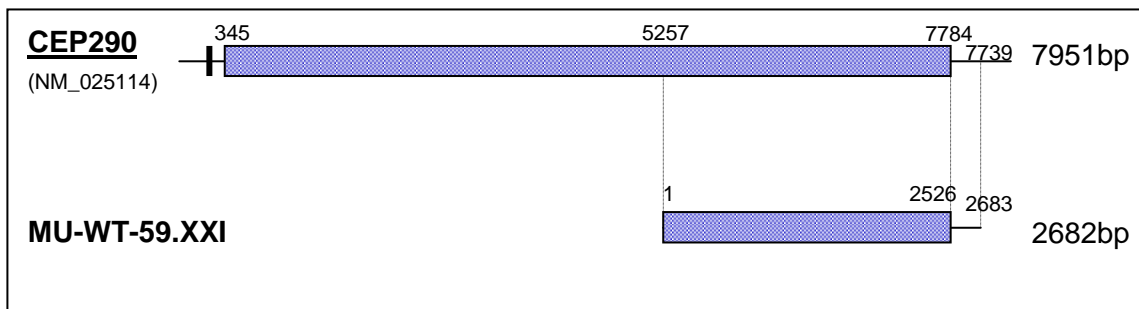


Abb. 4-22 cDNA-Homologie von Mu-WT-59.XXI zu CEP290 (NM_025114).

MU-WT-59.XXI wurde von p206 kodiert. Der CEP290-ORF wurde für bp 345-7784 (2480 AS) angegeben und war stromaufwärts von einem Stopkodon (kurzer, schwarzer vertikaler Balken) flankiert. Der korrespondierende MU-WT-59.XXI-ORF ging möglicherweise vom Vektor-ATG aus. Es gab drei kurze alternative ORF bei bp 559-637 (26 AS), 1663-1762 (33 AS) und 2029-2125 (32 AS).

Name	MU-WT-59.	Normalgewebe	Tumorgewebe	Referenz
MYH3	I	Fetales Gewebe Diverse Diverse	Diverse	(Eller et al., 1989) UniGene HPRD
HSF2	II	Diverse Gehirn Hoden, Niere, Leber, Thymus, Haut	Diverse Plattenepithelzell- karzinom Diverse Plattenepithel- karzinome aus dem Kopf-Hals-Bereich	UniGene (Heubeck et al., 2006) (Walsh et al., 1997) (Heubeck et al., 2006)
LRRFIP2	III	Diverse	Diverse	UniGene
APP		Diverse Lymphozyten, Monozyten Gehirn	Diverse	UniGene (Bullido et al., 1996) (Beyreuther et al., 1993)
CCDC46	IV	Diverse	Diverse	UniGene
MSH2	V	Diverse Blut, Kolon Lymphozyten, Darm Pankreas > Hoden > Magen > Lunge, Plazenta > Gehirn > Niere Adulte Leber, fetale Leber; diverse Leberzelllinien	Diverse Pankreaskarzinom	UniGene (Genuardi et al., 1998) (Wei et al., 1995) (Okada et al., 2005) (Rasmussen et al., 2000)
GNPAT	VI	Diverse Plazenta, Leber, Haut Niere Gehirn	Diverse	UniGene (Ofman and Wanders, 1994) (Schutgens et al., 1984) (Thai et al., 1997)
-	VII	-	-	-
NM23B	VIII	Gehirn Neutrophile Granulozyten B-Lymphozyten		(Kim et al., 2002) (Guignard and Markert, 1996) (Ji et al., 1995)
NAGR2	IX	Diverse Fetales Gewebe, Testis > Lunge >>> Niere	Diverse	UniGene (Sugiura et al., 2004)

Tab. 4-8 Publierte Genexpressionsdaten zu MU-WT-59.I-IX.

Name	MU-WT-59.	Normalgewebe	Tumorgewebe	Referenz
DHX38	X	Diverse	Diverse	UniGene
MYH8	XI	Skelettmuskulatur Fetales Gewebe Diverse Diverse	Nierentumor	(Feghali and Leinwand, 1989) (Jullian et al., 1995) UniGene HPRD
DACH1	XII	Diverse Niere, Herz, Leber, Skelettmuskulatur, Plazenta >>> Gehirn, Milz, Lunge, Leukozyten	Diverse	UniGene (Ayres et al., 2001)
SSRP1	XIII	Diverse Diverse	Diverse	UniGene (Bruhn et al., 1992)
RPL30	XIV	Diverse Diverse	Diverse Diverse Medulloblastom	UniGene CancerImmunome Database (ID 2048) (De Bortoli et al., 2006)
RPL13	XV	Diverse Benigne Mammaläsionen (hoch)	Diverse Mammakarzinom (gering)	UniGene (Adams et al., 1992)
Nebulin	XVI	Diverse Muskulatur	Diverse	UniGene (Zeviani et al., 1988)
IQWD	XVII	Diverse Diverse	Diverse Diverse	UniGene (Tureci et al., 2002)
GCC2	XVIII	Diverse Fetale Gewebe, Knochenmark, Herz, Niere, Leber, Lunge, Pankreas, Testis, Plazenta u.a.	Diverse Leukämie- und Melanomzelllinien	UniGene (Eichmüller et al., 2001)
ROCK1	XIX	Diverse Lymphozyten Myometrium	Diverse Pankreaskarzinom	UniGene (Vicente-Manzanares et al., 2002; Bardi et al., 2003) (Moran et al., 2002) (Kaneko et al., 2002)
ROCK2	XX	Diverse Herz, Gehirn, Lunge, Leber, Skelettmuskulatur, Niere, Pankreas, Milz, Testis, Ovar	Diverse	UniGene (Ishikawa et al., 1998)

Tab. 4-9 Publierte Genexpressionsdaten zu MU-WT-59.X-XX.

Name	MU-WT-59.	Normalgewebe	Tumorgewebe	Referenz
CEP290	XXI	Diverse	Diverse	(Eichmuller et al., 2001)
		Diverse	Diverse	UniGene
			Diverse	(Wong et al., 1990)
		Gehirn		(Valente et al., 2006)
		Keine	Ösophaguskarzinom, Magenkarzinom, Kolonkarzinom, Rektumkarzinom, Ovarialkarzinom, Zervixkarzinom, Harnblasenkarzinom, Herztumor, Leukämie- und Tumorzelllinien (K562, HeLa, MG803, B10)	(Chen and Shou, 2001)

Tab. 4-10 Publierte Genexpressionsdaten zu MU-WT-59.XXI.

5. Diskussion

Die vorliegende Studie zeigte, dass der untersuchte WT ein weites Spektrum an Antigenen exprimiert und ließ vermuten, dass weitere SEREX-Untersuchungen an anderen WT dieses Spektrum noch erweitern würden. Die identifizierten Antigene gehörten verschiedenartigen Proteinklassen an, darunter einige, die an der Genexpression und Zellproliferation beteiligt sind wie Transkriptionsfaktoren (HSF2, NM23B, SSRP1), DNA-Reparatur-Enzyme (MSH2), Spleißfaktoren (DHX38), Protoonkogene (DACH), aber auch einige, die für die Zytokinese wichtig sind (MYH3 und 8, ROCK1 und 2) oder ribosomale Proteine darstellen (L13 und L30).

In der aktuellen SEREX-Untersuchung wurden insgesamt 69 Klone identifiziert, die sich 21 Genen zuordnen ließen. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse wurden die drei Antigene MU-WT-59.V, -59.IX und -59.XIII, als Tumorantigene eingestuft. 16 Antigene wurden den Autoantigenen zugeordnet, da sie mit zwei oder mehr ($\geq 10\%$) der getesteten Normalseren reagierten. Zwei weitere Antigene, MU-WT-59.VI und -59.VII, reagierten mit nur einem Normalserum; ihre Zugehörigkeit zur einen oder anderen Gruppe konnte anhand der eigenen Ergebnisse nicht sicher beurteilt werden. In der nachfolgenden Diskussion werden die eigenen DSA-Ergebnisse mit differentiellen serologischen Befunden anderer Autoren verglichen, um eine möglichst zuverlässige Klassifizierung der Antigene zu erreichen.

Das Serum des Mädchens, dessen Tumormaterial zur Herstellung der cDNA-Bibliothek diente, lag in einer Konzentration von 1:800 vor. Die anderen Seren waren für das Screening 1:300 verdünnt worden. Erfolgreiche SEREX-Screens sind auch bei starken Verdünnungen von bis zu 1:1000 in der Literatur beschrieben (Chen et al., 2005; Hishizawa et al., 2005; Kim et al., 2004; Okada et al., 2006). Bei sehr hoher Serumverdünnung wird allerdings eine geringere Sensitivität der Analyse in Kauf genommen, weshalb in der eigenen Arbeitsgruppe bei ausreichendem Ausgangsmaterial vorzugsweise Serumverdünnungen von 1:100 bis 1:300 für die Screeningexperimente gewählt werden.

Eine Voraussetzung für den Erfolg von tumorspezifischen, immuntherapeutischen Strategien ist die Existenz und die Identifikation von Genen, die entweder ausschließlich oder zumindest vorzugsweise in malignen Zellen exprimiert werden im Vergleich zu Normalgeweben (Schmits et al., 2002). Eigene mRNA-Expressionsanalysen waren in dieser Arbeit nicht vorgesehen, aber es sollten alle verfügbaren Informationen zur Expression der identifizierten Gene aus Daten- und Literaturbanken zusammengetragen und diskutiert werden.

Da die identifizierten Antigene zwar höchstwahrscheinlich zu den jeweils klassischen Genprodukten der kodierenden Gene homolog waren, dies jedoch nicht durch eine aufwändige serologische Testung von rekombinantem Antigen überprüft wurde, wird auch in der Diskussion weiterhin vorsichtig von putativen Homologen des klassischen Genprodukts gesprochen.

5.1. Potentielle Tumorantigene

Tumorantigene sind definitionsgemäß Antigene, gegen die Ak nur in Tumorpatienten nachgewiesen werden können. Es gibt verschiedene, mögliche Ursachen dafür, dass diese Proteine nur im Kontext von Tumoren immunogen wirken: zum einen können Mutationen, alternative

mRNA-Prozessierung und alternative Proteinprozessierung zu einer Strukturänderung führen, die ein Neoepitop zur Folge hat, zum anderen kann die Antigenität auch durch ein verändertes Expressionsmuster verursacht sein, z.B. durch Überexpression oder durch Expression in Gewebe, das immunologisch besser zugänglich ist als die reguläre Antigenquelle.

Das putative MSH2-Homolog MU-WT-59.V wirkte wahrscheinlich aufgrund einer Tumor-assoziierten Überexpression immunogen.

MU-WT-59.V war wahrscheinlich identisch mit dem *mismatch repair*-Protein MSH2. Es stellte sich in dieser Arbeit als ein Tumorantigen mit schwach immunogener Potenz dar, da zwar bei keinem gesunden Probanden, aber auch nur bei 1/20 Tumorpatienten (5%) eine Seroreaktivität nachzuweisen war. In der DSA einer anderen Arbeitsgruppe, die MSH2 mit SEREX in Pankreaskarzinomgewebe identifiziert hatte, konnte ebenfalls keine Immunreaktion mit Serum gesunder Probanden (0/34) nachgewiesen werden. Mit 7,4% (8/108) reaktiven Individuen lag das Vorkommen spezifischer Ak bei Tumorpatienten in einer ähnlichen Größenordnung wie in der eigenen Untersuchung. Die Ak waren wie in der gleichen Untersuchung nur im Kontext bestimmter Entitäten zu detektierten (5/37 bei Pankreaskarzinom, 1/8 bei Nierenzellkarzinom, 1/10 bei Prostatakarzinom, 1/6 bei Endometriumskarzinom). Patienten mit anderen Tumoren wiesen keine Ak auf (0/10 mit Ösophaguskarzinom, 0/10 mit Melanom, 0/10 mit Harnblasenkarzinom, 0/17 mit Kolonkarzinom). Anti-MSH2-Ak wurden in dieser Studie auch bei 4,9% (5/102) Patienten mit Dermatomyositis (DM) oder Polymyositis (PM) detektiert, so dass MSH2 letztendlich wohl eher als Autoantigen zu klassifizieren ist (Okada et al., 2005).

Um den Mechanismus der Immunogenität aufzuklären, hatten Okada und Kollegen vergleichende immunhistochemische Untersuchungen von normalem Pankreasgewebe und Gewebe duktaler Pankreaskarzinome durchgeführt und dabei eine MSH2-Überexpression in letzteren festgestellt (Okada et al. 2005). Eine Überexpression von MSH2 war zuvor bereits in anderen malignen Tumoren, z.B. dem Glioblastoma multiforme (Srivastava et al., 2004), bei malignen Speicheldrüsentumoren (Castrilli et al., 2002) und urothelialen Neoplasien (Leach et al., 2000) beschrieben worden. Darüber hinaus hatte Idikio die Expression von MSH2 in verschiedenen pädiatrischen Tumoren untersucht und eine Überexpression des Proteins in WT (4/4), Neuro- und Hepatoblastomen, Lymphomen und Sarkomen gefunden (Idikio, 2001). Auch die Tatsache, dass in der vorliegenden SEREX-Untersuchung vier verschiedene cDNAs kloniert wurden, die MSH2 kodierten, sprach dafür, dass die korrespondierende mRNA in dem untersuchten WT relativ stark exprimiert worden war. Die tumorassoziierte Überexpression des Antigens lieferte eine gute Erklärung für die tumorassoziierte Induktion der Immunantwort. Ob dieser Mechanismus auch im Kontext von Autoimmunerkrankungen zutrifft, ist bislang unklar. Zur Expression in entzündetem Gewebe von Patienten mit DM oder PM liegen keine Daten vor. Die biologische Bedeutung der MSH2-Überexpression in Tumoren ist noch unklar.

Da sich im Sequenzvergleich eine 100%ige Homologie zwischen den WT-Antigenen der Gruppe MU-WT-59.V und MSH2 (NM_000251.1) herausstellte, war die Immunogenität eher nicht auf mögliche Abweichungen der Proteinstruktur in nicht klonierten Abschnitten der Antigene oder auf eine Expression von alternativen ORFs zurückzuführen. Allerdings sind Mutationen im *MSH2*-Gen

und in vielen anderen *mismatch repair*-Genen durchaus beschrieben und für eine erhöhte Krebsneigung der betroffenen Personen verantwortlich gemacht worden (Etzler et al., 2007).

Interessant ist die Beobachtung, dass die Expression einiger *mismatch repair*-Gene einschließlich des MSH2 in differenzierten Tumoren eher höher als in undifferenzierten ist (Chen et al., 2003). Erste Evidenzen für eine prognostische Bedeutung der MSH2-Expression liegen für andere Tumorentitäten als WT bereits vor (Lanza et al., 2006; Leach et al., 2000; Nijhuis et al., 2007; Taubert et al., 2003; Uehara et al., 2005). In aggressiven Tumoren wird unter anderem ein epigenetisches *silencing* für die verminderte Expression von *mismatch repair*-Genen verantwortlich gemacht (Soreide, 2007). Dies könnte bedeuten, dass von der Überexpression und von der assoziierten Ak-Bildung eher die prognostisch günstigeren WT betroffen sind. Diese Hypothese an einer größeren Zahl von Patienten mit WT zu überprüfen, erscheint außerordentlich interessant, weil sich daraus mögliche neue prognostische Marker in Gewebe und Blut ergeben könnten.

Ob MSH2 eine gute Zielstruktur für die Immuntherapie darstellt, ist augenblicklich schwer zu beantworten. Die Assoziation von antigenspezifischen Immunreaktionen mit Autoimmunerkrankungen stimmt eher kritisch, obwohl unklar bleibt, ob die antigenspezifische Immunreaktion ursächlich am Gewebeschaden beteiligt ist oder eher ein nicht-pathogenes, durch Überexpression der Antigene bedingtes Epiphänomen der Erkrankung darstellt. Auf der anderen Seite könnte das immunologische Targeting von Krebszellen, die ein *mismatch repair*-Gen evtl. kompensatorisch überexprimieren, möglicherweise die Empfindlichkeit der Tumorerkrankung auf Chemotherapie oder Bestrahlung erhöhen. Zu dieser Spekulation liegen bislang keine Daten vor.

Zusammenfassend zeigt die Identifikation des MSH2 mit SEREX, dass das Verfahren außerordentlich hilfreich dabei sein kann, Proteine zu identifizieren, die im Kontext von malignen Tumoren eine biologisch und klinisch bedeutsame Rolle spielen.

Das putative NARG2-Homolog MU-WT-59.IX ist möglicherweise ein neues Cancer/Testis-Antigen.

Das Antigen MU-WT-59.IX war wahrscheinlich identisch mit dem funktionell noch wenig charakterisierten NARG2. Es konnte den Tumorantigenen zugeordnet werden, da es mit keinem der 20 getesteten Seren gesunder Probanden, aber mit einem Serum aus dem WT-Serumpool reagierte. Da in der SEREX-Datenbank keine Homologe zu finden waren, und über das homologe Genprodukt NARG2 bisher wenig Informationen vorlagen, konnte in dieser Arbeit erstmals die Immunogenität des NARG2 postuliert werden.

Sugiura und Kollegen hatten mit Northern-Blot-Analysen eine starke NARG2-Expression in verschiedenen fetalen Geweben und in adultem Testis, eine schwache Expression in adultem Lungengewebe und keine Expression in verschiedenen anderen adulten Geweben gefunden (Sugiura et al., 2004). Dieses Expressionsmuster ist charakteristisch für sogenannte *Cancer/Testis*-Antigene, die nicht in normalen, adulten Geweben, außer in Testis, aber aberrant in einer Reihe von Malignomen exprimiert werden (Simpson et al., 2005). Die bekannten *Cancer/Testis*-Antigene werden in der Mehrzahl, aber nicht ausschließlich vom X-Chromosom kodiert (Nicholaou et al., 2006). Sie besitzen durch ihr restringiertes Expressionsmuster gute Voraussetzungen, um als

Zielstrukturen für Immuntherapien zu dienen und werden bereits in klinischen Studien erprobt (NY-ESO-1, MAGE) (Nicholaou et al., 2006).

In der UniGene-Datei (hs.200943) wurde das Vorkommen von NARG2-ESTs nicht nur in malignen Geweben, sondern auch in multiplen normalen Geweben dokumentiert. Dieses EST-Expressionsmuster findet sich allerdings auch für zahlreiche bekannte CTA (MAGE-A4, hs.37107; Necdin, hs.50130; MAGE-F1, hs.306123). Aufgrund der hohen Sensitivität der Methode finden sich ESTs der meisten Gene in zahlreichen Normalgeweben. Die Aussagekraft bzgl. einer biologisch relevanten Genexpression ist damit deutlich geringer als diejenige vergleichender Northern-Blot-Analysen. Da es sich bei den ESTs nur um kurze Sequenzabschnitte handelt, kann zudem nicht zwischen verschiedenen Spleißvarianten eines Gens unterschieden werden. Die EST-Recherche kann bei fehlenden zusätzlichen Daten zur Expression dennoch einen ersten Eindruck zum Vorkommen der Transkripte liefern und besonders bei stark restringierter Expression wegweisend sein.

Passend zur Annahme eines *Cancer/Testis*-Antigens konnten Sugiura und Kollegen durch *in vitro* und *in vivo* Versuche zeigen, dass die NARG2-Expression mit zunehmendem Differenzierungs- bzw. Reifegrad der transfizierten, murinen, embryonalen Karzinomzellen (P16) sowie von murinem, embryonalen Hirngewebe abnahm (Sugiura et al., 2004; Sugiura et al., 2001). Es handelte sich demnach um ein Tumorantigen, das in undifferenzierten Tumoren hoch und in gut differenziertem, gesunden Parenchym niedrig oder nicht signifikant exprimiert wurde. Diese Eigenschaften ließen das Antigen MU-WT-59.IX als ein außerordentlich interessantes und viel versprechendes potentiell Target für zukünftige immuntherapeutische Ansätze erscheinen.

Da NARG2 wahrscheinlich nukleär lokalisiert ist (Sugiura et al. 2004), ist diese mögliche immuntherapeutische Zielstruktur allerdings nur für T-Zell-basierte und nicht für Ak-basierte Ansätze relevant. Falls sich eine pathogene Rolle des NARG2 im Kontext der Dedifferenzierung herauskristallisieren sollte, wäre das Antigen in doppelter Hinsicht als Zielstruktur für die therapeutische Intervention qualifiziert.

Ob das mRNA-Expressionsmuster in Tumoren und das Ak-Vorkommen bei Tumorpatienten eventuell auch diagnostisches Potential aufweist, lässt sich augenblicklich nur spekulieren. Eine Untersuchung an einer größeren Kohorte von Patienten mit WT erscheint zur Klärung dieser Frage sehr erstrebenswert.

Die hohe therapeutische Relevanz des Antigens rechtfertigt den Aufwand einer rekombinanten Expression für zukünftige Untersuchungen mit T-Zellen seropositiver Patienten. In der eigenen Arbeitsgruppe sind Analysen zur Erkennung des NARG2 durch CD4+ T-Zellen geplant, die von den Patienten stammen, deren Serum in den Screeningpool einging.

Das putative SSRP1-Homolog MU-WT-59.XIII gehört wohl doch in die Gruppe der Autoantigene.

MU-WT-59.XIII war wahrscheinlich identisch mit dem Elongationsfaktor SSRP1, der eine entscheidende Rolle bei der Transkription spielt. In der DSA reagierten die Seren von zwei Patienten mit WT (2/6), aber keines der Kontrollseren. In der SEREX-Datenbank fanden sich zwei homologe cDNAs, und die entsprechenden Antigene, NY-Co-19 (ID 28) und NGO-St-119 (ID 80

1330), waren ebenfalls einer DSA unterzogen worden. NGO-St-119 hatte wie das WT-Antigen nur mit einem Tumors serum (1/13) und keinem der Kontrollseren (0/16) reagiert (CancerImmunomeDB, ID 1022). Dagegen fand sich für NY-Co-19 neben der Reaktion mit zwei Tumorseren (2/16) auch eine Reaktivität mit einem Normalserum (1/16) (Scanlan et al., 1998), was die Klassifikation als Tumorantigen fraglich erscheinen ließ und eine generell eher geringe Immunogenität des Antigens bestätigte.

Die Sequenzen der drei mit SEREX identifizierten Antigen-cDNAs, MU-WT-59.XIII, NY-Co-19 und NGO-St-119, war zu 100% identisch, so dass das gleiche Antigen angenommen werden durfte. Die Sequenz von MU-WT-59.XIII war allerdings zum 5'-Ende hin um 489bp kürzer. Deshalb war nicht auszuschließen, dass sich in diesem Bereich ein zusätzliches Ak-Epitop befand, das in der eigenen DSA nicht erfasst wurde, und das die höhere Sensitivität der DSA von NGO-St-119 erklärte. Eine zweite Ak-Bindungsstelle musste in jedem Falle weiter 3' lokalisiert sein, um die Isolierung der kürzeren MU-WT-59.XIII-cDNA zu erklären.

Dafür, dass es sich bei MU-WT-59.XIII tatsächlich um ein Autoantigen handelte, sprach vor allem die Tatsache, dass Ak gegen SSRP1 bereits in zwei Studien bei mehreren Patienten mit systemischem Lupus erythematoses (19/66 bzw. 43/120) (Fineschi et al., 2004; Santoro et al., 2002) gefunden worden waren, und dass sie darüber hinaus auch bei anderen Autoimmunerkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis (8/95) und der systemischen Sklerose (9/51) (Fineschi et al., 2004) vorkamen.

SSRP1 trägt im Bereich des hier klonierten Aminoendes eine HMG-Box (*high mobility group box*). Ueda und Kollegen hatten durch Western-Blot- und Elisa-Analysen herausgefunden, dass die HMG-Box von SOX6, einem anderen Protein aus der HMG-Box-tragenden Proteinfamilie, möglicherweise das dominante Ak-Epitop darstellte (Ueda et al., 2004). In der Literatur wird über eine ganze Reihe von HMG-Box-Proteinen, z.B. SOX13 (Fida et al., 2002) und HMG1 und 2 (Sobajima et al., 1999) berichtet, gegen die Ak gebildet werden. Passend dazu hatten Kim und Kollegen das HMG-Box Protein SRY bemerkenswerterweise bei SEREX-Untersuchungen verschiedener Gewebe identifiziert (Kim et al., 2004).

Zur Therapie hochmaligner WT ab dem Stadium II wird unter anderem Carboplatin eingesetzt. Carboplatin gehört wie Cisplatin zu den alkylierenden Substanzen. Das Protein SSRP1 erkennt Cisplatin-geschädigte DNA und schirmt diese möglicherweise vor Reparaturmechanismen ab (Yarnell et al., 2001), so dass die Zelltoxizität des Cisplatins gesteigert wird. Es wäre interessant zu untersuchen, inwieweit dieser Mechanismus auch für Carboplatin-geschädigte DNA zutrifft, und ob sich aus dem Expressionsniveau des SSRP1 Rückschlüsse auf das Therapieansprechen ziehen lassen. Zur Expression des SSRP1 in Tumorgeweben liegen noch kaum Daten vor, und es erscheint interessant die Expression dieses Proteins in einer Sammlung von WT zu studieren. Ob die anti-SSRP1-Ak im Kontext von Tumoren diagnostische Bedeutung haben können, muss zukünftig untersucht werden.

Zusammenfassend läßt sich sagen, dass das putative SSRP1-Homolog MU-WT-59.XIII wohl eher in die Gruppe der Autoantigene gehört und aufgrund seiner breiten Expression in gesunden Geweben keine geeignete Zellstruktur für die antigenspezifische Immuntherapie darstellt.

5.2. Fragliche Tumorantigene

Antigene, die nur von einem der 20 getesteten Kontrollseren detektiert wurden.

Ak gegen die Antigene MU-WT-59.VI und VII fanden sich jeweils nur bei einem der getesteten 20 Normalseren (5%). Diese Antigene waren somit nicht eindeutig der Gruppe der Tumor- oder Autoantigene zuzuordnen. Angesichts der niedrigen Ak-Frequenz in der Kontrollgruppe und der Möglichkeit einer latenten, malignen Erkrankung der entsprechenden Kontrollperson wurden die Antigene MU-WT-59.VI und VII wie potentielle Tumorantigene behandelt.

Ein Beispiel für tumorspezifische Ak, die bei klinisch tumorfreien Personen auf eine maligne Erkrankung hinweisen, sind die anti-Hu-Ak. Diese sind gegen neuronale Antigene gerichtet, die aberrant in verschiedenen neuroektodermalen Malignomen exprimiert werden, und sind mit der paraneoplastischen sensorischen Neuropathie und/oder Enzephalomyelitis (anti-Hu-Syndrom) assoziiert (Senties-Madrid and Vega-Boada, 2001). Bei Patienten mit unklaren neurologischen Symptomen kann das Vorliegen von anti-Hu-Ak auf ein zugrundeliegendes Malignom hindeuten.

Für das GNPAT-Genprodukt MU-WT-59.VI wurde erstmalig eine Immunogenität gezeigt.

Das putative Antigen MU-WT-59.VI war zum peroxisomalen Enzym GNPAT homolog und sowohl mit dem Serum eines gesunden Probanden (1/20, 5%) als auch mit Proben von zwei Tumorpatienten reaktiv (2/20; 10%). Die seropositiven Tumorpatienten hatten beide einen WT, so dass das Antigen möglicherweise in diesem Kontext besonders immunogen wirkt. Da GNPAT bislang nicht mit SEREX kloniert und darüber hinaus auch nicht als Auto- oder Tumorantigen charakterisiert worden war, lieferte die eigene Arbeit die ersten Evidenzen für eine Immunogenität von GNPAT-Genprodukten. Ob es sich um ein Tumor- oder Autoantigen handelte, blieb offen. Allerdings belegen die verfügbaren Expressionsanalysen ein Vorkommen in multiplen Normalgeweben und sprachen somit eher für das Vorliegen eines Autoantigens (Ofman and Wanders, 1994; Schutgens et al., 1984; Thai et al., 1997; UniGene hs.498028).

Das Antigen MU-WT-59.VII war von einem bisher unbekanntem Gen kodiert worden.

Die DSA von MU-WT-59.VII lieferte, ebenso wie die für MU-WT-59.VI, keine eindeutigen Ergebnisse bezüglich der Klassifizierung als Tumor- oder Autoantigen. Auch hier konnten bei einer einzigen Kontrollperson (1/20; 5%) und insgesamt drei Tumorpatienten (3/20; 15%) spezifische Ak detektiert werden. Da das Antigen von einem bisher unbekanntem Gen kodiert wurde, gibt es noch keine Daten zu Gewebeexpression und Funktion des entsprechenden Genproduktes. Einen ersten Hinweis auf seine Gewebeverteilung könnten PCR-Analysen bringen. Dieser Befund ist ein Beispiel dafür, dass mit SEREX nicht selten neue Gene identifiziert werden (Lee et al., 2007; Shu et al., 2006; Zhou et al., 2006).

5.3. Autoantigene

Autoantigene sind gegenüber Tumorantigenen dadurch definiert, dass spezifische Ak auch bei Individuen ohne maligne Erkrankung vorkommen. Der einfachste Test zur Identifikation von Autoantigenen ist die Analyse der Testantigene mit Serum von gesunden Probanden. Ein erweiterter Test ist die Analyse mit Serum von Patienten mit Autoimmunerkrankungen. Diese Untersuchungen sind wichtig, um antigenspezifische Autoimmunreaktionen mit möglicher pathogener Bedeutung zu identifizieren. Immunreaktionen, die im Kontext von Autoimmunkrankheiten hochreguliert sind, stellen keine sicheren Ansatzpunkte für die Immuntherapie dar. Autoantigene mit restriktiver Expression und fehlender Assoziation mit Autoimmunerkrankungen können dagegen durchaus als Kandidaten für die Immuntherapie diskutiert werden. Darüber hinaus gibt es viele Beispiele dafür, dass Autoantigene und/oder die spezifischen Auto-Ak aufgrund ihres Vorkommens in Tumoren bzw. bei bestimmten Tumorpatienten als diagnostische, prognostische und/oder Verlaufsmarker in der Behandlung von Malignomen hilfreich sein können (Behrends et al., 2002; Behrends et al., 2003).

Auch für alle in der DSA als Autoantigene klassifizierten WT-Proteine wurde deshalb eine sorgfältige Datenbank- bzw. Literaturrecherche nach Zusatzinformationen durchgeführt, und die eigenen Ergebnisse im Folgenden vor diesem Hintergrund diskutiert.

5.3.1. Autoantigene mit cDNA-Homologen in der SEREX-Datenbank.

Zehn der hier identifizierten Antigene wurden bereits bei anderen SEREX-Untersuchungen entdeckt. Die Homologe fanden sich überwiegend in der SEREX-Datenbank.

Das nm23B-Genprodukt Mu-WT-59.VIII wurde auch von anderen Arbeitsgruppen als Autoantigen beschrieben.

Das putative Antigen MU-WT-59.VIII war zur NDP-Kinase nm23B homolog und wegen der Reaktivität mit mehr als einem Kontrollserum (2/20; 10%) als Autoantigen eingruppiert worden. Passend dazu war in der eigenen Arbeitsgruppe auch ein putatives nm23B-Homolog aus Osteosarkomgewebe kloniert und als Autoantigen klassifiziert worden (6/29 Kontrollseren) (Bornkamm, 2008; eingereicht). In der SEREX-Datenbank fanden sich die cDNA-Homologe HOM-Gliom-GT 3 (ID 212) und NW-F 102a (ID 2047), die aus einer Gliom- bzw. Kolonkarzinom-cDNA-Bibliothek kloniert worden waren. Zu HOM-Gliom-GT3 lagen DSA-Ergebnisse mit Tumorseren vor (4/40; 10%). Die nm23-H2/NM23B-cDNA war auch beim Screening einer Astrozytom-cDNA-Bibliothek identifiziert und aufgrund der DSA-Befunde (2/20 Kontrollseren; 1/20 Gliomsere) als Autoantigen klassifiziert worden (Schmits et al., 2002). Ein weiterer Hinweis auf seine Autoantigenität war seine ubiquitäre Expression, die von verschiedenen Arbeitsgruppen belegt werden konnte (Guignard and Markert, 1996; Ji et al., 1995; Kim et al., 2002; Schmits et al., 2002). Passend zu einer ähnlich hohen Frequenz von Auto-Ak bei

Kontrollpersonen und Tumorpatienten war im untersuchten Astrozytombgewebe keine tumorassoziierte Überexpression des *nm23-H2/NM23B*-Gens nachgewiesen worden (Schmits et al., 2002). In anderen Entitäten wie Weichteilsarkomen (D'Souza et al., 2003), Riesenzelltumoren des Knochens (Wuelling et al., 2004) und hepatozellulären Karzinomen (Iizuka et al., 2003) war dagegen eine Überexpression des *NM23B* beschrieben. DSA lagen im Kontext dieser Tumorarten nicht vor.

Ob ein und welcher Zusammenhang zwischen Expressionshöhe des nm23-H2 und der Prognose besteht wird diskutiert (Kanayama et al., 1994; Leone et al., 1993; Myeroff and Markowitz, 1993; Nakagawa et al., 1998; Okabe-Kado et al., 1998; Theisinger et al., 1998; Tokunaga et al., 1993; Wakimoto et al., 1998; Yamaguchi et al., 1994). Die Arbeitsgruppe um Wakimoto und Okabe-Kado zeigte, dass eine Überexpression von nm23 in Leukämiezellen mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist (Okabe-Kado et al., 1998; Wakimoto et al., 1998). Wenig später konnte gezeigt werden, dass auf Leukämiezellen der erythropoietischen Linie eine Oberflächenexpression des nm23-H2 beobachtet werden kann (Okabe-Kado et al., 2002), nicht jedoch auf differenzierten hämatopoietischen Zellen (Willems et al., 1998), so dass nm23-H2 als attraktives Ak-Target bei der Behandlung von Leukämien in Frage kommen könnte. Weitere Untersuchungen zur Oberflächenexpression von nm23 in anderen malignen und/oder benignen Geweben liegen bisher nicht vor.

Nm23-H2 wurde Anfang der 90er Jahre als Transkriptionsfaktor PuF identifiziert, der durch Bindung an den *c-myc*-Promotor P1 zur Transkription des Protoonkogens *c-myc* führt (Postel et al., 1993). Eine gesteigerte Expression von *c-myc* und/oder *c-myc*-Mutationen werden in einer Vielzahl von malignen Erkrankungen beschrieben (reviewed in Boxer and Dang, 2001). Im Burkitt-Lymphom scheint die Deregulation des *c-myc*-Gens durch den Transkriptionsfaktor nm23-H2 eine entscheidende Rolle an der Pathogenese zu spielen (Ji et al., 1995). Untersuchungen dieses Zusammenhangs in WT liegen bisher keine vor, obwohl auch hier ein interessanter Ansatz zum Verständnis der Tumorbilogie liegt.

Zum RPL30-Genprodukt MU-WT-59.XIV liegen widersprüchliche Daten zur Klassifizierung und Evidenzen für eine prognostische Bedeutung vor.

Das putative MU-WT-59.XIV-Antigen war zu dem ribosomalen Protein RPL30 homolog, in der DSA mit 20% (2/10) der Kontrollseren reaktiv und deshalb ebenfalls als Autoantigen klassifiziert worden. In der SEREX-Datenbank fand sich das cDNA-Homolog NW-F 130 (ID 2048), das aus Kolonkarzinomgewebe kloniert worden war, zu dem es aber keine weiteren, serologischen Daten gab. Widersprüchliche Daten bezüglich der Serologie lieferten Uemura und Kollegen. Sie identifizierten das homologe Antigen RPL30 ebenfalls mit Hilfe von SEREX in einer cDNA-Bibliothek eines hepatozellulären Karzinoms und klassifizierten es wegen fehlender Reaktivität mit den Kontrollseren als Tumorantigen (0/20 Kontrollseren, 4/20 Seren von Patienten mit hepatozellulärem Karzinom) (Uemura et al., 2003). In der darauffolgenden RT-PCR Untersuchung konnte RPL30-mRNA sowohl in Gewebe von hepatozellulären Karzinomen als auch in gesundem

Lebergewebe nachgewiesen werden. Dafür, dass eine tumorassoziierte Überexpression des *RPL30*-Gens für die höhere Frequenz von spezifischen Ak bei Tumorpatienten verantwortlich sein könnte, sprechen die Befunde, die an Prostatakarzinomzelllinien (Vaarala et al., 1998) und an Medulloblastomgewebe (De Bortoli et al., 2006) beobachtet worden waren. Die Tatsache, dass die verfügbaren Expressionsdaten einschließlich der Eingaben in UniGene (hs.400295) und der SEREX-Datenbank (CancerImmunome Database, ID 2048) auf ein Vorkommen des Genprodukts RPL30 in zahlreichen normalen Geweben weisen, passt zu der Annahme einer Autoimmunität. Interessanterweise berichteten De Bortoli und Kollegen darüber, dass die Expressionslevel von RPL30 in Medulloblastomen negativ mit der Prognose korrelieren (De Bortoli et al., 2006). Es wäre somit sehr interessant zu untersuchen, ob die RPL30-Expression auch in WT-Gewebe von prognostischer Bedeutung ist.

Das Autoantigen MU-WT-59.X gehört wahrscheinlich zu den DEAD-Box Proteinen, die in verschiedenen Tumoren überexprimiert werden.

Das putative Antigen MU-WT-59.X war zu DHX38/Prp16 homolog, welches an Spleißvorgängen mitwirkt. Bei 10% der Kontrollpersonen (2/20) fanden sich anti-MU-WT-59.X-Ak, weshalb es den Autoantigenen zugeordnet wurde. Dieses Ergebnis wurde durch die serologischen Daten zum cDNA-Homolog NGO-Br-2 (ID 802) aus der SEREX-Datenbank untermauert (7/16 positive Kontrollseren, 6/13 positive Seren von Patienten mit Magenkarzinom).

Der Spleißfaktor DHX38 gehört in die Gruppe der DEAD-Box Proteine, die an verschiedenen zellulären Prozessen beteiligt sind. Einige der DEAD-Box-Proteine, z.B. rck/p54, sind möglicherweise auch in die Karzinogenese involviert (Nakagawa et al., 1999). In verschiedenen Tumoren wurde bereits eine Überexpression von DEAD-Box-Proteinen beobachtet, darunter auch das oben genannte rck/p54 im Hepatitis C-Virus-induzierten hepatozellulären Karzinom (Miyaji et al., 2003). Martelange und Kollegen hatten das Gen *HAGE* identifiziert, dessen Genprodukt ebenfalls ein Mitglied der DEAD-Box-Familie ist, das tumorspezifisch exprimiert wird und möglicherweise als tumorspezifisches Antigen in der Immuntherapie Verwendung finden könnte (Martelange et al., 2000). Causevic und Kollegen hatten eine Überexpression der DEAD-Box-RNA-Helikase p68 in kolorektalen Tumoren gefunden (adenomatöse Polypen und Adenokarzinom) (Causevic et al., 2001), und Godbout und Kollegen über eine Überexpression des DEAD-Box-Gens DDX1 in Retinoblastom- und Neuroblastomzelllinien berichtet (Godbout et al., 1998). Die Co-Expression von DDX1 mit dem Protoonkogen MYCN, das zu den Transkriptionsfaktoren gehört, und seine Überexpression im Neuroblastom scheint mit einer schlechteren Prognose verbunden zu sein als die alleinige Überexpression von MYCN (George et al., 1996). In diesem Kontext scheint es interessant, die Expression auch dieses SEREX-Antigens auch in WT genauer zu studieren und auf eine mögliche Assoziation mit dem Krankheitsverlauf zu prüfen.

Das Autoantigen MU-WT-59.XVIII ist wahrscheinlich eine GCC2-Spleißvariante.

Das putative Antigen MU-WT-59.XVIII war eine molekulare Variante von GCC2, eines Membranproteins im Golgiapparat. In der DSA wurden bei 30% der untersuchten Kontrollpersonen (3/10) anti-MU-WT-59.XVIII-Ak detektiert, weshalb es als Autoantigen klassifiziert wurde. Die DSA von cDNA-Homologen in der SEREX-Datenbank hatte widersprüchliche Ergebnisse geliefert. Passend zu den eigenen Daten war für NGO-St-38 eine Reaktivität mit 8/50 Kontrollseren und 25/44 Seren von Patienten mit Magenkarzinom dokumentiert, während das Antigen se1-1 keine Reaktivität mit den wenigen untersuchten Kontrollseren (0/5) und eine 50%ige Reaktivität bei Patienten mit kutanem T-Zelllymphom (5/10) gezeigt hatte. Für die cDNA-Homologe NGO-Pr-1 und KW-11 lagen keine DSA-Daten vor. Zusammenfassend sprachen diese Ergebnisse für das Vorliegen eines Autoantigens.

Passend dazu waren Auto-Ak gegen verschiedene Golgi-Proteine auch im Kontext von verschiedenen Autoimmunkrankheiten gefunden worden, u.a. bei Sjögren-Syndrom, systemischem Lupus erythematodes und rheumatischer Arthritis (Blaschek et al., 1988; Fritzler et al., 1984; Hong et al., 1992; Mayet et al., 1991; Rodriguez et al., 1982; Rossie et al., 1992; Seelig et al., 1994). Unter diesen Auto-Ak waren z.B. Ak gegen Golgin-97 und Golgin-245/p230, die beide, wie GCC2 auch, eine *GRIP coiled-coil*-Domäne besitzen und im trans-Golgi-Kompartiment lokalisiert sind. Das Ak-Epitop war allerdings wahrscheinlich nicht im Bereich des *coiled-coil*-Motivs lokalisiert, da sich keine Kreuzreaktivität der Ak gegen Golgin-97 und Golgin-245/p230 fand. Eine Hypothese für die Entstehung der Autoimmunreaktion ist die Präsentation der Oberflächenstrukturen der Organellen bei krankheitsbedingter Nekrose oder Apoptose (Stinton et al., 2004). Da es sich um intrazelluläre Antigene handelte ist eine direkte pathogene Wirkung der Ak unwahrscheinlich.

Die neue Spleißvariante MU-WT-59.XVIII war durch Erhalt der Sequenzen von Intron 5 und Fragmenten von Intron 4 und 6 entstanden. Ob diese Spleißvariante wie das mRNA-Homolog se1-1 (Eichmüller et al., 2001) in verschiedenen normalen und malignen Geweben vorkommt oder möglicherweise nur in Tumoren exprimiert wird, bleibt zu untersuchen.

Die beiden Autoantigene MU-WT-59.XIX und MU-WT-59.XX entsprechen wahrscheinlich den tumortherapeutisch interessanten Rho-Kinasen ROCK1 und ROCK2.

Das Antigen MU-WT-59.XIX wurde in der vorliegenden Untersuchung von 40% der getesteten Kontrollseren (2/5) und das Antigen MU-WT-59.XX von 26,7% der getesteten Kontrollseren (4/15) detektiert und somit der Gruppe der Autoantigene zugeordnet. Zu beiden Autoantigenen lagen in der SEREX-Datenbank cDNA-Homologe vor. NY-REN-35 (ID 444), das aus Nierenzellkarzinomgewebe kloniert worden war, war homolog zu MU-WT-59.XIX und reagierte in der DSA passend zur Annahme eines Autoantigens mit 1/15 Kontrollseren und 4/24 Seren von Patienten mit Nierentumoren. Die beiden SEREX-Antigene NW-TWe 37 (ID 2069) und NY-TLU-54 (ID 2726), beide aus Testis kloniert, zeigten eine hohe Homologie zu MU-WT-59.XX, waren aber bislang nicht durch DSA weiter charakterisiert worden.

Die cDNAs der beiden Antigene entsprachen denen der Rho-Kinasen ROCK1 bzw. ROCK2. Beide Kinasen sind an Zelladhäsion und –motilität beteiligt (Amano et al., 1997; Amano et al., 1996; Kureishi et al., 1997). Rho-Kinase-Inhibitoren wie Fasudil werden bereits erfolgreich therapeutisch bei zerebralen Vasospasmen (Tachibana et al., 1999) sowie versuchsweise bei kardiovaskulären (Lai and Frishman, 2005) und renalen Erkrankungen (Hayashi et al., 2006) eingesetzt. In einer Untersuchung an Krebszelllinien über die Rolle von ROCK1 bei Invasion und Metastasierung wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine erhöhte Aktivität der ROCK1 die Migration der Krebszellen erleichtert (Kaneko et al., 2002). Ying und Kollegen berichteten von einer ersten Untersuchung, bei der der Rho-Kinase Inhibitor Fasudil im Zellkultur- und Tierversuch erfolgreich die Zellmigration bzw. die Tumorlast verringern konnte (Ying et al., 2006). Die Rho-Kinasen liefern somit Beispiele für Autoantigene, die molekulare Ansatzpunkte für die Tumorthherapie liefern.

Zu den IQWD1-Genprodukten der MU-WT-59.XVII-Gruppe liegen widersprüchliche serologische Daten vor.

Die Antigene der Gruppe MU-WT-59.XVII wurden vom *IQWD1*-Gen kodiert und als Autoantigene klassifiziert, da anti-MU-WT-59.XVII-Ak in 2/15 (13,3%) Kontrollseren detektiert werden konnten. Passend zum Postulat eines Autoantigens hatten die Begründer der SEREX-Technologie um Özlem Türeci und Ugur Sahin gezeigt, dass das mit SEREX identifizierte cDNA-Homolog HOM-TSMa4-9 mit 5/28 Kontrollseren und 5/33 Seren von Patienten mit Mammakarzinom reagierte sowie ubiquitär in verschiedenen Normalgeweben exprimiert wurde (Cancer Immunome Database, ID 742). Für ein weiteres, mit SEREX identifiziertes cDNA-Homolog, das Antigen HOM-TES-95, fand dieselbe Gruppe jedoch keine Reaktivität mit Normalseren (0/12 NS) und eine niederfrequente Reaktivität mit Seren von Patienten mit Seminom (1/11). Über die ubiquitäre Expression des Gens wurde auch in dieser Arbeit berichtet (Türeci et al., 2002). Eine andere Arbeitsgruppe hatte mit Liquor von Patienten mit einer ätiologisch unklaren Gehirngefäßerkrankung (Moyamoya-Krankheit) in einer gepoolten cDNA-Bibliothek aus Nieren-, Lungen- und Magenkarzinomzellen ein cDNA-Homolog identifiziert (MM-11), das mit 5/32 der Moyamoya-Liquorproben und 0/32 der Kontrollproben reagierte (Kim et al., 2004). Diese nicht ganz kongruenten Daten lassen insgesamt bei Reaktivität mit 7/87 (8%) getesteten Serum- bzw. Liquorproben von gesunden Kontrollen und ubiquitärer Expression des *IQWD1*-Gens die Hypothese zu, dass es sich bei dem Antigen MU-WT-59.XVII um ein Autoantigen handelt, das für immuntherapeutische Ansätze nicht geeignet ist. Inwieweit das mit nukleären Rezeptoren interagierende Protein im Kontext von malignen Erkrankungen von funktioneller Bedeutung ist, ist bislang nicht untersucht worden.

Autoimmunantworten gegen das putative CEP290-Genprodukt MU-WT-59.XXI sind bei gesunden Personen seltener als bei Tumorpatienten zu beobachten.

In der vorliegenden Untersuchung wurde das putative CEP290-Homolog MU-WT-59.XXI von 40% (2/5) der Kontrollseren detektiert und damit in die Gruppe der Autoantigene einsortiert. Auch die DSA-Ergebnisse zum cDNA-Homolog 3H11Ag waren mit einem, wenn auch weniger immunogenen Autoantigen vereinbar (1/40 bzw. 2,5% positive Kontrollseren). In gewissem Widerspruch standen die DSA-Ergebnisse zum cDNA-Homolog se2-2, das mit keinem Kontrollserum reagierte (0/8); allerdings waren in dieser Studie nur sehr wenige Proben untersucht worden, und die Aussagekraft der Untersuchungen dadurch limitiert (Eichmüller et al., 2001). Deutlich häufiger waren Ak gegen die beiden Antigene bei Tumorpatienten zu beobachten. Eine Seroreaktivität gegen Se2-2 war bei 3/10 (30%) Patienten mit kutanem T-Zell Lymphom (Eichmüller et al., 2001) und gegen 3H11Ag bei 7/30 (23,3%) Patienten mit hepatozellulärem Karzinom zu beobachten (Wong et al., 1990).

Dass Frequenz und Titer von Auto-Ak bei Patienten mit Autoimmun- und/oder Tumorerkrankungen häufiger bzw. höher sind als bei gesunden Individuen wurde wiederholt berichtet (Behrends et al., 2002; Behrends et al., 2003). Bei wenig sensitiver DSA mit sehr hoch verdünnten Serumproben oder bei DSA mit nur wenigen Kontrollseren können Autoantigene somit durchaus zunächst als Tumorantigene erscheinen. Es bedarf immer einer kritischen Durchsicht aller verfügbaren Daten zu einem neuen Antigen, um die Eingruppierung in die zutreffende Antigenklasse vorzunehmen. Im Falle des/r CEP290-Genprodukts/e kann bei insgesamt 3/53 positiven Kontrollseren zusammenfassend ein Autoantigen postulieren, dass bei gesunden Personen nur selten zu einer messbaren, humoralen Immunantwort führt.

Die Expressionsdaten von UniGene (Hs.150444) und die RT-PCR-Analyse von Eichmüller und Kollegen (Eichmüller et al., 2001) sprachen für ein weitgehend ubiquitäres Vorkommen der CEP290-mRNA, was die Hypothese eines Autoantigens stützte. Eine mögliche Erklärung für die deutlich höhere Immunogenität bei Tumorpatienten lieferten Wong und Kollegen, die in RT-PCR und Northern-Blot-Untersuchungen eine Expression der 3H11-mRNA lediglich in verschiedenen malignen Geweben, nicht jedoch in den korrespondierenden, gesunden Gewebeproben nachweisen konnten (Wong et al., 1990). Dies sprach für eine signifikante Überexpression des CEP90-Gens im Kontext bestimmter maligner Tumoren. Über eine minimale Expression des 3H11Ag in gesundem Gewebe wurde bereits in den ersten Abstracts zu diesem Ak berichtet (Wei, 1989).

Klinische Anwendung fand der J¹³¹-gebundene, monoklonale anti-3H11-Ak bereits in zwei chinesischen Studien, in denen seine Fähigkeit, Lymphknotenmetastasen und die Infiltration der Magenwand bei Magenkarzinomen anzuzeigen, untersucht wurde. Sowohl Sensitivität als auch Spezifität lagen bei beide Kriterien bei 84-99,2% (Wang et al., 2000; Xu et al., 1994). International hat sich das 3H11Ag allerdings noch nicht als Tumormarker durchgesetzt.

5.3.2. Autoantigene ohne cDNA-Homolog in der SEREX-Datenbank

Das putative Autoantigen MU-WT-59.II war eine bekannte, in Normalgeweben exprimierte Spleißvariante des HSF2-Gens.

MU-WT-59.II konnte als Autoantigen klassifiziert werden, da bei 4/20 getesteten Kontrollpersonen anti-MU-WT-59.II-Ak nachgewiesen werden konnten. Widersprüchliche Daten lieferten Heubeck und Kollegen, die in keinem der 10 getesteten Seren von gesunden Probanden anti-HSF2-Ak nachweisen konnten; sie fanden anti-HSF2-Ak bei 2/10 Patienten mit Plattenepithelzellkarzinom (Heubeck et al., 2006). Diese Arbeitsgruppe hatte mit SEREX ebenfalls die Spleißvariante β identifiziert, der das Exon 11 fehlte, und konnte mittels RT-PCR und *in-situ*-Hybridisierung eine mRNA-Expression in allen getesteten Plattenepithelzellkarzinomen und verschiedenen Normalgeweben nachweisen (Heubeck et al. 2006). Damit war ausgeschlossen, dass HSF2 β eine tumorspezifische Spleißvariante darstellte, und bei insgesamt 4/30 reaktiven Kontrollseren wahrscheinlicher, dass es sich um eine Autoantigen handelte.

Prinzipiell ist zu bedenken, dass Auto-Ak durchaus mit tumorspezifischen Varianten von Autoantigenen reagieren können, wenn das Ak-Epitop beiden Molekülen gemeinsam ist. Die tumorspezifischen Varianten können als Tumormarker von Bedeutung sein, auch wenn die Antigenfamilie aus Sicherheitsgründen nicht für eine Immuntherapie in Frage kommen sollte. Aus diesem Grunde ist es unabhängig vom DSA-Ergebnis erstrebenswert, das Expressionsmuster aller neuen, mit SEREX identifizierten molekularen Varianten zu kennen.

Das autoimmunogene Nebulin-Genprodukt MU-WT-59.XVI spielt möglicherweise eine Rolle bei paraneoplastischen Myopathien.

Das putative Nebulin-Homolog MU-WT-59.XVI reagierte mit 5/20 Kontrollseren und fiel damit eindeutig in die Kategorie der Autoantigene. Interessanterweise fanden sich vier neue Spleißvarianten der publizierten Nebulin-cDNA (NM_004543).

Mutationen und alternatives Spleißen im *Nebulin*-Gen können neben Veränderungen anderer Gene zur sogenannten Nemalinmyopathie führen (Donner et al., 2004; Pelin et al., 2002; Wallgren-Pettersson et al., 2007). Dies ist eine hereditäre Muskelerkrankung, die meist mit einer kongenitalen Hypotonie, generalisierten Muskelschwäche und einem stark gewölbten Gaumen einher geht und in ganz unterschiedlich starken Ausprägungen auftreten kann (Taratuto, 2002). Bisher wurden drei Fälle berichtet, bei denen histologische Zeichen einer Nemalinmyopathie im Rahmen einer malignen Erkrankung und entsprechender Chemo- und/oder Strahlentherapie aufgetreten waren (Kimura et al., 1997; Portlock et al., 2003; Zamecnik et al., 2004). Eine Erklärung für den Pathomechanismus gibt es bisher nicht. Die vorliegenden Ergebnisse bieten eventuell Anhalt für eine Beteiligung Nebulin-spezifischer Immunreaktionen an der Pathogenese der kongenitalen und/oder paraneoplastischen Nemalinmyopathie. Es erscheint deshalb außerordentlich interessant, das Vorkommen und den Titerverlauf von anti-Nebulin-Ak bei

betroffenen Patienten zu messen, und das Vorkommen der neu beschriebenen Spleißvarianten in gesundem Gewebe und Muskel von Patienten mit Nemalinmyopathie zu untersuchen.

Das DACH-Genprodukt MU-WT-59.XII ist eine Autoantigen.

Das putative Antigen MU-WT-59.XII war zum Protoonkogen DACH1 homolog und reagierte in der DSA mit 3/20 (15%) Kontrollseren positiv. Es gehörte damit eindeutig der Gruppe der Autoantigene an. In der Literatur ist die Immunogenität von *DACH*-Genprodukten bisher nicht beschrieben worden.

DACH1-mRNA wird in verschiedenen normalen Geweben exprimiert (Kozmik et al., 1999). Die immunhistochemische Untersuchung von Wu und Kollegen zeigte, dass das DACH1-Protein in gesundem Mammagewebe vorkam, in Mammakarzinomen jedoch nur vermindert nachweisbar war (Wu et al., 2006). Diese Arbeitsgruppe konnte auch zeigen, dass DACH1 durch Repression von Cyclin-D1 die DNA-Synthese in Mammakarzinomzellen inhibieren konnte, und dass durch Induktion der DACH1-Expression in Mäusen das Wachstum von Brusttumoren um 50% reduziert wurde. Bei der Analyse von 2000 Mammakarzinompatientinnen korrelierte die erhöhte Expression von DACH1 mit einer verbesserten Überlebensrate (Wu et al., 2006). Diese Daten geben Anlass, die *DACH*-Genexpression auch systematisch in WT-Gewebe zu untersuchen und auf eine mögliche prognostische Bedeutung zu prüfen. Als Zielstruktur für eine Immuntherapie erscheinen *DACH*-Genprodukte aufgrund der genannten Charakteristika nicht geeignet.

Das RPL13-Genprodukt MU-WT-59.XV ist ein Autoantigen und hat möglicherweise prokanzerogene Wirkung.

Das putative Antigen MU-WT-59.XV war 100% identisch mit dem ribosomalen protein RPL13 und reagierte in der DSA mit 3/10 (33%) Kontrollseren. Es fällt damit ebenfalls eindeutig in die Gruppe der Autoantigene. Über immunogene Eigenschaften von RPL13-Genprodukten wurde in der Literatur bislang nicht berichtet. Dagegen wurde in der vorliegenden Untersuchung ein weiteres ribosomales Protein, RPL30, gefunden (s. S. 66 und 84), das in der SEREX-Datenbank bereits gespeichert ist.

Das cDNA-Homolog *breast basic conserved gene 1* (BBC1) wurde 1992 von Adams und Kollegen aus Karzinomgewebe kloniert. Die Expression der entsprechenden mRNA war in benignen Brusttumoren signifikant höher als in Mammakarzinom (Adams et al., 1992). Zu diesem Ergebnis im Widerspruch stehen die Resultate von Kobayashi und Kollegen. Sie konnten nachweisen, dass die RPL13-Expression in Malignomen des Gastrointestinaltraktes hochreguliert wird, und dass RPL13-überexprimierende Zellen eine stärkere Chemotherapeutikaresistenz besaßen als Zellen mit normaler RPL13-Expression. Eine Hochregulation der RPL13-mRNA-Expression fanden Kobayashi und Kollegen in 10/36 (28%) Magen-, 19/46 (41%) kolorektalen und 5/25 (20%) Leberkarzinomen (Kobayashi et al., 2006). Auch hier erscheinen quantitative mRNA-Analysen an WT-Geweben mit Hinblick auf mögliche, neue prognostische Marker interessant.

Anti-Myosin-Ak kommen bei verschiedenen Herzerkrankung vor und können zur Radioimmunodetektion von Muskeltumoren verwendet werden.

Es wurden zwei Antigene (MU-WT-59.I und XI) gefunden, die Homologien zu zwei *myosin heavy chain* (MHC)-Isoformen (MYH3 und MYH8) aufwiesen. Beide reagierten in der DSA mit einem hohen Anteil der Normalseren, 5/5 (100%) bzw. 4/15 (\approx 40%) und wurden deshalb als eindeutige Autoantigene klassifiziert. Passend zu diesem Ergebnis waren die MHC-Varianten MYH3 und MYH7 in einer anderen SEREX-Analyse der eigenen Arbeitsgruppe bereits als Autoantigene in Rhabdomyosarkomgewebe identifiziert worden (MU-RMS-40.3 und MU-RMS-40.7). Die DSA mit diesen Antigenen hatte eine Reaktivität mit 14/30 (47%) bzw. 6/30 (20%) Seren gesunder Kontrollen ergeben (Götz, 2006). Auto-Ak gegen Myosin waren darüber hinaus bereits bei der dilatativen Kardiomyopathie (DCM) und der akuten Myokarditis (AM) gefunden worden. Caforio und Kollegen gaben in einer Übersichtsarbeit die Häufigkeit des Vorkommens von anti- α -MHC-Ak und anti- β -MHC-Ak bei AM mit 17% bzw. 37%, bei DCM mit 20% bzw. 44% und bei gesunden Kontrollen mit 2% bzw. 2,5% an ($p < 0,05$ gegenüber Kontrollpersonen) (Caforio et al., 2002).

Diese Daten stützten unsere Vermutung, dass es sich bei MU-WT-59.I und XI um Autoantigene handeln könnte. Die Häufigkeiten der Ak bei gesunden Individuen unterschieden sich allerdings in den einzelnen Untersuchungen, was auf einem unterschiedlichen Durchschnittsalter des Kontrollkollektivs, einer unterschiedlichen Immunogenität der getesteten Isoformen oder auf Polymorphismen der Myosin-Genprodukte beruhen könnte. Die cDNA-Sequenzen der Antigene MU-WT-59.I und MU-WT-59.XI zeigten gegenüber dem cDNA-Homolog der GenBank an mehreren Stellen Basenaustausche, die zum Teil zu Änderungen der Aminosäuresequenz führten (s. S. 53 und S. 63). Die Tatsache, dass beide Studien der eigenen Arbeitsgruppe ein sehr junges, erwachsenes Kontrollkollektiv (< 30 Jahre) untersuchten, und die internistisch-kardiologische Gruppe von Caforio und Kollegen vermutlich ein deutlich heterogeneres Altersspektrum analysierte, sprach dafür, dass die anti-Myosin-Ak evtl. häufiger bei jungen als bei älteren, gesunden Individuen vorkommen, möglicherweise als Folge einer höheren körperlichen Aktivität mit Mikrotraumata der Muskulatur.

Die MHC-Isoformen werden differentiell exprimiert. Physiologischerweise kommen MYH3 und MYH8 nur in der Embryonal- bzw. Perinatalzeit vor. Die pathologische, postnatale Expression von MYH3 wurde bei muskulären Erkrankungen, wie der Muskeldystrophie Typ Duchenne (Webster et al., 1988) und Muskeltumoren, z.B. Rhabdomyosarkomen (Karsch-Mizrachi et al., 1989), von MYH8 bei der Regeneration von Muskelverletzungen gefunden.

Anti-Myosin-Ak werden zur Radioimmunodetektion von Rhabdomyosarkomen, Leiomyosarkomen und Rhabdoidtumoren verwendet (Hoefnagel et al., 1993; Koscielniak et al., 1990; Planting et al., 1990). Durch die erhöhte Zellpermeabilität von Tumorzellen oder bei Zellschaden, z.B. im Rahmen von Tumornekrose oder Myokardinfarkt, kann der Ak an intrazelluläres Myosin binden und in den geschädigten Arealen anreichern, normale Muskelzellen zeigen dabei keine Anreicherung (Cox et al., 1988).

Das CCDC46-Genprodukt MU-WT-59.IV wurde als Autoantigen klassifiziert.

Das putative CCDC46-Homolog mit 4/10 (40%) Kontrollseren. Damit gehörte es eindeutig in die Reihe der Autoantigene. Die Immunogenität von CCDC46-Genprodukten war noch nicht bekannt. Bislang liegen keine näheren Informationen zur Bedeutung dieses Gens im Kontext von malignen Erkrankungen vor. Ob es sich bei der beschriebenen neuen Deletion um einen Polymorphismus oder eine tumorspezifische Mutation handelte, sollte nachträglich durch eine Analyse der genomischen Sequenz von Lymphozyten der mit SEREX untersuchten Patientin geklärt werden. Dies gilt für alle neuen molekularen Charakteristika, die nicht eindeutig als Spleißvarianten identifiziert werden konnten.

Das putative Autoantigen MU-WT-59.III war am ehesten eine neue LRRFIP2-Spleißvariante.

MU-WT-59.III reagierte in der DSA mit 4/20 (20%) Kontrollseren und wurde deswegen als Autoantigen klassifiziert. Die erste Hälfte der cDNA war homolog zur LRRFIP2-cDNA, unterschied sich allerdings von deren Sequenz durch eine Insertion von 72 Basen innerhalb des ORF, so dass eine neue Spleißvariante postuliert werden konnte. Die zweite Hälfte der cDNA war 100% homolog zur APP-cDNA. Welches der beiden Proteine nun das antigene Epitop trug kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, da sie nicht in rekombinanter Form einzeln getestet wurden. Die Hintereinanderreihung der cDNAs beruhte jedoch am ehesten auf einem Klonierartefakt und die Synthese des komplett und stromaufwärts klonierten LRRFIP2 war wahrscheinlicher. Zur Immunogenität dieses putativen Antigens und zur möglichen Bedeutung des Proteins im Kontext von Krebserkrankungen liegen bislang keine Daten anderer Autoren vor.

5.4. Zum Mechanismus der Immunogenität von Tumorproteinen.

Zusammenfassend lieferte die eigene Arbeit zwei klassische Beispiele für Mechanismen, die zu einer Immunogenität von Wildtypproteinen im Kontext von Tumoren führen können. Dies war im Falle des Tumorantigens MU-WT-59.V die vermutete Überexpression und im Falle des MU-WT-59.IX die postulierte selektive Expression in Tumoren und Gonaden.

Darüber hinaus finden sich in der Literatur einige Wildtyp-Tumorantigene, deren Expressionsmuster sich nicht erkennbar vom Wildtyp unterscheidet. Hier ist der Mechanismus der Immunogenität noch nicht eindeutig geklärt. Matzinger hatte zu diesem Problem eine interessante Hypothese. Sie postulierte, dass normale Zellstrukturen im Zusammenhang mit Krebs immunogen werden können, wenn vom Tumor zusätzliche Gefahrensignale ausgehen (*context of „danger“*) (Matzinger, 1994). Möglicherweise ist dieser Mechanismus auch dafür verantwortlich, dass viele Autoantigene im Kontext von Krebs häufiger mit einer messbaren Immunreaktion einhergehen und dass viele Auto-Ak im Rahmen von Tumorerkrankungen höhere Titer aufweisen.

Die eigenen Recherchen weisen daraufhin, dass ein Teil der Wildtypantigene mit ubiquitärer Expression trotz initialer Klassifizierung als Tumorantigen nach Analyse von größeren Kontrollkohorten schließlich doch als Autoantigen klassifiziert werden müssen. Hier bleibt der Mechanismus der Immunogenität in vielen Fällen ungeklärt.

5.5. Die Rolle von Autoantigenen im Kontext von malignen Erkrankungen

In der Literatur gibt es zahlreiche Beispiele, dass mit SEREX-identifizierte Autoantigene und/oder die entsprechenden Auto-Ak interessante neue klinische Marker zur Diagnose, Prognose und/oder Verlaufskontrolle von Tumoren darstellen können (Behrends et al., 2002; Behrends et al., 2003). Einige Autoantigene können auch unabhängig von ihrer Immunogenität Zielstrukturen für die Tumorthherapie darstellen. Das ist dann der Fall, wenn die Blockade ihrer Funktion das Tumorwachstum beeinträchtigt (Powers and Workman, 2007; Xu and Neckers, 2007). Für alle mit SEREX-identifizierten Tumor- und Autoantigene sollten deshalb, soweit die verfügbaren Daten unzureichend sind, zusätzliche differentielle, serologische, Expressions- und ggf. Funktionsanalysen durchgeführt und auf diese Weise ihr klinisches Potential weiter abgeklärt werden.

Bei der Frage, ob Autoantigene als Zielstruktur für die Immuntherapie von Tumoren in Frage kommen, ist ihr Expressionsmuster von entscheidender Bedeutung. Autoantigene mit hoher Expression in lebenswichtigen Organen eignen sich sicherlich nicht als Targets für immuntherapeutische Ansätze. Es gibt aber Evidenzen dafür, dass die Induktion einer Autoimmunantwort prinzipiell mit tumorspezifischen Immunreaktionen synergistisch wirken kann, und deshalb möglicherweise in gewissem Rahmen anzustreben ist. Eindrucksvoll waren in diesem Zusammenhang die Ergebnisse von Nishikawa und Kollegen, die im Tiermodell untersucht hatten, welche Auswirkung eine Immunisierung mit einem einzelnen tumorspezifischen Antigen (mutiertes ERK2 oder Her2/neu) gegenüber einer Kombination aus tumorspezifischem Antigen und SEREX-identifizierten Autoantigenen zeigte (Nishikawa et al., 2001). Es stellte sich heraus, dass die Koimmunisierung sowohl die tumorantigen-spezifische CD8⁺ T-Zellantwort steigerte als auch einen größeren Schutz vor Lungenmetastasen bot. Die Amplifikation der CD8⁺ T-Zellantwort war von der Präsenz von CD4⁺ Zellen abhängig, so dass eine wichtige Helferrolle von autoantigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen postuliert werden konnte. Einige der mit SEREX identifizierten Wildtypantigene von Tumoren könnten somit möglicherweise doch immuntherapeutische Bedeutung erlangen.

5.6. Ausblick

Mit dieser Arbeit wurde erstmals belegt, dass sich die SEREX-Strategie zur Identifikation von tumorassoziierten Antigenen in WT-Gewebe von Kindern eignet, und dass durch Einsatz gepoolter Seren von mehreren WT-Patienten eine hohe Antigenausbeute erzielt werden kann. Weitere SEREX-Untersuchungen mit gepoolten Seren an WT und anderen pädiatrischen Malignomen

wären daher zur Erweiterung des bekannten Antigenspektrums sinnvoll und wünschenswert. Viele der in dieser Arbeit identifizierten WT-Antigene hatten potentielle tumorbiologische und/oder klinische Bedeutung und sollten daher weiterführenden Untersuchungen zugeführt werden.

6. Zusammenfassung

Wilmstumoren gehören zu den häufigsten soliden pädiatrischen Tumoren, die im Allgemeinen eine gute Prognose aufweisen. Therapeutische Schwierigkeiten z.B. bei fortgeschrittenen Stadien und das Bestreben nach geringerer Toxizität der Therapie durch eine präzisere Risikostratifizierung verlangen jedoch nach der Entwicklung ergänzender therapeutischer und diagnostischer Optionen. Ziel dieser Untersuchung war es, mit Hilfe des SEREX-Verfahrens neue Antigene des Wilmstumors zu identifizieren und zu prüfen, inwiefern sie als zukünftige Zielstrukturen für die Immuntherapie und/oder als neue diagnostische Marker geeignet erscheinen.

69 Klone, die sich 21 Genfamilien zuordnen ließen, konnten serologisch detektiert werden. Die identifizierten Antigene gehörten verschiedenen Proteinklassen an, darunter einige, die an der Genexpression und/oder Zellproliferation beteiligt sind wie zum Beispiel Transkriptionsfaktoren (HSF2, NM23B, SSRP1), DNA-Reparatur-Enzyme (MSH2), Spleißfaktoren (PRP16), Protoonkogene (DACH), Proteine, die für die Zytokinese wichtig sind (MYH3 und 8, ROCK1 und 2), ribosomale Proteine (L13 und L30) und andere. Mit Hilfe von differentiellen Serumanalysen mit Proben von gesunden Probanden und anderen pädiatrischen Krebspatienten konnten die Antigene in Tumor- oder Autoantigene eingeteilt werden. Das Ergebnis wurde vor dem Hintergrund publizierter serologischer Daten zu den bekannten cDNA-Homologen interpretiert.

Zwei Antigene, MU-WT-59.V und -59.IX, konnten aufgrund ihrer Seroreaktivität als potentielle Tumorantigene eingruppiert werden. MU-WT-59.V war homolog zum *mismatch repair*-Protein MSH2, das eine wichtige Rolle bei der Reparatur von DNA-Schäden spielt. Daten aus der Literatur sprechen dafür, dass seine Immunogenität auf einer tumorassoziierten Überexpression beruhen könnte, und dass letztere eventuell von prognostischer Bedeutung ist. MU-WT-59.IX war homolog zu dem embryonalen Protein NARG2, das aufgrund seines restringierten Expressionsmusters zur Gruppe der *Cancer/Testis*-Antigene gezählt werden kann und somit für die Tumormimmuntherapie außerordentlich interessant ist.

Alle weiteren 19 Antigene wurden aufgrund ihrer Seroreaktivität als Autoantigene klassifiziert. Acht dieser Antigene wiesen neue molekulare Alterationen auf. So wurden beispielsweise vier neue Spleißvarianten des *Nebulin*-Gens identifiziert, welchem eine pathogenetische Rolle im Kontext von Myopathien zugeschrieben wird. Zudem repräsentierten die Antigene MU-WT-59.III/LRRFIP2 und MU-WT-59.XVIII/GCC2 neue Spleißvarianten. Darüber hinaus wiesen die verfügbaren publizierten Daten zu cDNA-Homologen darauf hin, dass die Antigene MU-WT-59.VIII, -XII, -XIV, -XV und -XXI als prognostische Marker hilfreich sein könnten, und dass Antikörper gegen Mu-WT-59.I/MYH3, MU-WT-59.XI/MYH8 und MU-WT-XXI/3H11 diagnostische Bedeutung haben. Beispiele für Autoantigene, die molekulare Ansatzpunkte für die Tumorthherapie liefern könnten, waren MU-WT-59.XIX und MU-WT-59.XX. Sie entsprachen Rho-Kinasen, die an Zelladhäsion und –motilität beteiligt sind und deren experimentelle Inhibition die Zellmigration reduziert.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit das SEREX-Verfahren erstmals auf einen Wilmstumor angewandt und auf diese Weise zahlreiche klinisch interessante Antigene identifiziert. Sie lieferten neue und bekannte Ansatzpunkte für Therapie, Diagnostik, und biologisches Verständnis von bösartigen Neoplasien einschließlich der Wilmstumoren von Kindern.

7. Literaturverzeichnis

- Adams, S. M., Helps, N. R., Sharp, M. G., Brammar, W. J., Walker, R. A., and Varley, J. M. (1992). Isolation and characterization of a novel gene with differential expression in benign and malignant human breast tumours. *Hum Mol Genet* **1**, 91-6.
- Amano, M., Chihara, K., Kimura, K., Fukata, Y., Nakamura, N., Matsuura, Y., and Kaibuchi, K. (1997). Formation of actin stress fibers and focal adhesions enhanced by Rho-kinase. *Science* **275**, 1308-11.
- Amano, M., Ito, M., Kimura, K., Fukata, Y., Chihara, K., Nakano, T., Matsuura, Y., and Kaibuchi, K. (1996). Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J Biol Chem* **271**, 20246-9.
- Andersen, J. S., Wilkinson, C. J., Mayor, T., Mortensen, P., Nigg, E. A., and Mann, M. (2003). Proteomic characterization of the human centrosome by protein correlation profiling. *Nature* **426**, 570-4.
- Appay, V. (2004). The physiological role of cytotoxic CD4(+) T-cells: the holy grail? *Clin Exp Immunol* **138**, 10-3.
- Ayres, J. A., Shum, L., Akarsu, A. N., Dashner, R., Takahashi, K., Ikura, T., Slavkin, H. C., and Nuckolls, G. H. (2001). DACH: genomic characterization, evaluation as a candidate for postaxial polydactyly type A2, and developmental expression pattern of the mouse homologue. *Genomics* **77**, 18-26.
- Bandman, E. (1985). Myosin isoenzyme transitions in muscle development, maturation, and disease. *Int Rev Cytol* **97**, 97-131.
- Bardi, G., Niggli, V., and Loetscher, P. (2003). Rho kinase is required for CCR7-mediated polarization and chemotaxis of T lymphocytes. *FEBS Lett* **542**, 79-83.
- Behrends, U. (2007). Identifikation von Zielantigenen tumor-, transplantations- und Epstein-Barr-Virus-assoziiierter CD4(+) T-Zell-Antworten bei Kindern.
- Behrends, U., Jandl, T., Golbeck, A., Lechner, B., Muller-Wehrich, S., Schmid, I., Till, H., Berthold, F., Voltz, R., and Mautner, J. M. (2002). Novel products of the HUD, HUC, NNP-1 and alpha-internexin genes identified by autologous antibody screening of a pediatric neuroblastoma library. *Int J Cancer* **100**, 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., and Mautner, J. (2003). Novel tumor antigens identified by autologous antibody screening of childhood medulloblastoma cDNA libraries. *Int J Cancer* **106**, 244-51.
- Beyreuther, K., Pollwein, P., Multhaup, G., Monning, U., Konig, G., Dyrks, T., Schubert, W., and Masters, C. L. (1993). Regulation and expression of the Alzheimer's beta/A4 amyloid protein precursor in health, disease, and Down's syndrome. *Ann N Y Acad Sci* **695**, 91-102.
- Birnboim, H. C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513-23.
- Blann, A. D., Li, J. L., Li, C., and Kumar, S. (2001). Increased serum VEGF in 13 children with Wilms' tumour falls after surgery but rising levels predict poor prognosis. *Cancer Lett* **173**, 183-6.
- Blaschek, M. A., Pennec, Y. L., Simitzis, A. M., Le Goff, P., Lamour, A., Kerdraon, G., Jouquan, J., and Youinou, P. (1988). Anti-Golgi complex autoantibodies in patients with primary Sjogren's syndrome. *Scand J Rheumatol* **17**, 291-6.
- Bober, E., Buchberger-Seidl, A., Braun, T., Singh, S., Goedde, H. W., and Arnold, H. H. (1990). Identification of three developmentally controlled isoforms of human myosin heavy chains. *Eur J Biochem* **189**, 55-65.
- Booy, E. P., Johar, D., Maddika, S., Pirzada, H., Sahib, M. M., Gehrke, I., Loewen, S., Louis, S. F., Kadkhoda, K., Mowat, M., and Los, M. (2006). Monoclonal and bispecific antibodies as novel therapeutics. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **54**, 85-101.

- Bornkamm, M. (in Vorbereitung). Analyse einer Osteosarkom-cDNA-Bibliothek mit Hilfe von gepoolten Patientenseren (SEREX) sowie molekulare, serologische und mRNA-Expressionsanalyse der identifizierten Antigene.
- Bown, N., Cotterill, S. J., Roberts, P., Griffiths, M., Larkins, S., Hibbert, S., Middleton, H., Kelsey, A., Tritton, D., and Mitchell, C. (2002). Cytogenetic abnormalities and clinical outcome in Wilms tumor: a study by the U.K. cancer cytogenetics group and the U.K. Children's Cancer Study Group. *Med Pediatr Oncol* **38**, 11-21.
- Boxer, L. M., and Dang, C. V. (2001). Translocations involving c-myc and c-myc function. *Oncogene* **20**, 5595-610.
- Breslow, N., Olshan, A., Beckwith, J. B., and Green, D. M. (1993). Epidemiology of Wilms tumor. *Med Pediatr Oncol* **21**, 172-81.
- Bruhn, S. L., Pil, P. M., Essigmann, J. M., Housman, D. E., and Lippard, S. J. (1992). Isolation and characterization of human cDNA clones encoding a high mobility group box protein that recognizes structural distortions to DNA caused by binding of the anticancer agent cisplatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 2307-11.
- Bullido, M. J., Munoz-Fernandez, M. A., Recuero, M., Fresno, M., and Valdivieso, F. (1996). Alzheimer's amyloid precursor protein is expressed on the surface of hematopoietic cells upon activation. *Biochim Biophys Acta* **1313**, 54-62.
- Burns, D. M., and Crawford, D. H. (2004). Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T-lymphocytes for adoptive immunotherapy of post-transplant lymphoproliferative disease. *Blood Rev* **18**, 193-209.
- Caforio, A. L., Mahon, N. J., Tona, F., and McKenna, W. J. (2002). Circulating cardiac autoantibodies in dilated cardiomyopathy and myocarditis: pathogenetic and clinical significance. *Eur J Heart Fail* **4**, 411-7.
- Camassei, F. D., Jenkner, A., Rava, L., Bosman, C., Francalanci, P., Donfrancesco, A., Alo, P. L., and Boldrini, R. (2003). Expression of the lipogenic enzyme fatty acid synthase (FAS) as a predictor of poor outcome in nephroblastoma: an interinstitutional study. *Med Pediatr Oncol* **40**, 302-8.
- Castrilli, G., Fabiano, A., La Torre, G., Marigo, L., Piantelli, C., Perfetti, G., Ranelletti, F. O., and Piantelli, M. (2002). Expression of hMSH2 and hMLH1 proteins of the human DNA mismatch repair system in salivary gland tumors. *J Oral Pathol Med* **31**, 234-8.
- Causevic, M., Hislop, R. G., Kernohan, N. M., Carey, F. A., Kay, R. A., Steele, R. J., and Fuller-Pace, F. V. (2001). Overexpression and poly-ubiquitylation of the DEAD-box RNA helicase p68 in colorectal tumours. *Oncogene* **20**, 7734-43.
- Chen, D., and Shou, C. (2001). Molecular cloning of a tumor-associated antigen recognized by monoclonal antibody 3H11. *Biochem Biophys Res Commun* **280**, 99-103.
- Chen, Y., Wang, J., Fraig, M. M., Henderson, K., Bissada, N. K., Watson, D. K., and Schweinfest, C. W. (2003). Alterations in PMS2, MSH2 and MLH1 expression in human prostate cancer. *Int J Oncol* **22**, 1033-43.
- Comito, M. A., Sun, Q., and Lucas, K. G. (2004). Immunotherapy for Epstein-Barr virus-associated tumors. *Leuk Lymphoma* **45**, 1981-7.
- Coppes, M. J., and Egeler, R. M. (1999). Genetics of Wilms' tumor. *Semin Urol Oncol* **17**, 2-10.
- Coppes, M. J., Wolff, J. E., and Ritchey, M. L. (1999). Wilms tumour: diagnosis and treatment. *Paediatr Drugs* **1**, 251-62.
- Cox, A. L., Skipper, J., Chen, Y., Henderson, R. A., Darrow, T. L., Shabanowitz, J., Engelhard, V. H., Hunt, D. F., and Slingluff, C. L., Jr. (1994). Identification of a peptide recognized by five melanoma-specific human cytotoxic T cell lines. *Science* **264**, 716-9.
- Cox, P. H., Verweij, J., Pillay, M., Stoter, G., and Schonfeld, D. (1988). Indium 111 antimyosin for the detection of leiomyosarcoma and rhabdomyosarcoma. *Eur J Nucl Med* **14**, 50-2.

Daw, N. C., Furman, W. L., Stewart, C. F., Iacono, L. C., Krailo, M., Bernstein, M. L., Dancey, J. E., Speights, R. A., Blaney, S. M., Croop, J. M., Reaman, G. H., and Adamson, P. C. (2005). Phase I and pharmacokinetic study of gefitinib in children with refractory solid tumors: a Children's Oncology Group Study. *J Clin Oncol* **23**, 6172-80.

De Bortoli, M., Castellino, R. C., Lu, X. Y., Deyo, J., Sturla, L. M., Adesina, A. M., Perlaky, L., Pomeroy, S. L., Lau, C. C., Man, T. K., Rao, P. H., and Kim, J. Y. (2006). Medulloblastoma outcome is adversely associated with overexpression of EEF1D, RPL30, and RPS20 on the long arm of chromosome 8. *BMC Cancer* **6**, 223.

De Plaen, E., Lurquin, C., Van Pel, A., Mariame, B., Szikora, J. P., Wolfel, T., Sibille, C., Chomez, P., and Boon, T. (1988). Immunogenic (tum-) variants of mouse tumor P815: cloning of the gene of tum- antigen P91A and identification of the tum- mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 2274-8.

De Smet, C., De Backer, O., Faraoni, I., Lurquin, C., Brasseur, F., and Boon, T. (1996). The activation of human gene MAGE-1 in tumor cells is correlated with genome-wide demethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 7149-53.

den Hollander, A. I., Koenekoop, R. K., Yzer, S., Lopez, I., Arends, M. L., Voesenek, K. E., Zonneveld, M. N., Strom, T. M., Meitinger, T., Brunner, H. G., Hoyng, C. B., van den Born, L. I., Rohrschneider, K., and Cremers, F. P. (2006). Mutations in the CEP290 (NPHP6) gene are a frequent cause of Leber congenital amaurosis. *Am J Hum Genet* **79**, 556-61.

Dome, J. S., and Coppes, M. J. (2002). Recent advances in Wilms tumor genetics. *Curr Opin Pediatr* **14**, 5-11.

Donner, K., Sandbacka, M., Lehtokari, V. L., Wallgren-Pettersson, C., and Pelin, K. (2004). Complete genomic structure of the human nebulin gene and identification of alternatively spliced transcripts. *Eur J Hum Genet* **12**, 744-51.

Driscoll, K., Isakoff, M., and Ferrer, F. (2007). Update on pediatric genitourinary oncology. *Curr Opin Urol* **17**, 281-6.

D'Souza, R. J., Sheikh, Z. A., Busund, L. T., Russell, P. J., Crowe, P. J., and Yang, J. L. (2003). Expression of nm23 protein in adult soft tissue sarcoma is correlated with histological grade. *Anticancer Res* **23**, 3289-94.

Efferth, T., Schulten, H. G., Thelen, P., Bode, M. E., Beniers, A. J., Granzen, B., Ringert, R. H., Mertens, R., Gefeller, O., Jakse, G., and Fuzesi, L. (2001). Differential expression of the heat shock protein 70 in the histological compartments of nephroblastomas. *Anticancer Res* **21**, 2915-20.

Eggert, A., Grotzer, M. A., Zhao, H., Brodeur, G. M., and Evans, A. E. (2001). [Expression of the neurotrophin-receptor TrkB predicts outcome in nephroblastomas: results of a pilot-study]. *Klin Padiatr* **213**, 191-6.

Eichmuller, S., Usener, D., Dummer, R., Stein, A., Thiel, D., and Schadendorf, D. (2001). Serological detection of cutaneous T-cell lymphoma-associated antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 629-34.

Eller, M., Stedman, H. H., Sylvester, J. E., Fertels, S. H., Wu, Q. L., Raychowdhury, M. K., Rubinstein, N. A., Kelly, A. M., and Sarkar, S. (1989). Human embryonic myosin heavy chain cDNA. Interspecies sequence conservation of the myosin rod, chromosomal locus and isoform specific transcription of the gene. *FEBS Lett* **256**, 21-8.

Etzler, J., Peyrl, A., Zatkova, A., Schildhaus, H. U., Ficek, A., Merkelbach-Bruse, S., Kratz, C. P., Attarbaschi, A., Hainfellner, J. A., Yao, S., Messiaen, L., Slavic, I., and Wimmer, K. (2007). RNA-based mutation analysis identifies an unusual MSH6 splicing defect and circumvents PMS2 pseudogene interference. *Hum Mutat*.

Feghali, R., and Leinwand, L. A. (1989). Molecular genetic characterization of a developmentally regulated human perinatal myosin heavy chain. *J Cell Biol* **108**, 1791-7.

Feo, S., Davies, B., and Fried, M. (1992). The mapping of seven intron-containing ribosomal protein genes shows they are unlinked in the human genome. *Genomics* **13**, 201-7.

- Fida, S., Myers, M. A., Whittingham, S., Rowley, M. J., Ozaki, S., and Mackay, I. R. (2002). Autoantibodies to the transcriptional factor SOX13 in primary biliary cirrhosis compared with other diseases. *J Autoimmun* **19**, 251-7.
- Figdor, C. G., de Vries, I. J., Lesterhuis, W. J., and Melief, C. J. (2004). Dendritic cell immunotherapy: mapping the way. *Nat Med* **10**, 475-80.
- Fineschi, S., Borghi, M. O., Riboldi, P., Gariglio, M., Buzio, C., Landolfo, S., Cebecauer, L., Tuchynova, A., Rovinsky, J., and Meroni, P. L. (2004). Prevalence of autoantibodies against structure specific recognition protein 1 in systemic lupus erythematosus. *Lupus* **13**, 463-8.
- Fishel, R., and Wilson, T. (1997). MutS homologs in mammalian cells. *Curr Opin Genet Dev* **7**, 105-13.
- Fitzsimons, R. B., and Hoh, J. F. (1981). Embryonic and foetal myosins in human skeletal muscle. The presence of foetal myosins in duchenne muscular dystrophy and infantile spinal muscular atrophy. *J Neurol Sci* **52**, 367-84.
- Fong, K. S., and de Couet, H. G. (1999). Novel proteins interacting with the leucine-rich repeat domain of human flightless-I identified by the yeast two-hybrid system. *Genomics* **58**, 146-57.
- Frischer, J. S., Huang, J., Serur, A., Kadenhe-Chiweshe, A., McCrudden, K. W., O'Toole, K., Holash, J., Yancopoulos, G. D., Yamashiro, D. J., and Kandel, J. J. (2004). Effects of potent VEGF blockade on experimental Wilms tumor and its persisting vasculature. *Int J Oncol* **25**, 549-53.
- Fritzler, M. J., Etherington, J., Sokoluk, C., Kinsella, T. D., and Valencia, D. W. (1984). Antibodies from patients with autoimmune disease react with a cytoplasmic antigen in the Golgi apparatus. *J Immunol* **132**, 2904-8.
- Gadhoum, Z., Delaunay, J., Maquarre, E., Durand, L., Lancereaux, V., Qi, J., Robert-Lezenes, J., Chomienne, C., and Smadja-Joffe, F. (2004). The effect of anti-CD44 monoclonal antibodies on differentiation and proliferation of human acute myeloid leukemia cells. *Leuk Lymphoma* **45**, 1501-10.
- Garvin, A. J., Surette, F., Hintz, D. S., Rudisill, M. T., Sens, M. A., and Sens, D. A. (1985). The in vitro growth and characterization of the skeletal muscle component of Wilms' tumor. *Am J Pathol* **121**, 298-310.
- Gattinoni, L., Powell, D. J., Jr., Rosenberg, S. A., and Restifo, N. P. (2006). Adoptive immunotherapy for cancer: building on success. *Nat Rev Immunol* **6**, 383-93.
- Geiger, J. D., Hutchinson, R. J., Hohenkirk, L. F., McKenna, E. A., Yanik, G. A., Levine, J. E., Chang, A. E., Braun, T. M., and Mule, J. J. (2001). Vaccination of pediatric solid tumor patients with tumor lysate-pulsed dendritic cells can expand specific T cells and mediate tumor regression. *Cancer Res* **61**, 8513-9.
- Genuardi, M., Viel, A., Bonora, D., Capozzi, E., Bellacosa, A., Leonardi, F., Valle, R., Ventura, A., Pedroni, M., Boiocchi, M., and Neri, G. (1998). Characterization of MLH1 and MSH2 alternative splicing and its relevance to molecular testing of colorectal cancer susceptibility. *Hum Genet* **102**, 15-20.
- George, R. E., Kenyon, R. M., McGuckin, A. G., Malcolm, A. J., Pearson, A. D., and Lunec, J. (1996). Investigation of co-amplification of the candidate genes ornithine decarboxylase, ribonucleotide reductase, syndecan-1 and a DEAD box gene, DDX1, with N-myc in neuroblastoma. United Kingdom Children's Cancer Study Group. *Oncogene* **12**, 1583-7.
- Ghanem, M. A., Van Der Kwast, T. H., Den Hollander, J. C., Sudaryo, M. K., Mathoera, R. B., Van den Heuvel, M. M., Noordzij, M. A., Nijman, R. J., and van Steenbrugge, G. J. (2001a). Expression and prognostic value of epidermal growth factor receptor, transforming growth factor-alpha, and c-erb B-2 in neuroblastoma. *Cancer* **92**, 3120-9.
- Ghanem, M. A., Van der Kwast, T. H., Den Hollander, J. C., Sudaryo, M. K., Oomen, M. H., Noordzij, M. A., Van den Heuvel, M. M., Nassef, S. M., Nijman, R. M., and Van Steenbrugge, G. J. (2000). Expression and prognostic value of Wilms' tumor 1 and early growth response 1 proteins in neuroblastoma. *Clin Cancer Res* **6**, 4265-71.
- Ghanem, M. A., Van der Kwast, T. H., Den Hollander, J. C., Sudaryo, M. K., Van den Heuvel, M. M., Noordzij, M. A., Nijman, R. J., Soliman, E. H., and van Steenbrugge, G. J. (2001b). The prognostic

significance of apoptosis-associated proteins BCL-2, BAX and BCL-X in clinical nephroblastoma. *Br J Cancer* **85**, 1557-63.

Ghanem, M. A., van Steenbrugge, G. J., Sudaryo, M. K., Mathoera, R. B., Nijman, J. M., and van der Kwast, T. H. (2003). Expression and prognostic relevance of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor (FLT-1) in nephroblastoma. *J Clin Pathol* **56**, 107-13.

Ghanem, M. A., Van Steenbrugge, G. J., Van Der Kwast, T. H., Sudaryo, M. K., Noordzij, M. A., and Nijman, R. J. (2002). Expression and prognostic value Of CD44 isoforms in nephroblastoma (Wilms tumor). *J Urol* **168**, 681-6.

Gires, O., Munz, M., Schaffrik, M., Kieu, C., Rauch, J., Ahlemann, M., Eberle, D., Mack, B., Wollenberg, B., Lang, S., Hofmann, T., Hammerschmidt, W., and Zeidler, R. (2004). Profile identification of disease-associated humoral antigens using AMIDA, a novel proteomics-based technology. *Cell Mol Life Sci* **61**, 1198-207.

Godbout, R., Packer, M., and Bie, W. (1998). Overexpression of a DEAD box protein (DDX1) in neuroblastoma and retinoblastoma cell lines. *J Biol Chem* **273**, 21161-8.

Götz, C. (2006). Identifikation von Tumorantigenen des embryonalen Rhabdomyosarkoms durch serologische Analyse einer Tumor-cDNS Expressionsbibliothek (SEREX) mit Untersuchung ihrer cDNS-Sequenz, mRNS-Expression und Immunogenität.

Golbeck, A. (2006). Serologische Identifizierung und Charakterisierung von Tumorantigenen beim Neuroblastom. *Dissertation an der Fakultät für Biologie der LMU*.

Goodson, M. L., Park-Sarge, O. K., and Sarge, K. D. (1995). Tissue-dependent expression of heat shock factor 2 isoforms with distinct transcriptional activities. *Mol Cell Biol* **15**, 5288-93.

Graf, N. (2007). Nephroblastoma - State of the art (Stand 07.01.2007). www.nephroblastom.de.

Grundy, P. E., Breslow, N. E., Li, S., Perlman, E., Beckwith, J. B., Ritchey, M. L., Shamberger, R. C., Haase, G. M., D'Angio, G. J., Donaldson, M., Coppes, M. J., Malogolowkin, M., Shearer, P., Thomas, P. R., Macklis, R., Tomlinson, G., Huff, V., and Green, D. M. (2005). Loss of heterozygosity for chromosomes 1p and 16q is an adverse prognostic factor in favorable-histology Wilms tumor: a report from the National Wilms Tumor Study Group. *J Clin Oncol* **23**, 7312-21.

Guignard, F., and Markert, M. (1996). The nucleoside diphosphate kinase of human neutrophils. *Biochem J* **316 (Pt 1)**, 233-8.

Guo, J., Jin, G., Meng, L., Ma, H., Nie, D., Wu, J., Yuan, L., and Shou, C. (2004). Subcellular localization of tumor-associated antigen 3H11Ag. *Biochem Biophys Res Commun* **324**, 922-30.

Gutjahr, P. (1999). Wilms-Tumoren (Nephroblastome). In "Krebs bei Kindern und Jugendlichen; Klinik und Praxis der pädiatrischen Onkologie" (P. Gutjahr, ed.), pp. 370-387. Deutscher Ärzte-Verlag Köln, Köln.

Hammond, K. L., Lettice, L. A., Hill, R. E., Lee, M., Boyle, S., and Hanson, I. M. (1999). Human (DACH) and mouse (Dach) homologues of Drosophila dachshund map to chromosomes 13q22 and 14E3, respectively. *Genomics* **55**, 252-3.

Hayashi, K., Wakino, S., Kanda, T., Homma, K., Sugano, N., and Saruta, T. (2006). Molecular mechanisms and therapeutic strategies of chronic renal injury: role of rho-kinase in the development of renal injury. *J Pharmacol Sci* **100**, 29-33.

Heller, K. N., Gurer, C., and Munz, C. (2006). Virus-specific CD4+ T cells: ready for direct attack. *J Exp Med* **203**, 805-8.

Heubeck, B., Wendler, O., Bumm, K., Schafer, R., Muller-Vogt, U., Hausler, M., Meese, E., Iro, H., and Steinhart, H. (2006). Tumor-associated antigenic pattern in squamous cell carcinomas of the head and neck - Analysed by SEREX. *Eur J Cancer*.

Hishizawa, M., Imada, K., Sakai, T., Ueda, M., and Uchiyama, T. (2005). Identification of APOBEC3B as a potential target for the graft-versus-lymphoma effect by SEREX in a patient with mantle cell lymphoma. *Br J Haematol* **130**, 418-21.

- Hoefnagel, C. A., Kapucu, O., de Kraker, J., van Dongen, A., and Voute, P. A. (1993). Radioimmunoscintigraphy using [¹¹¹In]antimyosin Fab fragments for the diagnosis and follow-up of rhabdomyosarcoma. *Eur J Cancer* **29A**, 2096-100.
- Hong, H. S., Morshed, S. A., Tanaka, S., Fujiwara, T., Ikehara, Y., and Nishioka, M. (1992). Anti-Golgi antibody in rheumatoid arthritis patients recognizes a novel antigen of 79 kDa (doublet) by western blot. *Scand J Immunol* **36**, 785-92.
- Huang, J., Moore, J., Soffer, S., Kim, E., Rowe, D., Manley, C. A., O'Toole, K., Middlesworth, W., Stolar, C., Yamashiro, D., and Kandel, J. (2001). Highly specific antiangiogenic therapy is effective in suppressing growth of experimental Wilms tumors. *J Pediatr Surg* **36**, 357-61.
- Idikio, H. A. (2001). Expression of DNA mismatch repair proteins hMSH2 and hMLH1 and the cyclin G1 inhibitor, p21(waf1/cip1) in pediatric tumors: correlation with response to therapy. *Oncol Rep* **8**, 965-71.
- Iizuka, N., Mori, N., Tamesa, T., Tangoku, A., and Oka, M. (2003). Telomerase activity and Nm23-H2 protein expression in hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res* **23**, 43-7.
- Ishida, H., Matsumura, T., Salgaller, M. L., Ohmizono, Y., Kadono, Y., and Sawada, T. (1996). MAGE-1 and MAGE-3 or -6 expression in neuroblastoma-related pediatric solid tumors. *Int J Cancer* **69**, 375-80.
- Ishikawa, K., Nagase, T., Suyama, M., Miyajima, N., Tanaka, A., Kotani, H., Nomura, N., and Ohara, O. (1998). 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**, 169-76.
- Ji, L., Arcinas, M., and Boxer, L. M. (1995). The transcription factor, Nm23H2, binds to and activates the translocated c-myc allele in Burkitt's lymphoma. *J Biol Chem* **270**, 13392-8.
- Joo, Y. M., Lee, M. A., Lee, Y. M., Kim, M. S., Kim, S. Y., Jeon, E. H., Choi, J. K., Kim, W. H., Lee, H. C., Min, B. I., Kang, H. S., and Kim, C. R. (2004). Identification of chicken nebulin isoforms of the 31-residue motifs and non-muscle nebulin. *Biochem Biophys Res Commun* **325**, 1286-91.
- Jullian, E. H., Kelly, A. M., Pompidou, A. J., Hoffman, R., Schiaffino, S., Stedman, H. H., and Rubinstein, N. A. (1995). Characterization of a human perinatal myosin heavy-chain transcript. *Eur J Biochem* **230**, 1001-6.
- June, C. H. (2007). Adoptive T cell therapy for cancer in the clinic. *J Clin Invest* **117**, 1466-76.
- Kanayama, H., Takigawa, H., and Kagawa, S. (1994). Analysis of nm23 gene expressions in human bladder and renal cancers. *Int J Urol* **1**, 324-31.
- Kaneko, K., Satoh, K., Masamune, A., Satoh, A., and Shimosegawa, T. (2002). Expression of ROCK-1 in human pancreatic cancer: its down-regulation by morpholino oligo antisense can reduce the migration of pancreatic cancer cells in vitro. *Pancreas* **24**, 251-7.
- Karsch-Mizrachi, I., Travis, M., Blau, H., and Leinwand, L. A. (1989). Expression and DNA sequence analysis of a human embryonic skeletal muscle myosin heavy chain gene. *Nucleic Acids Res* **17**, 6167-79.
- Kelsell, D. P., Black, D. M., Solomon, E., and Spurr, N. K. (1993). Localization of a second NM23 gene, NME2, to chromosome 17q21-q22. *Genomics* **17**, 522-4.
- Kenmochi, N., Kawaguchi, T., Rozen, S., Davis, E., Goodman, N., Hudson, T. J., Tanaka, T., and Page, D. C. (1998). A map of 75 human ribosomal protein genes. *Genome Res* **8**, 509-23.
- Kim, J., Kim, S. K., Wang, K. C., Kim, H. Y., and Jeoung, D. (2004). SEREX identification of the autoantibodies that are prevalent in the cerebrospinal fluid of patients with moyamoya disease. *Biotechnol Lett* **26**, 585-8.
- Kim, S. H., Fountoulakis, M., Cairns, N. J., and Lubec, G. (2002). Human brain nucleoside diphosphate kinase activity is decreased in Alzheimer's disease and Down syndrome. *Biochem Biophys Res Commun* **296**, 970-5.

- Kimura, M., Furuta, T., Hiruma, S., Otsuka, K., Teramura, K., Maekura, S., Satou, T., and Hashimoto, S. (1997). Nemaline bodies of skeletal muscle fibers of the neck in a case of pharyngeal cancer. *Pathol Int* **47**, 256-9.
- Knudson, A. G., Jr., and Strong, L. C. (1972). Mutation and cancer: a model for Wilms' tumor of the kidney. *J Natl Cancer Inst* **48**, 313-24.
- Kobayashi, T., Sasaki, Y., Oshima, Y., Yamamoto, H., Mita, H., Suzuki, H., Toyota, M., Tokino, T., Itoh, F., Imai, K., and Shinomura, Y. (2006). Activation of the ribosomal protein L13 gene in human gastrointestinal cancer. *Int J Mol Med* **18**, 161-70.
- Koscielniak, E., Reuland, P., Schilling, F., Feine, U., and Treuner, J. (1990). Radio-immunodetection of myosarcoma using ¹¹¹indium antimyosin. *Klin Padiatr* **202**, 230-4.
- Kozmik, Z., and Cvekl, A. (1999). Localization of the human homologue of the *Drosophila dachshund* gene (DACH) to chromosome 13q21. *Genomics* **59**, 110-1.
- Kozmik, Z., Pfeffer, P., Kralova, J., Paces, J., Paces, V., Kalousova, A., and Cvekl, A. (1999). Molecular cloning and expression of the human and mouse homologues of the *Drosophila dachshund* gene. *Dev Genes Evol* **209**, 537-45.
- Kureishi, Y., Kobayashi, S., Amano, M., Kimura, K., Kanaide, H., Nakano, T., Kaibuchi, K., and Ito, M. (1997). Rho-associated kinase directly induces smooth muscle contraction through myosin light chain phosphorylation. *J Biol Chem* **272**, 12257-60.
- Lai, A., and Frishman, W. H. (2005). Rho-kinase inhibition in the therapy of cardiovascular disease. *Cardiol Rev* **13**, 285-92.
- Lanza, G., Gafa, R., Santini, A., Maestri, I., Guerzoni, L., and Cavazzini, L. (2006). Immunohistochemical test for MLH1 and MSH2 expression predicts clinical outcome in stage II and III colorectal cancer patients. *J Clin Oncol* **24**, 2359-67.
- Le Naour, F. (2001). Contribution of proteomics to tumor immunology. *Proteomics* **1**, 1295-302.
- Leach, F. S., Hsieh, J. T., Molberg, K., Saboorian, M. H., McConnell, J. D., and Sagalowsky, A. I. (2000). Expression of the human mismatch repair gene hMSH2: a potential marker for urothelial malignancy. *Cancer* **88**, 2333-41.
- Lee, M., Kistler, C., Hartmann, T. B., Li, F., Dummer, R., Dippel, E., Booken, N., Klemke, C. D., Schadendorf, D., and Eichmuller, S. B. (2007). Immunoscreeing of a cutaneous T-cell lymphoma library for plasma membrane proteins. *Cancer Immunol Immunother* **56**, 783-95.
- Leone, A., Seeger, R. C., Hong, C. M., Hu, Y. Y., Arboleda, M. J., Brodeur, G. M., Stram, D., Slamon, D. J., and Steeg, P. S. (1993). Evidence for nm23 RNA overexpression, DNA amplification and mutation in aggressive childhood neuroblastomas. *Oncogene* **8**, 855-65.
- Li, C. M., Guo, M., Borczuk, A., Powell, C. A., Wei, M., Thaker, H. M., Friedman, R., Klein, U., and Tycko, B. (2002). Gene expression in Wilms' tumor mimics the earliest committed stage in the metanephric mesenchymal-epithelial transition. *Am J Pathol* **160**, 2181-90.
- Li, G., Miles, A., Line, A., and Rees, R. C. (2004). Identification of tumour antigens by serological analysis of cDNA expression cloning. *Cancer Immunol Immunother* **53**, 139-43.
- Lin, R. Y., Argenta, P. A., Sullivan, K. M., and Adzick, N. S. (1995). Diagnostic and prognostic role of basic fibroblast growth factor in Wilms' tumor patients. *Clin Cancer Res* **1**, 327-31.
- Lonergan, G. J., Martinez-Leon, M. I., Agrons, G. A., Montemarano, H., and Suarez, E. S. (1998). Nephrogenic rests, nephroblastomatosis, and associated lesions of the kidney. *Radiographics* **18**, 947-68.
- Luke, M. R., Kjer-Nielsen, L., Brown, D. L., Stow, J. L., and Gleeson, P. A. (2003). GRIP domain-mediated targeting of two new coiled-coil proteins, GCC88 and GCC185, to subcompartments of the trans-Golgi network. *J Biol Chem* **278**, 4216-26.

- Lum, L. G., Davol, P. A., and Lee, R. J. (2006). The new face of bispecific antibodies: targeting cancer and much more. *Exp Hematol* **34**, 1-6.
- Maekawa, M., Ishizaki, T., Boku, S., Watanabe, N., Fujita, A., Iwamatsu, A., Obinata, T., Ohashi, K., Mizuno, K., and Narumiya, S. (1999). Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science* **285**, 895-8.
- Malkin, D., Sexsmith, E., Yeger, H., Williams, B. R., and Coppes, M. J. (1994). Mutations of the p53 tumor suppressor gene occur infrequently in Wilms' tumor. *Cancer Res* **54**, 2077-9.
- Mandelboim, O., Berke, G., Fridkin, M., Feldman, M., Eisenstein, M., and Eisenbach, L. (1994). CTL induction by a tumour-associated antigen octapeptide derived from a murine lung carcinoma. *Nature* **369**, 67-71.
- Martelange, V., De Smet, C., De Plaen, E., Lurquin, C., and Boon, T. (2000). Identification on a human sarcoma of two new genes with tumor-specific expression. *Cancer Res* **60**, 3848-55.
- Matzinger, P. (1994). Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* **12**, 991-1045.
- Mayet, W. J., Hermann, E., Csernok, E., Knuth, A., Poralla, T., Gross, W. L., and Meyer zum Buschenfelde, K. H. (1991). 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**, 57-68.
- Merguerian, P. A., and Chang, B. (2002). Pediatric genitourinary tumors. *Curr Opin Oncol* **14**, 273-9.
- Metzger, M. L., Stewart, C. F., Freeman, B. B., 3rd, Billups, C. A., Hoffer, F. A., Wu, J., Coppes, M. J., Grant, R., Chintagumpala, M., Mullen, E. A., Alvarado, C., Daw, N. C., and Dome, J. S. (2007). Topotecan is active against Wilms' tumor: results of a multi-institutional phase II study. *J Clin Oncol* **25**, 3130-6.
- Miller, M. A., Karacay, B., Breslow, N. E., Li, S., O'Dorisio, M. S., Grundy, P. E., and Sandler, A. D. (2005). Prognostic value of quantifying apoptosis factor expression in favorable histology wilms tumors. *J Pediatr Hematol Oncol* **27**, 11-4.
- Miyagawa, K., Kent, J., Moore, A., Charliou, J. P., Little, M. H., Williamson, K. A., Kelsey, A., Brown, K. W., Hassam, S., Briner, J., Hayashi, Y., Hirai, H., Yazaki, Y., van Heyningen, V., and Hastie, N. D. (1998). Loss of WT1 function leads to ectopic myogenesis in Wilms' tumour. *Nat Genet* **18**, 15-7.
- Miyaji, K., Nakagawa, Y., Matsumoto, K., Yoshida, H., Morikawa, H., Hongou, Y., Arisaka, Y., Kojima, H., Inoue, T., Hirata, I., Katsu, K., and Akao, Y. (2003). Overexpression of a DEAD box/RNA helicase protein, rck/p54, in human hepatocytes from patients with hepatitis C virus-related chronic hepatitis and its implication in hepatocellular carcinogenesis. *J Viral Hepat* **10**, 241-8.
- Moran, C. J., Friel, A. M., Smith, T. J., Cairns, M., and Morrison, J. J. (2002). Expression and modulation of Rho kinase in human pregnant myometrium. *Mol Hum Reprod* **8**, 196-200.
- Muranski, P., Boni, A., Wrzesinski, C., Citrin, D. E., Rosenberg, S. A., Childs, R., and Restifo, N. P. (2006). Increased intensity lymphodepletion and adoptive immunotherapy--how far can we go? *Nat Clin Pract Oncol* **3**, 668-81.
- Myeroff, L. L., and Markowitz, S. D. (1993). Increased nm23-H1 and nm23-H2 messenger RNA expression and absence of mutations in colon carcinomas of low and high metastatic potential. *J Natl Cancer Inst* **85**, 147-52.
- Nagan, N., and O'Kane, D. J. (2001). Validation of a single nucleotide polymorphism genotyping assay for the human serum paraoxonase gene using electronically active customized microarrays. *Clin Biochem* **34**, 589-92.
- Nakagawa, Y., Morikawa, H., Hirata, I., Shiozaki, M., Matsumoto, A., Maemura, K., Nishikawa, T., Niki, M., Tanigawa, N., Ikegami, M., Katsu, K., and Akao, Y. (1999). Overexpression of rck/p54, a DEAD box protein, in human colorectal tumours. *Br J Cancer* **80**, 914-7.

- Nakagawa, Y., Tsumatani, K., Kurumatani, N., Cho, M., Kitahori, Y., Konishi, N., Ozono, S., Okajima, E., Hirao, Y., and Hiasa, Y. (1998). Prognostic value of nm23 protein expression in renal cell carcinomas. *Oncology* **55**, 370-6.
- Nestle, F. O. (2000). Dendritic cell vaccination for cancer therapy. *Oncogene* **19**, 6673-9.
- Neville, H. L., and Ritchey, M. L. (2000). Wilms' tumor. Overview of National Wilms' Tumor Study Group results. *Urol Clin North Am* **27**, 435-42.
- Nicholaou, T., Ebert, L., Davis, I. D., Robson, N., Klein, O., Maraskovsky, E., Chen, W., and Cebon, J. (2006). Directions in the immune targeting of cancer: lessons learned from the cancer-testis Ag NY-ESO-1. *Immunol Cell Biol* **84**, 303-17.
- Nijhuis, E. R., Nijman, H. W., Oien, K. A., Bell, A., ten Hoor, K. A., Reesink-Peters, N., Boezen, H. M., Hollema, H., and van der Zee, A. G. (2007). Loss of MSH2 protein expression is a risk factor in early stage cervical cancer. *J Clin Pathol* **60**, 824-30.
- Nishikawa, H., Tanida, K., Ikeda, H., Sakakura, M., Miyahara, Y., Aota, T., Mukai, K., Watanabe, M., Kuribayashi, K., Old, L. J., and Shiku, H. (2001). Role of SEREX-defined immunogenic wild-type cellular molecules in the development of tumor-specific immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 14571-6.
- Nykanen, P., Alastalo, T. P., Ahlskog, J., Horelli-Kuitunen, N., Pirkkala, L., and Sistonen, L. (2001). Genomic organization and promoter analysis of the human heat shock factor 2 gene. *Cell Stress Chaperones* **6**, 377-85.
- Ofman, R., Hetteema, E. H., Hogenhout, E. M., Caruso, U., Muijsers, A. O., and Wanders, R. J. (1998). Acyl-CoA: dihydroxyacetonephosphate acyltransferase: cloning of the human cDNA and resolution of the molecular basis in rhizomelic chondrodysplasia punctata type 2. *Hum Mol Genet* **7**, 847-53.
- Okabe-Kado, J., Kasukabe, T., and Honma, Y. (1998). Differentiation inhibitory factor Nm23 as a prognostic factor for acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* **32**, 19-28.
- Okabe-Kado, J., Kasukabe, T., and Honma, Y. (2002). Expression of cell surface NM23 proteins of human leukemia cell lines of various cellular lineage and differentiation stages. *Leuk Res* **26**, 569-76.
- Okada, T., Akada, M., Fujita, T., Iwata, T., Goto, Y., Kido, K., Matsuzaki, Y., Kobayashi, K., Matsuno, S., Sunamura, M., and Kawakami, Y. (2006). A novel cancer testis antigen that is frequently expressed in pancreatic, lung, and endometrial cancers. *Clin Cancer Res* **12**, 191-7.
- Okada, T., Noji, S., Goto, Y., Iwata, T., Fujita, T., Matsuzaki, Y., Kuwana, M., Hirakata, M., Horii, A., Matsuno, S., Sunamura, M., and Kawakami, Y. (2005). Immune responses to DNA mismatch repair enzymes hMSH2 and hPMS1 in patients with pancreatic cancer, dermatomyositis and polymyositis. *Int J Cancer* **116**, 925-33.
- Old, L. J. (1981). Cancer immunology: the search for specificity--G. H. A. Clowes Memorial lecture. *Cancer Res* **41**, 361-75.
- Orphanides, G., Wu, W. H., Lane, W. S., Hampsey, M., and Reinberg, D. (1999). The chromatin-specific transcription elongation factor FACT comprises human SPT16 and SSRP1 proteins. *Nature* **400**, 284-8.
- Pardoll, D. M., and Topalian, S. L. (1998). The role of CD4+ T cell responses in antitumor immunity. *Curr Opin Immunol* **10**, 588-94.
- Pastore, G., Znaor, A., Spreafico, F., Graf, N., Pritchard-Jones, K., and Steliarova-Foucher, E. (2006). Malignant renal tumours incidence and survival in European children (1978-1997): report from the Automated Childhood Cancer Information System project. *Eur J Cancer* **42**, 2103-14.
- Pelin, K., Donner, K., Holmberg, M., Jungbluth, H., Muntoni, F., and Wallgren-Pettersson, C. (2002). Nebulin mutations in autosomal recessive nemaline myopathy: an update. *Neuromuscul Disord* **12**, 680-6.
- Pieper, R., Christian, R. E., Gonzales, M. I., Nishimura, M. I., Gupta, G., Settlage, R. E., Shabanowitz, J., Rosenberg, S. A., Hunt, D. F., and Topalian, S. L. (1999). Biochemical identification of a mutated human melanoma antigen recognized by CD4(+) T cells. *J Exp Med* **189**, 757-66.

- Pinthus, J. H., Fridman, E., Dekel, B., Goldberg, I., Kaufman-Francis, K., Eshhar, Z., Harmelin, A., Rechavi, G., Mor, O., Ramon, J., and Mor, Y. (2004). ErbB2 is a tumor associated antigen and a suitable therapeutic target in Wilms tumor. *J Urol* **172**, 1644-8.
- Planting, A., Verweij, J., Cox, P., Pillay, M., and Stoter, G. (1990). Radioimmunodetection in rhabdo- and leiomyosarcoma with ¹¹¹In-anti-myosin monoclonal antibody complex. *Cancer Res* **50**, 955s-957s.
- Portlock, C. S., Boland, P., Hays, A. P., Antonescu, C. R., and Rosenblum, M. K. (2003). Nematine myopathy: a possible late complication of Hodgkin's disease therapy. *Hum Pathol* **34**, 816-8.
- Postel, E. H., Berberich, S. J., Flint, S. J., and Ferrone, C. A. (1993). Human c-myc transcription factor PuF identified as nm23-H2 nucleoside diphosphate kinase, a candidate suppressor of tumor metastasis. *Science* **261**, 478-80.
- Powers, M. V., and Workman, P. (2007). Inhibitors of the heat shock response: biology and pharmacology. *FEBS Lett* **581**, 3758-69.
- Rasmussen, L. J., Rasmussen, M., Lee, B., Rasmussen, A. K., Wilson, D. M., 3rd, Nielsen, F. C., and Bisgaard, H. C. (2000). Identification of factors interacting with hMSH2 in the fetal liver utilizing the yeast two-hybrid system. In vivo interaction through the C-terminal domains of hEXO1 and hMSH2 and comparative expression analysis. *Mutat Res* **460**, 41-52.
- Renkvist, N., Castelli, C., Robbins, P. F., and Parmiani, G. (2001). A listing of human tumor antigens recognized by T cells. *Cancer Immunol Immunother* **50**, 3-15.
- Robakis, N. K., Wisniewski, H. M., Jenkins, E. C., Devine-Gage, E. A., Houck, G. E., Yao, X. L., Ramakrishna, N., Wolfe, G., Silverman, W. P., and Brown, W. T. (1987). Chromosome 21q21 sublocalisation of gene encoding beta-amyloid peptide in cerebral vessels and neuritic (senile) plaques of people with Alzheimer disease and Down syndrome. *Lancet* **1**, 384-5.
- Robbins, P. F., El-Gamil, M., Li, Y. F., Kawakami, Y., Loftus, D., Appella, E., and Rosenberg, S. A. (1996). A mutated beta-catenin gene encodes a melanoma-specific antigen recognized by tumor infiltrating lymphocytes. *J Exp Med* **183**, 1185-92.
- Rodriguez, J. L., Gelpi, C., Thomson, T. M., Real, F. J., and Fernandez, J. (1982). Anti-golgi complex autoantibodies in a patient with Sjogren syndrome and lymphoma. *Clin Exp Immunol* **49**, 579-86.
- Rosenberg, S. A. (2001). Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature* **411**, 380-4.
- Rosenberg, S. A., Lotze, M. T., Muul, L. M., Chang, A. E., Avis, F. P., Leitman, S., Linehan, W. M., Robertson, C. N., Lee, R. E., Rubin, J. T., and et al. (1987). A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone. *N Engl J Med* **316**, 889-97.
- Rossie, K. M., Piesco, N. P., Charley, M. R., Oddis, C. V., Steen, V. D., Fratto, J., and Deng, J. S. (1992). A monoclonal antibody recognizing Golgi apparatus produced using affinity purified material from a patient with connective tissue disease. *Scand J Rheumatol* **21**, 109-15.
- Rutkowski, S., De Vleeschouwer, S., Kaempgen, E., Wolff, J. E., Kuhl, J., Demaerel, P., Warmuth-Metz, M., Flamen, P., Van Calenbergh, F., Plets, C., Sorensen, N., Opitz, A., and Van Gool, S. W. (2004). Surgery and adjuvant dendritic cell-based tumour vaccination for patients with relapsed malignant glioma, a feasibility study. *Br J Cancer* **91**, 1656-62.
- Sahin, U., Tureci, O., Schmitt, H., Cochlovius, B., Johannes, T., Schmits, R., Stenner, F., Luo, G., Schobert, I., and Pfreundschuh, M. (1995). Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 11810-3.
- Sampson, J. H., Akabani, G., Archer, G. E., Bigner, D. D., Berger, M. S., Friedman, A. H., Friedman, H. S., Herndon, J. E., 2nd, Kunwar, S., Marcus, S., McLendon, R. E., Paolino, A., Penne, K., Provenzale, J., Quinn, J., Reardon, D. A., Rich, J., Stenzel, T., Tourt-Uhlig, S., Wikstrand, C., Wong, T., Williams, R., Yuan, F., Zalutsky, M. R., and Pastan, I. (2003). Progress report of a Phase I study of the intracerebral microinfusion of a recombinant chimeric protein composed of transforming growth factor (TGF)-alpha and a mutated form of the Pseudomonas exotoxin termed PE-38 (TP-38) for the treatment of malignant brain tumors. *J Neurooncol* **65**, 27-35.

Sampson, J. H., Reardon, D. A., Friedman, A. H., Friedman, H. S., Coleman, R. E., McLendon, R. E., Pastan, I., and Bigner, D. D. (2005). Sustained radiographic and clinical response in patient with bifrontal recurrent glioblastoma multiforme with intracerebral infusion of the recombinant targeted toxin TP-38: case study. *Neuro-oncol* **7**, 90-6.

Santoro, P., De Andrea, M., Migliaretti, G., Trapani, C., Landolfo, S., and Gariglio, M. (2002). High prevalence of autoantibodies against the nuclear high mobility group (HMG) protein SSRP1 in sera from patients with systemic lupus erythematosus, but not other rheumatic diseases. *J Rheumatol* **29**, 90-3.

Satoh, Y., Nakadate, H., Nakagawachi, T., Higashimoto, K., Joh, K., Masaki, Z., Uozumi, J., Kaneko, Y., Mukai, T., and Soejima, H. (2006). Genetic and epigenetic alterations on the short arm of chromosome 11 are involved in a majority of sporadic Wilms' tumours. *Br J Cancer* **95**, 541-7.

Sayer, J. A., Otto, E. A., O'Toole, J. F., Nurnberg, G., Kennedy, M. A., Becker, C., Hennies, H. C., Helou, J., Attanasio, M., Fausett, B. V., Utsch, B., Khanna, H., Liu, Y., Drummond, I., Kawakami, I., Kusakabe, T., Tsuda, M., Ma, L., Lee, H., Larson, R. G., Allen, S. J., Wilkinson, C. J., Nigg, E. A., Shou, C., Lillo, C., Williams, D. S., Hoppe, B., Kemper, M. J., Neuhaus, T., Parisi, M. A., Glass, I. A., Petry, M., Kispert, A., Gloy, J., Ganner, A., Walz, G., Zhu, X., Goldman, D., Nurnberg, P., Swaroop, A., Leroux, M. R., and Hildebrandt, F. (2006). The centrosomal protein nephrocystin-6 is mutated in Joubert syndrome and activates transcription factor ATF4. *Nat Genet* **38**, 674-81.

Scanlan, M. J., Chen, Y. T., Williamson, B., Gure, A. O., Stockert, E., Gordan, J. D., Tureci, O., Sahin, U., Pfreundschuh, M., and Old, L. J. (1998). Characterization of human colon cancer antigens recognized by autologous antibodies. *Int J Cancer* **76**, 652-8.

Schiaffino, S., Askanas, V., Engel, W. K., Vitadello, M., and Sartore, S. (1982). Myosin isoenzymes in cultured human muscle. *Arch Neurol* **39**, 347-9.

Schmits, R., Cochlovius, B., Treitz, G., Regitz, E., Ketter, R., Preuss, K. D., Romeike, B. F., and Pfreundschuh, M. (2002). Analysis of the antibody repertoire of astrocytoma patients against antigens expressed by gliomas. *Int J Cancer* **98**, 73-7.

Schutgens, R. B., Heymans, H. S., Purvis, R., Wanders, R. J., Schrakamp, G., and van den Bosch, H. (1984). [Diagnosis of Zellweger's cerebrohepato-renal syndrome]. *Tijdschr Kindergeneesk* **52**, 231-8.

Seelig, H. P., Schranz, P., Schroter, H., Wiemann, C., and Renz, M. (1994). Macrogolgin--a new 376 kD Golgi complex outer membrane protein as target of antibodies in patients with rheumatic diseases and HIV infections. *J Autoimmun* **7**, 67-91.

Seifert, M., and Reichrath, J. (2006). The role of the human DNA mismatch repair gene hMSH2 in DNA repair, cell cycle control and apoptosis: implications for pathogenesis, progression and therapy of cancer. *J Mol Histol* **37**, 301-7.

Senties-Madrid, H., and Vega-Boada, F. (2001). Paraneoplastic syndromes associated with anti-Hu antibodies. *Isr Med Assoc J* **3**, 94-103.

Shu, J., He, X. J., and Li, G. C. (2006). Construction of cDNA library from NPC tissue and screening of antigenic genes. *Cell Mol Immunol* **3**, 53-7.

Simons, A., Ruppert, T., Schmidt, C., Schlicksupp, A., Pipkorn, R., Reed, J., Masters, C. L., White, A. R., Cappai, R., Beyreuther, K., Bayer, T. A., and Multhaup, G. (2002). Evidence for a copper-binding superfamily of the amyloid precursor protein. *Biochemistry* **41**, 9310-20.

Simpson, A. J., Caballero, O. L., Jungbluth, A., Chen, Y. T., and Old, L. J. (2005). Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nat Rev Cancer* **5**, 615-25.

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., and Engelhard, V. H. (1996). 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**, 527-34.

Skotnicka-Klonowicz, G., Kobos, J., Los, E., Trejster, E., Szymik-Kantorowicz, S., and Daszkiewicz, P. (2002). Prognostic value of proliferating cell nuclear antigen in Wilms' tumour in children. *Eur J Surg Oncol* **28**, 67-71.

- Slade, R. F., Hunt, D. A., Pochet, M. M., Venema, V. J., and Hennigar, R. A. (2003). Characterization and inhibition of fatty acid synthase in pediatric tumor cell lines. *Anticancer Res* **23**, 1235-43.
- Sobajima, J., Ozaki, S., Uesugi, H., Osakada, F., Inoue, M., Fukuda, Y., Shirakawa, H., Yoshida, M., Rokuhara, A., Imai, H., Kiyosawa, K., and Nakao, K. (1999). High mobility group (HMG) non-histone chromosomal proteins HMG1 and HMG2 are significant target antigens of perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in autoimmune hepatitis. *Gut* **44**, 867-73.
- Soffer, S. Z., Kim, E., Moore, J. T., Huang, J., Yokoi, A., Manley, C., O'Toole, K., Middlesworth, W., Stolar, C., Yamashiro, D., and Kandel, J. (2001). Novel use of an established agent: Topotecan is anti-angiogenic in experimental Wilms tumor. *J Pediatr Surg* **36**, 1781-4.
- Somasundaram, R., Satyamoorthy, K., Caputo, L., Yssel, H., and Herlyn, D. (2004). Detection of HLA class II-dependent T helper antigen using antigen phage display. *Clin Exp Immunol* **135**, 247-52.
- Soreide, K. (2007). Molecular testing for microsatellite instability and DNA mismatch repair defects in hereditary and sporadic colorectal cancers--ready for prime time? *Tumour Biol* **28**, 290-300.
- Sredni, S. T., de Camargo, B., Lopes, L. F., Teixeira, R., and Simpson, A. (2001). Immunohistochemical detection of p53 protein expression as a prognostic indicator in Wilms tumor. *Med Pediatr Oncol* **37**, 455-8.
- Srivastava, T., Chattopadhyay, P., Mahapatra, A. K., Sarkar, C., and Sinha, S. (2004). Increased hMSH2 protein expression in glioblastoma multiforme. *J Neurooncol* **66**, 51-7.
- Stedman, H., Browning, K., Oliver, N., Oronzi-Scott, M., Fischbeck, K., Sarkar, S., Sylvester, J., Schmickel, R., and Wang, K. (1988). Nebulin cDNAs detect a 25-kilobase transcript in skeletal muscle and localize to human chromosome 2. *Genomics* **2**, 1-7.
- Stinton, L. M., Eystathioy, T., Selak, S., Chan, E. K., and Fritzler, M. J. (2004). Autoantibodies to protein transport and messenger RNA processing pathways: endosomes, lysosomes, Golgi complex, proteasomes, assemblyosomes, exosomes, and GW bodies. *Clin Immunol* **110**, 30-44.
- Sugiura, N., Patel, R. G., and Corriveau, R. A. (2001). N-methyl-D-aspartate receptors regulate a group of transiently expressed genes in the developing brain. *J Biol Chem* **276**, 14257-63.
- Tachibana, E., Harada, T., Shibuya, M., Saito, K., Takayasu, M., Suzuki, Y., and Yoshida, J. (1999). Intra-arterial infusion of fasudil hydrochloride for treating vasospasm following subarachnoid haemorrhage. *Acta Neurochir (Wien)* **141**, 13-9.
- Takahashi, N., Tuiki, H., Saya, H., and Kaibuchi, K. (1999). Localization of the gene coding for ROCK II/Rho kinase on human chromosome 2p24. *Genomics* **55**, 235-7.
- Taratuto, A. L. (2002). Congenital myopathies and related disorders. *Curr Opin Neurol* **15**, 553-61.
- Taubert, H. W., Bartel, F., Kappler, M., Schuster, K., Meye, A., Lautenschlager, C., Thamm-Mucke, B., Bache, M., Schmidt, H., Holzhausen, H. J., and Wurl, P. (2003). Reduced expression of hMSH2 protein is correlated to poor survival for soft tissue sarcoma patients. *Cancer* **97**, 2273-8.
- Thai, T. P., Heid, H., Rackwitz, H. R., Hunziker, A., Gorgas, K., and Just, W. W. (1997). Ether lipid biosynthesis: isolation and molecular characterization of human dihydroxyacetonephosphate acyltransferase. *FEBS Lett* **420**, 205-11.
- Thai, T. P., Rodemer, C., Jauch, A., Hunziker, A., Moser, A., Gorgas, K., and Just, W. W. (2001). Impaired membrane traffic in defective ether lipid biosynthesis. *Hum Mol Genet* **10**, 127-36.
- Theisinger, B., Engel, M., Seifert, M., Seitz, G., and Welter, C. (1998). NM23-H1 and NM23-H2 gene expression in human renal tumors. *Anticancer Res* **18**, 1185-9.
- Tokunaga, Y., Urano, T., Furukawa, K., Kondo, H., Kanematsu, T., and Shiku, H. (1993). Reduced expression of nm23-H1, but not of nm23-H2, is concordant with the frequency of lymph-node metastasis of human breast cancer. *Int J Cancer* **55**, 66-71.
- Tonin, P. N., Scrable, H., Shimada, H., and Cavenee, W. K. (1991). Muscle-specific gene expression in rhabdomyosarcomas and stages of human fetal skeletal muscle development. *Cancer Res* **51**, 5100-6.

- Trauger, J. W., Lin, F. F., Turner, M. S., Stephens, J., and LoGrasso, P. V. (2002). Kinetic mechanism for human Rho-Kinase II (ROCK-II). *Biochemistry* **41**, 8948-53.
- Tsai, T. C., Lee, Y. L., Hsiao, W. C., Tsao, Y. P., and Chen, S. L. (2005). NRIP, a novel nuclear receptor interaction protein, enhances the transcriptional activity of nuclear receptors. *J Biol Chem* **280**, 20000-9.
- Tureci, O., Sahin, U., Koslowski, M., Buss, B., Bell, C., Ballweber, P., Zwick, C., Eberle, T., Zuber, M., Villena-Heinsen, C., Seitz, G., and Pfreundschuh, M. (2002). A novel tumour associated leucine zipper protein targeting to sites of gene transcription and splicing. *Oncogene* **21**, 3879-88.
- Tureci, O., Sahin, U., and Pfreundschuh, M. (1997). Serological analysis of human tumor antigens: molecular definition and implications. *Mol Med Today* **3**, 342-9.
- Ueda, R., Iizuka, Y., Yoshida, K., Kawase, T., Kawakami, Y., and Toda, M. (2004). Identification of a human glioma antigen, SOX6, recognized by patients' sera. *Oncogene* **23**, 1420-7.
- Uehara, H., Miyamoto, M., Kato, K., Cho, Y., Kurokawa, T., Murakami, S., Fukunaga, A., Ebihara, Y., Kaneko, H., Hashimoto, H., Murakami, Y., Shichinohe, T., Kawarada, Y., Itoh, T., Okushiba, S., Kondo, S., and Katoh, H. (2005). Deficiency of hMLH1 and hMSH2 expression is a poor prognostic factor in esophageal squamous cell carcinoma. *J Surg Oncol* **92**, 109-15.
- Uemura, M., Nouse, K., Kobayashi, Y., Tanaka, H., Nakamura, S., Higashi, T., Ono, T., Nakayama, E., Hanafusa, T., and Shiratori, Y. (2003). Identification of the antigens predominantly reacted with serum from patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer* **97**, 2474-9.
- Vaarala, M. H., Porvari, K. S., Kyllonen, A. P., Mustonen, M. V., Lukkarinen, O., and Vihko, P. T. (1998). Several genes encoding ribosomal proteins are over-expressed in prostate-cancer cell lines: confirmation of L7a and L37 over-expression in prostate-cancer tissue samples. *Int J Cancer* **78**, 27-32.
- Valente, E. M., Silhavy, J. L., Brancati, F., Barrano, G., Krishnaswami, S. R., Castori, M., Lancaster, M. A., Boltshauser, E., Boccone, L., Al-Gazali, L., Fazzi, E., Signorini, S., Louie, C. M., Bellacchio, E., Bertini, E., Dallapiccola, B., and Gleeson, J. G. (2006). Mutations in CEP290, which encodes a centrosomal protein, cause pleiotropic forms of Joubert syndrome. *Nat Genet* **38**, 623-5.
- Van den Bosch, G. A., Ponsaerts, P., Vanham, G., Van Bockstaele, D. R., Berneman, Z. N., and Van Tendeloo, V. F. (2006). Cellular immunotherapy for cytomegalovirus and HIV-1 infection. *J Immunother (1997)* **29**, 107-21.
- Van den Eynde, B. J., and Boon, T. (1997). Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Int J Clin Lab Res* **27**, 81-6.
- Van den Eynde, B. J., and van der Bruggen, P. (1997). T cell defined tumor antigens. *Curr Opin Immunol* **9**, 684-93.
- van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van den Eynde, B., Knuth, A., and Boon, T. (1991). A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* **254**, 1643-7.
- Velders, M. P., Markiewicz, M. A., Eiben, G. L., and Kast, W. M. (2003). CD4+ T cell matters in tumor immunity. *Int Rev Immunol* **22**, 113-40.
- Vicente-Manzanares, M., Cabrero, J. R., Rey, M., Perez-Martinez, M., Ursa, A., Itoh, K., and Sanchez-Madrid, F. (2002). A role for the Rho-p160 Rho coiled-coil kinase axis in the chemokine stromal cell-derived factor-1alpha-induced lymphocyte actomyosin and microtubular organization and chemotaxis. *J Immunol* **168**, 400-10.
- Vujanic, G. M., Sandstedt, B., Harms, D., Kelsey, A., Leuschner, I., and de Kraker, J. (2002). Revised International Society of Paediatric Oncology (SIOP) working classification of renal tumors of childhood. *Med Pediatr Oncol* **38**, 79-82.
- Wakimoto, N., Yokoyama, A., Okabe-Kado, J., Nagata, N., Motoyoshi, K., and Honma, Y. (1998). Combined analysis of differentiation inhibitory factor nm23-H1 and nm23-H2 as prognostic factors in acute myeloid leukaemia. *Br J Cancer* **77**, 2298-303.

- Wallgren-Pettersson, C., Lehtokari, V. L., Kalimo, H., Paetau, A., Nuutinen, E., Hackman, P., Sewry, C., Pelin, K., and Udd, B. (2007). Distal myopathy caused by homozygous missense mutations in the nebulin gene. *Brain* **130**, 1465-76.
- Walsh, D., Li, Z., Wu, Y., and Nagata, K. (1997). Heat shock and the role of the HSPs during neural plate induction in early mammalian CNS and brain development. *Cell Mol Life Sci* **53**, 198-211.
- Wang, C., Wang, Y., Su, X., Lin, B., Xu, X., Zhang, M., Li, J., and Xu, G. (2000). [Iodine-125 labeled monoclonal antibody 3H11: in radioimmunoguided surgery for primary gastric cancer]. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* **38**, 507-9.
- Wang, K., Knipfer, M., Huang, Q. Q., van Heerden, A., Hsu, L. C., Gutierrez, G., Quian, X. L., and Stedman, H. (1996). Human skeletal muscle nebulin sequence encodes a blueprint for thin filament architecture. Sequence motifs and affinity profiles of tandem repeats and terminal SH3. *J Biol Chem* **271**, 4304-14.
- Wang, Y., and Guthrie, C. (1998). PRP16, a DEAH-box RNA helicase, is recruited to the spliceosome primarily via its nonconserved N-terminal domain. *Rna* **4**, 1216-29.
- Webster, C., Silberstein, L., Hays, A. P., and Blau, H. M. (1988). Fast muscle fibers are preferentially affected in Duchenne muscular dystrophy. *Cell* **52**, 503-13.
- Wei, S. M. (1989). [Monoclonal antibodies against gastric cancer and their selective reaction on various tissues]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* **11**, 162-4.
- Weirich, A., Ludwig, R., Graf, N., Abel, U., Leuschner, I., Vujanic, G. M., Mehls, O., Boos, J., Beck, J., Royer-Pokora, B., and Voute, P. A. (2004). Survival in nephroblastoma treated according to the trial and study SIOP-9/GPOH with respect to relapse and morbidity. *Ann Oncol* **15**, 808-20.
- Weiss, A., Schiaffino, S., and Leinwand, L. A. (1999). Comparative sequence analysis of the complete human sarcomeric myosin heavy chain family: implications for functional diversity. *J Mol Biol* **290**, 61-75.
- Whalen, R. G., Sell, S. M., Butler-Browne, G. S., Schwartz, K., Bouveret, P., and Pinset-Harstom, I. (1981). Three myosin heavy-chain isozymes appear sequentially in rat muscle development. *Nature* **292**, 805-9.
- Willems, R., Van Bockstaele, D. R., Lardon, F., Lenjou, M., Nijs, G., Snoeck, H. W., Berneman, Z. N., and Slegers, H. (1998). Decrease in nucleoside diphosphate kinase (NDPK/nm23) expression during hematopoietic maturation. *J Biol Chem* **273**, 13663-8.
- Wong, L. Y., Chan, S. H., and Oon, C. J. (1990). Detection of tumour antigens in sera of patients with hepatocellular carcinoma using monoclonal antibodies. *Asian Pac J Allergy Immunol* **8**, 83-6.
- Wu, K., Li, A., Rao, M., Liu, M., Dailey, V., Yang, Y., Di Vizio, D., Wang, C., Lisanti, M. P., Sauter, G., Russell, R. G., Cvekl, A., and Pestell, R. G. (2006). DACH1 is a cell fate determination factor that inhibits cyclin D1 and breast tumor growth. *Mol Cell Biol* **26**, 7116-29.
- Wuelling, M., Delling, G., and Kaiser, E. (2004). Differential gene expression in stromal cells of human giant cell tumor of bone. *Virchows Arch* **445**, 621-30.
- Xu, W., and Neckers, L. (2007). Targeting the molecular chaperone heat shock protein 90 provides a multifaceted effect on diverse cell signaling pathways of cancer cells. *Clin Cancer Res* **13**, 1625-9.
- Yamaguchi, A., Urano, T., Goi, T., Takeuchi, K., Niimoto, S., Nakagawara, G., Furukawa, K., and Shiku, H. (1994). Expression of human nm23-H1 and nm23-H2 proteins in hepatocellular carcinoma. *Cancer* **73**, 2280-4.
- Yang, L., Han, Y., Suarez Saiz, F., and Minden, M. D. (2007). A tumor suppressor and oncogene: the WT1 story. *Leukemia* **21**, 868-76.
- Yannelli, J. R., and Wroblewski, J. M. (2004). On the road to a tumor cell vaccine: 20 years of cellular immunotherapy. *Vaccine* **23**, 97-113.
- Yarnell, A. T., Oh, S., Reinberg, D., and Lippard, S. J. (2001). Interaction of FACT, SSRP1, and the high mobility group (HMG) domain of SSRP1 with DNA damaged by the anticancer drug cisplatin. *J Biol Chem* **276**, 25736-41.

- Yashima, K., Maitra, A., Timmons, C. F., Rogers, B. B., Pinar, H., Shay, J. W., and Gazdar, A. F. (1998). Expression of the RNA component of telomerase in wilms tumor and nephrogenic rest recapitulates renal embryogenesis. *Human Pathology* **29**, 536-542.
- Ying, H., Biroc, S. L., Li, W. W., Aliche, B., Xuan, J. A., Pagila, R., Ohashi, Y., Okada, T., Kamata, Y., and Dinter, H. (2006). The Rho kinase inhibitor fasudil inhibits tumor progression in human and rat tumor models. *Mol Cancer Ther* **5**, 2158-64.
- Yokoi, A., McCrudden, K. W., Huang, J., Kim, E. S., Soffer, S. Z., Frischer, J. S., Serur, A., New, T., Yuan, J., and Mansukhani, M. (2003). Human epidermal growth factor receptor signaling contributes to tumor growth via angiogenesis in her2/neu-expressing experimental Wilms's tumor. *Journal of Pediatric Surgery* **38**, 1569-1573.
- Zamecnik, M., Mukensnabl, P., and Kracik, M. (2004). Nemaline myopathy in neck muscle after radiotherapy. *Hum Pathol* **35**, 642-3.
- Zarour, H. M., DeLeo, A., Finn, O. J., and Storkus, W. J. (2003). Tumor Antigens. In "Cancer Medicine" (D. W. Kufe, R. E. Pollock, R. R. Weichselbaum, R. C. Bast, T. S. Gausler, J. F. Holland and E. Frei, eds.), Vol. 6, pp. 196-208. BC Decker Inc., Hamilton, London.
- Zeviani, M., Darras, B. T., Rizzuto, R., Salviati, G., Betto, R., Bonilla, E., Miranda, A. F., Du, J., Samitt, C., Dickson, G., and et al. (1988). Cloning and expression of human nebulin cDNAs and assignment of the gene to chromosome 2q31-q32. *Genomics* **2**, 249-56.
- Zhou, S. F., Xie, X. X., Bin, Y. H., Lan, L., Chen, F., and Luo, G. R. (2006). Identification of HCC-22-5 tumor-associated antigen and antibody response in patients. *Clin Chim Acta* **366**, 274-80.
- Zhou, Z., and Reed, R. (1998). Human homologs of yeast prp16 and prp17 reveal conservation of the mechanism for catalytic step II of pre-mRNA splicing. *Embo J* **17**, 2095-106.

8. Anhang

8.1. Verzeichnis der Abkürzungen

∅	Durchmesser
λ-Phagen	Lambda-Phagen
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
AFP	Alpha-1-Fetoprotein
Ak	Antikörper
ALP	Alkalische Phosphatase
AM	akute Myokarditis
AMIDA	<i>autoantibody-mediated identification of antigens</i>
APP	<i>Amyloid A4 precursor protein of Alzheimer</i>
AS	Aminosäure
BBC1	<i>breast basic conserved gene 1</i>
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyolphosphat
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp (<i>base pair</i>)	Basenpaar
BRCA	<i>breast cancer antigen</i>
BWS	Beckwith-Wiedemann-Syndrom
cALL	<i>Common ALL</i>
CCDC64	<i>coiled coil domain containing protein 64</i>
CDK ₄ (<i>cyclin dependent kinase 4</i>)	Cyclin abhängige Kinase 4
cDNA (<i>complementary DNA</i>)	komplementäre DNA
CEA (<i>carcino-embryonic antigen</i>)	karzino-embryonales Antigen
CEP 290	<i>centrosomal protein 290</i>
CML66	chronisch myeloische Leukämie (Antigen) 66
CMV	Zytomegalie-Virus
COG	Children's Oncology Group
CT	Computertomographie
CTA	<i>Cancer-testis</i> -Antigene
DACH	Dachshund Homolog
DAP-AT	<i>dihydroxyacetone phosphate acyltransferase</i>
DC (<i>dendritic cell</i>)	dendritische Zelle
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
ddH ₂ O	doppeltdestilliertes Wasser
DHX38	DEAH-Box Polypeptid 38
dl	Deziliter

DM	Dermatomyositis
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA (<i>desoxiribonucleic acid</i>)	Desoxyribonucleinsäure
DSA	differentielle Serumanalyse
E. coli	Escherichia coli
EBV	Epstein-Barr-Virus
EGF (<i>epidermal growth factor</i>)	epidermaler Wachstumsfaktor
EGF-R (<i>EGF-receptor</i>)	EGF-Rezeptor
EGR-1	<i>early growth response gene-1</i>
Ep-CAM	<i>epithelial cell adhesion molecule</i>
F1-Hp	F1-Helferphage
FACT-Protein	<i>facilitates chromatin transcription</i> -Protein
FAS (<i>fatty acid synthase</i>)	Fettsäure-Synthetase
g	Gravitation; Gramm
GCC2-Protein	<i>GRIP coiled coil</i> -Protein 2
GF (<i>growth factor</i>)	Wachstumsfaktor
GNPAT	<i>glyceronephosphate O-acyltransferase</i>
GPOH	Deutsche Gesellschaft für pädiatrische Onkologie und Hämatologie
GSF	Gesellschaft für Strahlenforschung; jetzt: Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit
h	Stunde
HCL	Salzsäure
HER-2	humaner EGFR-2
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
HLA	<i>human leucocyte antigen-I/-II</i>
HMG-Box	<i>high mobility group</i> -Box
Hp	Helferphage
HPRD	<i>human protein reference database</i>
HPV	humanes Papilloma-Virus
HSE	<i>heat shock element</i>
HSF	<i>Heat Shock transcription factor</i>
HSP (<i>heat shock protein</i>)	Hitzeschockprotein
hTR	humane Telomerase
IFN- γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin
IGF 2	<i>Insulin-like Growth Factor</i>
IL-2	Interleukin-2
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IQWD-Protein	<i>IQ motif and WD repeats 1</i> -Protein

kB	Kilobasen
KLH	<i>Keyhole-limpet Hämocyanin</i>
l	Liter
LAK-Zellen	Lymphokin-aktivierte Killerzellen
L-Folien	Lytische Folien
LOH	<i>loss of heterocygosity</i>
LRRFIP2	<i>leucin rich repeat interacting protein 2</i>
L-Säule	lytische Säule
M	molar
MAGE	<i>melanoma antigen gene</i>
mAK	monoklonaler Antikörper
MART-1/-2	<i>melanoma antigen recognised by t-cells-1/-2</i>
MC1R	Melanocortin-1-Receptor
MCS (<i>multiple cloning site</i>)	Multiple Klonierstelle
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MHC	<i>major-histocompatibility-complex</i>
MIBG	Meta-Jod-Benzyl-Guanidin
min	Minute
ml	Milliliter
MLC	<i>myosin light chain</i>
MRD (<i>minimal residual disease</i>)	minimale Resterkrankung
mRNA (<i>messenger RNA</i>)	Boten-RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
M-Säule	mechanische Säule
MSH2	<i>mutS-Homolog 2</i>
MYH	<i>myosin heavy chain</i>
NaCl	Natriumchlorid
NaN ₃	Natriumazid
NaOH	Natronlauge
NARG2	<i>NMDA receptor-regulated gene 2</i>
NBT	Nitroblau-Tetrazolium
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NK	natürliche Killerzellen
NMDAR	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor
NPC	Nasopharyngeales Karzinom
NRIP	<i>nuclear receptor interacting protein</i>
NSE	Neuronspezifische Enolase
NWTS	Nationale Wilmstumor Studie der USA
OD ₆₀₀	optische Dichte bei der Wellenlänge λ 600

ORF (<i>open reading frame</i>)	Offener Leserahmen
p	Plasmid
pAPC (<i>professional antigen-presentating cells</i>)	professionelle Antigen-präsentierende Zellen
pB	pBluescript® Phagemid
PBS (<i>phosphate buffer saline</i>)	Phosphatpuffer-Salzlösung
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR (<i>polymerase chain reaction</i>)	Polymerase-Ketten-Reaktion
pDNA	Plasmid-DNA
pfu	<i>plaque forming units</i>
Ph	Phagenbank
PM	Polymyositis
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
RNA (<i>ribonucleic acid</i>)	Ribonukleinsäure
ROCK	<i>Rho associated, coiled-coil containing protein kinase</i>
RPL	<i>ribosomal protein L</i>
rpm (<i>rounds per minute</i>)	Umdrehungen pro Minute in Schüttlern und Zentrifugen
RT	reverse Transkriptase
RT-PCR (<i>RT-polymerase chain reaction</i>)	Reversen Transkription und nachfolgende PCR
SAP-1	<i>stomach cancer-associated protein tyrosine phosphatase-1</i>
SCC (<i>squamous cell cancer</i>)	Plattenepithelkarzinom
SEREX (<i>serological identification of recombinantly expressed genes</i>)	serologische Analyse von rekombinanten Tumor-cDNA-Expressionsbibliotheken
SIOP (<i>société internationale de l'oncologie pédiatrique</i>)	Internationale Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie
SM-Puffer	Phagenverdünnungspuffer
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
SSRP1	<i>structure specific recognition protein 1</i>
TAA	tumorassoziierte Antigene
Tab.	Tabelle
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-Buffer-Saline
TCR (<i>t-cell receptor</i>)	T-Zell-Rezeptor
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TIL	Tumor-infiltrierende Lymphozyten
Treg	regulatorische T-Zellen
TrkB	Neutrophin-Rezeptor
TRP	<i>tyrosinase-related protein</i>
TSA	Tumor-spezifisches Antigen
TUM	Technische Universität München
U (<i>units</i>)	Einheiten

UTR (<i>untranslated region</i>)	Untranslatierter Bereich
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
WAGR-Syndrom	<i>Wilmstumor-Aniridia-Genitourinary Anomalies-Mental Retardation-Syndrom</i>
WT	Wilmstumor
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid
μ g	Mikrogramm

8.2. Vektorkarten

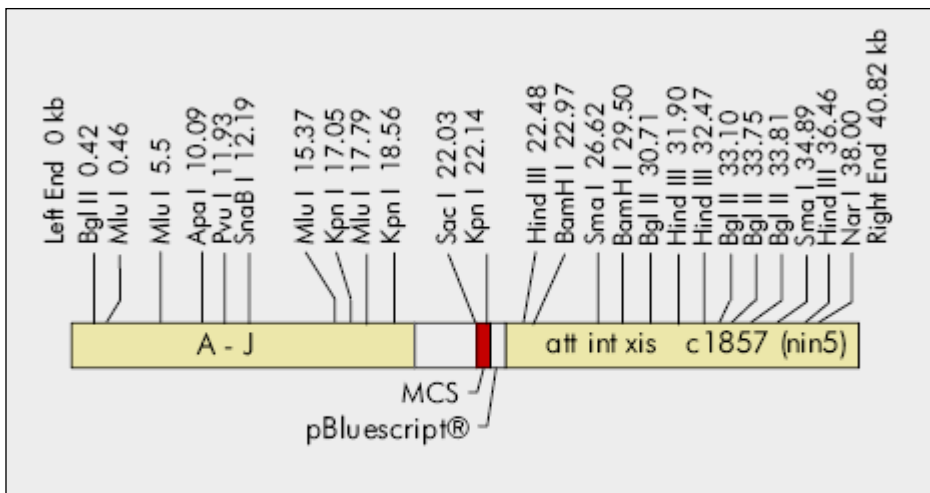


Abb. 8-1 Karte des Uni-ZAP[®]XR Insertionsvektors (Stratagene).

Die WT-cDNA wurde über die Restriktionsenzyme *EcoR1* und *Xho1* in den Polylinker des Uni-ZAP[®]XR Vektors kloniert (s. **Abb. 8-3**). Der Polylinker des Uni-ZAP[®]XR Vektors, in den die Tumor cDNA einkloniert worden war, lag innerhalb des *lacZ* Gens, welches für eine Untereinheit des Enzyms β -Galaktosidase kodiert. Mithilfe des Galaktose-Analogons Isopropyl- β -D-Thiogalactosid (IPTG) konnte die Repression des *lacZ* Genpromotors aufgehoben, und damit die Expression der rekombinanten Tumorproteine induziert werden (s. **Abb. 8-2**). Um das cDNA-Insert in einem Plasmidsystem charakterisieren zu können, wurde das pBluescript-Phagemid (s. **Abb. 8-2**) mithilfe des f1-Helferphagen ExAssist[™] *in vivo* exzidiert.

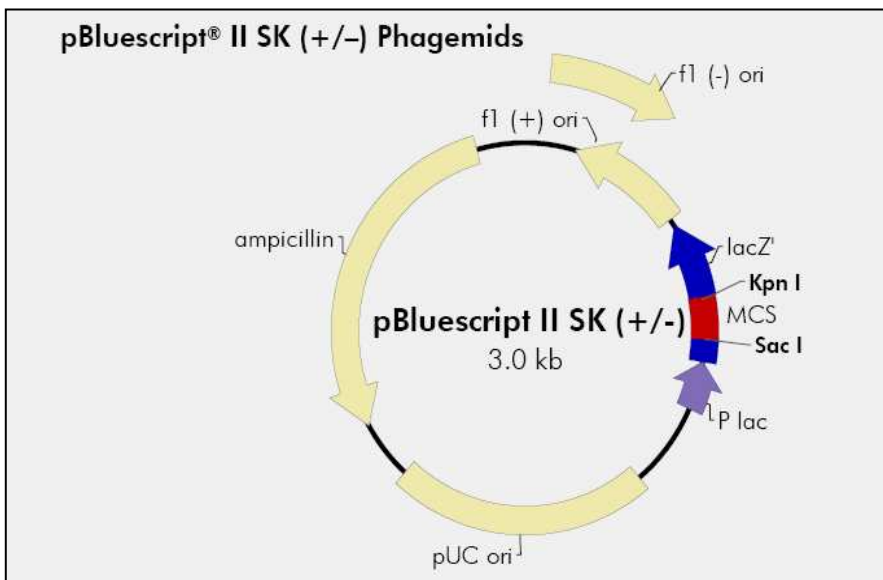


Abb. 8-2 Zirkuläre Vektorkarte des pBlueskript-Phagemids (Stratagene).

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

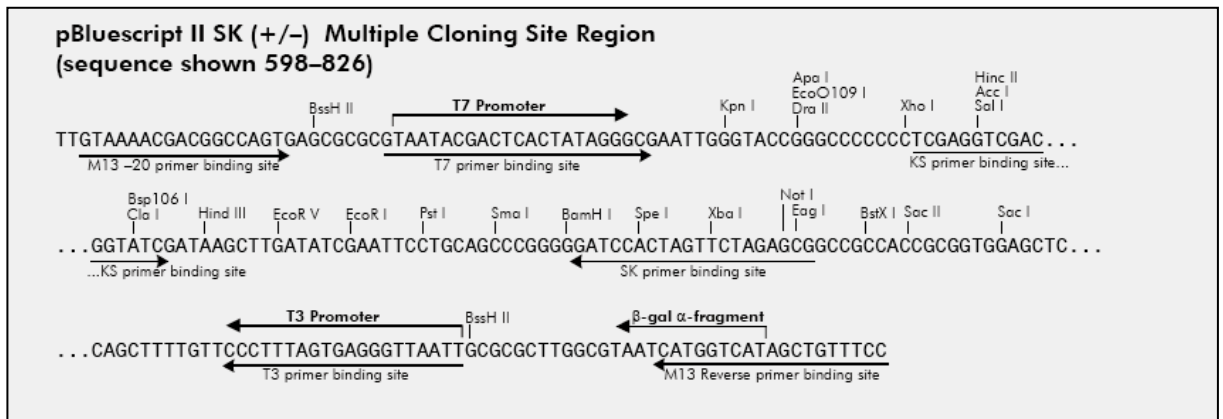


Abb. 8-3 Sequenz der *multiple cloning site* des pBluescript-Phagemids (Stratagene).

Der Polylinker des pBluescript-Phagemids wird stromaufwärts von einem T7- und stromabwärts von einem T3-Promotor flankiert.

8.3. Lebenslauf

Name: Anne-Katrin Zimmermann
Geburtsdatum: 01.10.1978 in Hamburg
Anschrift: Selnastr. 34
8001 Zürich, Schweiz
Tel.: 0041-(0)43-535 74 17
E-Mail: ak.zimmermann@gmx.de

Berufserfahrung:

Okt. 2007 - Klinische Pathologie des Kantonsspital Luzern (KSL)
Okt. 2006 - Sept. 2007 Medizinische Onkologie des Universitäts Spital Zürich (USZ)
Okt. 2005 - Sept. 2006 Klinische Pathologie des USZ

Schulbildung und Studium:

März 2001 – April 2005 Medizinstudium an der Technischen Universität München
- **3. Staatsexamen und Approbation**
- **Thema der Doktorarbeit:** Identifikation von Wilmstumor-Antigenen mittels serologischer Analyse einer rekombinanten Tumor-cDNA-Expressionsbibliothek
Okt. 2002 – April 2003 Medizinstudium an der Universität von Lausanne, Schweiz
Okt. 1998 – März 2001 Medizinstudium an der Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald
Aug. 1989 – Juli 1998 Gymnasium Christianeum, Hamburg, **Hochschulreife**
Aug. 1984 – Juli 1989 Grundschule Maria Grün, Hamburg

8.4. Danksagung

Die Durchführung dieser Doktorarbeit, mit deren praktischen Teil ich im April 2002 begonnen habe, hat mir die Möglichkeit gegeben, Grundlagen der Laborarbeit zu erlernen, wissenschaftlich zu arbeiten und vor allem Einblicke in das Gebiet der Tumorummunologie zu erhalten. Diese Doktorarbeit hat mir letztendlich auch zu meinen beiden ersten Assistenzarztstellen (in der Pathologie des USZ bei Herrn Prof. Dr. H. Moch und in der Medizinischen Onkologie des USZ bei Herrn Prof. Dr. A. Knuth) verholfen, mit denen ich sehr zufrieden bin bzw. war.

Bei Frau PD Dr. Uta Behrends möchte ich mich ganz herzlich bedanken, dass sie es mir ermöglicht hat dieses SEREX-Projekt durchzuführen, das nun rückblickend ganz entscheidende Weichen in meinem Lebenslauf gestellt hat. Ich möchte mich außerdem für ihr fortwährendes Engagement, ihre ansteckende Begeisterung und ihre konstruktive Kritik bedanken, mit der sie mich bis zum Abschluss dieser Arbeit begleitet hat.

Tatkräftige Unterstützung bei der praktischen Umsetzung des Forschungsprojektes habe ich im Labor von den MTA Gerhard Eigenstetter, Colette Zobywalski, Brigitte Lechner, Regine Greiner-Petter und der biologischen Doktorandin Anja Golbeck erhalten. Mit Milena Bornkamm, der zweiten medizinischen Doktorandin, habe ich mich durch die immer wieder auftretenden, aber nie unüberwindbaren Hindernisse der Laborarbeit gekämpft.

Ich möchte mich besonders bei Herrn Prof. Dr. Stephan Müller-Wehrich, dem ehemaligen Leiter der Abteilung für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie der TUM, der diese Arbeit ermöglicht und bis zu seinem frühen Tod unterstützt hat, und bei Herrn Prof. Dr. Georg W. Bornkamm, dem Leiter des kooperierenden GSF-Instituts für Klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik, bedanken.

Während der ganzen Zeit an meiner Seite und immer ein geduldiger, bereichernder, kritischer und motivierender Begleiter auf dem langen Weg zum Abschluss dieser Doktorarbeit war Nils Henningsen, mein Freund.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern, Gerda und Gerhard Zimmermann, bedanken. Sie haben es mir ermöglicht meinen Weg zu gehen, mich über die ganze Zeit bei meinem Tun unterstützt und ermutigt und mit hartnäckigen, manchmal auch lästigen Fragen so manches Mal meinen inneren Schweinehund vertrieben.