

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

„SEROLOGISCHE ANALYSE EINER
cDNA-EXPRESSIONSBIBLIOTHEK AUS DEM GEWEBE EINES
ALVEOLÄREN RHABDOMYOSARKOMS“

Claudia Settevendemie

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

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier
Prüfer der Dissertation: 1. Priv.-Doz. Dr. U. A. D. Behrends
2. Univ.-Prof. Dr. St. Burdach

Die Dissertation wurde am 12.05.2009 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 21.10.2009 angenommen.

gewidmet

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	8
1.1	Einführung in das Arbeitsthema	8
1.2	Fragestellung der Arbeit	9
1.3	Das Rhabdomyosarkom	10
1.3.1	Histopathologie	10
1.3.2	Epidemiologie	12
1.3.3	Ätiologie	12
1.3.4	Molekulargenetik	13
1.3.5	Klassifikationen	14
1.3.6	Klinik	17
1.3.7	Diagnose	18
1.3.8	Therapie	18
1.3.9	Prognose	19
1.4	Tumorimmunologie	20
1.4.1	Tumorantigene	20
1.4.2	Verfahren zur Identifizierung von Tumorantigenen mittels zytotoxischer T-Zellen	21
1.4.3	Identifizierung von Tumorantigenen mit Hilfe von Antikörpern	23
1.4.4	Das SEREX-Verfahren	23
1.5	Immuntherapie von Tumoren	24
1.5.1	Nicht-antigenspezifische Therapie	24
1.5.2	Antigenspezifische Therapie	25
1.5.3	Tumorimmuntherapie bei Sarkomen	25
2	Material	27
2.1	Antibiotika	27
2.2	Bakterien	27
2.3	cDNA-Expressionsbibliothek	27
2.4	cDNA aus Gewebe	27
2.5	Chemikalien	28
2.6	Enzyme	29
2.7	Kits	29
2.8	Medium	30
2.9	Oligonukleotide	30

2.10	Humanes Serum	31
2.11	Phagen	31
2.12	Puffer	31
2.13	Sekundärantikörper	32
2.14	Geräte	32
2.15	Software und Datenbanken	33
2.16	Verbrauchsmaterial	33
3	Methoden	34
3.1	SEREX-Analyse	34
3.1.1	Präparation der bakteriellen Wirtszellen	35
3.1.2	Transfektion der λ -Phagen und Induktion der rekombinanten Proteinexpression	36
3.1.3	Amplifikation und Konservierung der λ -Phagen-Bibliothek	38
3.1.4	Titerbestimmung der λ -Phagen-Bibliothek	38
3.1.5	Bestimmung des Anteils rekombinanter Klone („Blue-White-Test“)	38
3.1.6	Präabsorption der humanen Seren	39
3.1.7	SEREX-screening	40
3.1.8	Isolierung der positiven Klone	41
3.1.9	Ausschluss von IgG und Färbeartefakten und Monoklonalisierung	41
3.1.10	Subklonierung durch <i>in vivo excision</i>	43
3.2	DNA-Präparation und Analyse	44
3.2.1	Mini-Präparation von Plasmid-DNA	44
3.2.2	Maxi-Präparation von Plasmid-DNA	44
3.2.3	DNA-Restriktionsanalyse	45
3.2.4	Sequenzierung	45
3.3	Homologierecherche	46
3.4	Heterologe Serumanalyse	46
3.5	mRNA-Expressionsanalyse mit Hilfe von PCR und Gewebe-cDNA	46
4	Ergebnisse	48
4.1	Qualitätskontrolle, Amplifikation und serologische Analyse der rekombinanten RMS-cDNA Expressionsbibliothek	48
4.1.1	Titerbestimmung und Amplifikation	48

4.1.2	Blue-White-Test	48
4.2	Isolation von seroaktiven Klonen	48
4.3	Molekulare Charakterisierung der RMS-Antigene	49
4.3.1	Restriktionsanalyse der SEREX-definierten RMS-Antigene	49
4.3.2	Sequenzanalyse der SEREX-definierten RMS-Antigene	51
4.3.3	Computergestützte Homologierecherche	53
4.4	Charakteristika des Antigens MU-RMS-248-210 auf Proteinebene	57
4.5	Immunogenität der RMS-Antigene	59
4.5.1	Heterologe Serumanalyse mit Proben von gesunden Kontrollen	59
4.5.2	Heterologe Serumanalyse mit Tumorseren	59
4.6	Gewebsspezifität des Antigens MU-RMS-248-210	61
5	Diskussion	64
5.1	Struktur, Funktion, Lokalisation und molekulare Varianten des Homologs RANBP2	64
5.2	Molekulare Struktur, Gewebeexpression und Immunogenität des Antigens MU-RMS-248-210/292	66
5.3	Mögliche klinische Bedeutung von Tumorantigenen und tumorantigen-spezifischen Antikörpern	68
5.4	Die klinische Bedeutung von Cancer-Testis-Antigenen	71
5.5	Mechanismen der immunologischen Maskierung von Tumoren	72
5.6	Neue methodische Ansätze für die Identifikation von Tumor-Ag	73
6	Zusammenfassung	76
7	Literaturverzeichnis	78
8	Abbildungs-/ Tabellenverzeichnis	90
9	Danksagung	91
10	Erklärung an Eides Statt nach Anlage 5 PromO	92

Abkürzungsverzeichnis

Ak	Antikörper
APC	antigenpräsentierende Zellen
Ag	Antigen
aRMS	alveoläres Rhabdomyosarkom
bp	Basenpaar
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>
CD4/CD8	Cluster of Differentiation 4/8
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten
CWS	Cooperative-Weichteilsarkom-Studie
eRMS	embryonales Rhabdomyosarkom
FKHR	<i>forkhead-related</i>
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage-colony stimulating factor</i>
GPOH	Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie
GTP	Guanosintriphosphat
Gy	Gray
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL2	Interleukin 2
IPTG	Isopropylthiogalactosid
IRSG	<i>Intergroup Rhabdomyosarcoma Study Group</i>
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LK	Lymphknoten
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
OD 400	optische Dichte bei 400 nm

ORF	<i>open reading frame</i>
PAX	<i>paired box</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pfu	<i>plaque forming unit</i>
RANBP	RAN-bindendes Protein
RNA	Ribonukleinsäure, <i>ribonucleic acid</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SEREX	<i>serological analysis of a recombinant cDNA expression library</i>
SIOP	<i>International Society of Pediatric Oncology</i>
UICC	<i>International Union Against Cancer</i>

1 Einleitung

Im Alter von 4 Jahren fielen bei dem zuvor gesunden Patienten ein einseitiger Exophthalmus sowie eine Schwellung und Schmerzen im Bereich des gleichseitigen Kiefergelenks und der Wange auf. Die histologische Untersuchung führte zu der Diagnose eines alveolären Rhabdomyosarkoms (aRMS) der Orbita mit Infiltration der Umgebung. Trotz neoadjuvanter Chemotherapie und radikaler Tumorresektion verstarb das Kind im Alter von fünf Jahren im Rahmen einer Tumorprogression mit Fernmetastasierung.

1.1 Einführung in das Arbeitsthema

In der vorliegenden Arbeit geht es um die Bedeutung des autologen Immunsystems im Hinblick auf die Bekämpfung von malignen Tumoren. Mittels des 1995 von Sahin und Kollegen publizierten SEREX-Verfahrens (*serological analysis of a recombinant cDNA expression library*) wurde die humorale Immunantwort eines an einem aRMS erkrankten pädiatrischen Patienten untersucht.

RMS repräsentieren die häufigsten malignen Weichteiltumoren des Kindesalters. Mit ca. 7-10 % aller malignen Erkrankungen im Kindesalter bilden die Weichteilsarkome die vierthäufigste Diagnosegruppe.

Auch wenn sich die Heilungsrate der nicht metastasierten RMS in den letzten Jahren aufgrund multimodaler Therapiemöglichkeiten deutlich verbessert hat, so bleibt dennoch eine sehr hohe Sterberate von ca. 80% bei bereits metastasierten Krankheitsfällen. Hinzu kommt das hohe Risiko von schweren Spätfolgen der Therapie wie toxische Leber- und Nierenschäden oder induzierte Zweitmalignome.

Eine Verbesserung der Heilungsrate sowie Reduktion der therapiebedingten Morbidität durch alternative adjuvante Therapieoptionen und eine verbesserte Diagnostik ist dringend anzustreben.

Vielversprechend ist diesbezüglich das wachsende Wissen zur körpereigenen Tumorimmunantwort. Es mehren sich Hinweise darauf, dass zelluläre und humorale Immunreaktionen gegen tumorassoziierte oder tumorspezifische Antigene (Ag) zu Spontanremissionen bestimmter Tumorarten beitragen und Ansatzpunkte für eine Tumorimmuntherapie liefern können. Desweiteren kann der Nachweis von Tumor-Ag im Tumorgewebe und/oder der Nachweis von Tumor-Ag-spezifischen Serum-Antikörpern (Ak) diagnostisch hilfreich sein.

Für die Entwicklung von möglichst tumorspezifischen immuntherapeutischen Strategien,

die gut verträgliche Therapieoptionen bieten sollen, ist die Identifizierung geeigneter Tumor-Ag essentiell.

Eines der Verfahren zur Identifizierung von Tumor-Ag ist das oben genannte SEREX-Verfahren. Ein großer Vorteil dieser Methode ist die Unabhängigkeit von etablierten Tumorzelllinien, deren Kultivation *in vitro* bei RMS problematisch, aber für die Expansion tumorspezifischer T-Zellklone essentiell ist. Das Verfahren nutzt die humorale Immunantwort zur Identifizierung von Tumor-Ag in cDNA-Expressionsbibliotheken aus primärem Tumorgewebe. Es erlaubt einen sehr effizienten Nachweis von Ag, die von CD4+ T-Helfer-Zellen und teilweise von CD8+ zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) erkannt werden.

Aus verschiedenen Malignomen des Erwachsenenalters konnten auf diese Weise bereits zahlreiche klinisch interessante, tumorassoziierte und tumorspezifische Ag identifiziert werden. Dagegen waren Untersuchungen zur Tumor-Ag-Expression bei Kindern einschließlich pädiatrischer Patienten mit Weichteiltumoren zu Beginn dieser Arbeit noch rar.

1.2 Fragestellung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollten erstmals Tumor-Ag des aRMS mit Hilfe des SEREX-Verfahrens identifiziert werden. Zu diesem Zweck sollte aus dem primären Tumorgewebe eines vierjährigen Patienten mit aRMS eine rekombinante cDNA-Expressionsbibliothek erstellt und die rekombinanten Proteine mittels eines Pools aus Serumproben von fünf weiteren pädiatrischen Patienten mit RMS auf das Vorkommen von Tumor-Ag gescreent werden.

Die cDNA der identifizierten Tumor-Ag sollte sequenziert und mit Hilfe von Homologierecherchen anhand publizierter cDNA-Dateien genauer charakterisiert werden.

Zudem sollte mit Hilfe von Serum von gesunden Probanden und anderen pädiatrischen Tumorpatienten das Vorkommen der Tumor-Ag-spezifischen Serum-Ak geklärt werden.

Im dritten Teil der Arbeit sollte die Gewebsspezifität der detektierten tumorspezifischen Ag durch RNA-Expressionsanalysen an malignen und benignen Geweben bestimmt werden.

1.3 Das Rhabdomyosarkom

1.3.1 Histopathologie

RMS sind hochmaligne Tumoren aus der Gruppe der Weichteilsarkome im Kindes- und Jugendalter. Sie machen mit 54% die Mehrheit der pädiatrischen Weichteilsarkome aus. Histogenetisch lassen sie sich von der quergestreiften Muskulatur ableiten (Paulino AC 2008). Je nach Differenzierungsgrad können Ag der Skelettmuskulatur wie Myogenin, MyoD1, Desmin, Vimentin, Myoglobin, Aktin, neuronenspezifische Enolase, S-100 und MIC2 immunhistochemisch nachgewiesen werden (Koscielniak et al., 1999, Kumar et al., 2000, Morgenstern DA, 2008). RMS können in nahezu allen Körperregionen auftreten und sind nicht an die Lokalisationen der gesunden, quergestreiften Muskulatur gebunden.

Besonders betroffen sind Kopf- und Halsbereich, Harnblase, Prostata, paratestikuläres Gewebe, Samenstrang, Ovar, Uterus und Vagina. Selten beschriebene Lokalisationen sind Brustwand, Herz, Diaphragma und Gallenwege.

Nach histologischen Kriterien lassen sich vier Subtypen unterscheiden, den klassischen embryonalen Typ, den botryoiden Typ, den Spindelzelltyp sowie den alveolären Typ (Leuschner u. Harms 1999):

Das klassische embryonale RMS (eRMS) kommt in allen Regionen des Körpers vor. Bevorzugt ist es jedoch mit 46% aller RMS im Kopf-Hals-Bereich und zu 28% im Urogenitalbereich zu finden (Gadner u. Gaedicke 2006). Der Tumor ist aus spindeligen bis ovoiden Zellen aufgebaut. Histologisch fallen neben einer teilweise ausgeprägten Myogenese einige Zellen mit stark eosinophilem Zytoplasma auf (Harms et.al.,1985) (**Abb.1**).

Der botryoide Typ des eRMS manifestiert sich als traubenartige Vorwölbung in Hohlorganen wie Harnblase, Vagina, Gallengängen, Ohren, Nase oder Analregion. Charakteristisch ist eine mikroskopisch sichtbare Kondensierung der Tumorzellen parallel unter der Kambiumschicht (Oberflächenepithel) (**Abb. 2**).

Der Spindelzelltyp des RMS ist bevorzugt in der paratestikulären Region lokalisiert. Kennzeichnend ist ein bündel- und strangförmiges Proliferationsmuster mit über 75% Spindelzellen und einer immunhistochemisch skelettmuskulären Differenzierung (Cavazzana et al. 1992) (**Abb. 3**).

Dem aRMS, welches Gegenstand dieser Arbeit ist, entsprechen ca. 20% aller RMS. Die Manifestationsorte sind vor allem Stamm und Extremitäten. Morphologisch können alveoläre Hohlräume auffallen, die bei einer soliden Variante des aRMS noch nicht ausgebildet sind (**Abb. 4**).

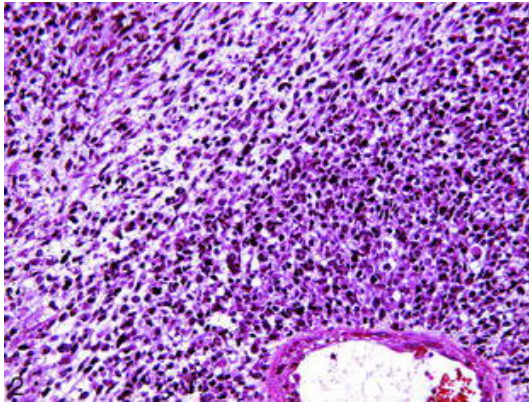


Abb. 1 Klassisches embryonales RMS

Zellen mit perivaskulärer Kondensation in einem myxoiden Stroma Hämatoxylin-Eosin, Originalvergrößerung 2000x (Parham D, Ellison DA, 2006)

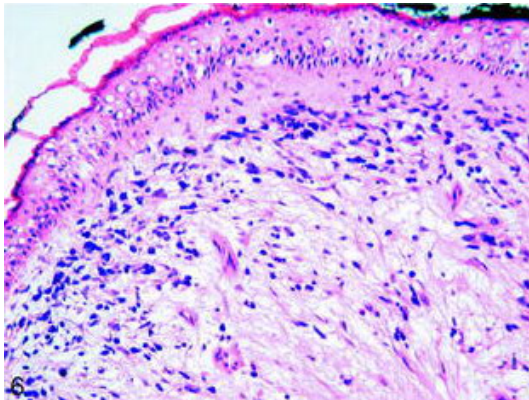


Abb. 2 Botryoides RMS

Zellkondensierung unter der Kambiumschicht; Hämatoxylin-Eosin, Originalvergrößerung 200x (Parham D, Ellison DA, 2006)

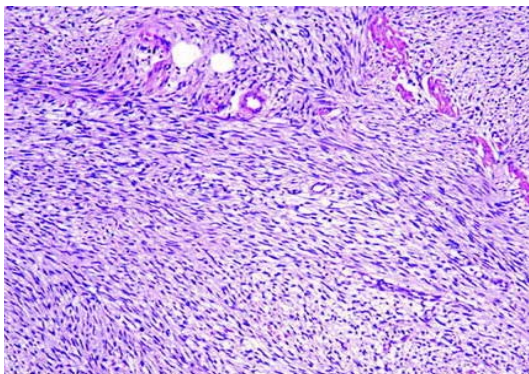


Abb. 3 Spindelzelliges RMS

Paratestikulärer Tumor mit charakteristischem, bündelförmigem Proliferationsmuster. Hämatoxylin-Eosin, Originalvergrößerung 40x (Parham D, Ellison DA, 2006)

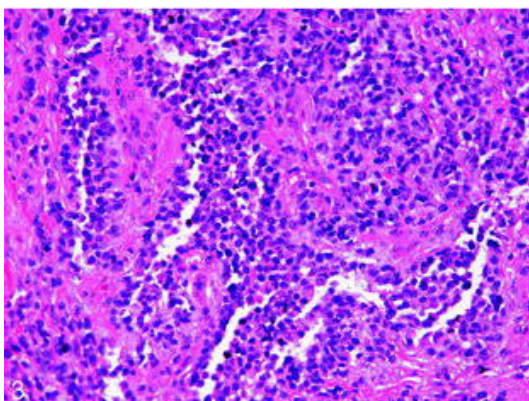


Abb. 4 Alveoläres RMS

Kleine, runde blaue Zellen, die fibrovaskuläre Septen charakterisieren. Hämatoxylin-Eosin, Originalvergrößerung 2000x (Parham D, Ellison DA, 2006)

1.3.2 Epidemiologie

RMS gehören zu den häufigsten malignen Weichteiltumoren des Kindesalters. Die Inzidenz der malignen Weichteilsarkome liegt in Deutschland im Jahr bei 1:100.000 Kindern unter 15 Jahren (Gadner, Gaedicke, 2006). Damit machen die Weichteilsarkome ca. 7-10% aller malignen Erkrankungen im Kindesalter aus und gehören nach den Leukämien, Lymphomen, Tumoren des zentralen Nervensystems und Neuroblastomen zu der vierthäufigsten Diagnosegruppe. Innerhalb dieser Gruppe bilden die RMS mit 54% die häufigste Entität, gefolgt von extraossären Ewingtumoren bzw. peripheren primitiven neuroektodermalen Tumoren (11%), Synovialsarkomen (7%), malignen peripheren Nervenscheidentumoren (4%), Fibrosarkomen (2%), Leiomyosarkomen (2%) und anderen seltenen Weichteilsarkomen (20 %) (Gadner, Gaedicke, 2006).

Das Verhältnis von Jungen zu Mädchen liegt bei 1,2:1 bei einem medianen Erkrankungsgipfel von 4,6 Jahren (Kaatsch u. Spix, 2002).

Ein erster Altersgipfel liegt zwischen dem 3. und 5. Lebensjahr vor allem bei RMS am Kopf und Hals. Der zweite Gipfel vor allem für RMS im Urogenitaltrakt tritt zwischen dem 13. und 18. Lebensjahr auf (Paulino AC et al., 2008).

1.3.3 Ätiologie

Weichteilsarkome entwickeln sich selten aus benignen Weichteiltumoren, sondern vielmehr aus pluripotenten, mesenchymalen Stammzellen. Als mögliche Entstehungsursache werden chemische Faktoren, Strahlenbelastung, Immundefekte und genetische Faktoren beschrieben. So wurden Kanzerogene wie Asbest, Pestizide und Nickel als mögliche ätiologische Faktoren bei Weichteilsarkomen genannt (Szepsenwol et al., 1985, Goggon et Acheson, 1983). Circa 0,1 % der Patienten mit einer malignen Erkrankung entwickeln postradiogen innerhalb von fünf Jahren ein Sarkom der Weichteile oder Knochen (Gadner, Gaedicke, 2006). Ebenso bekannt ist die Induktion von Weichteiltumoren bei langzeitimmunsupprimierten Patienten z.B. nach Organtransplantation. Es gibt Hinweise für eine familiäre Häufung von RMS bei Geschwistern (Birch et al., 1990), vor allem in Zusammenhang mit kongenitalen Syndromen: Neurofibromatose von Recklinghausen, Rubinstein-Taybi-Syndrom, Beckwith-Wiedemann-Syndrom, Costello-Syndrom, Noonan-Syndrom, Gorlin-Syndrom und Li-Fraumeni-Syndrom mit Mutation des Tumorsuppressorgens *p53* (Paulino AC, 2008).

1.3.4 Molekulargenetik

Charakteristisch für das aRMS im Vergleich zum eRMS sind in über 70% der Fälle eine $t(2;13)(q35;q14)$ -Translokation und in ca. 10% der Fälle eine $t(1;13)(p36;q14)$ -Translokation (Barr et al., 1997, Cullinane et al., 2003, Gallego Melcón S et al., 2007).

Bei der Translokation $t(2;13)$ fusioniert das aminoternale Ende des auf Chromosom 2 kodierten Homebox-Proteins PAX3 (*paired box 3*) mit dem auf Chromosom 13 kodierten carboxyterminalen Bereich des Transkriptionsfaktors FKHR (*forkhead-related*) (Anderson et al., 1999, Bennicelli et al., 1999, Linardic 2008) (**Abb. 5**).

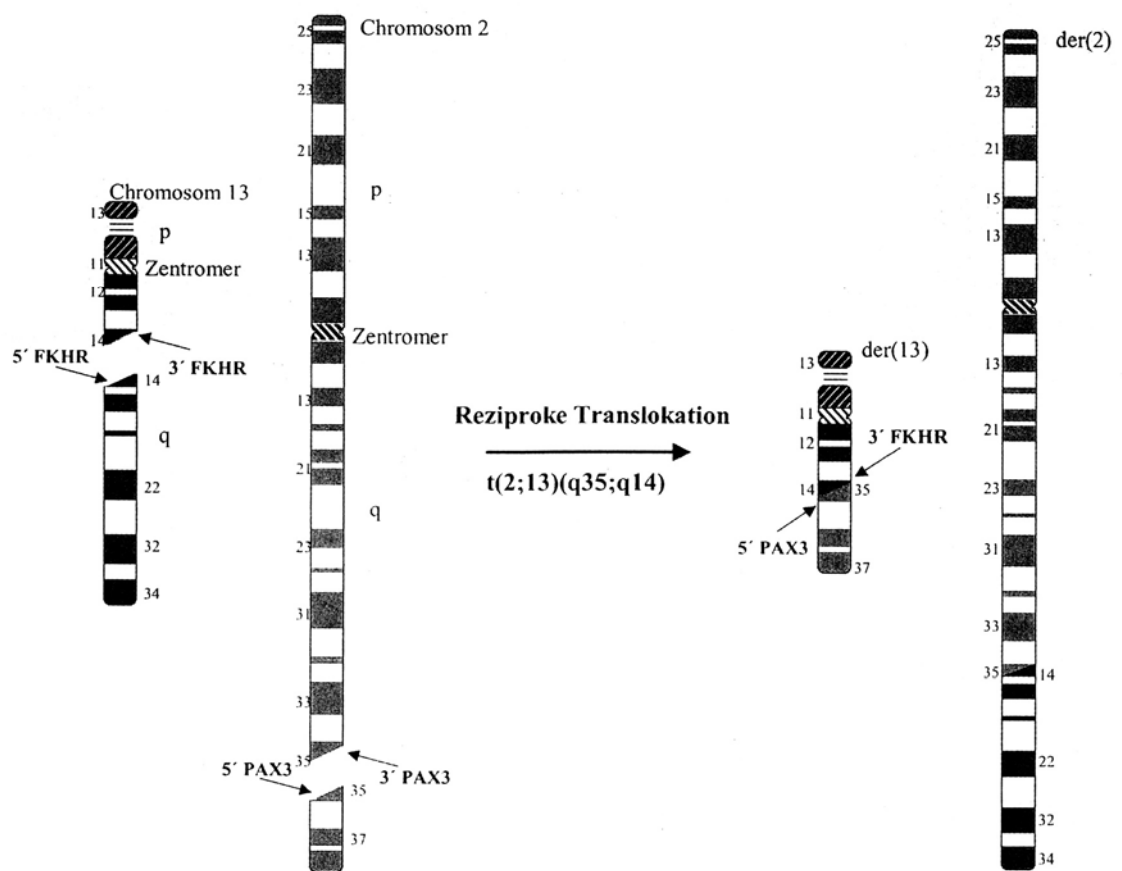


Abb. 5 Graphische Darstellung der Translokation $t(2;13)(q35;q14)$

Fusion des Homebox-Protein-Gens *PAX3* (Paired-Box-3-Gene) auf Chromosom 2 mit dem Transkriptionsfaktor-Gen *FKHR* (*forkhead-related*) auf Chromosom 13 (Gadner H und Gaedicke G, 2006).

Die Translokation t(1;13) resultiert in einer Fusion aus dem Homebox-Gen *PAX7* mit dem Transkriptionsfaktor-Gen *FKHR*. Sie findet sich deutlich seltener und ist gemäß Kelly und Kollegen mit einer günstigeren Prognose assoziiert (Kelly et al., 1997; Slater et al., 2007). Bei der Diagnosesicherung eines rRMS spielen beide Hybridgene eine wichtige Rolle (Anderson et al., 1999, Edwards et al., 1997, Keith M et al., 2007).

Weitere molekulargenetische Pathomechanismen wie Verlust der Heterozygotie von Chromosom 11 mit veränderter Expression des *Insulin growth factor-2* (IGF-2) -Gens oder eine Amplifikation des *NMYC*-Gens (Hachitanda et al., 1998, Slater O et al., 2007) sowie eine gesteigerte Enzymaktivität des DNA-Repair-Proteins Methylguanin-DNA Methyltransferase (MGMT) (Papaefthymiou MA et al., 2008) wurden beschrieben. Diese erwiesen sich jedoch *bis dato* nicht als pathognomonisch und haben deshalb keine signifikante diagnostische und/oder prognostische Relevanz.

1.3.5 Klassifikationen

Risikogruppen

In den zentrumsübergreifenden RMS-Behandlungsstudien (CWS-2002P, CWS-2006, SIOP MMT-98, pESSG-Studie) sowie den deutschen Diagnose- und Therapieleitlinien (AWMF Leitlinien-online 05/2008) wird das Risiko einer RMS-Erkrankung abhängig von Ausdehnung (TNM-Klassifikation), Lokalisation und histologischem Typ des Tumors sowie Alter des Patienten in günstig oder ungünstig eingeteilt (**Tab. 1**).

	Günstig	Ungünstig
Präoperativer TN-Status	T1	T2
Postchirurgischer TN-Status	N0 pT1 - pT2 - pT3a pN0	N1 pT3b - pT3c pN1
Lokalisation	Kopf, Hals (nicht parameningeal), urogenital (nicht Blase/Prostata)	Kopf, Hals (parameningeal), Blase, Prostata, Extremitäten, andere
Alter	≤ 10 Jahre	>10 Jahre
Tumorgroße	≤ 5 cm	> 5 cm
Histologischer Typ	embryonales RMS	alveoläres RMS, EES, PNET, SS

Tab. 1 Allgemeine Risikogruppierung (AWMF: Leitlinien-online 05/2008)

TNM-Klassifikation

Die Ausdehnung der RMS-Erkrankung wird international mit der TNM-Klassifikation der Weichteilsarkome beschrieben (UICC, Wittekind et Wagner, 1997), die die lokale Tumorgöße (T), eine evtl. Lymphknoten (LK)-Metastasierung (N) und eine evtl. Fernmetastasierung (M) berücksichtigt (**Tab. 2**).

	Primärtumor
T1a	Tumordurchmesser = 5 cm Lokalisation oberflächlich zur Fascia superficialis ohne deren Infiltration
T1b	Tumordurchmesser = 5 cm Lokalisation unterhalb der Fascia superficialis und/oder deren Infiltration sowie retroperitoneale, mediastinale bzw. Beckentumoren
T2a	Tumordurchmesser > 5 cm Lokalisation oberflächlich zur Fascia superficialis ohne deren Infiltration
T2b	Tumordurchmesser > 5 cm Lokalisation unterhalb der Fascia superficialis und/oder deren Infiltration sowie retroperitoneale, mediastinale bzw. Beckentumoren
N	Regionäre Lymphknoten
NX	regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	regionäre Lymphknotenmetastasen
M	Fernmetastasen
MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Tab. 2 TNM-Klassifikation der Weichteilsarkome (UICC, Wittekind et Wagner, 1997)

Histopathologische Gradeinteilung

Für die Therapie und Prognose ist zusätzlich die histologische Gradeinteilung (Coindre et al., 1986) von Bedeutung. Den höchsten Malignitätsgrad haben die so genannten G4-Tumoren (**Tab. 3**).

	Differenzierungsgrad
GX	Differenzierungsgrad kann nicht beurteilt werden
G1	Gut differenziert
G2	mäßig differenziert
G3	schlecht differenziert
G4	Undifferenziert

Tab. 3 Histopathologisches Grading von Weichteilsarkomen (Coindre et al., 1986)

Präoperative Stadieneinteilung

Mit Hilfe der oben genannten TNM-Klassifikation und der histologischen Gradeinteilung wird das präoperative Stadium der Weichteilsarkome festgelegt (Spiessl et al., 1993) (**Tab. 4**).

Stadium	G	TNM		
I A	G1	T1a und b	N0	M0
	G2			
I B	G1	T2a		
	G2			
II A	G1	T2b		
	G2			
II B	G3	T1a und b		
	G4			
II C	G3	T2a		
	G4			
III	G3	T2b		
	G4			
IV	jedes G	jedes T	N1	
			jedes N	M1

Tab. 4 Präoperative Stadieneinteilung der Weichteilsarkome (Spiessl et al., 1993)

Postchirurgische Stadieneinteilung

Das Gesamtkonzept der Therapie richtet sich in der Regel nach der von der amerikanischen IRSG (*Intergroup Rhabdomyosarcoma Study Group*) vorgeschlagenen postchirurgischen Stadieneinteilung, die Aspekte der Tumoroperation miteinbezieht. In der nachfolgenden Tabelle finden sich die IRS-Stadien I-IV der postoperativen TNM-Klassifikation (pTNM) gegenübergestellt (**Tab. 5**).

IRS-Stadium	Definition	pTNM
I	komplette Tumorresektion makroskopisch und mikroskopisch, keine LK-Metastasen	
I A	Tumor organbegrenzt	T1
I B	Tumor nicht organbegrenzt	T2
II	komplette Tumorresektion makroskopisch, mikroskopisch nicht im Gesunden reseziert	
II A	keine regionären LK-Metastasen	T3
II B	regionäre LK-Metastasen, reseziert	
II C	regionäre LK-Metastasen, nicht reseziert	
III	inkomplette Resektion makroskopisch oder Biopsie mit malignem Erguss in eine benachbarte Körperhöhle	T3b/c
IV	Fernmetastasen bei Erstdiagnose, nicht-regionäre LK-Metastasen	T4

Tab. 5 Postchirurgische Stadieneinteilung gemäß der Weichteilsarkomstudie CWS-96 (CWS-96)

1.3.6 Klinik

Die klinische Symptomatik ist sehr variabel und hängt stark von der Lokalisation der Tumoren ab. RMS im Kopf-Hals-Bereich können im Falle von Orbitatumoren lediglich mit einem indolenten Exophthalmus auffallen, wohingegen parameningeale oder sinusoidale Tumoren eine vielfältige Symptomatik aufweisen wie zum Beispiel Paresen der Hirnnerven, Nausea, Erbrechen, Schmerzen, Nasenatmungsbehinderung, Epistaxis und/oder Sinusitiden. Tumoren im urogenitalen Bereich gehen häufig einher mit Bauchschmerzen, Hämaturie, Dysurie, Obstipation und/oder Hodenschwellung. Bei Tumoren der Extremitäten wird oftmals eine dolente oder auch indolente Schwellung manifest.

1.3.7 Diagnose

Die Diagnosestellung sollte nach einem allgemein standardisierten Algorithmus erfolgen (AWMF online, Leitlinien Weichteilsarkome). Nach der allgemeinen körperlichen Untersuchung erfolgt die bildgebende Untersuchung mittels Sonographie, Computertomographie und/oder Magnetresonanztomographie der Primärtumorregion sowie ggf. Szintigraphie zur Feststellung von Tumorgröße und –volumen, Beziehung des Tumors zu Gefäßen, Nerven, Nachbarstrukturen und Organen sowie Veränderungen am Skelettsystem und Gefäßversorgung des Tumors.

Zur Sicherung der Diagnose ist eine Biopsie notwendig. Sie sollte als offene Inzisionsbiopsie mit Gewebegewinnung für die konventionelle Pathomorphologie, Immunhistochemie, Zyto- und Molekulargenetik erfolgen. Wie in den Kapiteln 1.3.1 und 1.3.4. genannt, stützt sich die Diagnosesicherung der Weichteilsarkome auf den immunhistochemischen Nachweis von Myogenin, MyoD1, Desmin, Vimentin, Myoglobin, Aktin, neuronenspezifischer Enolase, S-100 und/oder MIC2 (Koscielniak et al., 1999) sowie im Falle des aRMS auf den Nachweis der Translokationen t(2;13)(q35;q14) oder t(1;13)(p36;q14) (Barr et al., 1997, Cullinane et al., 2003, Linardic 2008) (s. Kapitel 1.3.4).

1.3.8 Therapie

Aktuell stehen bei der Behandlung der RMS zum jetzigen Zeitpunkt die Chemotherapie, Chirurgie und/oder Bestrahlung zur Verfügung. Die optimale Kombination der einzelnen Therapiemodalitäten hängt von der Größe, Ausdehnung, Lokalisation und Histologie des Tumors sowie der damit verbundenen Resektabilität und vom Alter des Patienten ab (Leaphart C, Rodeberg D, 2007).

Mit der Kombination aus Chemotherapie und Lokaltherapie liegt die 5-Jahres-Überlebensrate von Patienten mit primär lokalisierten RMS bei ca. 70%. Nach alleiniger Resektion des RMS finden sich hingegen nur Überlebenschancen von 8-22% (Mankin HJ et al., 2005, Yuan XJ et al., 2008).

Die Chemotherapie wird als Kombinationschemotherapie verabreicht. Als bei den RMS besonders wirksame Chemotherapeutika gelten Dactinomycin, Vincristin, Alkylanzien (Cyclophosphamid, Ifosfamid) und Anthrazykline (Doxorubicin, Epi-Doxorubicin) (Walterhouse D et al., 2007). Alternativ können bei mangelhaftem Ansprechen oder in Hochrisikofällen VP-16 und Platin-Derivate eingesetzt werden.

Bezüglich der Zusammensetzung der Medikamente sowie der Intensität und Dauer der aktuell empfohlenen Behandlung in den einzelnen Risikogruppen ist auf das aktuelle Protokoll der Cooperativen-Weichteilsarkom-Studie (CWS-2002P) der Deutschen Gesellschaft für pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH) zu verweisen.

Die lokale Tumorkontrolle kann durch eine operative Tumorentfernung und/oder durch eine lokale Strahlentherapie erfolgen. Die Wahl der lokalen Maßnahmen hängt von der Ausdehnung, Lokalisation und Histologie des RMS ab. Die Lokaltherapie sollte nicht später als 10-12 Wochen nach Chemotherapiebeginn erfolgen (Pisters PWT et al., 2007).

Bei der primären Tumorresektion wird eine onkologisch radikale Resektion (R0) mit Organerhalt angestrebt. Eine intraläsionale Tumorverkleinerung sollte vermieden werden. Bei primär nicht resektablen Tumoren wird nach der bioptischen Sicherung der Diagnose mit einer Chemotherapie begonnen und je nach Ansprechen die weitere Lokaltherapie geplant.

Eine adjuvante Strahlentherapie erfolgt regelhaft bei inkompletter Resektion; bei RMS-artigen Tumoren, außer eRMS, wird sie auch nach einer R0-Tumorresektion eingesetzt. Die kumulative Strahlendosis (32-54 Gy) richtet sich nach der Radikalität der Resektion, dem Ansprechen auf die Chemotherapie und dem Alter des Patienten. Sie wird konventionell fraktioniert (1 x 1,8-2 Gy/Tag) oder hyperfraktioniert (zweimal 1,6 Gy/Tag) appliziert (Paulino AC, 2008; Park K et al., 2008).

Eine Hochdosischemotherapie mit Reinfusion von hämatopoetischen Stammzellen als Konsolidierung der kompletten Remission wird im Rahmen kontrollierter Studien bei initialer Metastasierung praktiziert (Ladenstein R et al., 2004). In der Studie CWS96 zeigte die doppelte Hochdosischemotherapie (Cyclophosphamid/Thiotepa und Melphalan/VP-16) mit autologem Stammzellrescue allerdings gegenüber einer oralen Dauertherapie (Trophosphamid, Idarubicin und VP-16) bei der Gesamtgruppe keinen Vorteil und war der oralen Dauertherapie bei der prognostisch günstigeren Subgruppe unterlegen (Klingebiel T et al., 2008). Aktuell wird in einer Phase II-Studie geprüft, ob eine Konsolidierung mit allogener Stammzelltransplantation und anschließender Tumorstabilisierung auf der Basis von dendritischen Zellen die Prognose verbessert wird. (CWS-IV 2002, Studienleiter Prof. Klingebiel, Olgahospital Stuttgart). Ergebnisse liegen noch nicht vor.

1.3.9 Prognose

Bei der Prognosestellung kommt es auf das Zusammenspiel von verschiedenen Faktoren an. So sind der histologische Typ, die Tumorkontrolle, der TNM-Status, das Alter des

Patienten wichtige Parameter. Besonders ungünstig sind ein niedriger Differenzierungsgrad, ein Tumordurchmesser von größer als 5 cm, eine rasche Tumorprogression, LK- und Fernmetastasierung, tiefe Lokalisationen, Lokalisationen am Körperstamm, parameningeal in der Kopf-Hals-Region, urogenital die Blase betreffend und ein hohes Alter des Patienten.

Im Falle eines lokalen RMS beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate zum heutigen Zeitpunkt mit konventioneller Therapie fast 70%. Das Problem stellen die metastasierten Fälle mit einer 5-Jahresüberlebensrate von weniger als 30% dar.

Die Prognose des aRMS ist aufgrund der hohen Lokalrezidivrate und Metastasierungstendenz im Vergleich zu allen anderen RMS-Subtypen generell schlechter (Brecht et al., 2003). Innerhalb der aRMS ist die relativ zur t(2;13)-Translokation seltener auftretende t(1;13)-Translokation mit einer günstigeren Prognose assoziiert (Slater et al., 2007).

Die Prognose ist zudem durch toxische Spätfolgen der Therapie belastet. Im Einzelnen sind dies nephrologische, kardiologische, hepatische, und endokrinologische Störungen sowie eine Minderung des Hörvermögens, Störung der Lungenfunktion und /oder eine verminderte Fertilität. Funktionelle Störungen können darüber hinaus auch als Folge des operativen Eingriffs eintreten.

Ziel der aktuellen kinderonkologischen Forschung ist es deshalb, neue klinische Marker und Konzepte im Bereich der Immun- und Gentherapie zu entwickeln, mit denen die Heilungsraten verbessert und die Spätfolgen reduziert werden können.

1.4 Tumorimmunologie

1.4.1 Tumorantigene

Im Rahmen der Tumorgenese bedingen qualitative und quantitative molekulare Veränderungen in benignen Ursprungszellen die Bildung von Tumorproteinen, die eine tumorassoziierte Immunantwort auslösen und demnach als Tumor-Ag bezeichnet werden. Tumor-Ag können als diagnostische Marker und als Ansatzpunkte für die Tumorimmuntherapie hilfreich sein (Chen YT et al., 2000).

Unter den Tumor-Ag muß man zwischen tumorspezifischen und tumorassoziierten Ag sowie zwischen individuellen und gemeinsamen (*shared*) Tumor-Ag unterscheiden.

Tumorspezifische Ag kommen nur in neoplastischen Geweben vor, während tumorassoziierte Ag nicht nur in Tumorgewebe, sondern in einem bestimmten Maße

(z.B. Überexpression) bzw. während bestimmter Entwicklungsstufen auch in Normalgeweben auftreten. Gemeinsame Tumor-Ag finden sich entitätsübergreifend in verschiedenartigen Tumoren, während individuelle Tumor-Ag nur bei einzelnen Tumoren und entitätsspezifische Ag nur bei einer bestimmten Art von Tumoren vorkommen.

Den Tumor-Ag sind Auto-Ag gegenüberzustellen. Sie werden in dieser Arbeit durch eine Immunantwort bei klinisch gesunden Individuen definiert. Die von anderen Autoren ausgewiesene Gruppe der tumorabhängigen Auto-Ag kann ohne quantitative Analyse des Expressionsniveaus und Untersuchung evtl. posttranslationaler Modifikationen nicht von der Gruppe der tumorassoziierten Ag unterschieden werden und wird deshalb in dieser Arbeit nicht extra abgegrenzt (Chen et al., 2000, Pfreundschuh et al., 2000, Preuss et al., 2002).

Die heterologe Serumanalyse mit Proben von gesunden Probanden (s. Kapitel 3.4) gibt Hinweise zur Unterscheidung von Tumor-Ag (nicht reaktiv) und Auto-Ag (reaktiv). Falls es sich bei dem Ag um ein Tumor-Ag handelt, ist über eine Analyse der molekularen Struktur und Gewebeexpression des Ag die oben genannte weitere Klassifizierung möglich.

Die größte Anzahl an heute bekannten Tumor-Ag mit klinischer Relevanz bilden die tumorassoziierten Ag. Als wichtiges Beispiel sind die Cancer-Testis-Ag zu nennen (z.B. NY-ESO-1; GAGE- MAGE-Familie), die ausschließlich in Tumorgewebe und in Gonaden exprimiert werden (Jäger D et al., 2001, Scanlan MJ et al., 2002, 2004). In letzteren werden sie nicht vom Immunsystem erkannt und lösen deshalb bei gesunden Probanden keine Immunreaktion aus (Simpson AJ et al., 2005). Als Beispiel für überexprimierte Tumor-Ag sind die bei Mamma- bzw. Prostatakarzinomen relevanten Ag HER 2/neu (*human epidermal growth factor receptor 2*) und PSA (*prostate specific antigen*) zu nennen. Zu den tumorassoziierten Ag, die nur während einer bestimmten Phase der Tumorgenese vorkommen, zählen z.B. die Melanozyten-Differenzierungs-Ag Tyrosinase, gp 100 oder Melan-A/ MART 1 (Chen YT et al., 2000).

Da Tumor-Ag sowohl über das zelluläre als auch über das humorale Immunsystem erkannt werden können, gibt es unterschiedliche Ansätze zu deren Identifikation, die im Folgenden kurz genannt werden (Jäger et al., 1998; Jäger et al., 2007).

1.4.2 Verfahren zur Identifizierung von Tumorantigenen mittels zytotoxischer T-Zellen

Zur Identifizierung von Tumor-Ag mittels CTL wurde 1991 von der Arbeitsgruppe um Thierry Boon erstmals ein Verfahren beschrieben, das eine Identifizierung von *major*

histocompatibility complex (MHC)-Klasse I-präsentierten Tumor-Ag mit Hilfe selektionierter, tumorspezifischer CD8⁺ T-Lymphozyten erlaubt (Van der Bruggen et al., 1991). Inzwischen wird bei den Verfahren, die auf vorselektionierten CD8⁺ T-Zellen basieren, zwischen einem genetischen und einem biochemischen Ansatz unterschieden.

Für den genetischen Ansatz wurden durch Kokultur humaner Tumorzellen und autologer Lymphozyten CTL-Klone generiert, die zwar die Tumorzellen, nicht aber eine Ag-Verlust-Variante der Tumorzellen erkannten. Durch Transfektion der Ag-Verlustvariante mit cDNA-Fraktionen der Ag-tragenden Tumorzelllinie und anschließende Testung der Transfektanten mit den tumorspezifischen CTL konnte die relevante Tumor-Ag-cDNA identifiziert werden. Zur Kartierung der verantwortlichen T-Zell-Epitope wurden überlappende cDNA-Abschnitte einzeln transfiziert, und die Transfektanten mit den Ag-spezifischen CTL getestet (Boon et al., 1999). Auf diese Weise wurde in einer Melanomzelllinie das erste humane Tumor-Ag namens MAGE-1 identifiziert (Van der Bruggen et al., 1991). Es gehört der Familie der Cancer-Testis-Ag an. Es folgte die Identifikation von weiteren zahlreichen Tumor-Ag von Melanomzellen, z.B. BAGE und GAGE (Boel et al., 1995, Van den Eynde et al., 1995), oder MART-1 (Coulie et al., 1994).

Als Modifikation des genetischen Ansatzes wurden tumorinfiltrierende Lymphozyten (TIL) mit autologen Tumorzellen *in vitro* kultiviert und dem Patienten reinfundiert. Bei klinischem Tumorregress *in vivo* wurden sie anstelle der aus peripherem Blut generierten CTL für den klassischen genetischen Ansatz verwendet (Rosenberg et al., 1997).

Für den biochemischen Ansatz wurden MHC-gebundene Peptidfraktionen aus den MHC-Molekülen von Tumoren herausgelöst, nach chromatografischer Auftrennung auf Surrogatzellen mit leeren MHC-Molekülen übertragen und mittels tumorspezifischer CTL gescreent. Auf diese Weise wurden tumorspezifische Peptide detektiert und anschließend ihre Sequenz analysiert (Van Bleek et Nathenson 1990, Mandelboim et al., 1994, Cox et al., 1994).

Mit Hilfe der beschriebenen T-Zell-Verfahren konnten zahlreiche Tumor-Ag identifiziert werden. Dennoch blieben die T-Zell-basierten Verfahren aus technischen Gründen zunächst auf MHC-Klasse I-präsentierte Ag beschränkt. Erst einige Jahre später wurden auch genetische und biochemische Ansätze für die Identifikation von MHC-Klasse II-präsentierten Tumor-Ag mit CD4⁺ T-Lymphozyten beschrieben (Pieper R. et al., 1999, Wang RF et al., 1999).

Ein allgemeiner Nachteil der T-Zell-basierten Verfahren ist die Abhängigkeit von etablierten Tumorzelllinien und tumorspezifischen T-Zellklonen; deren Herstellung ist zeitintensiv, komplex und bei vielen pädiatrischen Tumorentitäten problematisch.

1.4.3 Identifizierung von Tumorantigenen mit Hilfe von Antikörpern

Zur Identifizierung von Tumor-Ag mittels Serum-Ak entwickelte die Arbeitsgruppe von Lloyd Old in den 70-er Jahren ein Verfahren, das als autologe Typisierung bekannt wurde. Dabei wurden Oberflächen-Ag autologer Tumorzellen bzw. Tumorzelllinien durch die Reaktion mit autologen Serum-Ak nachgewiesen. Die Bestätigung eines Tumor-Ag wurde durch fehlende Ak-Bindung an autologe, benigne Zellen bekräftigt. Zu dieser Zeit wurde der Fokus auf maligne Melanome (Carey et al., 1976; Shiku et al., 1977), Leukämiezellen (Garrett et al., 1977), Hirntumoren (Pfreundschuh et al. 1978) und Nierenzellkarzinome gesetzt. Die Ausbeute an identifizierten Ag war jedoch aufgrund des hohen technischen Aufwands relativ gering, und eine molekulare Charakterisierung war noch nicht möglich.

1.4.4 Das SEREX-Verfahren

Mit Hilfe molekularer Klonierungstechniken wurde 1995 von der Arbeitsgruppe um Ugur Sahin, Özlem Türeci und Michael Pfreundschuh die autologe Typisierung zu dem sogenannten SEREX-Verfahren weiterentwickelt (Sahin et al., 1995). Dabei wird zunächst aus frischem oder kryokonserviertem Tumorgewebe eine repräsentative cDNA-Expressionsbibliothek in λ -Phagen konstruiert. Mit diesen werden *Escherichia coli* (*E. coli*) Bakterien infiziert und in den Bakterien die rekombinante Proteinsynthese induziert. Von Plattenkulturen der transfizierten Bakterien werden die rekombinanten Tumorproteine auf Nitrozellulosefolien übertragen und schließlich mit verdünnten Patientenseren auf ihre Reaktivität mit hochtitrigen Immunglobulin-G (IgG)-Ak getestet. Im positiven Falle wird die jeweilige Tumor-cDNA durch einfache Klonierschritte aus dem großen λ -Phagen in ein kleines Plasmid transferriert und in diesem sequenziert.

Das SEREX-Verfahren weist gegenüber den T-Zell-basierten Methoden und gegenüber der autologen Typisierung wichtige Vorteile auf (Preuss et al., 2002; Türeci et al., 1997).

Erstens besteht keine Abhängigkeit von etablierten Tumorzelllinien und selektionierten CTL-Klonen, so dass auch Tumoren untersucht werden können, die nicht *in vitro* kultivierbar sind.

Vorteilhaft ist zweitens auch der verhältnismäßig geringe Bedarf an biologischem Material. Das Patientenserum kann in einer Verdünnung von mindestens 1:100 und zudem mehrmals verwendet werden. Vom Tumor ist ein 0,5-1cm³ großes Stück ausreichend.

Drittens repräsentiert das Verfahren das *in vivo* exprimierte Ag-Spektrum. Artefakte wie Ag-Verlust oder Ag-Neuexpression, die bei der Expansion von Tumorzelllinien *in vitro* vorkommen, werden vermieden.

Viertens wird die gesamte mRNA der Tumorzellen repräsentiert, während bei der autologen Typisierung nur Oberflächen-Ag analysiert werden.

Der entscheidende Vorteil gegenüber der autologen Typisierung liegt darin, dass eine direkte molekulare Identifizierung der gefundenen Ag möglich ist.

Nachteilig ist bei dem SEREX-Verfahren, dass Epitope, die auf posttranslationalen Veränderungen beruhen, der Entdeckung entgehen. Außerdem fallen natürlich Ag, die keine signifikante humorale Immunantwort hervorrufen, durch das Raster.

Mit SEREX wurden einige Ag detektiert, die bereits mit CTL-basierten Verfahren identifiziert worden waren (Türeci et al., 1996; Van der Bruggen et al., 1991. Chen YT et al., 2000). Dies zeigt, dass der serologische Ansatz auch als indirektes *Screening*-Verfahren bei der Suche nach antitumoralen T-Zell-Antworten genutzt werden kann.

Eine SEREX-Analyse von pädiatrischen Sarkomen war zu Beginn dieser Arbeit nicht publiziert worden. In der vorliegenden Arbeit sollte die SEREX-Methode deshalb zum ersten Mal auf ein aggressives Sarkom eines pädiatrischen Patienten angewandt werden.

1.5 Immuntherapie von Tumoren

1.5.1 Nicht-antigenspezifische Therapie

Zahlreiche Verfahren zur Immuntherapie von Tumoren wurden getestet. Der Einsatz von bestrahlten autologen und allogenen Tumorzellen als Vakzine zeigte keine zufriedenstellenden Erfolge (Jäger et Knuth, 1999). Zur Unterstützung der Tumorzellvakzinierung wurden immunstimulierende Faktoren wie Interleukin 2 (IL2) oder Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) eingesetzt. Als Erweiterung der Methode wurden diese Faktoren auch rekombinant in Tumorzellen exprimiert. (Soiffer et al., 1998, Roskrow et al., 1999). Der Nachteil all dieser Tumorzellvakzine war jedoch die Beschränkung auf Tumorentitäten, deren Zellen sich *in vitro* gut kultivieren lassen. Außerdem gilt die ungerichtete verglichen mit der Ag-spezifischen Vakzinierung als weniger effektiv und weniger sicher, da sie die Gefahr von unerwünschten Autoimmunreaktionen gegen Normalgewebe birgt.

1.5.2 Antigen-spezifische Therapie

Ag-spezifische immuntherapeutische Strategien lassen auf eine höhere Wirksamkeit und auf ein geringeres Risiko für unerwünschte Nebenwirkungen hoffen. Bei der Ag-spezifischen Immuntherapie sind aktive und passive Ansätze zu unterscheiden.

Bei der aktiven Ag-spezifischen Vakzinierung wird das Immunsystem des Patienten *in vivo* stimuliert. Zum Einsatz kommen zum Beispiel Tumor-Ag-Peptide oder Tumor-Ag-beladene autologe dendritische Zellen (Jäger et Knuth, 1999). Voraussetzung ist ein weitgehend funktionierendes Immunsystem.

Da die Funktion des Immunsystems bei vielen Risikopatienten aufgrund des ausgedehnten Krankheitsprozesses und/oder Zustandes nach immunsuppressiver Therapie eingeschränkt ist, erscheinen hier passive Ansätze günstiger.

Die passive Immuntherapie kann in der Gabe von monoklonalen Ak bestehen, die gegen Oberflächen-Ag des Tumors gerichtet sind. Eine Weiterentwicklung stellen bispezifische Ak dar, die sowohl das Tumor-Ag als auch einen modulierenden löslichen Faktor oder einen T-Zellrezeptor binden können.

Einen anderen passiven Ansatz bietet der adoptive T-Lymphozyten-Transfer. Im klassischen Fall werden tumorspezifische T-Zellen des Patienten *in vitro* selektiert und nach Amplifikation in den Patienten reinfundiert (Bernhard et al., 1999).

Problematisch bleibt bei allen Formen der Tumorimmuntherapie die Tatsache, dass viele Tumoren *immune escape*-Mechanismen entwickelt haben (s. Kapitel 5.4.). Ein solcher Mechanismus besteht in der selektionsbedingten Anpassung des Ag-Musters mit Auswachsen von Ag-Verlustvarianten. Deshalb sollten Ag-spezifische tumorimmuntherapeutische Strategien möglichst gegen mehrere Ag gleichzeitig gerichtet, also polyvalent sein.

Um die Entwicklung von Ag-spezifischen therapeutischen Strategien zu fördern, muss demnach weiterhin systematisch nach geeigneten Tumor-Ag gesucht werden. Im Sinne der Rentabilität von Ag-spezifischen Strategien sind entitätsübergreifende Ag besonders günstig.

1.5.3 Tumorimmuntherapie bei Sarkomen

Die Kenntnisse über tumorspezifische Immunreaktionen gegen Sarkome sind noch rar. Demzufolge stehen auch nur wenige immuntherapeutische Therapieansätze für Sarkome zur Verfügung. Sie wurden in ersten Pilotstudien getestet.

Beispielsweise wurden 17 erwachsene Sarkompatienten nach Radiatio intradermal mit GM-CSF-transfizierten, allogenen Tumorzellen vakziniert. Ein Patient zeigte eine positive Immunantwort gegen den Tumor in Form einer verzögerten Hypersensitivitätsreaktion. Ein weiterer Patient zeigte eine partielle Remission einer Metastase (Mahvi et al., 2002).

Bei 16 jungen Patienten mit Rezidiven eines Ewingtumors oder eines aRMS erfolgte eine Peptidvakzinierung mit gleichzeitiger Gabe von IL2. Die Peptide stammten von den tumorspezifischen Fusionsproteinen EWS/FLI-1 und PAX3/FKHR, die von den charakteristischen Translokationsbruchpunktregionen kodiert wurden (s. Kapitel 1.3.4. Molekulargenetik). Ein signifikantes klinisches Ansprechen der Tumorerkrankungen konnte nicht dokumentiert werden (Dagher et al., 1999, 2002).

Vielversprechend ist die Identifikation einer Reihe von tumorassoziierten Cancer-Testis-Ag in RMS, so dass potentielle Targets für Ag-spezifische Immuntherapieansätze postuliert werden können. Beispiele liefern Ag der MAGE-, BAGE- und GAGE-Familie (Tanzarella et al., 2004, Dalerba et al., 2001).

Die Ergebnisse zeigen interessante Therapieansätze auf, die jedoch noch deutlich weiterentwickelt und ergänzt werden müssen, bevor sie zur Reduktion der Therapietoxizität und verbesserten Heilungsraten bei Kindern mit Sarkomen beitragen können.

2 Material

2.1 Antibiotika

Ampicillin (# 835269), Roche (Mannheim):

Stammlösung: 10 mg/ml in 70% EtOH; Gebrauchslösung: 50 µg/ml

Kanamycin (# K-0879), Sigma (München):

Stammlösung: 10 mg/ml H₂O; Gebrauchslösung: 50 µg/ml

Tetrazyklin (# T 7660), Sigma (München):

Stammlösung: 10 mg/ml in 70% EtOH; Gebrauchslösung: 15 µg/ml

2.2 Bakterien

XL-1 Blue MRF'

E. coli XL1-Blue MRF' (# 200450), Fa. Stratagene

SOLR

SOLRTM (# 200298), Fa. Stratagene

2.3 cDNA- Expressionsbibliothek

Die primäre cDNS Expressionsbibliothek enthielt mehr als 1×10^6 rekombinanter Phagen. Sie wurde nach Amplifikation von PD Dr. med. Uta Behrends zur Verfügung gestellt.

2.4 cDNA aus Gewebe

Das verwendete *human multiple tissue cDNA panel I + II* (# 636742, # 636743) der Fa. Becton Dickinson (Biosciences Clontech, Palo Alto, USA) enthielt cDNA-Proben von Lunge, Niere, Leber, Skelettmuskulatur, Plazenta, Pankreas, Herz, Gehirn, Ovar, Dünndarm, Leukozyten, Dickdarm, Milz, Thymus, Prostata, Testis. cDNA aus peripheren Blutlymphozyten und cDNA-Bibliotheken von anderen Tumorgeweben wurden von PD Dr. med. U. Behrends zur Verfügung gestellt.

2.5 Chemikalien

Agarose (# 11404), Serva (Heidelberg)

Agarose, Electrophoresis Grade (# 15510-027), Invitrogen (Carlsbad, USA)

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

Stammlösung: 50 mg/ml (in 100% DMF)

Gebrauchslösung: 1:2000 (in 1× CDS)

Chloroform (# 1.02445), Merck (Darmstadt)

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

dNTP Set PCR Grade 100 mM (# 10297-117), Invitrogen (Carlsbad, USA)

Ethanol absolut (# 1.00983.2500), Merck (Darmstadt)

Ethidiumbromid (# 1.11608.0030), Merck (Darmstadt)

Ethylenediaminetetraacetic acid-disodium salt (EDTA) (# 300071), Stratagene (La Jolla, USA)

Gene Ruler™ 1kb DNA Ladder (# SM 0311), Fermentas (St. Leon-Rot)

Gene Ruler™ 1kb DNA plus Ladder (# 1241400), Invitrogen (Carlsbad, USA)

Glycerin 87% (# 1.04094), Merck (Darmstadt)

HCl 32% (# 1.00319), Merck (Darmstadt)

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

Stammlösung: 1 M (in ddH₂O, aliquotiert bei - 20°C)

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

Kaliumchlorid (# 1.04936), Merck (Darmstadt)

Magermilchpulver, Nestle (Frankfurt)

Maltose, (# M-5885), Sigma (München)

Stammlösung: 20%

Gebrauchslösung: 0,2%

MgSO₄ - 7 H₂O , (# M-5921), Sigma (München)

Stammlösung: 1 M

Gebrauchslösung: 0,01 mM

NaCl (# 1.06404.5000), Merck (Darmstadt)

NaOH (# 6498), Merck (Darmstadt)

Natriumazid (# 106688), Merck (Darmstadt):

Stammlösung: 10%

Gebrauchslösung: 0,0125%

Natriumhydrogenphosphat (# 1.06586), Merck (Darmstadt)

NBT (Nitroblue Tetrazoliumchloride), (# 06428), Biomol (Hamburg):

Stammlösung: 100 mg/ml (in 70% DMF)

Gebrauchslösung: 1:2000 (in 1× CDS)

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

Select Agar (# 30391-023), Gibco BRL (Eggenstein)

Select Peptone 140, (# 30392-021), Gibco BRL (Eggenstein)

Select Yeast Extract (# 30393.020), Gibco BRL (Eggenstein)

Thimerosal (# T 2299), Sigma (München)

Stammlösung: 10%

Gebrauchslösung: 0,0125%

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (# 1.08382.2500), Merck (Darmstadt)

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

Stammlösung: 250 mg/ml in DMF 99%

2.6 Enzyme

EcoRI (# 500480), Stratagene (La Jolla, USA)

Taq DNA Polymerase (# 15756305) Promega (Mannheim)

XhoI (# 501140), Stratagene (La Jolla, USA)

BamHI (# R0136), Bio Labs (New England)

2.7 Kits

Jetstar, Plasmid Mini/Maxiprep Kit/20 (#220020), Genomed (Bad Oeynhausen)

2.8 Medium

- LB-Medium: 10 g Peptone
5 g Select Yeast-Extract
10 g NaCl
ad 1 Liter dd H₂O, autoklaviert
- LB-Tet-Platten: 7 g Select Agar
ad 400 ml LB-Medium, autoklaviert
Gebrauchslösung: 52°C + 600 µl Tetrazyklin-Stammlösung
Lagerung: lichtgeschützt bei 4°C
Verwendung: 2-14 Tage nach Herstellung
- Top-Agar: 2,8 g Agarose
ad 400 ml LB-Medium, autoklaviert
Gebrauchslösung: 52°C

2.9 Oligonukleotide

Die Basenangaben beziehen sich auf den GenBank-Eintrag der RANBP2-cDNA mit der GenBank-Zugangsnummer NM_006267.4.

PCR-Produkte 248-210 se1/an1 (3131bp und 206bp bei Spleißen von 2925bp):

Sense 1: 5'-CAG TAT CTT CTC AGA CCA GC-3' (bp 2782-2801)

Antisense 1: 5'-CCA CTA ATA TCC TGA GCC TG-3' (bp 5912-5893)

PCR-Produkt 248-210 se2/an2 (725bp):

Sense 2: 5'-ATA GTG TCA CTA CCA GAG GT-3' (bp 8869-8888)

Antisense 2: 5'-CCA GGA CCA GTA TGT TTC AC-3' (bp 9593-9574)

PCR-Produkt 248-210 se3/an3 (661bp):

Sense 3: 5'-TGC TTG TAT GTT CTC TCA GG-3' (bp 2916-2935)

Antisense 3: 5'-TGC TGT CTC TAA AGT GGG TG-3' (bp 3576-3557)

2.10 Humanes Serum

Das Serum wurde einerseits von klinisch gesunden Probanden im Alter von 0 bis 45 Jahren und andererseits von pädiatrischen Patienten mit verschiedenen Malignomen gewonnen. Die Proben wurden entsprechend dem genehmigten Antrag an die Ethikkommission der Technischen Universität (TU) München nach Einwilligung der Probanden bzw. nach Einwilligung der Patienten bzw. ihrer Sorgeberechtigten entnommen.

2.11 Phagen

λ -Phage, EX Assist™ (# 200450), Stratagene (La Jolla, USA)

f1-Helferphage, EX Assist™ (# 200450), Stratagene (La Jolla, USA)

2.12 Puffer

CDS: Stammlösung (5×): 100 ml Tris (1 M) + 50 ml MgCl₂ (1 M)
+ 100 ml NaCl (5 M), auf 1 Liter dd H₂O

Gebrauchslösung (1×): verdünnen mit ddH₂O

PBS (pH 7,4): 5,8 g NaCl + 0,2 g KCl + 1,15 g Na₂HPO₄ × 7 H₂O + 0,2 g KH₂PO₄
auf 1 Liter dd H₂O (pH mit 32% HCl)

SM-Puffer: 5,8 g NaCl + 2 g MgSO₄ × 7 H₂O + 50 ml Tris-HCl (pH 7,5) +
5 ml 2% (w/v) Gelatine, auf 1 Liter ddH₂O und steril filtrieren

TAE (pH 7,5): Stammlösung (50×): 242 g Tris-Base + 57,1 g Eisessig +
37,2 g Na₂EDTA × 2 H₂O (ddH₂O auf 1 Liter)

Gebrauchslösung (1×): verdünnt mit ddH₂O

TBS (pH 7,5): 120 g Tris + 175 g NaCl, auf 2 Liter mit ddH₂O auffüllen und mit
32% HCl auf pH 7,5 einstellen

TBST (pH 7,5): 2 Liter TBS + 10 ml Tween 20

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

2.13 Sekundärantikörper

Zum Einsatz kam ein anti-humaner IgG-Fc-Ak der Ziege, der an alkalische Phosphatase gekoppelt war (#109-055-098) (Dianova, Hamburg).

0,6 mg des lyophilisierten Ak wurden in 1 ml dd H₂O und 1ml Glycerol gelöst.

2.14 Geräte

Analysen-Waage, Mettler (Giessen)

Beheizter Rüttler, Innova 400, New Brunswick Scientific (Edison, USA)

Beheiztes Wasserbad, Typ WB 22, Memert (Schwabach)

Brutschrank, Memert Modell 400, Memert (Schwabach)

Dampfsterilisator Varioklav 300 E (H+P) (München)

Gelelektrophoresekammer mit Powersupply, Peqlab (Erlangen)

Kühlzentrifuge Sigma 2K15, Sigma (Osterade am Harz)

Photometer, Uvikon-Spectrophotometer 922, Bio-Tek Kontron (Neufahrn)

Pipetus-Akku Pipetierhilfe-ml, Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt)

Pipetierhilfe- μ l, Pipetman, Gilson S.AS. (Villiers le Bel, Frankreich)

Schwenktisch, IKA Labortechnik (Staufen)

Standzentrifuge, Varifuge 3.2 RS, Heraeus, Sepatech (Hanau)

Rüttler, Vortex Genie 2, Scientific Industries (Bohemia, NY, USA)

Thermocycler, GeneAmp PCR-System 2400, Perkin Elmer (Weiterstadt)

Tischwaage, Mettler (Giessen)

Tischzentrifuge Centrifuge 5415C, Eppendorf (Hamburg)

Ultrazentrifuge, Centricon, H-401, ZK 401, B. Hermele (Gosheim)

UV-Transilluminator Gel Doc 2000, Biorad (München)

2.15 Software und Datenbanken

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

GENETOOL 1.0, Bio Tools (Edmonton Canada)

PUBMED: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>

SEREX-Database: <http://www2.licr.org/CancerImmunomeDB/>

2.16 Verbrauchsmaterial

Falcon Röhrchen, Becton Dickinson (Heidelberg)

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

Parafilm, Laboratory Film, PM-996, American National Can (Chicago, USA)

Petrischalen (#639102), M&B Stricker (München)

Pipettenspitzen (#2149P), ART Molecular Bio Products (SD, USA)

Polypropylene Round-Bottom Tubes, Becton Dickinson (Heidelberg)

Polypropylene Conical Tubes, Becton Dickinson (Heidelberg)

Sterican, Einmal-Injektions-Kanülen (B/Braun)

3 Methoden

3.1 SEREX-Analyse

Die von Sahin und Kollegen etablierte SEREX-Analyse hat das Ziel, mit Hilfe der autologen, humoralen Immunantwort tumorale Ag zu finden und deren molekulare Struktur zu identifizieren (Sahin et al. 1995).

In der eigenen Arbeit wurde eine cDNA-Expressionsbibliothek verwendet, die von der Arbeitsgruppe mit Hilfe des *mRNA Isolation Kit*, des *ZAP cDNA Synthese Kit* und des *ZAP-cDNA Gigapack III Gold cloning Kit* der Fa. Stratagene den Angaben des Herstellers entsprechend aus kryokonserviertem Gewebe eines aRMS konstruiert worden war. Zur Herstellung der cDNA-Bibliothek war die messenger (m)RNA aus dem Tumorgewebe isoliert, in methylierte cDNA umgeschrieben und über die Schnittstellen der Enzyme *EcoRI* und *XhoI* in den Uni-ZAP XR λ -Vektor kloniert worden. Die rekombinanten Vektoren waren anschließend mit Hilfe eines Verpackungsextrakts zu funktionellen λ -Phagen verpackt worden.

In der eigenen Arbeit wurde zunächst der Titer der primären Phagenbibliothek über eine Transfektion von *E. coli*-Bakterien des Stammes XL-1 Blue MRF' ermittelt. Anschließend wurde die primäre Bibliothek amplifiziert und ihr Phagentiter sowie der Anteil rekombinanter Phagen geprüft. Wünschenswert waren eine mindestens 1000-fache Amplifikation und ein Anteil von mehr als 90% rekombinanter Klone.

Bei der anschließenden SEREX-Analyse wurden *E. coli*-Bakterien mit einzelnen Fraktionen der amplifizierten Phagenbibliothek infiziert und zur Rasenbildung auf Agarplatten ausgebracht. Die einzelnen lytischen Plaques auf dem Bakterienrasen entsprachen jeweils einem Phagenklon und ggf. einem rekombinanten Tumorprotein. Alle Proteine wurden durch Abklatsch von den Agarplatten auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und für die Tumor-Ag-Suche mit Patientenserum inkubiert. In dieser Arbeit wurde ein Pool der Serumproben von fünf Patienten mit einem RMS (davon drei mit einem aRMS und jeweils ein Patient mit einem unklassifizierbaren RMS bzw. eRMS) eingesetzt. Durch einen zweiten Inkubationsschritt mit einem Alkalische-Phosphatase-gekoppelten Sekundär-Ak, der gegen den Fc-Teil humaner IgG-Ak gerichtet war, ließen sich Serum-Ak-reaktive Tumorproteine darstellen. Die entsprechenden Plaques wurden auf der Bakterienplatte ausgestochen, ggf. durch erneutes Ausplattieren monoklonalisiert, in monoklonaler Form durch einfache Klonierschritte in eine Plasmidform überführt und anschließend die cDNA-Sequenz des Fremdgens bestimmt. In den folgenden Abschnitten werden die einzelnen Arbeitsschritte näher erläutert (**Abb. 6**).

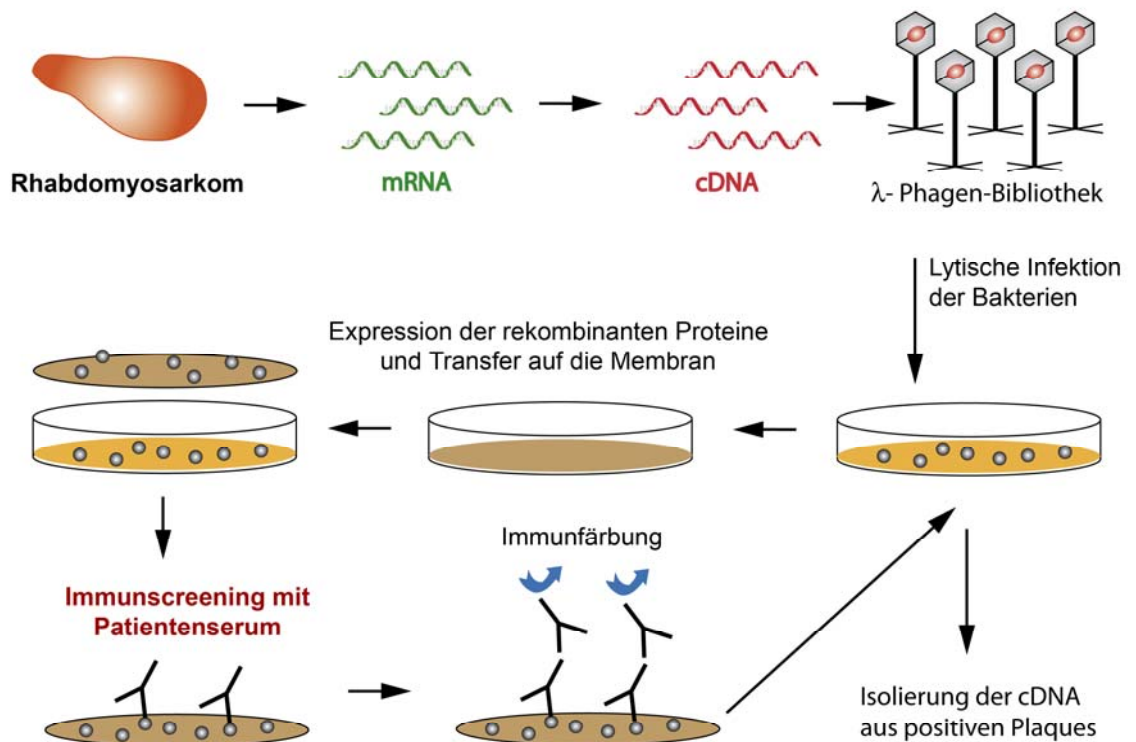


Abb. 6 Graphische Darstellung der SEREX-Analyse

(Abbildung modifiziert nach Rößler, 2005)

3.1.1 Präparation der bakteriellen Wirtszellen

Verwendet wurden die Bakterienstämme XL1-Blue MRF' und SOLR, die als Glycerolstocks zur Verfügung gestellt wurden.

Spuren der Glycerolstocks der oben genannten Bakterien wurden wöchentlich neu auf einer LB-Tetrazyklin-Stammagarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37° C inkubiert. Die Platte mit den makroskopisch sichtbaren Bakterienkolonien wurde für eine Woche bei +4° konserviert und diente als Bakterienquelle für die einzelnen Transfektionsansätze.

Für die Transfektion mit den Bakteriophagen wurden ca. zehn Kolonien von der Bakterienstammpalte geerntet und in 50 ml LB-Medium mit 75µg Tetrazyklin, 500 µl 20% Maltose und 500 µl 1M Mg SO₄ als Schüttlerkultur (200 rpm, 37° C) angezchtet. Die Zugabe von Maltose und MgSO₄ sollte eine Verbesserung der späteren Anheftung von Bakterien und Phagen bewirken. Nach Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase, die bei einer optischen Dichte von 0,5 bei der Wellenlänge 600 nm (OD₆₀₀ 0,5) anzunehmen war, wurde die Bakterienkultur 10 min bei 500 x g zentrifugiert und das Bakterienpellet in sterilem 0,01 M MgSO₄ bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 resuspendiert.

3.1.2 Transfektion der λ -Phagen und Induktion der rekombinanten Proteinexpression

Zur Transfektion wurden jeweils 600 μ l der oben beschriebenen Bakteriensuspension in 0,01 M MgSO_4 (OD_{600} 0,5) mit einer geeigneten Menge der Phagenlösung ($< 250 \mu$ l) für 15 min bei 37° C inkubiert. Während dieser Zeit erfolgte die Anheftung der Phagen an die Bakterien. Das eingesetzte Phagenvolumen wurde so berechnet, dass sich später etwa 3000 Plaques auf der Bakterienplatte fanden. Anschließend wurde das Phagen-Bakterien-Gemisch zur Induktion der rekombinanten Proteinsynthese mit jeweils 30 μ l IPTG (Isopropylthiogalactosid) versetzt sowie mit 6 ml flüssigem Topagar (52°C) gemischt und schließlich gleichmäßig auf vorgewärmte (37°C) LB-Tetrazyklin-Platten gegossen. Nach Festwerden des Agars (ca. 10min) wurden die Topagar-beschichteten Platten für ca. 8-12 h bis zur Bildung lytischer Plaques mit einem Durchmesser von ca. 2 mm bei 37 °C inkubiert.

Bei der Durchführung des Blue-White-Tests zur Differenzierung von rekombinanten und nicht-rekombinanten Phagen (s. Kapitel 3.1.5) wurden dem Transfektionsansatz zusätzlich 50 μ l X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid) zugegeben.

Die *multiple cloning site* (MCS) des UNI-ZAP-XR-Vektors, in den die Tumor-cDNA inkloniert wurde, befindet sich innerhalb des *lacZ*-Gens, welches für eine Untereinheit des Enzyms β -Galactosidase kodiert. Der Promotor dieses Gens wird in XL1-Blue MRF' durch einen auf dem F'Episom der Bakterien kodierten Repressor gehemmt. Durch den Zusatz des Galaktoseanalogons IPTG kann diese Hemmung jedoch aufgehoben und auf diese Weise die Transkription des Gens mit nachfolgender Synthese des rekombinanten Proteins induziert werden.

Das *β -Galactosidase*-Gen ist nur bei fehlender Rekombination funktionstüchtig, weshalb die Zugabe des X-Gal im Blue-White-Test nur bei nicht-rekombinanten Phagen in einer enzymatischen Umwandlung zu einem blauen Farbstoff resultiert (s. Kapitel 3.1.5).

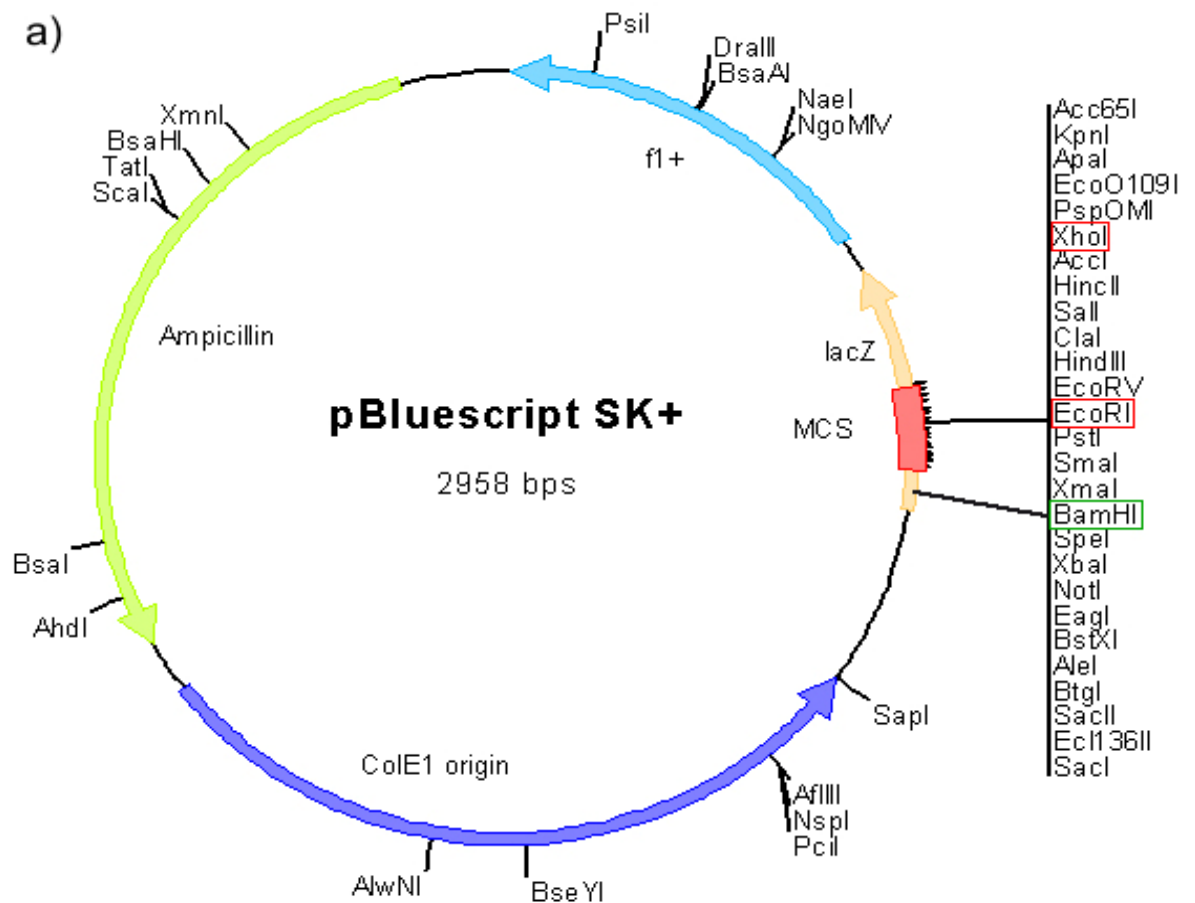


Abb. 7 Vektorkarte des pBluescript Phagemids (2958 bp) (a) und Sequenz der rekombinanten MCS (b) (Abbildung modifiziert nach Rößler 2006)

a) Ampicillin (bp 1975-2832): Ampicillinresistenz; f1 + (bp 6-462): Replikationsstartpunkt für den filamentösen Phagen; ColE1 origin (bp 1032-1912): Replikationsstartpunkt des Plasmids bei Abwesenheit von Helferphagen; LacZ (lac Promotor: bp 816-938): das *lacZ*-Gen ermöglicht die *Blue-White*-Selektion von rekombinanten Phagen, der IPTG-induzierbare *lacZ*-Promotor erlaubt die Expression eines Fusionsproteins mit dem β -Galaktosidasegenprodukt; MCS (bp 657-759): *multiple cloning site*, flankiert von den T3- und T7-Promotoren. Rechts in der Spalte sind die in der MCS gelegenen Schnittstellen verschiedener Enzyme einschließlich der in dieser Arbeit verwendeten Enzyme *XhoI* und *EcoRI* gelistet

b) Das ATG-Startcodon des β -Galaktosidase-Gens (bp 11-13) wurde blau hervorgehoben, die Sequenz des T3- und T7- Promotors wurde unterstrichen, das Fremdgen wurde mit Hilfe von Polylinkern (rote Nukleotide) in die Schnittstellen der Enzyme *EcoRI* *XhoI* und *BamHI* einkloniert.

3.1.3 Amplifikation und Konservierung der λ -Phagen-Bibliothek

Zur Amplifikation der primären Phagen-Bibliothek wurden je 500 pfu mit 600 μ l Bakteriensuspension auf eine Agarplatte ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Ab Erreichen eines Durchmessers von 1-2 mm pro lytischem Plaque wurden die Platten mit jeweils 8 ml SM-Puffer überschichtet und über Nacht auf einem Schwenktisch bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Dabei diffundierten die Phagen in den SM-Puffer und konnten mit diesem am nächsten Morgen abpipettiert werden. Die Phagenlösung wurde mit 5 Vol% Chloroform versetzt und zentrifugiert (2000 \times g für 10 min), um kontaminierende Bakterien abzutöten und zu eliminieren. Nach der Titerbestimmung wurden Aliquots der gereinigten Phagensuspension entweder zur vorübergehenden Aufbewahrung bei 4°C mit 0,3 Vol% Chloroform versetzt oder nach Durchmischung mit 7 Vol% DMSO langfristig bei - 80°C asserviert.

3.1.4 Titerbestimmung der λ -Phagen-Bibliothek

Zur Titerbestimmung der Phagenlösung wurde nach dem beschriebenen Protokoll (s. Kapitel 3.1.2) ein Transfektionsansatz mit je 10 μ l der unterschiedlich verdünnten Phagenlösung (1:10² bis 1:10⁶) in je 600 μ l der Bakteriensuspension (XL1-Blue MRF') hergestellt. Nach 8-12 h Bebrütung auf je einer LB-Tetrazyklin-Agarplatte pro Ansatz wurden die lytischen Plaques auf allen geeigneten Platten ausgezählt und der Mittelwert für die Berechnung des Phagentiters herangezogen.

3.1.5 Bestimmung des Anteils rekombinanter Klone („Blue-White Test“)

Der Blue-White-Test stellt eine Methode dar, die es erlaubt, die Qualität der Phagenbank zu überprüfen. Das angestrebte Ergebnis ist ein Verhältnis von mindestens 9:1 rekombinanter zu nicht rekombinanten Klonen.

Für den Blue-White-Test wurde dem Transfektionsansatz (s. Kapitel 3.4) zusätzlich zu IPTG das Lactoseanalogon X-Gal hinzugegeben. Der Abbau von X-Gal zu 5,5-Dibrom-4,4-Dichlorindigo bewirkte eine Blaufärbung, die nicht rekombinante blaue von rekombinanten weißen Plaques unterschied. Verantwortlich für die unterschiedliche Anfärbung war die Tatsache, dass bei rekombinanten Klonen das β -Galactosidase-Gen (*lac Z*-Gen) durch die aus dem Tumor stammende einklonierte DNA zerstört war und

somit die Enzymaktivität der β -Galaktosidase fehlte, während Phagen ohne Fremd-DNA das intakte Enzym bilden konnten und daher blau erschienen.

Im Einzelnen wurden 600 μ l XL1-Blue MRF' und 3000 pfu der cDNA-Bibliothek für 15 min bei 37°C inkubiert. Der Transfektionsansatz wurde mit 6 ml TOP-Agar, 50 μ l X-Gal-Lösung und 30 μ l IPTG-Lösung vermischt auf eine LB-Tet-Agarplatte ausgebracht, über Nacht bei 37°C inkubiert, und der Anteil weißer Plaques am Folgetag durch makroskopische Auszählung ermittelt.

3.1.6 Präabsorption der humanen Seren

Vor dem Einsatz der Seren mußten diese an nicht rekombinante *E. coli*-Bakterien und Phagenproteine vorabsorbiert werden, um bei den späteren Analysen unspezifische IgG-Bindungen an Bakterien- und Phagenbestandteile zu vermeiden.

Dazu wurden Kieselgelsäulen und Nitrozellulosemembranen mit Lysat von phageninfizierten *E.coli*-Bakterienkulturen beladen und die präparierten Säulen und Membranen mit den Patientenseren inkubiert.

Zur Herstellung der Kieselgelsäulen wurden 50 ml Bakteriensuspension XL-1 Blue MRF' in Schüttelkulturen bei 37°C über Nacht bis zu einer OD 1 kultiviert und anschließend bei RT mit 1500 \times g zentrifugiert. Das Pellet wurde nach Lösung in 5 ml TBS mit einem Ultraschallhomogenisator über 5 - 8 sec auf Eis mechanisch aufgeschlossen.

Das Pellet einer weiteren Kultur wurde in 5 ml LB-Medium aufgenommen, mit 7,5 μ l Tetrazyklin, 50 μ l 1 M MgSO₄, 50 μ l 20% Maltose und 10 μ l nicht rekombinanten Phagen versetzt und 4 h bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Die lysierte Bakteriensuspension wurde ebenso mit dem Ultraschallhomogenisator aufgeschlossen.

Beide Ansätze wurden jeweils in ein mit 2 ml Kieselgel (Glutaraldehyd-aktivierte Silikatmatrix) gefülltes Falconröhrchen gefüllt und für 4 h bei Raumtemperatur (RT) oder über Nacht bei 4°C in einem Rotator gedreht. Dabei banden sich die Bakterien- bzw. Phagenbestandteile der einzelnen Kulturen an die Säulenmatrix. Nach Abnehmen der Bakteriensuspension wurden die Säulen dreimal je 30 min mit 35 ml TBS/0,01% Na-Azid gewaschen und standen als so genannte „mechanische“ bzw. „lytische“ Säulen für die Serum-Präabsorption zur Verfügung.

Nach Gebrauch wurden sie je dreimal eine halbe Stunde mit Tris pH 3 gewaschen, mit TBS äquilibriert und bei 4°C aufbewahrt. Insgesamt wurden sie für maximal drei Präabsorptionsgänge benutzt.

Zur Herstellung der Präabsorptionsmembranen wurden 600 µl der Bakteriensuspension (XL1-Blue MRF') mit nicht rekombinanten Phagen transfiziert, auf einer LB-Tet-Agarplatte ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Konzentration der Phagen wurde so gewählt, dass der Bakterienrasen fast vollständig von lytischen Plaques durchsetzt war. Am nächsten Morgen wurde wie unten beschrieben (s. Kapitel 3.1.7.) für 2 h eine Nitrozellulosemembran aufgelegt und auf diese Weise die Phagenproteine übertragen. Nach Waschen mit TBS und Na-Azid konnten die Membranen entweder sofort in die Serumpräabsorption eingesetzt oder zur weiteren Aufbewahrung luftgetrocknet werden.

Zur Präabsorption der Seren wurden 2 ml Serum in TBS mit 0,2% Magermilchpulver zehnfach verdünnt und je 20ml verdünntes Serum zunächst für je 6-24 h mit einer lytischen und einer mechanischen Kieselgelsäule sowie im Anschluss jeweils über 4-16 h bei RT auf einem Schwenktisch mit 6 lytischen Nitrozellulosemembranen inkubiert. Nach der Präabsorption wurden je 20 ml des 1:10 vorverdünnten Serums mit 0,2 % Magermilchpulver in TBS zehnfach auf 200 ml verdünnt und mit Stabilisatoren versetzt (0,025 % Na-Azid und 0,025% Thimerosal), bei 4° C aufbewahrt oder sofort in das Immunscreening eingesetzt.

3.1.7 SEREX-screening

Wie oben beschrieben (s. Kapitel 3.1.2), wurde eine Fraktion der Phagenlösung (ca. 3000 pfu/Ansatz) mit 600 µl Bakteriensuspension bei 37°C über 15 min inkubiert, anschließend mit je 6 ml vorgewärmtem (52°C) Top-Agar und 30 µl IPTG-Stammlösung auf vorgewärmten (37 °C) Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag fanden sich auf den Agarplatten lytische Plaques mit ca. 2-3 mm Durchmesser.

Um die rekombinant exprimierten Tumorproteine in den lytischen Plaques auf Nitrozellulose zu übertragen, wurden auf den mit Plaques durchsetzten Bakterienrasen passend zugeschnittene frische Nitrozellulosefolien luftblasenfrei aufgelegt und für 2 h bei 37°C inkubiert. Um die Position der Folie auf der Agarplatte später rekonstruieren zu können, wurde sie mittels dreier Nadelstiche durch Membran und Agar markiert. Um das Ablösen der Membranen von deren Agarplatten zu erleichtern, wurden die belegten Platten vor dem Abziehen der Membranen für ca. 30 min bei 4°C gekühlt. Nach dem Abziehen wurden die Folien für 3 x 15 min in TBS-T auf einem Schwenktisch gewaschen und verbliebene Agarreste manuell mit rauen Handschuhen abgestreift.

Vor der Seruminkubation der Folien wurden sie für 1 h mit 5% Magermilchpulver in TBS

inkubiert, um unspezifisch bindende Reste der Nitrozellulosefolie zu blocken. Nach Abnehmen der Magermilch wurden die Folien 3 × 30 min in jeweils frischem TBS gewaschen. Anschließend wurde jede Folie einzeln in einer Petrischale bei RT über Nacht auf einem Schwenktisch mit dem präabsorbierten, 1:300 verdünnten Patientenserum inkubiert. In dieser Arbeit wurde ein Pool aus Serumproben von fünf Patienten mit einem RMS eingesetzt, darunter drei Patienten mit einem aRMS und jeweils ein Patient mit einem unklassifizierbaren RMS bzw. eRMS. Am nächsten Morgen wurde das Serum abgenommen, über einem Faltenfilter gereinigt und wieder bei 4°C asserviert.

Nach der Seruminkubation wurden die Folien 3 x 10 min in TBS gewaschen und für 2 h bei RT mit Alkalische-Phosphatase-gekoppeltem Sekundär-Ak mit Spezifität für humanes IgG (Verdünnung 1:2500 in 0,5 % Magermilch in TBS) inkubiert. Im Anschluß folgte nach zweimaliger Säuberung der Folien mit TBS über 15 min die Immunfärbung. Zu diesem Zweck wurden die Folien mit je 20 ml CDS versetzt, mit je 20 µl BCIP und 20 µl NBT bei 37° C im dunklen Raum inkubiert. Nach ca. 2 h war die Farbintensität ausreichend und die Folien konnten mit ddH₂O gespült werden. Die blaue Färbung kam durch eine Reaktion der alkalischen Phosphatase mit 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat (BCIP) und dem Farbverstärker Nitroblue-Tetrazoliumchlorid (NBT) zustande.

3.1.8 Isolierung der positiven Klone

Zeigte sich ein eindeutig angefärbter Klon auf der Folie, so wurde diese mit Hilfe der drei Einstichmarkierungen so auf der Rückseite der Ursprungsagarplatte positioniert, dass der verantwortliche Plaque mit ein bis drei negativen umliegenden Plaques aus dem Agar ausgestochen werden konnte. Zur Lösung der Phagen wurde das Agarpräparat in 500 µl SM-Puffer für 1 h geschüttelt, anschließend für 30 sec zentrifugiert (13000 x g), der Überstand abgenommen und mit 25 µl Chloroform vermischt konserviert.

3.1.9 Ausschluss von IgG und Färbeartefakten und Monoklonalisierung

Jeder durchblutete Tumor ist zu einem bestimmten Maße von B-Lymphozyten durchsetzt, so dass sich in der rekombinanten Proteinbibliothek auch rekombinante IgG befinden. Diese binden den alkalisch-Phosphatase markierten Zweit-Ak direkt und täuschen eine falsch positive Anfärbung auf der Folie vor. Daneben konnten falsch positive Färbungen auch durch Artefakte wie etwa Luftblasen, Falten oder Randständigkeit entstehen.

Jeder positive Phage wurde daher in eine zweite Infektionsrunde eingesetzt, in der die Färbereaktion vergleichend auf je einer Folienhälfte mit bzw. ohne Serum durchgeführt wurde. Rekombinante IgG wurden mit und ohne Serum angefärbt; Artefakte färbten sich in dieser Runde gar nicht und Ag-tragende Klone wurden auf der mit Serum inkubierten Folie durch Blaufärbung bestätigt. Von den richtig positiven Plaques wurde ein einzeln liegender ausgestochen, um eine monoklonale Lösung des relevanten Phagenklons zu erhalten.

Im Einzelnen wurden die zu prüfenden Phagenlösungen aus dem Ausstich 1: 10² und 1: 10³ verdünnt und à 10 µl nach dem beschriebenen Transfektionsansatz verarbeitet (s. Kapitel 3.1.2). Die abgezogenen Nitrozellulosefolien eines jeden Klons wurden halbiert und eine Hälfte mit Serum, die andere mit TBS inkubiert. Nach der Färbung konnten die fraglichen Klone beurteilt werden (**Abb. 8**).

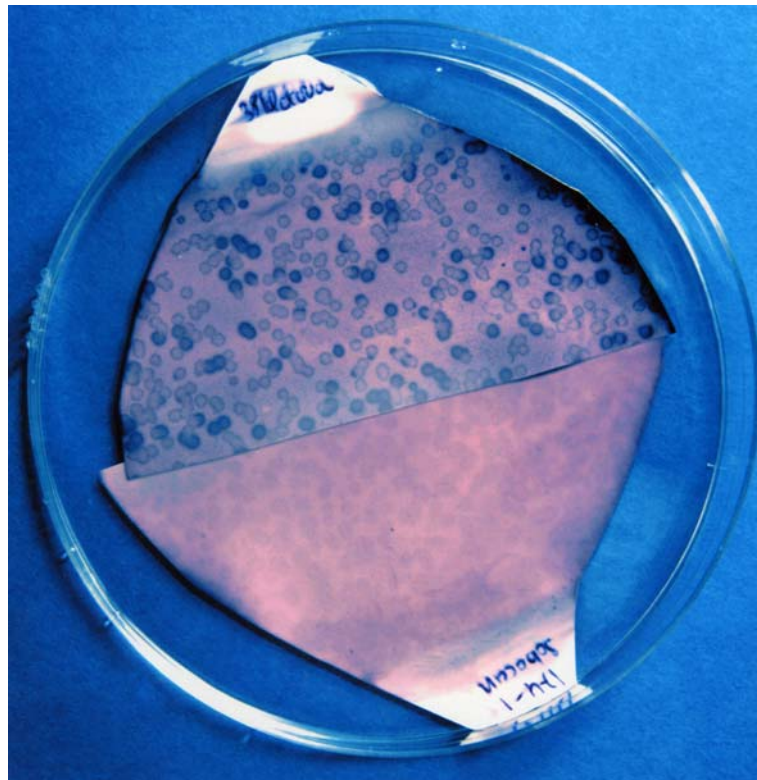


Abb. 8 Ausschluß von rekombinantem IgG und Färbeartefakten

Die oben liegende Folienhälfte war mit Serum, die unten liegende nur mit TBS inkubiert worden. Auf der oben liegenden sind die dunkelblauen, serumreaktiven Plaques eindeutig von den noch-reaktiven, hellblauen Plaques abzugrenzen. Nach Inkubation nur mit TBS ist dieser Unterschied nicht gegeben. Das Phagengemisch enthielt demnach einen seroreaktiven Klon bzw. ein seroreaktives Ag. Im Falle eines IgG wären auf beiden Folien neben den hellblauen auch dunkelblaue Plaques zu erkennen gewesen, während sich im Falle eines Artefakts auf beiden Folien nur hellblaue Plaques gefunden hätten.

3.1.10 Subklonierung durch *in vivo excision*

Für die folgenden molekularen Analysen der Tumor-Ag benötigt man die DNA des rekombinanten Vektors in aufgereinigter Form. Der λ -Vektor (Uni-ZAP-XR) war aufgrund seiner Größe (Aufnahme von bis zu 10kb langer Fremd-DNA) und seiner Klonierungseffizienz für die Konstruktion einer hochwertigen cDNA-Expressionsbibliothek gut geeignet. Für die Aufreinigung der klonierten DNA war der Vektor jedoch nicht geeignet, da die Ausbeute gering, die Isolierung der DNA sehr aufwendig und die Reinheit für Restriktionsanalysen und Sequenzierung nicht ausreichend war.

Die Fa. Stratagene bot daher ein Kloniersystem an, das die Fremd-cDNA mitsamt den umgebenden Sequenzen aus dem λ -Genom kopierte und somit ein rekombinantes Plasmid aus dem λ -Vektor herausschnitt. Das Kloniersystem bediente sich eines filamentösen (fl) Helferphagen, der die Fremd-cDNA nicht nur mit umliegenden Sequenzen eines Bluescript-Vektors exzidierte, sondern darüber hinaus zu kleinen rekombinanten, infektiösen fl-Phagen verpackte und auf *E. coli*-Bakterien des Stammes SOLR, die für λ -Phagen resistent und für fl-Phagen sensibel sind, übertragen konnte. Nicht rekombinante fl-Helferphagen konnten sich aufgrund der *amber*-Mutation nicht in SOLR-Bakterien vermehren. Das rekombinante Tumor-cDNA-tragende Plasmid konnte in den SOLR-Bakterien amplifiziert und mit hoher Ausbeute aufgereinigt werden. Aufgrund des *Ampicillinresistenz*-Gens in der pBluescript-DNA konnten die mit rekombinanten Helferphagen infizierten SOLR selektioniert werden.

Die genauen Arbeitsschritte wurden dem Stratagene-Protokoll entnommen. Der Bakterienstamm XL1-Blue MRF' wurde in LB-Tet-Medium (5 ml LB-Medium, 50 μ l 20% Maltose, 50 μ l 1 M MgSO₄, 7,5 μ l Tetrazyklin) und der Stamm SOLR in LB-Kana-Medium (5 ml LB-Medium, 50 μ l 20% Maltose, 50 μ l 1 M MgSO₄, 25 μ l Kanamycin) als Schüttelkultur bei 37 °C über Nacht angezüchtet. Nach Zentrifugation (5 min bei 1000 \times g) und Resuspension des Pellets mit 0,01 M MgSO₄ wurde eine OD600 von 1,0 erreicht.

200 μ l der Arbeitslösung von XL1-Blue MRF', 1 μ l „EX-Assist“ Helferphage und 250 μ l unverdünnte Phagenlösung eines positiven Klons wurden 15 min bei 37°C unter leichtem Schwenken inkubiert und anschließend mit 3 ml LB-Tet-Medium für weitere 3 h ergänzt. Zur Gewinnung der pBluescript-Phagen wurde der Infektionsansatz über 20 min auf 70°C erhitzt, dann 15 min zentrifugiert (1000 \times g) und als Überstand abgenommen. Je 10 μ l oder 100 μ l (zwei Verdünnungen) wurden mit 200 μ l der SOLR-Arbeitslösung bei 37°C für 15 min inkubiert und anschließend auf LB-Ampicillin-Platten ausgegossen. Nach 12 h waren ampicillinresistente Kolonien zu erkennen, die den pBluescript-Vektor mit dem zu charakterisierenden Insert trugen.

3.2 DNA-Präparation und Analyse

3.2.1 Mini-Präparation von Plasmid-DNA

Die Mini-Präparation ist ein Verfahren zur groben Aufreinigung der Plasmid-DNA z.B. für Restriktionsanalysen.

Hierfür wurden pro SOLR-Platte (s. Kapitel 3.1.10) drei bis vier Bakterienkolonien einzeln in jeweils 5 ml LB-Amp-Medium bei 37°C über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurden 1,5 ml jeder Kultur ca. 5 min zentrifugiert (8000 rpm) und anschließend mit 100 µl Puffer 1 (50 mM Succose, 25 mM Tris pH 8, 10 mM EDTA) und 100 µl Puffer 2 (1% SDS, 0,2 M NaOH) versetzt. Zum Abbau der RNA-Moleküle wurde 1 µl Ribonuklease hinzugegeben. Es folgte die Denaturierung der Proteine mit 100 µl Puffer 3 (600 ml 5 M KOAc pH 5,3, 115 ml Eisessig, ddH₂O ad 1 Liter). Die chromosomale Bakterien-DNA haftete sich den Bakterienproteinen an und konnte somit abzentrifugiert (ca. 13000 rpm für 20 min). Die Plasmid-DNA konnte im dekantierten Überstand durch Zugabe von 750 µl 100% EtOH gefällt werden. Das Präzipitat wurde nach Zentrifugation (15000 rpm) in einem kopfüber gestelltem Eppendorfgefäß kurz getrocknet und in 100 µl 1 × TE pH 7,5 wieder aufgelöst. Die gewonnene DNA konnte nun für die Restriktionsanalyse verwendet werden, deren Ziel es war, die Länge der Inserts und ggf. redundante cDNA-Inserts zu erkennen. Im Folgenden wurden die gewonnenen Plasmide einer aufwendigeren Aufreinigung in größerem Maßstab, der so genannten Maxi-Präparation, unterzogen.

3.2.2 Maxi-Präparation von Plasmid-DNA

Die Maxi-Präparation erlaubte eine saubere Aufreinigung von Plasmid-DNA in großem Maßstab. Sie wurde vor der Sequenzierung durchgeführt.

Hierzu wurden 400 µl der ausgewählten Kultur für Mini-Präparation in 400 ml LB-Amp Medium 24 h bei 37°C auf einem Schwenktisch inkubiert. Nach Zentrifugation (15 min mit 6000 × g bei 4°C) wurde das Pellet in 10 ml Puffer 1 resuspendiert und anschließend mit 10 ml Puffer 2 versetzt. Nach weiteren 5 min wurden 10 ml vorgekühlter Puffer 3 zur Ausfällung der Proteine hinzugegeben, welche nach Zentrifugation (30000 × g für 30 min bei 4°C) und Filtration durch Gaze separiert und zur Plasmidanheftung auf eine mit 10 ml Puffer QBT äquilibrierte Qiagen-Tip-20-Säule gegeben wurden. Die Säule wurde 2-3 x mit je 30 ml Puffer QC gespült und die Plasmide schließlich mit 15 ml Puffer QF abgenommen. Mit Hilfe von 10,5 ml Isopropanol und anschließender Zentrifugation (15000 × g für 30 min bei 4°C) wurde die DNA gefällt, und das Pellet nach Waschen mit 5

ml 70% EtOH erneut zentrifugiert ($15000 \times g$, 10 min, 4°C), luftgetrocknet und in $400 \mu\text{l}$ sterilem ddH₂O gelöst. Die Konzentration der DNA-Lösung wurde im Fotometer bestimmt.

3.2.3 DNA-Restriktionsanalyse

Die Restriktionsanalyse hatte das Ziel, die Länge der Inserts abzuschätzen. Für die Restriktion wurden die Enzyme *Bam*HI sowie *Eco*RI und *Xho*I eingesetzt, die jeweils eine Schnittstelle in der MCS aufwiesen. Bei Fehlen einer passenden Schnittstelle in der Fremd-DNA wurde das Plasmid durch Anwendung von *Bam*HI linearisiert, während eine kombinierte Anwendung von *Eco*RI und *Xho*I das Insert aus dem Vektor herauslöste. In diesem Falle resultierten zwei Fragmente. Eines entsprach dem Vektor mit einer Länge von 2,9 kb, das andere der einklonierten Fremd-DNA. Falls für die jeweiligen Enzyme zusätzliche Schnittstellen innerhalb des cDNA-Inserts lagen, so resultierten mehrere Fragmente, deren Längen zur Berechnung der gesamten Insertlänge addiert werden mussten.

Für die Restriktionsanalyse wurden $1 \mu\text{g}$ der Plasmid-DNA aus der Mini-Präparation, je $1 \mu\text{l}$ des jeweiligen Enzyms, $2 \mu\text{l}$ des entsprechenden Puffers und $16 \mu\text{l}$ 1:10 verdünnter BSA-Puffer mit ddH₂O für 1-2 h bei 37°C inkubiert. Dieser Ansatz und $0,5 \mu\text{g}$ des Längenstandards wurden mit $3 \mu\text{l}$ Ficoll-Blaumarker versehen, auf ein ethidiumbromidhaltiges 1,5 %-iges TAE-Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die ethidiumbromidmarkierten DNA-Fragmente wurden auf einem UV-Transilluminator sichtbar, so dass im Vergleich mit den Banden des Längenstandards die Größe der Inserts abgeschätzt werden konnte.

3.2.4 Sequenzierung

Zur Sequenzierung wurden jeweils $20 \mu\text{l}$ der Plasmid-DNA mit einer Konzentration von mindestens $0,1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ an die Firma Sequiserve in Vaterstetten, Deutschland, versandt. Als Primer wurden anfangs die bekannten T3- und T7-Primer verwendet. Im Folgenden konnten anhand der ermittelten Sequenz neue interne Primer synthetisiert werden.

3.3 Homologierecherche

Mit Hilfe computergestützter Recherchen wurden Homologien zu der gefundenen Tumor-cDNA-Sequenz eruiert. Hierfür wurden die GenBank-Datenbank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> und die SEREX-Datenbank <http://www.licr.org/SEREX.html> verwendet. Eine signifikante cDNA-Homologie wurde mit einer Übereinstimmung von mehr als 98 % bei einer Länge von mehr als 100 bp definiert. Als Homologe wurden in der SEREX-Datenbank nur Ag berücksichtigt, die von den Autoren demselben Gen zugeordnet worden waren, wie das eigene SEREX-definierte Ag.

3.4 Heterologe Serumanalyse

Das Vorkommen der SEREX-Ak bei gesunden Probanden und anderen Tumorkranken wird durch eine heterologe Serumanalyse ermittelt. Hierfür werden 100 heterologe Serumproben präabsorbiert (s. Kapitel 3.1.6). Die untersuchten 100 Serumproben stammten von 40 gesunden Probanden, elf pädiatrischen Patienten mit einem RMS und 49 pädiatrischen Patienten mit einem anderen Malignom. Die elf Patienten mit RMS schlossen zum einen die fünf Patienten ein, deren Proben in den Serumpool für das SEREX-*screening* eingegangen waren. Von diesen hatten drei Patienten ein aRMS und jeweils einer ein unklassifizierbares RMS bzw. ein eRMS. In der HSA wurden zum anderen eine Probe eines weiteren Patienten mit aRMS und Proben von 5 weiteren Patienten mit eRMS eingesetzt.

Die Ag-exprimierenden Phagen wurden in einem Verhältnis von ca. 1:10 mit der Phagenbibliothek verdünnt und mit XL1-Blue MRF'-Bakterien ausplattiert, die rekombinanten Phagenproteine aus den lytischen Plaques auf Nitrozellulose abgezogen und mit den Seren, wie oben beschrieben, getestet (Plaque Assay) (s. Kapitel 3.1.9).

3.5 mRNA-Expressionsanalyse mit Hilfe von PCR und Gewebe-cDNA

Die Analyse der mRNA-Expression des Ag MU-RMS-248-210 erfolgte mit Hilfe von kommerziell erworbener cDNA aus Normalgeweben und Tumor-cDNA-Bibliotheken der eigenen Arbeitsgruppe unter Verwendung der im Materialteil aufgeführten Oligonukleotidprimer.

Für einen PCR-Durchlauf wurden 5 µl MTCTM-cDNA oder 3 µl Tumor cDNA-Bibliothek, 5 µl PCR-Puffer mit MgCl₂, 1 U Platinum® Taq DNA Polymerase, 1 µl dNTP und je 1 µl sense und antisense Primer (10 pmol/µl) eingesetzt. Nach einer Denaturierung bei 95°C (1 min) folgten 40 weitere Zyklen. Ein Zyklus bestand aus einem Denaturierungsschritt bei 95°C (1 min), einem Primeranlagerungsschritt bei 55°C (1 min) und einem Syntheseschritt bei 72°C (2 min). 20 µl des PCR-Produktes wurden mit 4 µl Ladepuffer auf ein 1,5%-iges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

4 Ergebnisse

4.1 Qualitätskontrolle, Amplifikation und serologische Analyse der rekombinanten RMS-cDNA-Expressionsbibliothek

4.1.1 Titerbestimmung und Amplifikation

Die Titerbestimmung ergab $1,7 \times 10^5$ pfu in der primären Phagenbibliothek. Nach Amplifikation errechnete sich ein Phagenpool von $1,2 \times 10^9$ pfu. Dies bedeutete, dass die primäre Phagenbibliothek erfolgreich um ca. das 10^4 -fache amplifiziert worden war. Die primäre Phagenbibliothek hatte 1/5 der optimalen Komplexität von ca. einer Million rekombinanter Klone, d.h. es waren möglicherweise nicht alle mRNAs des Tumorgewebes repräsentiert. Angesichts des Mangels an weiterem Tumormaterial wurde diese Einschränkung akzeptiert.

4.1.2 Blue-White-Test

Der *Blue-White* Test ergab ein Verhältnis von 9:1 rekombinanten zu nicht-rekombinanten Phagen, was auf eine effiziente Klonierung hinwies und somit ein effizientes serologisches Screening in Aussicht stellte.

4.2 Isolation von seroreaktiven Klonen

Durch das Screening von über einer Million Phagenklonen wurden insgesamt zwei seroreaktive Klone identifiziert. Die entsprechenden Plasmide wurden nach der SEREX-Konvention mit Buchstaben für den Ort (MU) und die Tumorentität (RMS) sowie Zahlen für die Labornummer des Tumors (248) und die Agarplatte (210 bzw. 292), von der der Phage gewonnen worden war, bezeichnet. Die Plasmide pMU-RMS-248-210 und pMU-RMS-248-292 wurden nachfolgend molekular charakterisiert. Rekombinante IgG fanden sich nicht.

4.3 Molekulare Charakterisierung der RMS-Antigene

4.3.1 Restriktionsanalyse der SEREX-definierten RMS-Antigene

Zur Abschätzung der Größe der DNA-Inserts in den isolierten Plasmiden erfolgte eine Restriktionsanalyse. Dabei kamen die Enzyme *Bam*HI, *Eco*RI und *Xho*I zum Einsatz. Durch Vergleich mit dem kommerziell erworbenen DNA-Größenmarker konnte die Größe der einzelnen Fragmente abgeschätzt werden.

Nach Restriktion mit dem Enzym *Bam*HI zeigten sich bei den Plasmiden pMU-RMS-248-210 und pMU-RMS-248-292 in der Gelelektrophorese zwei Banden von ca. 3 kb und 4 kb Länge. Dieses Ergebnis sprach dafür, dass beide Plasmide zwei Schnittstellen für das Enzym *Bam*HI enthielten, von denen eine innerhalb und eine außerhalb der MCS lag.

Weiterhin wurden die Enzyme *Eco*RI und *Xho*I eingesetzt, die stromaufwärts bzw. stromabwärts der cDNA-Insertion in der MCS schnitten und somit das Insert aus dem Vektor mobilisierten. In der Gelelektrophorese des Doppelverdaus fanden sich drei Banden mit knapp 4,0 kb, ca. 3,0 kb und ca. 0,6 kb. Anzunehmen war, dass die 3,0 kb-Bande dem 2,9 kb großen Vektor entsprach (s. Kapitel 3.1.2.) und, dass das Insert durch eine interne *Xho*I- oder *Eco*RI-Schnittstelle auf die Banden bei knapp 4 kb und ca. 0,6 kb aufgeteilt worden war. Die Ergebnisse für pMU-RMS-248-210 und pMU-RMS-248-292 waren identisch (**Abb. 9 und 10**). Möglicherweise handelte es sich somit bei den von Platte 210 und Platte 292 gepickten Klonen um Amplifikate desselben Primärvektors bzw. derselben cDNA.

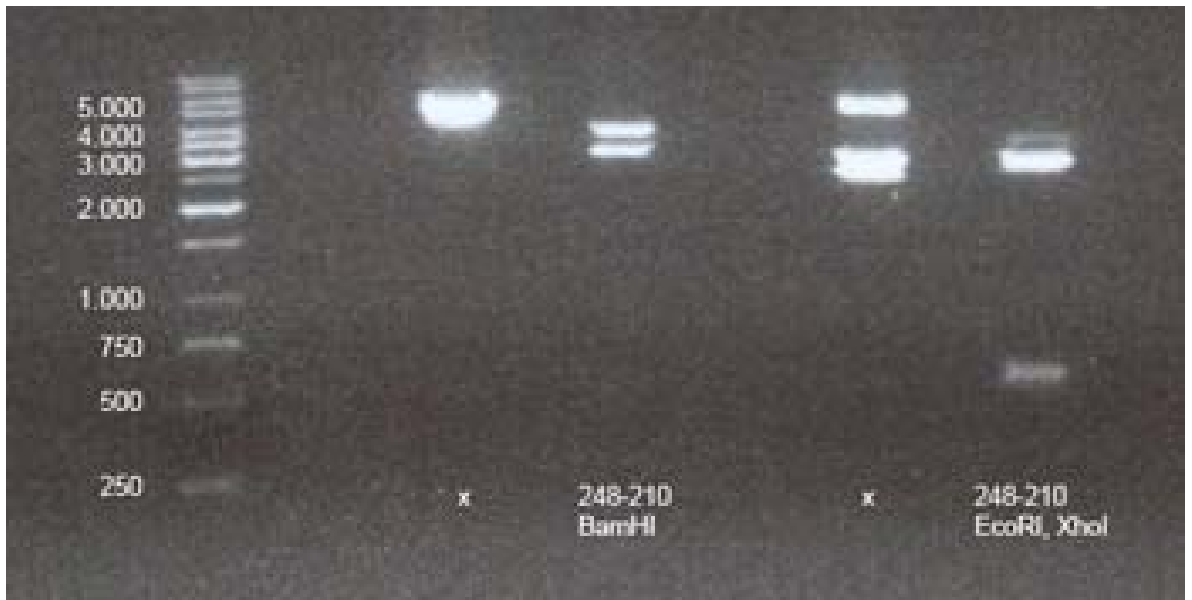


Abb. 9 Agarosegelelektrophorese der Restriktionsprodukte von pMU-RMS-248-210

Durch den Einsatz von *Bam*HI resultierten zwei Banden von ca. 3 kb und 4 kb Länge. Das Plasmid pMU-RMS-248-210 enthielt deshalb mindestens zwei Schnittstellen für das Enzym *Bam*HI. Durch den Einsatz von *Eco*RI und *Xho*I resultierten drei Banden mit ca. 4,0 kb, ca. 3,0 kb und ca. 0.6 kb. Das Insert wurde aus dem Vektor mobilisiert und durch eine interne *Xho*I- oder *Eco*RI-Schnittstelle auf die Banden bei knapp 4 kb und ca. 0,6 kb aufgeteilt. Die mit x markierten Restriktionsergebnisse waren nicht Teil dieser Arbeit.

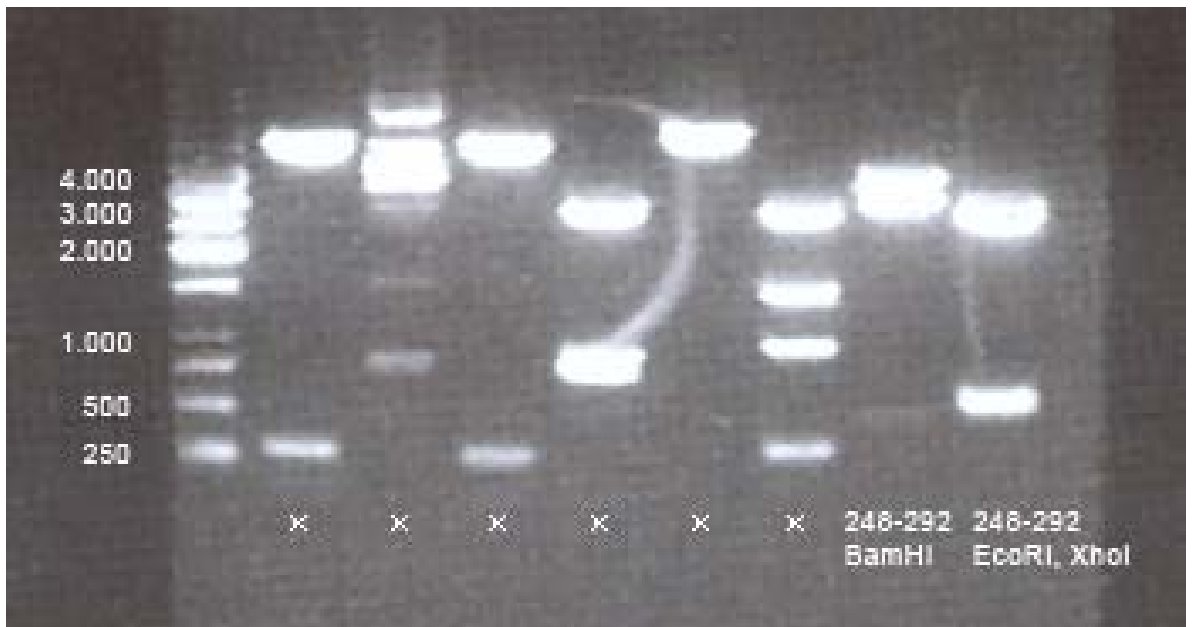


Abb. 10 Agarosegelelektrophorese der Restriktionsprodukte von pMU-RMS-248-292

Der Einsatz von *Bam*HI resultierte in zwei Banden von ca. 3 kb und 4 kb Länge. Das Plasmid pMU-RMS-248-292 enthielt demnach mindestens zwei Schnittstellen für das Enzym *Bam*HI. Durch den Einsatz von *Eco*RI und *Xho*I resultierten drei Banden mit ca. 4,0 kb, ca. 3,0 kb und ca. 0.6 kb. Die mit x markierten Spuren zeigen keine Ergebnisse dieser Arbeit.

4.3.2 Sequenzanalyse der SEREX-definierten RMS-Antigene

Die Sequenzierung der Fremd-cDNA in pMU-RMS-248-210 und pMU-RMS-248-292 ergab in beiden Plasmiden dieselbe, 4081 bp lange Sequenz. Sie enthielt ab bp 4049 ein Polyadenylierungssignal (aataaa) und ab bp 4072 einen Poly-A-Schwanz.

Der längste offene Leserahmen (*open reading frame*, ORF) innerhalb der Fremd-cDNA begann bei dem Startsignal ATG (bp 49-51) und endete am Stoppsignal TAA (bp 3866-3868). Dieser ORF lag *in frame* mit dem stromaufwärts gelegenen ATG des Vektors und wurde von diesem nicht durch ein *in frame* gelegenes Stopkodon getrennt. Im Bakterium war das rekombinante Ag somit vermutlich vom Vektor-ATG abgelesen worden. Das putative Ag, welches von diesem langen ORF kodiert wurde, wird im Folgenden als MU-RMS-248-210/292 bezeichnet. Daneben finden sich zwei alternative kleinere ORF über 50 bp Länge (bp 1662-1850 und bp 2190-2378) (**Abb. 11**).

```
1      GATTTTTGGCCAAACAAGTAGCACTTTTACATTTGCAGAT      40
41     CTTGCAAAATCAACTTCAGGAGAAGGATTTTCAGTTTGGCA      80
81     AAAAAGACCCCAATTTCAAGGGATTTTCAGGTGCTGGAGA     120
121    AAAATTATTCTCATCACAATACGGTAAAATGCGCCAATAAA     160
161    GCAAACACTTCCGGTGACTTTGAGAAAGATGATGATGCCT     200
201    ATAAGACTGAGGACAGCGATGACATCCATTTTGAACCAAGT     240
241    AGTTCAAATGCCCGAAAAAGTAGAACTTGTAACAGGAGAA     280
281    GAAGATGAAAAAGTTCTGTATTTCACAGCGGGTAAAACTAT     320
321    TTAGATTTGATGCTGAGGTAAGTCAGTGGAAGAAAGGGG      360
361    CTTGGGGAACTTAAAAATTCTCAAAAACGAGGTCAATGGC      400
401    AAAC TAAGAATGCTGATGCGAAGAGAACAAGTACTAAAAG     440
441    TGTGTGCTAATCATTGGATAACGACTACGATGAACCTGAA     480
481    GCCTCTCTCTGGATCAGATAGAGCATGGATGTGGTTAGCC     520
521    AGTGATTTCTCTGATGGTGATGCCAAACTAGAGCAGTTGG     560
561    CAGCAAATTTAAAACACCAGAGCTGGCTGAAGAATTCAA     600
601    GCAGAAATTTGAGGAATGCCAGCGGCTTCTGTTAGACATA     640
641    CCACTTCAAAC TCCCATAAACTTGTAGATACTGGCAGAG     680
681    CTGCCAAGTTAATACAGAGAGCTGAAGAAATGAAGAGTGG     720
721    ACTGAAAGATTTCAAACATTTTTGACAAATGATCAAACA     760
761    AAAGTCACTGAGGAAGAAAATAAGGGTTCAGGTACAGGTG     800
801    CGGCCGGTGCCCTCAGACACAACAATAAAACCCAATCCTGA     840
841    AAACACTGGGCCACATTAGAATGGGATAACTATGATTTA     880
881    AGGGAAGATGCTTTGGATGATAGTGTCAGTAGTAGCTCAG     920
921    TACATGCTTCTCCATTGGCAAGTAGCCCTGTGAGAAAAAA     960
961    TCTTTTCCGTTTTGGTGAGTCAACAACAGGATTTAACTTC     1000
1001   AGTTTTAAATCTGCTTTGAGTCCATCTAAGTCTCCTGCCA     1040
1041   AGTTGAATCAGAGTGGGACTTCAGTTGGCACTGATGAAG     1080
1081   AATCTGATGTTACTCAAGAAGAAGAGAGATGGACAGTAC     1120
1121   TTTGAACCTGTTGTTCCCTTTACCTGATCTAGTTGAAGTAT     1160
1161   CCAGTGGTGAGGAAAATGAACAAGTTGTTTTTAGTCACAG     1200
1201   GGCAAAACTCTACAGATATGATAAAGATGTTGGTCAATGG     1240
1241   AAAGAAAGGGGCATTGGTGATATAAAGATTTTACAGAATT     1280
1281   ATGATAATAAGCAAGTTCGTATAGTGATGAGAAGGGACCA     1320
1321   AGTATTTAAACTTTGTGCCAATCACAGAATAACTCCAGAC     1360
1361   ATGACTTTGCAAAATATGAAAGGGACAGAAAGAGTATGGT     1400
```

1401	TGTGGACTGCATGTGATTTTGCAGATGGAGAAAAGAAAAGT	1440
1441	AGAGCATTTAGCTGTTTCGTTTTAACTACAGGATGTTGCA	1480
1481	GACTCGTTTAAAGAAAATTTTTGATGAAGCAAAAACAGCCC	1520
1521	AGGAAAAAGATTCTTTGATAACACCTCATGTTTCTCGGTC	1560
1561	AAGCACTCCAGAGAGTCAACCATGTGGCAAAATTGCTGTA	1600
1601	GCTGTATTAGAAGAAACCACAAGAGAGAGGACAGATGTTA	1640
1641	TTCAGGGTGATGATGTAGCAGATGCAACTTCAGAAGTTGA	1680
1681	AGTGTCTAGCACATCTGAAACAACCCAAAAGCAGTGGTT	1720
1721	TCTCCTCCAAAGTTTGTATTTGGTTTCAGAGTCTGTTAAAA	1760
1761	GCATTTTTAGTAGTGAAAAATCAAACCATTTGCATTCCGG	1800
1801	CAACAGTTCAGCCACTGGGTCTTTGTTTGGATTTAGTTTT	1840
1841	AATGCACCTTTGAAAAGTAACAATAGTGAACTAGTTTCA	1880
1881	TAGCCCAGAGTGGATCTGAAAGCAAAGTGGAACTAAAAA	1920
1921	ATGTGAACTGTCAAAGAACTCTGATATCGAACAGTCTTCA	1960
1961	GATAGCAAAGTCAAATCTCTTTGCTTCCTTTCCAACGG	2000
2001	AAGAATCTTCAATCAACTACACATTTAAAACACCAGAAAA	2040
2041	GGCAAAAGAGAAGAAAAAACCTGAAGATTCTCCCTCAGAT	2080
2081	GATGATGTTCTCATTGTATATGAACTAACTCCAACCGCTG	2120
2121	AGCAGAAAGCCCTTGCAACCAAACCTTAACTTCTCCTCAAC	2160
2161	TTTCTTCTGCTACAAGAATAGACCAGATTATGTTAGTGAA	2200
2201	GAAGAGGAGGATGATGAAGATTTGAAACAGCTGTCAAGA	2240
2241	AACTTAATGGAAAATATATTTGGATGGCTCAGAAAAATG	2280
2281	TAGACCCTTGGAAAGAAAATACAGCAGATAATGAGAAAGAA	2320
2321	TGTATTATTGTTTGGGAAAAGAAACCAACAGTTGAAGAGA	2360
2361	AGGCAAAAGCAGATACGTTAAACTTCCACCTACATTTTT	2400
2401	TTGTGGAGTCTGTAGTGATACTGATGAAGACAATGGAAT	2440
2441	GGGGAAGACTTTCAATCAGAGCTTCAAAGTTTCAGGAAG	2480
2481	CTCAAATCTCAGACAGAAGAAATAACTAGCACAACTGA	2520
2521	CAGTGTATATACAGGTGGGACTGAAGTGATGGTACCTTCT	2560
2561	TTCTGTAAATCTGAAGAACCTGATTCTATTACCAAATCCA	2600
2601	TTAGTTCACCATCTGTTTCTCTGAAACTATGGACAAACC	2640
2641	TGTAGATTTGTCAACTAGAAAGGAAATTGATACAGATTCT	2680
2681	ACAAGCCAAGGGGAAAGCAAGATAGTTTCATTTGGATTTG	2720
2721	GAAGTAGCACAGGGCTCTCATTTGCAGACTTGGCTTCCAG	2760
2761	TAATTCTGGAGATTTTGGCTTTTGGTTCTAAAGATAAAAAT	2800
2801	TTCCAATGGGCAAATACTGGAGCAGCTGTGTTTGGAACAC	2840
2841	AGTCAGTCGGAACCCAGTCAGCCGGTAAAGTTGGTGAAGA	2880
2881	TGAAGATGGTAGTGATGAAGAAGTAGTTCATAATGAAGAT	2920
2921	ATCCATTTTGAACCAATAGTGTCACTACCAGAGGTAGAAG	2960
2961	TAAAATCTGGAGAAGAAGATGAAGAAATTTGTTTAAAGA	3000
3001	GAGAGCCAAACTTTATAGATGGGATCGGGATGTCAGTCAG	3040
3041	TGGAAGGAGCGCGGTGTTGGAGATATAAAGATTCTTTGGC	3080
3081	ATACAATGAAGAATTATTACCGGATCCTAATGAGAAGAGA	3120
3121	CCAGGTTTTTAAAGTGTGTGCAAACCACGTTATTACTAAA	3160
3161	ACAATGGAATTAAGCCCTTAAATGTTTCAAATAATGCTT	3200
3201	TAGTTTGGACTGCCTCAGATTATGCTGATGGAGAAGCAAA	3240
3241	AGTAGAACAGCTTGCAGTGAGATTTAAACTAAAGAAGTA	3280
3281	GCTGATTGTTTCAAGAAAACATTTGAAGAATGTCAGCAGA	3320
3321	ATTTAATGAAACTCCAGAAAGGACATGTATCACTGGCAGC	3360
3361	AGAATTATCAAAGGAGACCAATCCTGTGGTGTTTTTTGAT	3400
3401	GTTTGTGCGGACGGTGAACCTCTAGGGCGGATAACTATGG	3440
3441	AATTATTTTCAAACATTGTTTCTCGGACTGCTGAGAACTT	3480
3481	CAGAGCACTATGCACTGGAGAGAAAGGCTTTGGTTTCAAG	3520
3521	AATTCCATTTTTCACAGAGTAATTCCAGATTTTGTGTTGCC	3560
3561	AAGGAGGAGATATCACCAAACATGATGGAACAGGCGGACA	3600
3601	GTCCATTTATGGAGACAAATTTGAAGATGAAAATTTTGTG	3640
3641	GTGAAACATACTGGTCTGGTTTACTATCCATGGCCAATC	3680
3681	AAGGCCAGAATACCAATAATTCTCAATTTGTTATAACACT	3720

3721	GAAGAAAGCAGAACATTTGGACTTTAAGCATGTAGTATTT	3760
3761	GGGTTTGTTAAGGATGGCATGGATACTGTGAAAAAGATTG	3800
3801	AATCATTTGGTTCTCCCAAAGGGTCTGTTTGTGCGAAGAAT	3840
3841	AACTATCACAGAATGTGGACAGATA <u>TAA</u> AATCATTGTTGT	3880
3881	TCATAGAAAATTTTCATCTGTATAAGCAGTTGGATTGAAGC	3920
3921	TTAGCTATTACAATTTGATAGTTATGTTTCAGCTTTTGAAA	3960
3961	ATGGACGTTTCCGATTTACAAATGTAAAATTGCAGCTTAT	4000
4001	AGCTGTTGTCACTTTTTAATGTGTTATAATTGACCTTGCA	4040
4041	TGGTGTGA <u>AATAA</u> AAGTTTAAACACTGGTGT <u>AAAAAAAAA</u>	4080
4081	<u>AAAAAAAAAAAAAAAAA</u>	4094

Abb. 11 Sequenz des cDNA-Inserts von pMU-RMS-248-210 bzw. pMU-RMS-248-292

Rot markiert sind das interne Startcodon ATG an bp 49-51, das Stopcodon TAA an bp 3868, das Polyadenylierungssignal ab bp 4049 und der Poly-A-Schwanz ab bp 4072. Die Start- und Stop-Kodons der alternativen ORFs mit Länge von mehr als 50bp wurden blau markiert und unterstrichen (bp 162-1850 und bp 2190-2378).

4.3.3 Computergestützte Homologierecherche

Die cDNA des Ag MU-RMS-248-210/292 wurde mit Hilfe der GenBank und SEREX-Datenbank auf homologe cDNA-Einträge überprüft.

Eine vollständige Homologie fand sich zu der 5' und 3' längeren cDNA des humanen Ran-bindenden Proteins RANBP2 (NM_006267) (**Tab. 6, Abb. 12**).

Eine partielle Homologie zeigte sich mit der aus Hodengewebe klonierten cDNA des *sperm membrane protein* BS-63 (XM_165991.3), die von einem differentiell gespleißten Genduplikat des RANBP2 exprimiert wird. Das Genduplikat wird als *RANBP2-like 1* (*RANBP2L1*)-Gen bezeichnet und kodiert verschiedene 6-8kB lange Transkripte. Diese werden als RANBP2-like and GRIP domain containing (RGPD) 1-8 bezeichnet. Die 7.1 kb-lange BS-63-cDNA ist 100% homolog mit der 7.8 kb-langen RGPD8-cDNA (XM_001722379.1). Die BS-63/RGPD8-cDNA zeigte gegenüber der RANBP2-cDNA eine Deletion von ca. 2925 bp (bp 2825-5750 in NM_006267) sowie einzelne Basenaustausche und ein alternatives 3'-Ende (**Tab. 6, Abb. 12**).

Das alternative 3'-Ende aller *RANBP2L1*-Transkripte zeigt hohe Homologie mit dem 3'-Ende von Transkripten des *GRIP and coiled-coil domain containing 2* (*GCC2*)-Gens. Den *GCC2*-Transkripten fehlen dagegen die in den *RANBP2L1*-Transkripten stromaufwärts gelegenen, zu RANBP2 homologen Sequenzen; sie weisen deshalb keine Homologie zur cDNA des Ag MU-RMS-248-210/292 auf (nicht gezeigt).

Beim Durchsuchen der SEREX-Datenbank fand sich eine komplette Homologie zur NY-CO-50-cDNA (**Abb. 13**), die aus dem Gewebe eines Kolonkarzinoms isoliert wurden und mit RANBP2 weitgehend identisch war. Daneben fanden sich Homologien zu fünf weiteren Transkripten des *RANBP2*- oder *RANBP2L1*-Gens (Hom-Ts-PMR1-11, Mo-BC-1083, Hom-Gliom-GT 39, Hom-TSMa5-58 und NY-TLU-17) (**Tab. 6, Abb. 13**).

Mit SEREX waren darüber hinaus diverse Ag kloniert worden, die vom GCC2-Gen kodiert wurden und somit Homologie zum C-terminalen Ende des BS-63/RGPD8, nicht aber zu RANBP2 oder zum putativen MU-RMS-248-210/292, aufwiesen (HOM-TS-GLI-72, MO-CO-1053, MO-CO-99, NGO-Pr-1, NGO-St-38 und se1-1) (nicht gezeigt).

Bezeichnung	RMS-248-210
Chromosom	2
cDNA-Homologe in der GenBank (Zugangs-Nr.)	RANBP2 (NM_006267.4) <i>Sperm membrane protein BS-63</i> (XM_165991.3)
cDNA-Homologe in der SEREX-Datenbank (falls dort angegeben: HSA-Ergebnis)	NY-CO-50 (Kolonkarzinom) Hom-Ts-PMR1-11 (Testis) (3' wie BS-63) HSA: 1/19 Patienten mit Arteriitis 0/12 gesunde Kontrollen MO-BC-1083 (Mammakarzinom) Hom-Gliom GT 39 (Gliom) (3' wie BS-63) Hom-TSMa5-58 (Testis) (3' wie BS-63) HSA: 0/37 Patienten mit Mammakarzinom 0/10 gesunde Kontrollen NY-TLU-17 (Testis)
Biologische Bedeutung	Regulation von: - Nucleoporin-Transport - Zellzyklus - Mitose - DNA-Synthese - Prozessierung und Erhalt des Kernkomplexes
Charakteristika des Homologs RANBP2 auf Protein-Ebene	8 Zinkfingerdomänen leucinreiche Region 4 RAN-bindende Domänen FXFG- und FG-Motive Cyclophilin A-homologe Domänen

Tab. 6 Homologierecherche zur cDNA des Ag MU-RMS-248-210/292

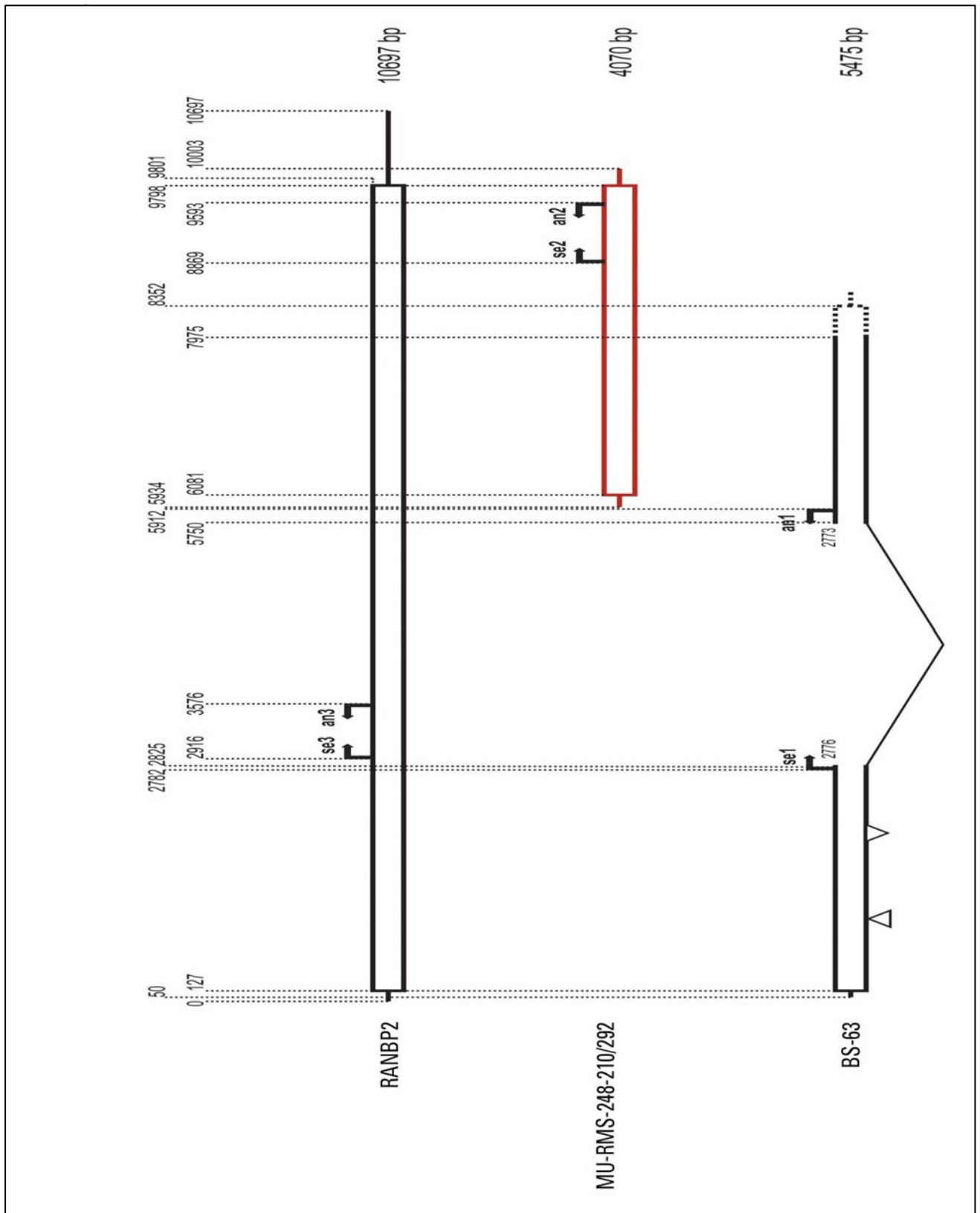


Abb. 12 Längste Homologe der cDNA des Ag MU-RMS-248-210/292 in der GenBank

Der zu RANBP2 *in frame* gelegene ORF ist in allen cDNAs als Kasten eingetragen. Darüberhinaus sind die Positionen der durch PCR mit den Primerpaaren se3/an3, se2/an2 und se1/an1 amplifizierten Produkte eingetragen. Eine Insertion (bp 938-940) und eine Deletion (bp 1974-1976) in cDNA BS-63 gegenüber RANBP2 wurde durch zwei offene Dreiecke symbolisiert.

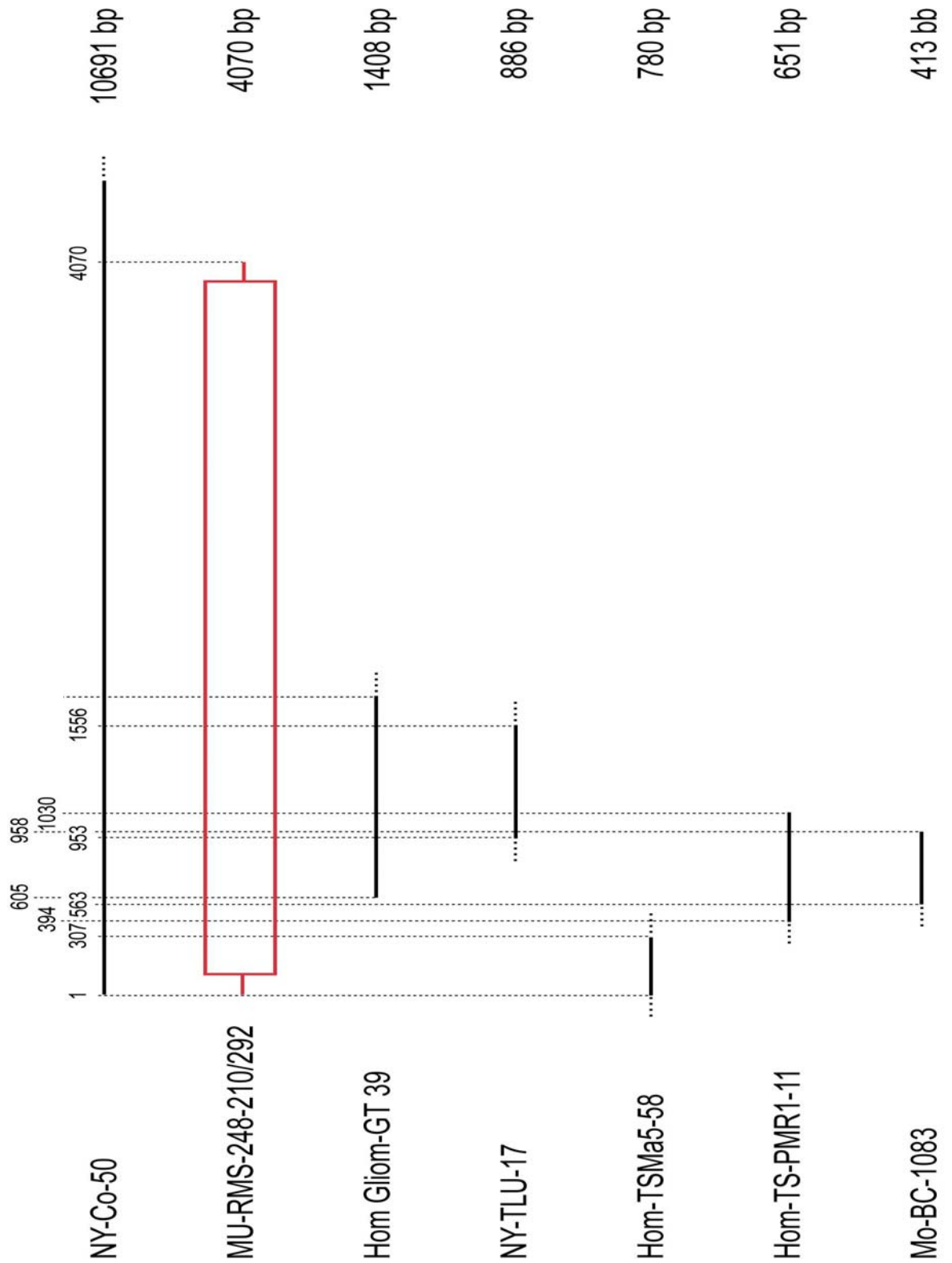


Abb. 13 Längste Homologe der cDNA des Ag MU-RMS-248-210/292 in der SEREX-Datenbank

In der SEREX-Datenbank fand sich eine komplette Homologie zur NY-CO-50-cDNA (aus dem Gewebe eines Kolonkarzinoms). Außerdem fanden sich Homologien zu fünf weiteren Transkripten des *RANBP2*- oder *RANBP2L1*-Gens: Hom-Ts-PMR1-11, Mo-BC-1083, Hom-Gliom-GT 39, Hom-TSMa5-58 und NY-TLU-17.

4.4 Charakteristika des Antigens MU-RMS-248-210/292 auf Proteinebene

Das Homolog des putativen Ag MU-RMS-248-210/292 zeigt auf Proteinebene zahlreiche interessante Motive (**Abb. 14 und 15**).

Am Aminoende des RANBP2, welches dem putativen Ag MU-RMS-248-210/292 fehlte, war eine leucinreiche Region lokalisiert, die charakteristisch für Proteine des Zellkernporenkomplexes ist und eine Funktion im Zellkerntransport postuliert. Stromabwärts fanden sich insgesamt vier RANBP1-homologe Domänen (RBH), die in komplexem Zusammenhang mit dem Zellimport von Proteinen, dem Zellexport von RNA, der Regulation des Zellzyklus, der Mitose, der DNA-Synthese und -Prozessierung und des Erhaltes des Kernkomplexes stehen (Bischoff et al., 1995, Rush et al., 1996, Koepf and Silver, 1996, Grisendi S, 2008, Navarro MS et al., 2008). Zwischen RBH-1 und RBH-2 waren acht Zinkfingerdomänen gelegen, die für mögliche genetische Rekombinationen wie Duplikationen, Fusionen oder Translokationen prädisponieren (Fauser et al., 2001, Loughlin FE et al., 2009). Zwischen RBH-3 und RBH-4 lag eine Ak-bindende Region (*antibodybindingside*, ABS). Stromab- und aufwärts von RBH-4 fanden sich 26 degenerierte XFXFG- bzw. FG-Pentapeptidmotive, die charakteristisch sind für Proteine des Zellkernporenkomplexes (Wu et al., 1995, Yokoyama et al., 1995, Hutten S et al., 2008). Am carboxyterminalen Ende war eine Cyclophilin A-homologe Domäne (CyH) lokalisiert, die das Protein RANBP2 als Chaperone fungieren läßt (Ferreira et al., 1996, 1997).

Die Aminosäuresequenz des Ag MU-RMS-248-210/292 begann 27 Aminosäuren stromaufwärts von RHB2.

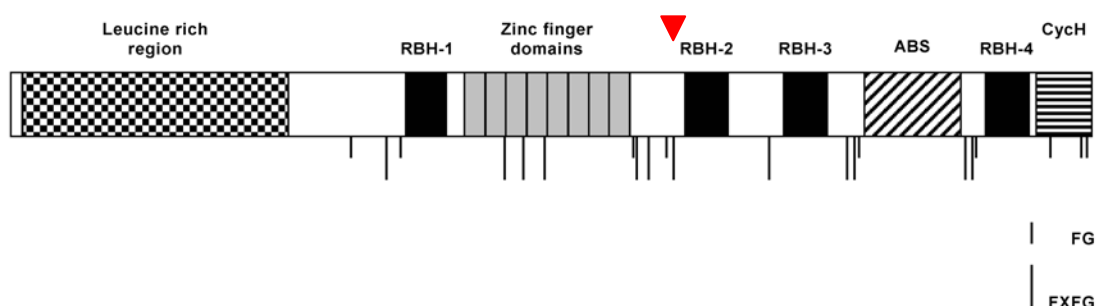


Abb. 14 Graphische Darstellung der molekularen Charakteristika von RANBP2 auf Proteinebene

Die Aminosäuresequenz des RANBP2 kodierte aminoterminal eine leucinreiche Region sowie stromabwärts vier RANBP1-homologe Domänen (RBH-1 bis RBH-4), acht Zinkfingerdomänen, eine Ak-bindende Region (*antibody-binding site*, ABS), eine Cyclophilin A-homologe Domäne (CyH) sowie zahlreiche FG- bzw. XFXFG-Pentapeptidmotive (horizontale Striche unterhalb des Kastens). Rotes Dreieck: Aminoende des MU-RMS-248-210/292 (Abbildung modifiziert nach Wu J 1995, Fauser S 2001)

MRRSKADVERYIASVQGSTPSRQKSMKGFYFAKLYEAEKEYDLAKKYICTYINVQERDPKAHRFLGLLYELEENTDKAVECYRRSVELNPTQKDLVLKI 100
 AELLCKNDVTDGRAKYWLERAAKLFPGSPAIIYKLEQLDCEGEDGWNKFLDLIOSELYVRPDDVHVNIIRLVEVYRSTKRLKDAVAHCHEAERNIALRSS 200
 LEWNSCVVQTLKEYLESQCLESKSDWRATNTDLLLAYANMLLTLSTRDVSRELLQSFDALQSVKSLGGNDELSATFLEMKGHFYMHAGSLLLKM 300
 GQSSNVQWRALSELAAALCYLIAFQVPRPKIKIKGEAGQNLLEMMACDRLSQSGHMLNLSRGKQDFLKEIVETFANKSGQSALYDALFSSQSPKDTSF 400
 LGSDDIGNIDVREPELEDLTRYDVGAI RAHNGSLQHLTWLGLQWNSLPALPGIRKWLKQLFHHLPHETSRLETNAPESICILDLEVFLLGVVYTSHLQLK 500
 EKCNSHHSSYQPLCLPLPVCKQLCTERQKSWDAVCTLIHRKAVPGNVAKLRLLVQHEINTLRAQEKHGLQALLVHWAECLOKQTSGLNSFYDQREYIG 600
 RSVHYWKKVPLPKIKIKKNSIPEPIDPLFKHFHSVDIQASEIVEYEEDAHTITFAILDVANGNIEDAVTAFESIKSVSYWNLALIFHRKAEDIENDALS 700
 PEEQECKNYLRKTRDYLIKIIDSDSNLSVVKKLPVPLESVKEMLNSVMQLEDYSEGGPLYKNGSLRNADSEIKHSTPSPTRYLSPSKSYKYSPKTP 800
 PRWAEDQNSLLKMICQVEAIKEMQELKLNSSNSASPHRWPTENYGPDSVPDGYQGSQTFHGAPLTVATGTPSVYYSQSPAYNSQYLLRPAANVTPTKG 900
 PVYGMNRLPPQQHIYAYPQQMHTPPVQSSSACMFSQEMYGPPALRFESPATGILSPRGDDYFNYNVQQTSTNPPLEPGYFTKPIAAHASRSAESKTI 1000
 ** FGKTNFVQMPGEGLRPSLPTQAHTTQPTPFKFNFSKNDGDFTFSSPQVVTQPPPAAYSNSESLGLLTSDKPLQGDGYSGAKPIPGGQTI GPRNTFN ** 1100
 ** FGSKNVSGISFTENMGSSQKNSGFRSDDMFTFHGPGKSVFGTPTLETANKNHETDGGSAHGDDDDGPHFEPVPLPDKIEVKTGEDEEEFFCNRAK 1200
 RBH-1
 LFRFDVESKEWKERGIGNVKILRHKTSKIRLLMRREQVLKICANHYSISPMKLTNPAGSDRSFVWHALDYADELPKPEQLAIRFKTPEEAALFKCKFEE 1300
 AQSILKAPGNTVAMASNQAVRIVKEPTSHDNKDICKSDAGNLNFEFQVAKKEGSWHHCNSCSLKNASTAKKCVSCQNLNPNKELVGPPLAETVFTPKTS 1400
 Zn-1
 PENVQDRFALVTPKKEGHWDCSICLVNREPTVSRCAICQNTKSANKSGSSFVHQASFKFGQDLPKPINSDFRSVFSTKEGHWDCSACLVQNEGSSTKCA 1500
 Zn-2 Zn-3
 ACQNPRKQSLPATS IPTPASFKFGTSETSKTLKSGFEDMFAKKEGHWDCSSCLVRNEANATRCVACQNPDKPSPSTSVPA PASFKFGTSETSKAPKSGFE 1600
 Zn-4 Zn-5 Zn-6
 GMFTKKEGHWDCSVCLVRNEASATKCIACQNPQKQNTTSAVSTPASSETSKAPKSGFEGMFTKKEGHWDCSVCLVRNEASATKCIACQNPQKQNTTSA 1700
 Zn-7 Zn-8
 VSTPASSETSKAPKSGFEGMFTKKEGHWDCSVCLVRNEASATKCIACQPSKQNTTASTPASSEISKAPKSGFEGMFIKKGHWDCSVCCVQNESSLK 1800
 CVACDASKPTHKPIAEAPSFTLGSEMKLHDSGSGVGTGFKSNFSEKASKFGNTEQGFKGHVVDQENSPSFMFGSSNTEFKSTKEGFSIPVSADGFKF 1900
 ** **
 * GISEPGNQEKKSEKPLENGTFQAQDISGQKNRGRVIFGQTSSTFTFADLAKSTSGEGFQFGKDPNFKGFSGAGEKLFSSQYGMANKANTSGDFEKDD 2000
 ** **
 DAYKTEDSDDIHFEPVQMPKVELVTGEDEKVLYSORVKLFRPDAEVSQWKERGLNLIKLVNEVNGKLRMLRREQVLKVCANHWITTTMNLKPLSG 2100
 RBH-2
 SDRAMWLASDFSDGDAKLEQLAAKFKTPELAEFEKQKFEQCRLLLDIPLOTPHKLVDTGRAAKLIQRAEEMKSLGKDFKFTFLTNDQTKVTEENKGG 2200
 TGAAGASDTTIKPNPENTGPTLEWDNYDLREDALDSSVSSSVHASPLASSPVRKMLFRFGESTTGFNFSFKSALS PSKSPAKLNQSGT SVGTDEESDVT 2300
 QBEERDQYFEPVPLPDLVEVSGEENEQVVFSHRAKLYRYDKVQGWKERGIGDIKILQNYDNKQVRIMRDRQVLKLCANHRITPDMTLQNMKGTER 2400
 RBH-3
 VWLWTACDFADGERKVEHLAVRFKLQDVADSFKKIFDEAKTAQEKDSLITPHVRSSTPRESPCGKI AVAVLEETTRETDRDVIQGDVADATSEVVSST 2500
 SETTPKAVVSPPKFVFGSES VKSIFSSSEKPFAPGNSSATGSLFGFSFNAPLKSNNSETSSVAQSGSEKVEPKCELSKNSDIEQSSDSKVNLFASF 2600
 PTESSINYTFKTPEKAKKKKPEDSPSDDDLIVYELTPAEQKALATKCLKLPPTFFCYKNRPDYVEEEDDEDFETAVKLNGLKLYLDGSEKCRPLE 2700
 ENTADNEKECIIVWEKPTVEKAKADTLKLPPTFFCGVCSDDTDEDNGNGEDFQSELQKVQEAQKSQTEEITSTTDSVYTGTEVMVPSFKSEEPSIT 2800
 KSISSPVSSETMDKPVLDLSTRKEIDTSTSQGESKIVSFGFSSTGLSFADLASSNSGDFAFGSKDKNFQWANTGA AVFGTQSVGTQSAKGVGEDEDGS 2900
 DEEVVHNEIDIHFEPVLSPEVEVKS GEEDEEILFKERAKLYRWRDVSQWKERGVGDIKILWHTMKNYYRILMRRDQVFKVCANHVITKTMELKPLNVSN 3000
 RBH-4
 NALVWTASDYADGEAKVEQLAVRFKTKAVDCFKKTFEECQNLMLKQKGVSLAAELSKETNPVVFFDVCADGEPGLGRITMELFSNIVPRTAENFRALC 3100
 Cych
 TGEKGFGFKNSIFHRVIPDFVCQGGDITKHDGTGGQSIYGDKFEDENFDVKHTGPGLLSMANQOGQNTNNSQFVITLKAHEHLDFKHVVFGFKDGMDTVK 3200
 ** **
 ** KIESFGSPKGSVCRITITECQI 3224

Abb. 15 Aminosäuresequenz der Proteine RANBP2 und MU-RMS-248-210/292 (vorangehende Seite)

Zn-1 bis Zn-8: Zinkfingerdomänen; RBH-1 bis RBH-4: potentielle Ran-bindende Domänen; LRR: Leucinreiche Region; Drei Sterne: 26 degenerierte XFXFG-Pentapeptidmotive; Zwei Sterne: 11 degenerierte FG-Pentapeptidmotive; CycH: Homologie zu Cyclophilin A. Das rote Dreieck markiert den Beginn des putativen Ag MU-RMS-248-210/292 27 Aminosäuren stromaufwärts der RBH-2 (MANKANT...CGQI) (Abbildung modifiziert nach Wu J 1995, Fauser S 2001).

4.5 Immunogenität der RMS-Antigene

4.5.1 Heterologe Serumanalyse mit Proben von gesunden Kontrollen

Um eine Aussage über die Immunogenität des gefundenen Ag zu treffen, bzw. um herauszufinden, ob es sich um ein Tumor-Ag oder Auto-Ag (s. Kapitel 1.4.1) handelte, wurde das rekombinant exprimierte Ag MU-RMS-248-210/292 in Plaque-Assays sequentiell mit Proben von 40 gesunden Probanden inkubiert. Keines der Kontrollseren gesunder Probanden zeigte dabei eine Ag-Ak-Reaktion. Es handelte sich demnach bei MU-RMS-248-210/292 um ein Ag, das nur in Tumorpatienten eine messbare Immunantwort auslöste und somit definitionsgemäß um ein Tumor-Ag (**Tab. 7**).

Dieses Ergebnis wurde unterstützt durch die HSA-Daten zu den beiden mit SEREX aus Testis isolierten RANBP2L1-cDNAs, Hom-Ts-PMR1-11 und Hom-TSMa5-58, deren Produkt ebenfalls mit keinem der Seren von zwölf bzw. zehn untersuchten gesunden Kontrollen reagiert hatte.

4.5.2 Heterologe Serumanalyse mit Tumorseren

Um zu untersuchen, ob die humorale Immunreaktion evtl. entitätsspezifisch bei mehreren Patienten oder entitätsübergreifend nachzuweisen war, wurden Serumproben von anderen Patienten mit Malignomen der gleichen oder einer anderen Entität überprüft. Insgesamt wurden die Seren von 59 anderen Tumorpatienten einschließlich zehn weiterer Patienten mit RMS verwendet. Bei drei Tumorpatienten zeigten sich positive Ag-Ak-Reaktionen. Darunter war jeweils ein Patient mit einem Ewingtumor, einem Neuroblastom und einem RMS. Der seroreaktive RMS-Patient war einer der fünf Patienten, deren Proben in den Serumpool für das SEREX-*screening* eingegangen waren. Bei ihm war ein unklassifizierbares RMS diagnostiziert worden (**Tab. 7**).

Die Evidenz dafür, dass messbare humorale Immunreaktionen gegen Mitglieder der RANBP2-Ag-Familie auch bei Patienten mit anderen Malignomen vorkamen, wurde durch die Tatsache unterstützt, dass das verwandte Ag Hom-TSMa5-58 mit dem Serum eines Patienten mit Mammakarzinom gefunden wurde. Allerdings war kein Serum der insgesamt 37 weiteren Patienten mit Mammakarzinom in dieser Analyse mit dem Ag reaktiv (**Tab. 6**).

Bemerkenswerterweise war die verwandte Hom-Ts-PMR1-11-cDNA mit Serum eines Patienten mit rheumatoider Arteriitis aus Hodengewebe kloniert worden, und das Ag war auch mit Serum eines Patienten mit Arteriitis reaktiv (**Tab. 6**). Diese Beobachtung sprach dafür, dass RNBP2-Proteine auch im Kontext von Autoimmunerkrankungen immunogen wirken.

	Anzahl der untersuchten Seren	Reaktive Seren
Gesunde Probanden	40	0
Patienten mit Malignomen	60	3
Akute lymphatische Leukämie	4	0
Non-Hodgkin-Lymphom	4	0
Hodgkin-Lymphom	2	0
Medulloblastom	6	0
Ependymom	2	0
Neuroblastom	7	1
Wilmstumor	3	0
Hepatoblastom	1	0
Rhabdomyosarkom:	11	1
alveolär	4	0
embryonal	6	0
unklassifizierbar	1	1
Ewingtumor	10	1
Osteosarkom	10	0

Tab. 7 Heterologe Serumanalyse des rekombinanten Antigens MU-RMS-248-210/292

4.6 Gewebsspezifität des Antigens MU-RMS-248-210

Nachdem gezeigt worden war, dass das Ag MU-RMS-248-210/292 nur bei Tumorpatienten eine messbare spezifische IgG-Ak-Antwort ausgelöst hatte, war es naheliegend zu fragen, ob ein Familienmitglied der RAN-BP 2-Familie möglicherweise tumorspezifisch exprimiert wurde und auf diese Weise eine tumorassoziierte Immunreaktion ausgelöst hatte.

Wie in Kapitel 4.3.3. dargelegt, wurden drei Primerpaare etabliert, die jeweils den Nachweis von Sequenzabschnitten 1.) der klonierten MU-RMS-248-210/292-mRNA, 2.) der stromaufwärts gelegenen RANBP2-mRNA-Sequenzen oder 3.) der stromaufwärts alternativ wie BS-63 gespleißten RANBP2-mRNA erlaubten (**Abb. 12**).

Das Primerpaar se2/an2 wurde zur Darstellung von 725 bp des in dieser Arbeit klonierten Abschnitts der RANBP2-mRNA eingesetzt. Von genomischer DNA wurde mit diesem Primerpaar erwartungsgemäß kein PCR-Produkt amplifiziert. Wie erwartet konnte dagegen ein ca. 725 kb großes PCR-Produkt vom Plasmid pMU-RMS-248-210 und aus der Phagenbibliothek des Tumors 248 amplifiziert werden (**Abb. 16**). Daneben fand sich dieser Sequenzabschnitt in diversen (10/16) Normalgeweben, nicht jedoch in Hoden (**Abb. 15**), Lunge, Niere, Milz und Thymus, Dünndarm (**Abb. 18**).

Zur Darstellung der stromaufwärts gelegenen nicht klonierten Abschnitte der RANBP2-mRNA wurde das Primerpaar se3/an3 ausgewählt, welches kein Exon umspannte und somit erwartungsgemäß ein 661 kb großes Produkt von genomischer DNA amplifizierte. Die Sequenz fand sich, ebenfalls erwartungsgemäß, nicht auf dem Plasmid pMU-RMS-248-210 mit der 5' inkompletten Fremd-cDNA. Interessanterweise war sie auch nicht in der Phagenbibliothek aus dem RMS 248 und nicht in Hodengewebe zu detektieren (**Abb. 16**). Dies ließ darauf schließen, dass der stromaufwärts der klonierten Sequenz gelegene mRNA-Bereich im RMS 248 möglicherweise wie in BS-63 gespleißt wurde. Dies wurde mit dem Primerpaar se1/an1 getestet.

Mit dem Primerpaar se1/an1 wurde, wie aufgrund der Primärbeschreibung des Spleißens in BS-63 zu erwarten, eine 206 bp lange mRNA-Sequenz aus Hodengewebe amplifiziert. Ebenfalls erwartungsgemäß war die Tatsache, dass die entsprechende Sequenz nicht von den 5' inkompletten Sequenzen in Plasmid pMU-RMS-248-210 und nicht von genomischer DNA amplifiziert wurde, die zusätzliche Intronsequenzen enthielt. Interessanterweise konnte die untersuchte Spleißvariante tatsächlich auch in dem RMS 248 nachgewiesen werden (**Abb. 17**). Allerdings ließ sich das Postulat eines Cancer-Testis-spezifischen Epitops in diesem Bereich nicht belegen, da die Testis-Spleißvariante auch in diversen anderen Normalgeweben nachweisbar war (insg. 11/16) (**Abb. 19**).

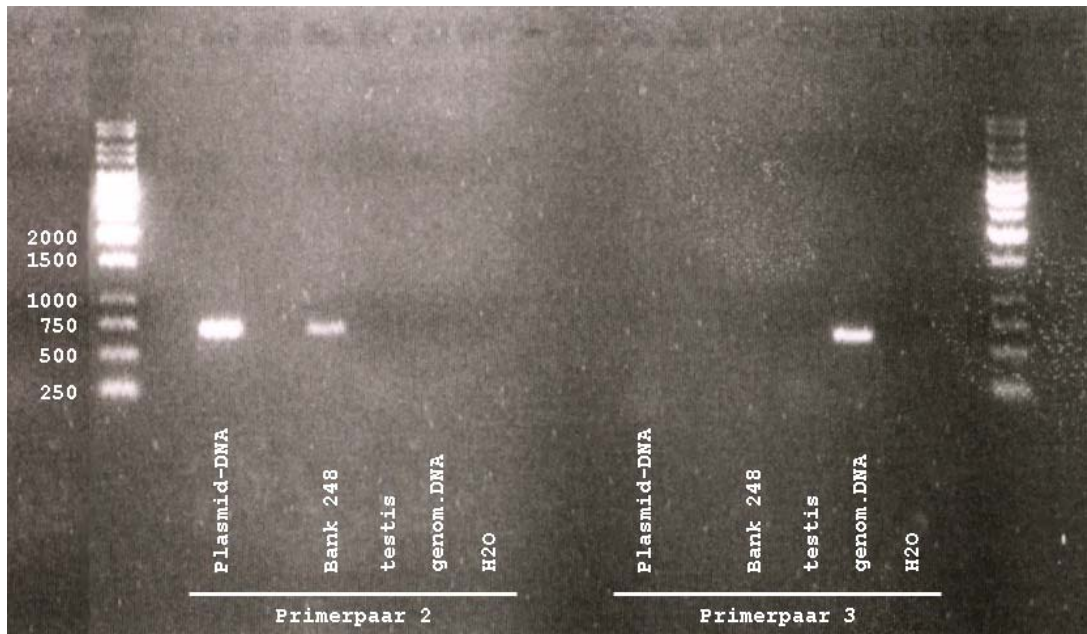


Abb.16 Charakterisierung der PCR-Produkte mit den Primerpaaren se2/an2 und se3/an3

Die Abbildung zeigt eine Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte im Vergleich zu einem Größenmarker (rechts und links außen). Das 725 kb große PCR-Produkt mit dem Primerpaar se2/an2 wurde vom Plasmid pMU-RMS-248-210 und aus der Phagenbibliothek des RMS 248 (Bank 248), nicht jedoch aus Hodengewebe oder von genomischer DNA aus gesunden Lymphozyten amplifiziert. Das 631 kb große PCR-Produkt mit dem Primerpaar se3/an3 konnte ausschließlich von normaler genomischer DNA amplifiziert werden. H2O : Negativkontrolle.



Abb.17 Charakterisierung der PCR-Produkte mit dem Primerpaar se1/an1

Die Abbildung zeigt eine Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte im Vergleich zu einem Größenmarker (rechts und links außen). Das 206 bp lange PCR-Produkt mit dem Primerpaar se1/an1 konnte aus der Phagenbibliothek des RMS 248 (Bank 248) und normalem Hodengewebe (testis Ag), jedoch nicht vom Plasmid pMU-RMS-248-210 oder von genomischer DNA amplifiziert werden.

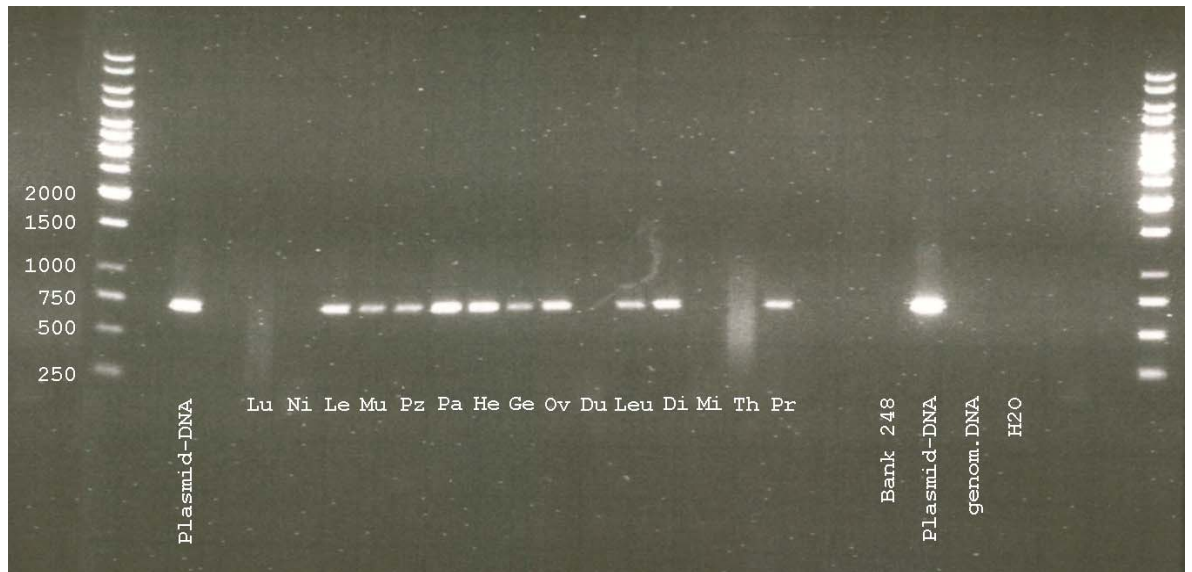


Abb. 18 mRNA-Expressionsanalyse des Antigens MU-RMS 248-210/292 mittels RT-PCR

Die Abbildung zeigt eine Agarosegelelektrophorese der 725 bp-PCR-Produkte mit dem Primerpaar se2/an2. Lu: Lunge, Ni: Niere, Le: Leber; Mu: Muskel, Pz: Plazenta, Pa: Pankreas, He: Herz, Ge: Gehirn, Ov: Ovar, Du: Dünndarm, Leu: Leukozyten, Di: Dickdarm, Mi: Milz, Th: Thymus, Pr: Prostata, Plasmid-DNA: Plasmid-DNA: pMU-RMS-248-210 (Positivkontrolle), Bank 248: Phagenbibliothek aus dem RMS 248, genom. DNA: genomische DNA aus gesunden Blutlymphozyten, H2O: Negativ-Kontrolle. Die Integrität aller eingesetzten cDNAs war durch den Nachweis von mRNA der *house keeping*-Gene *GAPDH* und *Aktin* geführt worden (nicht gezeigt). Das negative Ergebnis für genomische DNA belegte, dass keine genomischen, sondern nur mRNA-Sequenzen amplifiziert worden waren.

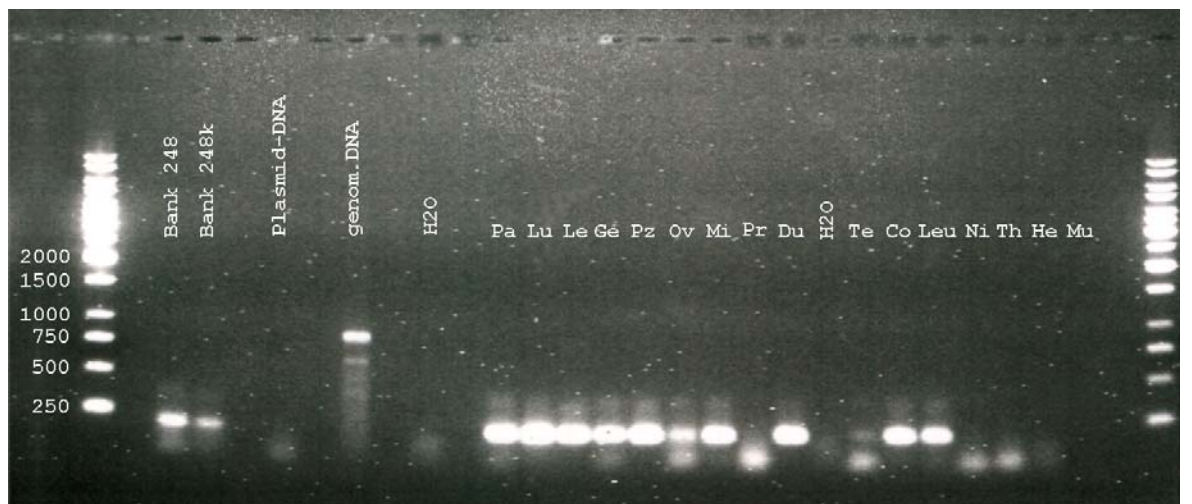


Abb.19 mRNA-Expressionsanalyse der Spleißvariante BS-63 mittels PRT-PCR

Die Abbildung zeigt eine Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte mit dem Primerpaar se1/an1. Länge des erwarteten PCR-Produkts: 202 bp. Bank 248: Phagenbibliothek aus dem RMS 248; Plasmid-DNA: pMU-RMS-248-210; genom. DNA: genomische DNA aus gesunden Lymphozyten; H2O: Negativkontrolle; Pa: Pankreas, Lu: Lunge, Le: Leber, Ge: Gehirn, Pz: Plazenta, Ov: Ovar, Mi: Milz, Pr: Prostata, Du: Dünndarm, Te: Testis, Co: Colon, Leu: Leukozyten, Ni: Niere, Th: Thymus, He: Herzmuskel, Mu: Skelettmuskel.

5 Diskussion

In dieser Arbeit wurde das SEREX-Verfahren erstmals auf ein aRMS angewandt mit dem Ziel, neue Tumor-Ag dieses aggressiven pädiatrischen Sarkoms zu identifizieren.

Dabei wurden zwei seroreaktive Klone isoliert, die die gleiche ca. 4 kb-lange Tumor-cDNA enthielten und somit offensichtlich Amplifikate repräsentierten. Das längste putative Produkt der isolierten Tumor-cDNA (MU-RMS-248-210/292) war identisch mit dem Carboxyterminus des Ran-bindenden Proteins RANBP2 und zeigte aminoterminal hohe Homologie zu den Produkten des *RANBP2L1*-Gens, welches ein partielles Duplikat des RANBP2-Gens auf Chromosom 2 darstellt. Neben dem großen *RANBP2*-ORF wurden in der klonierten Tumor-cDNA zwei kleine alternative ORF identifiziert. Das Ag wurde der Gruppe der Tumor-Ag mit entitätsübergreifender Immunogenität zugeordnet, da es mit Seren von Patienten mit unterschiedlichen Malignomen, nicht aber mit Seren gesunder Probanden, reaktiv war. Die Expressionsanalyse mittels RT-PCR ergab keinen Hinweis auf eine Tumor- oder Cancer-Testis-restringierte Expression des klonierten Ag. Allerdings fand sich unter den partiell homologen Produkten des *RANBP2L1*-Gens das Testis-spezifische Protein BS-63.

5.1 Molekulare Struktur, Funktion, Lokalisation und molekulare Varianten des Homologs RANBP2

Das homologe RANBP2 wird auch als *nuclear pore component 358* (Nup358) bezeichnet und ist ein Protein der RAS-Familie. In Assoziation mit der Kernmembran bindet es Ran.

Ran ist ein ubiquitär vorkommendes, kleines eukaryotisches Protein, das Guanosyl-Triphosphat (GTP) hydrolysiert und deshalb als Ran-GTPase bezeichnet wird. Es ist sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma zu finden und steht in komplexem Zusammenhang mit dem Zellimport von Proteinen, dem Zellkernexport von RNA, der Regulation des Zellzyklus, der Mitose, der DNA-Synthese und der DNA-Prozessierung sowie dem Erhalt des Kernkomplexes (Bischoff et al., 1995; Rush et al., 1996; Koepp and Silver, 1996; Grisendi S, 2008; Navarro MS et al., 2008; Cho KI et al., 2009).

Verschiedene Ran-GTP-bindende Proteine wurden bereits identifiziert wie z.B. der Guanin-Nucleotid-Austauschfaktor RCC1, das GTPase-aktivierende Protein RANGAP1, das 24 kDa Protein RANBP1 und schließlich das RANBP2/Nup358 (Lounsbury et al., 1994, Wu et al., 1995, Yokoyama et al. 1995, Chi et al., 1996, Saitoh et al., 1996).

RANBP2 wird wie Ran ubiquitär exprimiert und ist auf der zytoplasmatischen Seite des Kernporenkomplexes lokalisiert (Wilken et al., 1995). Es gilt als Hauptbindungspartner für Ran-GTP und spielt demnach eine entscheidende Rolle bei dem Ran-vermittelten Zellkerntransport (Melchior et al., 1995, Hutten S et al., 2008, 2009).

Das humane RANBP2-Protein hat eine molekulare Masse von 358 kDa und wird durch ein mehr als 60 kb umspannendes Gen auf Chromosom 2q12.3 kodiert. Ein Mega-Exon von ca. 5 kb, das acht variable Zinkfingerdomänen einschließt, prädisponiert für genetische Rekombinationen wie Duplikationen, Fusionen oder Translokationen. Die chromosomale Region 2q11-q12 wird als *hot spot* für Rekombinationen angesehen (Fauser et al., 2001, Nothwang et al., 1998, Hillier LW et al., 2005, Loughlin FE et al., 2009). Passend dazu ist ein *RANBP2*-ähnliches Gen, das *RANBP2L1*, wahrscheinlich im Rahmen einer partiellen Genduplikatur an der chromosomalen Position 2q13 entstanden. Die *RANBP2L1*-Genprodukte unterscheiden sich von RANBP2 durch einen alternativen Carboxyterminus, der wiederum große Ähnlichkeit mit dem Carboxyterminus des ebenfalls auf Chromosom 2q12 kodierten *GCC2*-Genprodukts aufweist.

Genetische Veränderungen im Bereich des Mega-Exons von *RANBP2* werden mit verschiedenen nicht-malignen Erkrankungen wie der juvenilen Nephronophthise, der kongenitalen hepatischen Fibrose und der chorioretinalen Dysplasie sowie unlängst einer akuten nekrotisierenden Enzephalopathie (ANE) in Verbindung gebracht (Fauser, 2001, Neilson DE et al., 2009). Ein ungewöhnliches Rearrangement zwischen dem *RANBP2*-Gen und dem *anaplastic lymphoma kinase* (ALK) Gen wurde kürzlich in einem myofibroblastischen Tumor der Leber beschrieben (Chen ST, 2008).

Weiterhin wurden neben den erwähnten vier potentiellen RAN-Bindedomänen (RBH) eine leucinreiche Region am Aminoterminus und 26 degenerierte XFXFG-Pentapeptidmotive beschrieben. Letztere sind ebenfalls charakteristisch für Proteine des Zellkernporenkomplexes (Wu et al., 1995, Yokoyama et al., 1995, Hutten S et al., 2008, 2009).

Am Carboxyterminus beinhaltet das RANBP2 eine Region mit hoher Homologie zu Cyclophilin (RBD4) und fungiert dadurch als Chaperone für das rote und grüne Sehpigment (Rhodopsin, Pophyropsin) (Ferreira et al., 1996, 1997).

Ein Produkt der partiellen Genduplikatur ist die BS-63-mRNA, die primär in einer humanen Testis-cDNA-Bibliothek identifiziert worden war. Mittels Northern-Blot-Analysen waren zwei verschiedene BS-63-Transkripte nachgewiesen worden. Das 8.5 kb lange Transkript war in geringen Mengen in verschiedenen humanen Geweben, das 6.0 kb lange Transkript dagegen ausschließlich in Keimzellen des Hodens zu detektieren (Wang et al., 1999).

5.2 Molekulare Struktur, Gewebeexpression und Immunogenität des Antigens MU-RMS-248-210/292

Da das putative Ag MU-RMS-248-210 aminoterminal inkomplett war, stellte sich zunächst die Frage, ob es in dem vom Mega-Exon kodierten Bereich eher dem Spleißtyp des RANBP2 oder dem des BS-63 entsprach. Interessanterweise war nur die BS-63-ähnlich gespleißte Variante und nicht die klassische RANBP2-mRNA-Sequenz aus der Phagenbibliothek des RMS 248 zu amplifizieren.

Um nach Gründen für die tumorassoziierte Immunogenität der RANBP2-Familie zu suchen, wurde die Gewebeexpression der aus dem RMS klonierten mRNA-Sequenz und verwandter mRNA-Sequenzen mittels RT-PCR untersucht. Alle untersuchten Sequenzabschnitte zeigten dabei eine Expression in diversen Normalgeweben und waren somit keine Quelle für Tumor- oder Cancer-Testis-spezifische Epitope.

Eine mögliche Erklärung für die tumorassoziierte Immunogenität der RANBP-Familie im RMS 248 lag allerdings darin, dass die 6 kb lange, Testis-spezifische Variante des BS-63 möglicherweise aberrant im Tumor der seroreaktiven Patienten exprimiert worden war. Die kurze BS-63-mRNA-Variante könnte im Sinne eines Cancer-Testis-Ag ein T-Zellepitop geliefert haben, das normalerweise im Hoden vor einer Immunerkennung geschützt ist und nur nach aberranter Expression in Tumorgewebe immunogen wirkt. Aufgrund der partiellen Homologie mit RANBP2 war es denkbar, dass die primär gegen Testis-spezifische Sequenzen des BS-63-gerichtete T-Zell-Antwort in der Produktion von Ak resultierte, die ubiquitär exprimierte Homologe banden.

Eine andere mögliche Erklärung für eine tumorassoziierte Immunreaktion gegen Proteine der RANBP2-Familie böten tumorspezifische molekulare Veränderungen z.B. im Bereich der mutationsanfälligen Zinkfingerregion. Wie oben berichtet, war über *missense*-Mutationen im Kontext von nicht-malignen Erkrankungen (Fauser et al., 2001, Neilson DE et al., 2009) und ein tumorassoziiertes Genarrangement im Kontext eines myofibroblastischen Tumors berichtet worden (Chen ST, 2008). Eine Mutationsanalyse des *RANBP2*-Genklusters erscheint nicht nur vor dem Hintergrund möglicher tumorassoziiertes T-Zellepitope lohnenswert, sondern auch, weil RANBP2 kürzlich als neuer Tumorsuppressor identifiziert wurde (Navarro et al., 2008).

Schließlich war es auch denkbar, dass im Tumor nicht der konventionelle *RANBP2*-ORF, sondern einer der beiden kleinen, alternativen ORF abgelesen worden war. Es mehren sich in den letzten Jahren Hinweise darauf, dass alternativ translatierte Genprodukte zur Komplexität des tumorassoziierten Immunoms beitragen. Diese alternativen ORF können zum klassischen ORF verschoben liegen oder aber auch den klassischerweise nicht translatierten 5'- oder 3'-Abschnitten (5'-UTR, 3'-UTR) einer mRNA entstammen

(Behrends et al., 2002, 2003, Probst-Kepper M 2001).

Interessanterweise war die MU-RMS-248-210/292-spezifische Seroreaktivität nicht auf Patienten mit RMS beschränkt, sondern darüber hinaus in der eigenen Arbeit auch im Kontext eines Neuroblastoms und eines Ewingtumors sowie in einer fremden Arbeit im Kontext eines Mammakarzinoms nachzuweisen. Dies bedeutete, dass die Immunogenität möglicherweise auf einen, allen Tumoren gemeinsamen Mechanismus und weniger auf individuelle Mutationen zurückzuführen war. Zukünftige Expressionsanalysen der verschiedenen RANBP2-Homologe in Tumoren seropositiver Patienten und ggf. Mutationsanalysen des *RANBP*-Genklusters in diesen Tumoren könnten diese Hypothesen prüfen.

Durch Untersuchungen dieser Art könnte man auch lernen, ob die Immunogenität nur vom Vorkommen der relevanten Sequenzen im Tumor oder auch vom HLA-Typ des Patienten abhängig ist. Wenn letzteres der Fall wäre, wäre die relativ niedrige Frequenz nachweislicher Immunreaktionen bei nur drei von 60 untersuchten Patienten mit einer malignen Erkrankung gut zu erklären.

Interessanterweise war innerhalb des eingesetzten Serumpools nicht das autologe Serum des Patienten mit dem untersuchten aRMS, sondern das heterologe Serum eines Patienten mit einem unklassifizierbaren RMS reaktiv. Der Befund gibt Anlaß zu den alternativen Hypothesen, dass a) das RANBP2-Protein mit dem für die Ak-Produktion verantwortlichen T-Zellepitop nicht im Kontext von aRMS vorkommt, b) dass es im Kontext des aRMS nicht hinreichend immunogen wirkt, z.B. als Folge von Mechanismen des *immune escape*, oder c) dass unter den Patienten aus dem Serumpool evtl. nur der Patient mit dem unklassifizierbaren RMS den passenden HLA-Typ für eine effiziente Präsentation des verantwortlichen T-Zell-Epitops aufwies.

Als Hinweis darauf, dass auch der nicht mit RANBP2 homologe Anteil der *RANBPL1*-Genprodukte immunogene Wirkung haben könnte, ist die Tatsache zu werten, dass sich in der SEREX-Datenbank neben *RANBP2*- und *RANBP2L1*-Genprodukten auch Genprodukte des *GCC2*-Gens finden, namentlich HOM-TS-GLI-72, MO-CO-1053, MO-CO-99, NGO-Pr-1, NGO-St-38 und se1-1. Sie weisen, wie in 4.3.3 erwähnt, im carboxyterminalen Teil hohe Homologie mit den Produkten des *RANBP2L1*-Gens auf. Für das NGO-St-38 sind auch Reaktionen mit Seren von gesunden Probanden belegt, so dass es sich zumindest bei diesem Ag definitionsgemäß um ein Auto-Ag handelt.

Bemerkenswert war der Befund, dass auch Patienten mit rheumatischen Erkrankungen Ak gegen Mitglieder der RANBP2-Familie aufweisen können. So war ein Homolog des BS-63, das Ag HOM-Ts-PRM1-11, durch Analyse einer Testis-cDNA-Bibliothek mit dem Serum eines Patienten mit rheumatoider Arteriitis identifiziert worden und mit dem Serum

eines Patienten mit Arteriitis reaktiv. Dieses Ergebnis sprach dafür, dass es auch tumorunabhängige Mechanismen gibt, die Immunreaktionen gegen RANBP2-Proteine auslösen können. Denkbar wäre, dass die rheumatische Entzündung z.B. mit einer Überexpression von Produkten des *RANBP2*-Genklusters assoziiert ist und auf diese Weise die immunologische Toleranz für diese Proteine bricht.

Die Tatsache, dass Immunreaktionen gegen RANBP2-Proteine im Kontext von schweren Autoimmunerkrankungen gemessen wurden, stimmt bezüglich der möglichen Verwendung von RANBP2-Genprodukten als Ziel-Ag für die Tumorimmuntherapie bedenklich. Auch die Tatsache, dass dem RANBP2 Tumorsuppressorfunktionen zugeschrieben werden, gebietet Zurückhaltung bei der Targetierung dieser Proteinfamilie. Wenn sich allerdings zukünftig doch tumorspezifische oder Cancer-Testis-spezifische Epitope identifizieren lassen sollten, könnte über deren Einsatz als Zielstruktur bei der Immuntherapie von Malignomresiduen spekuliert werden.

5.3 Mögliche klinische Bedeutung von Tumorantigenen und tumorantigenspezifischen Antikörpern

Für die Ag-spezifische Tumorimmuntherapie sind tumorspezifische oder Cancer-Testis-spezifische Ziel-Ag attraktiver als Ag, die auch in lebenswichtigem Normalgewebe vorkommen, da eine gezielte Steuerung der Immunantwort gegen malignes Gewebe möglich ist. Unerwünschte Nebenwirkungen an Normalgeweben können so vermieden und die Effizienz der Therapie gezielt optimiert werden.

Ein klassischer Ansatz der Tumorimmuntherapie besteht in der Applikation von Ak, die ausschließlich oder unter anderem gegen Tumorzellen gerichtet sind. Um die Toxizität der Ak zu steigern, wurden sie zum Teil mit pflanzlichen oder bakteriellen Toxinen, Radionukliden, Enzymen oder Zytokinen gekoppelt (Ross et al., 2003), so zum Beispiel der radioaktiv gekoppelte chimäre anti-CD20-mAk Rituximab gegen das CD20-Oberflächen-Ag von B-Zellen, der erfolgreich zur Behandlung von B-Non-Hodgkin-Lymphomen eingesetzt wird. Um die Bildung von humanen Anti-Maus-Ak (HAMA) zu vermeiden, werden zunehmend humanisierte Ak, wie etwa der monoklonale anti-Her-2-Ak Trastuzumab, gegen den epidermalen Wachstumsfaktor Her-2/neu z.B. auf Mammakarzinomen verwendet (Argyriou A, Kalofonos HP, 2009). An der Effizienz der Ak-Therapie wurde durch Herstellung von bispezifischen Ak gearbeitet, die Bindungsstellen für zwei Ag enthalten und so Tumorzellen mit immunologischen Effektorzellen vernetzen. Dieser Ansatz wurde durch die so genannten „Diabodies“ verfeinert, denen bei erhaltener

Bispezifität das Fc-Fragment fehlt (Chames P, Baty D, 2009) Die Ak-Therapie hat allerdings zwei wesentliche Limitationen, zum einen die Tatsache, dass die konventionellen Ak nur Oberflächen-Ag der Zielzellen binden können, und zweitens die Tatsache, dass sie schlecht vaskularisiertes Gewebe kaum penetrieren. RANBP2 ist als intrazellulär lokalisiertes Ag deshalb kein geeignetes Ziel-Ag für die klassische Ak-Therapie.

Wie in Kapitel 1.5.2 ausgeführt, ist der adoptive Transfer von Ag-spezifisch *ex vivo* expandierten T-Zellen ein vielversprechender alternativer Ansatz der passiven Tumormimmuntherapie. Die Zellen können nicht nur Ag-spezifisch selektioniert, sondern auch genetisch modifiziert werden (Kessels et al., 2000; Morgan et al., 2003). Die zellulären Effektorzellen gelangen auch in Gewebe, die Ak unzugänglich sind (Kaufmann et Disis, 2004). Einsatz fand der adoptive T-Zelltransfer vor allem bei malignen Melanomen. Für CTL gegen die Melanom-Ag Mart1/Melan A und gp100 konnten klinische Teilerfolge erzielt werden (Yee et al., 2002). Eine zentrale Schwachstelle des adoptiven T-Zelltransfers liegt in der unzureichenden Proliferation der übertragenen T-Zellen *in vivo*. Dies wird u.a. mit den immunsuppressiven Eigenschaften von so genannten regulatorischen T-Zellen (Treg) im Patienten erklärt. Um deren Einfluß zu unterdrücken, werden aktuell verschiedene Konzepte für eine prä-immuntherapeutische Immunsuppression zum Beispiel durch eine milde Chemotherapie oder eine Radiatio getestet (Muranski et al., 2006, Wang, 2007). Wenn sich tumorspezifische oder Cancer-Testis-spezifische T-Zellepitope in Mitgliedern der RANBP2-Proteinfamilie identifizieren lassen, die in aRMS vorkommen, wäre der adoptive Transfer von autologen T-Zellen, die diese Epitope erkennen, durchaus ein interessanter adjuvanter Therapieansatz.

Prinzipiell kann die Tumormimmuntherapie, wie bei der klassischen Impfung auch, als Vakzinierung mit Ag oder Ag-Peptiden erfolgen. Voraussetzung für die aktive Vakzinierung ist allerdings ein ausreichend starkes Immunsystem des Empfängers, was bei intensiv vortheraipierten Patienten selten zur Verfügung steht. Klinische Teilerfolge konnten zum Beispiel mit Peptidvakzinen gegen die Cancer-Testis-Ag NY-ESO-1 (Jäger et al., 2000) und MAGE-1/3 (Knuth et al., 2000) erzielt werden. Vielversprechender erscheint die Gabe von professionellen Ag-präsentierenden Zellen, vor allem von dendritischen Zellen (Proudfoot et al., 2007), die mit Ag beladen wurden. Der Einsatz von peptidbeladenen dendritischen Zellen, z.B. bei Prostata-, Zervixkarzinom- und B-Zell-Lymphompatienten, erbrachte teilweise klinische Erfolge (Markiewicz und Kast, 2004, Rini 2004, Ferrara et al., 2003, Hsu et al., 1996). Die Behandlung von pädiatrischen RMS-Patienten mit Fusionspeptid (EWS/FLI1 bzw. PAX3/FKHR) -gepulsten dendritischen Zellen in Kombination mit Monozyten und IL-2 konnte dagegen den fatalen klinischen Verlauf nicht aufhalten (Daughter et al., 2002). Alternativ wurden auch Studien zum

direkten DNA- bzw. RNA-Transfer in DC durchgeführt (Grunebach et al., 2005, Banchereau et Palucka, 2005). Vakzinierungsansätze könnten demnach auf der Basis von Tumor- oder Cancer-Testis-spezifischen RANBP2-Abkömmlingen entwickelt werden, erscheinen aber aus den oben genannten Gründen weniger erfolgversprechend als der Ag-spezifische adoptive T-Zelltransfer.

Erweist sich ein tumorassoziiertes Ag als nicht geeignet für den Einsatz in der Tumorimmuntherapie, bleibt zu prüfen, ob das Ag selbst oder Ag-spezifische Ak als diagnostischer oder prognostischer Marker von Bedeutung sein könnten. Als Beispiele für klinisch interessante Ak sind Ak gegen das transmembranständige Mucin-1 (MUC1) bei Pankreaskarzinompatienten zu nennen, deren erhöhte Titer mit einem längeren Überleben assoziiert sind (Hamanaka et al., 2003). Mit einer besseren 5-Jahres-Überlebensrate assoziiert sind auch Ak gegen die Hu-Proteinfamilie bei Patienten mit Neuroblastom und kleinzelligem Bronchialkarzinom (Dalmau J et al., 1995, Graus et al., 1997). Dagegen fanden sich schlechtere Prognosen von Mamma-, Magen- und Kolonkarzinomen bei Nachweis von Ak gegen den Tumorsuppressor p53 (Soussi, 2000) oder von Mammakarzinomen bei Vorkommen von Auto-Ak gegen das Hitzeschockprotein 90 (HSP90) (Conroy et al., 1998). Letzteres ist ein Beispiel dafür, dass auch Auto-Ak klinische Bedeutung im Kontext von Tumoren haben können. Weiterhin gibt es verschiedene Berichte darüber, dass die Titer von Ak gegen tumorassoziierte Proteine mit dem Verlauf maligner Erkrankungen korrelieren und somit frühzeitig Hinweise auf einen Krankheitsprogress oder ein Rezidiv geben können (Jäger et al., 1999, Behrends et al., 2002).

Zum Zeitpunkt des Verfassens dieser Arbeit waren noch keine prognostisch relevanten serologischen Marker oder Gewebemarkers im Kontext von aRMS bekannt. Es erscheint somit sinnvoll, die RANBP2-spezifische serologische Analyse von pädiatrischen Patienten mit RMS, Ewingtumor oder Neuroblastom auf größere Patientenkollektive zu erweitern und auf diese Weise zu lernen, ob die RANBP2-spezifischen Ak möglicherweise von diagnostischer oder prognostischer Bedeutung sind. Ob das Vorkommen bestimmter Transkripte oder Mutationen des *RANBP2*-Genkomplexes in diesen Tumoren eventuell Rückschlüsse auf die Aggressivität der Malignome zulässt und somit der Therapiestrategie dienlich sein könnte, wäre in zusätzlichen Sets von Experimenten zu prüfen.

5.4 Die klinische Bedeutung von Cancer-Testis-Antigenen

Wenn gezeigt werden kann, dass das Testis-spezifische RANBP2-Derivat in pädiatrischen Tumoren vorkommt und für die Immunogenität der RANBP2-Familie im Tumorkontext verantwortlich ist, wäre dieses Protein als Cancer-Testis-Ag zu klassifizieren.

Cancer-Testis-Ag wirken in gesunden Personen nicht immunogen, da der Hoden normalerweise dem Immunsystem nicht zugänglich ist (*immune privileged site*). Nur wenn die Keimzell-Ag *ektop* in Tumorgewebe exprimiert werden, kommt es zur Immunerkennung. Die ektopische Expression der Cancer-Testis-Ag in Tumoren wird mit einer Demethylierung der verantwortlichen Gene erklärt, welche in der Regel auf dem X-Chromosom gelegen sind. Cancer-Testis-Ag sind attraktive Kandidaten für die Immuntherapie, da die lebenswichtigen Normalgewebe aufgrund der fehlenden Ag-Expression vor unerwünschten Nebenwirkungen geschützt sind.

Die ersten Cancer-Testis-Ag waren mit CTL-Klonen identifiziert und den Familien der MAGE-, BAGE- und GAGE-Ag zugeordnet worden (Boel et al., 1995, Gaugler et al., 1994, Van den Eynde et al. 1997, Chen YT et al., 2000). Für einige Proteine der MAGE-A-Familie sind T-Lymphozyten-Epitope bekannt, so dass diese in klinischen Pilotstudien als Peptidvakzine eingesetzt werden konnten (Tanzarella et al., 2004). Aufgrund seiner hohen Expression in Melanomen gilt MAGE-A3 als besonders attraktives Target für die Tumorimmuntherapie. Als weiteres Beispiel zu nennen, ist das Cancer-Testis-Ag NY-ESO-1, das mit SEREX in einem Oesophaguskarzinom identifiziert worden war und in dem ebenfalls T-Zell-Epitope charakterisiert wurden (Chen et al., 1997, 2000).

Die Arbeitsgruppe um Rodolfo und Kollegen konnte erstmals bei pädiatrischen Patienten mittels eines ELISA Ak gegen NY-ESO-1 nachweisen (Rodolfo et al. 2003). Über die Identifikation von SEREX-Ag in pädiatrischen Tumoren wurde bislang in der Literatur nicht berichtet, obwohl eine mRNA-Expression von Cancer-Testis-Ag in pädiatrischen Tumoren zahlreich belegt wurde (Corrias et al., 1996; Ishida et al., 1996, Scarcella et al., 1999, Wölfl et al., 2005). In der eigenen Arbeitsgruppe war die mRNA-Expression von 17 Cancer-Testis-Ag in verschiedenen pädiatrischen Tumoren untersucht worden. In der Mehrzahl der Tumoren (ca. 80 %) konnte mindestens eine Cancer-Testis-Ag-mRNA den verschiedenen Familien wie z.B. MAGE-A2, GAGE und SSX-4 nachgewiesen werden.

Die Tatsache, dass in dieser Arbeit mit SEREX ein klinisch sehr interessantes und möglicherweise mit einem verwandten Cancer-Testis-Ag koexprimiertes Ag identifiziert werden konnte, spricht dafür, die serologische Tumor-Ag-Suche in aggressiven RMS durch zusätzliche Recherchen zu intensivieren.

5.5 Mechanismen der immunologischen Maskierung von Tumoren

Die Identifikation einzelner Ag wird bei der Tumorimmuntherapie voraussichtlich nicht allein zielführend sein, da Tumore diverse Strategien dafür entwickelt haben, sich der natürlichen Überwachung (*surveillance*) des Immunsystems zu entziehen. Dieses Phänomen wird allgemein als *tumor immune escape* bezeichnet (Dunn GP 2002).

Aufgrund des natürlichen Selektionsdrucks entstehen zum Beispiel Ag-Verlustvarianten, die nur noch eine verminderte oder eine fehlende Ag-Expression aufweisen. Dieses Phänomen wurde experimentell in murinen Methylcholanthren-A-induzierten Tumoren belegt. Durch den Verlust oder die Modulation von immundominanten Ag wurden diese nicht mehr von den Ag-spezifischen CTL erkannt und somit selektioniert (Seliger, 2005). Nach Beobachtungen von Jäger und Knuth wurde auch im Menschen eine Immunselektion nach Peptidvakzinierung beschrieben (Jäger et al., 1997). Um der Entstehung von Ag-Verlustvarianten vorzubeugen, sind polyvalente Impfstoffe wünschenswert, die Epitope mehrerer Ag beinhalten. Voraussetzung dafür ist aber wiederum eine weitere Aufschlüsselung des Immunoms der verschiedenen internistischen und pädiatrischen Tumoren durch eine intensive Ag-Suche.

Ein weiterer wesentlicher Schritt zur Antagonisierung des *tumor immune escape* besteht in der oben bereits erwähnten Ausschaltung von negativen Immunregulatoren vor dem adoptiven Transfer Ag-spezifischer T-Zellen, so z.B. Suppression der regulatorischen T-Zellen durch eine vorgeschaltete milde Chemo- oder Radiotherapie (Muranski P, Restifo NP et al., 2006).

Erschwerend kommt die Herunterregulation von MHC Klasse I- und II-Oberflächenmolekülen zu anderen Mechanismen der immunologischen Maskierung von Tumoren hinzu. Immunhistochemische Untersuchungen hatten ergeben, dass die MHC Klasse-I-Oberflächenexpression in 25 -75 % der Tumorzellen im Vergleich zu korrespondierenden nicht malignen Zellen vermindert und in 9-52 % sogar komplett supprimiert ist (Hui et al., 1984, Restifo et al., 1991, Seliger B, 1999). Die CD8+ T-Zell vermittelte Immunerkennung ist somit beeinträchtigt. Darüber hinaus wurden molekulare MHC-Anomalien wie Mutationen, Deletionen oder andere Genrearrangements in Tumoren beobachtet und können mit einer verminderten Differenzierung, Tumorprogress und somit schlechterer Prognose assoziiert sein (Seliger B, 1999). Eine ausreichende Expression von MHC-Molekülen und somit verbesserte Ag-Präsentation wird in vielen immuntherapeutischen Protokollen durch parallelen Einsatz von proinflammatorischen Zytokinen mit Tumorimpfstoffen oder alleinige Gabe von Zytokinen wie Interferon-alpha, GM-CSF oder IL-2 angestrebt (Virasch et al., 2001, Seliger B, 1999).

Neben den genannten Ursachen für den *tumor immune escape* ist auch die Produktion immunmodulierender Proteine und Substanzen durch die Tumoren zu nennen. Beispiele hierfür sind einerseits verschiedene Zytokine, retrovirusähnliche Partikel und Oxidantien (Seliger B, 1999), andererseits zellständige Faktoren wie etwa der Fas-Ligand (FasL), der die Induktion von Apoptose in Fas exprimierenden Zellen und somit in aktivierten T-Zellen bewirkt (Bodey et al., 1999).

Da die Ausbeute an Ag bei der SEREX-Analyse des aRMS in dieser Arbeit gegenüber der Ausbeute bei der SEREX-Analyse eines eRMS (Götz C, 2006) in derselben Arbeitsgruppe deutlich geringer ausfiel, könnte man spekulieren, dass im aRMS *tumor immune escape* Mechanismen eine gewichtigere Rolle spielen. Diese Hypothese wäre durchaus mit der allgemein schlechteren Prognose der aRMS gegenüber den eRMS zu vereinen. Es wäre interessant, sie durch Analyse weiterer aRMS und eRMS zu prüfen.

5.6 Neue methodische Ansätze für die Identifikation von Tumorantigenen

Die geringe Ausbeute an Ag in der eigenen Arbeit gibt Anlass zu der Frage, ob und wie der serologische Ansatz evtl. optimiert werden könnte, oder ob inzwischen evtl. noch effizientere Verfahren für die Ag-Identifikation zur Verfügung stehen.

In der vorliegenden Arbeit wurde durch Verwendung eines Serumpools bereits eine Modifikation des ursprünglich autologen SEREX-Verfahrens umgesetzt. Es wurde nicht nur mit dem Serum des Patienten, von dem das Tumorgewebe stammte, sondern mit einem Serumpool von insgesamt fünf Patienten mit RMS gearbeitet. Der Einsatz von Serumpools bei der Analyse anderer Tumoren in der eigenen Arbeitsgruppe hatte deutlich höhere Ausbeuten an Ag, verglichen mit den vorangegangenen, autologen Serumanalysen, erbracht. Bei der Analyse eines eRMS mit fünf gepoolten Seren von Patienten mit eRMS in unserer Arbeitsgruppe waren insgesamt 40 reaktive Phagenklone isoliert und identifiziert worden (Götz C, 2007). Dass die Ag-Ausbeute in der eigenen Arbeit sehr viel geringer ausfiel, könnte, wie oben gemutmaßt, mit einer relativ geringen Immunogenität bzw. einem kleineren Ag-Repertoire des untersuchten Tumors zusammenhängen.

Ein weiterer Ansatzpunkt zur Optimierung der Effizienz des Verfahrens ist der Einsatz spezifischer Biomaterialien bei der Präabsorption der Seren. So hatten zum Beispiel Liao und Kollegen im Tiermodell ein differentielles Immunoabsorptionsverfahren (DIA) entwickelt, bei dem das Serum vor der Suche nach Glioblastom-Ag an gesundes Gehirngewebe absorbiert wurde (Liao LM et al., 2000). Dieser Ansatz erhöht allerdings

nur die Spezifität des Verfahrens, indem es vor einem Überschuss an Auto-Ag schützt. Bei primär geringer Immunität des Tumors hilft er nicht weiter. Ähnliches gilt für eine mögliche Vorabfärbung von rekombinanten IgG-Klonen, die die SEREX-Analyse von gut durchblutetem und damit B-Zell-reichem Gewebe sehr aufwendig machen kann.

Neben der Vorselektion der Ak kann auch durch Vorselektion der c-DNA-Bibliothek eine höhere Effizienz der Methode erreicht werden. Vielfach wurden beispielsweise Testis-cDNA-Bibliotheken eingesetzt, um gezielt nach Cancer-Testis-Ag zu suchen (Türeci et al., 1998). Auch die Erstellung einer differentiellen cDNA-Bibliothek aus Tumor- und entsprechendem Normalgewebe wurde vorgeschlagen, ist allerdings mit zusätzlichem technischem Aufwand verbunden (Minenkova et al., 2003). Minenkova und Kollegen hatten die Phage-Display-Technik in das SEREX-Verfahren eingebaut, um hochkomplexe cDNA-Bibliotheken zu generieren. Ein Poolen von mehreren Tumorgeweben wäre eine weitere Möglichkeit, die Ag-Ausbeute pro Screen potentiell zu erweitern.

Schließlich ist auch zu berücksichtigen, dass humane Proteine nach bakterieller Expression entweder nicht den ursprünglichen posttranslationalen Modifikationen unterliegen, wie beispielsweise Methylierungen, Glykosilierungen und Phosphorylierungen, oder, dass sie im Bakterium toxisch wirken und deshalb nicht zur Expression gelangen können, wie zum Beispiel hydrophobe Membranproteine. Es wurde deshalb ein eukaryontisches Expressionssystem (*recombinant expression on yeast surface*, RAYS) entwickelt, bei dem die Ag auf der Oberfläche von Hefezellen exprimiert werden (Mischo et al., 2003). Nachteil dieser Methode bleibt, dass tumorspezifische posttranslationale Modifikationen nicht erfaßt werden.

Wie in Kapitel 1.4.2 beschrieben, existieren neben dem SEREX-Verfahren eine Reihe von T-Zell-basierten Verfahren zur Identifikation von Ag. Von diesen waren diejenigen, die mit CD8+ T-Zellen arbeiten, in der Vergangenheit durchaus erfolgreich. Sie haben z.B. zur Entdeckung der klassischen Melanom-Ag geführt (Van der Bruggen et al., 1991; Boel et al., 1995; Van den Eynde et al., 1995; Coulie et al., 1994). Dagegen waren diejenigen, bei denen tumorspezifische CD4+ T-Zellen zum Einsatz kamen, nicht ausreichend zuverlässig und so komplex, dass sie wenigen spezialisierten Labors vorbehalten blieben.

Kürzlich wurde deshalb in der eigenen Arbeitsgruppe ein Verfahren zur direkten Ag-Identifizierung (DANI) mit CD4+ T-Zellen entwickelt (Milosevic et al. 2005, Milosevic et al. 2006). Die DANI-Strategie gründet auf ältere Verfahren (Sahara et Shastri 2003, Van de Corput et al. 2005), bei denen autologe Ag-präsentierende Zellen mit Tumor-cDNA exprimierenden Bakterien beladen und anschließend mit spezifischen CD4+ T-Zellklonen gescreent werden. Eine höhere Komplexität der untersuchten Tumor-cDNA-Bibliotheken wurde bei DANI durch Expression von Fusionsproteinen aus kleinen Ag-Fragmenten und

einem Selektionsmarker gewährleistet. Bei dem Verfahren werden die Epitope von großen und kleinen Ag gleich gut exprimiert, toxische Ag verlieren ihre Wirkung und Multimerisierungen werden unterbunden (Milosevic et al. 2006). Mit dem DANI-Verfahren wurden erfolgreich immundominante virale Epitope identifiziert, die von Epstein-Barr-Virus-spezifischen CD4+ T-Zellklonen erkannt werden (Milosevic et al., 2006). Wenn sich die Strategie auch bei der Tumor-Ag-Suche bewährt, wird es voraussichtlich die älteren T-Zell-basierten Verfahren zur Identifikation von MHC Klasse II-assoziierten Ag ablösen. Auch dieses T-Zellverfahren ist allerdings auf die Etablierung von tumorspezifischen T-Zellklonen mit Hilfe von Tumorzelllinien angewiesen und wird deshalb die serologischen Ansätze zur Analyse schlecht kultivierbarer Malignome nicht ersetzen.

Interessant wird es sein, ob sich zukünftig bei der Ag-Suche eher die primär immunologischen, serologischen und T-Zell-basierten Verfahren durchsetzen oder, ob eher revers immunologische Strategien zum Einsatz kommen (Viatte et al., 2006). Letztere basieren in einem ersten Schritt auf der molekulargenetischen und computergestützten Identifikation von Ag-Kandidaten und prüfen in einem zweiten Schritt, ob die Kandidaten-Ag tatsächlich bei Krebspatienten immunogen sind. Von genetischen *high though put*-Verfahren sind bzgl. der Effizienz der Ag-Suche durchaus entscheidende Fortschritte zu erwarten.

6 Zusammenfassung

Rhabdomyosarkome gehören zu den häufigsten, hochmalignen Weichteiltumoren des Kindesalters. Trotz Verbesserung der Heilungsrate nicht metastasierter Rhabdomyosarkome mittels multimodaler Therapiemöglichkeiten bleibt eine sehr hohe Sterberate von ca. 80% bei bereits metastasierten Krankheitsfällen. Die Spätfolgen, wie zum Beispiel toxische Leber- und Nierenschäden, strahlenbedingte Wachstumsstörungen oder induzierte Zweitmalignome, stellen nach der heutigen Therapie immer noch große Probleme dar.

Die vorliegende Arbeit befasste sich mit der Bedeutung des autologen Immunsystems für die Bekämpfung von aggressiven Rhabdomyosarkomen. Ziel war es, durch die Identifikation von Tumorantigenen eines alveolären Rhabdomyosarkoms weitere Grundlagen für adjuvante Therapieoptionen (z.B. den adoptiven antigenspezifischen T-Zelltransfer) und/oder ergänzende diagnostische Ansätze zu schaffen.

Zu diesem Zweck wurde das 1995 erstbeschriebene SEREX-Verfahren (serologische Analyse einer rekombinanten cDNA-Expressionsbibliothek) erstmals auf ein alveoläres Rhabdomyosarkom angewandt. Das Verfahren nutzt die hochtitrige IgG-Antikörperantwort, die nach antigenspezifischer Stimulation von B-Zellen durch CD4+ T-Helfer-Zellen ausgelöst wird. Um die Effizienz des Verfahrens zu steigern, wurde ein Serumpool von fünf pädiatrischen Patienten mit Rhabdomyosarkom eingesetzt.

Es konnten zwei seroreaktive Klone identifiziert werden, die die gleiche Fremd-cDNA enthielten. Diese war identisch mit dem terminalen Drittel der cDNA des RAN-bindenden Proteins 2 (RANBP2) und partiell homolog mit Transkripten des *RANBP2*-ähnlichen Gens *RANBP2L1*, welches ein partielles Duplikat des *RANBP2*-Gens darstellt. Das Antigen wurde als Tumorantigen klassifiziert, da es IgG-Antikörper im Serum von weiteren pädiatrischen Patienten mit verschiedenen malignen Erkrankungen, nicht aber im Serum von gesunden Probanden, band. Eine Expressionsanalyse mit Hilfe der Reversen Transkription und Polymerasekettenreaktion ergab keinen Hinweis auf eine Tumor- oder Cancer-Testis-spezifische Expression des klonierten Transkripts.

Eine Recherche der SEREX-Datenbank zeigte, dass Transkripte des *RANBP2*- und *RANBP2L1*-Gens bereits in SEREX-Analysen anderer Autoren identifiziert worden waren, die verschiedene cDNA-Bibliotheken mit Seren von erwachsenen Tumorpatienten gescreent hatten. Auch in diesen Untersuchungen hatten die Antigene nicht mit Seren von gesunden Probanden reagiert.

Als mögliche Ursache der tumorassoziierten Immunogenität des RANBP2-Homologs wurden in der Arbeit vier verschiedene Mechanismen diskutiert: erstens eine aberrante, tumorassoziierte Expression des bekannten Testis-spezifischen *RANBP2L1*-Transkripts, zweitens mutations-bedingte Neoepitope zum Beispiel im Bereich des instabilen Megaexons von *RANBP2*, drittens Expression eines tumorspezifischen Genprodukts von einem der beiden identifizierten, kleinen alternativen offenen Leserahmen, und viertens eine tumorassoziierte Überexpression von *RANBP2*- und/oder *RANBP2L1*-Genprodukten. Diese Hypothesen sind in zukünftigen Experimenten zu prüfen, um die mögliche therapeutische Bedeutung von Produkten des *RANBP2*-Genklusters bei der Behandlung von pädiatrischen Malignomen näher einzugrenzen.

Interessanterweise war die Ausbeute an Tumorantigenen in dieser Arbeit deutlich geringer als die in einer vorangegangenen SEREX-Analyse eines embryonalen Rhabdomyosarkoms. Dieses Ergebnis gab Anlass zu der Hypothese, dass alveoläre Rhabdomyosarkome möglicherweise weniger immunogen sind als Rhabdomyosarkome des embryonalen Typs, was mit der allgemein höheren Aggressivität der alveolären Variante gut vereinbar wäre. Diese Hypothese kann durch zukünftige SEREX-Analysen an größeren Patientenkohorten überprüft werden.

Zusammenfassend zeigte die vorliegende Arbeit, dass das SEREX-Verfahren gut geeignet ist, um Tumorantigene in aggressiven Rhabdomyosarkomen zu identifizieren und dass die gewonnenen Ergebnisse neue Einblicke in die Tumorbiologie und Ausblick auf neue therapeutische Ansätze bei der Behandlung von betroffenen pädiatrischen Patienten liefern können.

Schlagwörter: Rhabdomyosarkom, SEREX, RANBP2, Tumorantigen, Tumorimmuntherapie

7 Literaturverzeichnis

- Anderson J, Gordon A, Pritchard-Jones K, Shipley J. Genes, chromosomes, and rhabdomyosarcoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 1999; 26: 275-285
- Argyriou A, Kalofonos HP. Recent advances relating to the clinical application of naked monoclonal antibodies in solid tumours. *Mol Med*. 2009 Feb 23. [Epub ahead of print]
- Banchereau J, Palucka A.K., Dhodapar M, Burkeholder S, Taquet N, Rollans A, Taquet S, Coquery S, Wittkowski K.M., Bhardwaj N, Pineiro L, Steinman R, Fay J. Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to DC34(+) progenitor-derived dendritic cell vaccine. *Cancer Res* 2001; 61 (17): 6451-6458
- Banchereau J., Palucka A.K. Dendritic cell as therapeutic vaccines against cancer. *Nat Rev Immunol* 2005; 5(4): 296-306 Review
- Barr FG. Molecular genetics and pathogenesis of rhabdomyosarcoma. *J Pediatr Hematol Oncol* 1997; 19: 483-489
- Behrends U, Schneider I, Rössler S, Frauenknecht H, Golbeck A, Lechner B, Eigenstetter G, Zobywalski C, Müller-Wehrich S, Graubner U, Schmid I, Sackerer D, Späth M, Goetz C, Prantl F, Asmuss HP, Bise K, Mautner J. Novel tumor antigens identified by autologous antibody screening of childhood medulloblastoma cDNA libraries. *Int J Cancer*. 2003, 106(2):244-51
- Behrends U, Jandl T, Golbeck A, Lechner B, Müller-Wehrich S, Schmid I, Till H, Berthold F, Voltz R, Mautner JM. 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*. 2002;100(6):669-77
- Bennicelli JL, Advani S, Schaefer BW, Barr FG. PAX3 and PAX7 exhibit conserved cis-acting transcription repression domains and utilize a common gain of function mechanism in alveolar rhabdomyosarcoma. *Oncogene* 1999; 18: 4348-4356
- Bernhard H, Meyer z. Büschenfelde C, Kolb HJ, Peschel C. Adoptiver Transfer von malignomreaktiven T-Zellen. *Onkologie* 1999, 5: 688-694
- Birch JM, Hartley AL, Blair V et al. Cancer in the families of children with soft tissue sarcoma. *Cancer* 1990; 66: 2239-2248
- Bischoff FR, Krebber H, Smirnova E, Dong W, Ponstingel H. Co-activation of RanGTPase and inhibition, of GTP dissociation by Ran-GTP binding protein RANBP1. *The EMBO Journal* 1995, 14 (4): 705-715
- Blaes F, Klotz M, Huwer H, Straub U, Kalweit G, Schimrigk K, Schafers HJ. Antineural and antinuclear autoantibodies are of prognostic relevance in non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* 2000, 69 (1): 254-258
- Bodey B, Bodey B Jr., Siegel SE, Kaiser HE. Fas (Apo-1, CD95) receptor expression in childhood astrocytomas. Is it a marker of the major apoptotic pathway or a signaling receptor for immune escape of neoplastic cells? *In Vivo* 1999, 13 (4): 357-373
- Boel P, Wildmann C, Sensi ML, Brasseur R, Renauld JC, Coulie P, Boon T, Van der Bruggen P. BAGE: a new gene encoding an antigen recognized on human melanomas by cytolytic T lymphocytes. *Immunity* 1995, 2 (2):167-175
- Boon T, Coulie PG, Van den Eynde B. Tumor antigens recognized by T cells. *Immunol Today* 1997, 18: 267-268

- Brecht IB, Mattke AC, Kunz DS et al. Is the response rate a reliable measurement for prognosis of rhabdomyosarcoma in children? SIOP XXXV Meeting. *Med Pediatr Oncol* 2003; 41: 316
- Brichard V, Van Pel A, Wolfel T, Wolfel C, De Plaen E, Lethe B, Coulie P, Boon T. The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J Exp Med* 1993, 178 (2): 489-495
- Cai Y, Gao Y, Sheng Q, Miao S, Cui X, Wang L, Zong S, Koide S. Characterization and Potential Function of a Novel Testis-Specific Nucleoporin BS-63. *Mol Reprod and Developm* 2002, 61: 126-134
- Carey TE, Takahashi T, Resnick LA, Oettgen HF, Old LJ. Cell surface antigens of human malignant melanoma mixed hemadsorption assays for humoral immunity to cultured autologous melanoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976, 73 (9): 3278-3282
- Cavazzana AO, Schmidt D, Ninfo V et al. Spindle cell rhabdomyosarcoma. A prognostically favorable variant of rhabdomyosarcoma. *Am J Surg Pathol* 1992; 16: 229-235
- Chames P, Baty D. Bispecific antibodies for cancer therapy. *Curr Opin Drug Discov Devel* 2009, 12(2):276-83
- Chen ST, Lee JC. An inflammatory myofibroblastic tumor in liver with ALK and RANBP2 gene rearrangement: combination of distinct morphologic, immunohistochemical, and genetic features. *Hum Pathol*. 2008 Aug 11. Epub
- Chen YT. Cancer vaccine: identification of human tumor antigens by SEREX. *Cancer J* 2000, 6 Suppl 3: 208-217. Review
- Chen YT, Scanlan MJ, Sahin U et al. A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc. Natl Acad Sci USA* 1997, 94: 1914-1918
- Chi NC, Adam EJ, Visser GD, Adam SA. Ran BP1 stabilizes the interaction of Ran with p97 nuclear protein import. *J Cell Biol*. 1996, 135 (3): 559-569
- Cho KI, Yi H, Desai R, Hand AR, Haas AL, Ferreira PA. RANBP2 is an allosteric activator of the conventional kinesin-1 motor protein, KIF5B, in a minimal cell-free system. *EMBO Rep*. 2009 Mar 20. [Epub ahead of print]
- Coiffier B. Rituximab in the treatment of diffuse large B-cell lymphomas. *Semin Oncol* 2002, 29 (1 Suppl 2): 30-35
- Coindre JM, Terrier P, Guillou L et al. Predictive value of grade for metastasis development in the main histologic types of adult soft tissues sarcomas. A study of 1240 patients from the French Federation of Cancer Centers Sarcoma Group. *Cancer* 2001; 91: 1914-1926
- Coindre JM, Trojani M, Contesso G, David M, Rouesse J, Bodaert A, De Mascarell, Goussot JF. Reproducibility of a histopathologic grading system for adult soft tissue sarcoma. *Cancer* 1986; 58: 306-309
- Conroy SE, Sasieni PD, Fentiman I, Latchman DS. Autoantibodies to the 90 kDa heat shock protein and poor survival in breast cancer patients. *Eur J Cancer* 1998, 34 (6): 942-943
- Corrias MV, Scaruffi P, Occhino M, De Bernardi B, Tonini GP, Pistoia V. Expression of MAGE-1, MAGE-3 and MART-1 genes in neuroblastoma. *Int J Cancer* 1996, 69 (5): 403-407
- Coulie PG, Brichard V, Van Pel A, Wolfel T, Scheider J, Traversari C, Mattei S, De Plaen E, Lurquin C, Szikora JP et al. A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J Exp Med* 1994, 180 (1): 35-42

- Coussens L, Yang FT, Liao YC et al. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with new oncogene. *Science* 1985, *Science* 230: 1132-1139
- Cox AL, Skipper J, Chen Y, Henderson RA, Darrow TL, Shabanowitz J, Engelhard VH, Hunt DF, Slingluff CL. Identification of a peptide recognized by five melanoma-specific human cytotoxic T cell lines. *Science* 1994, 264 (5159): 716-719
- Cullinane C.J, Burchill SA, Squire JA, O`Leary JJ, Lewis IJ. *Paediatric Cancer. Molecular Biology and Pathology*, 2003. Oxford University Press
- CWS: Studienprotokolle der Cooperativen Weichteilsarkomstudie der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie CWS-96 und CWS 2002, Studienleiter: Prof. Dr. E. Koscielnak, Prof. Dr. T. Klingebiel; CWS-Studienzentrale, Olgahospital Stuttgart
- Dagher R, Helman L. Rhabdomyosarcoma: An overview. *Oncologist* 1999, 4: 33-44
- Dagher R, Long LM, Read EJ, Leitman SF, Carter CS, Tsokos M, Goletz TJ, Avila N, Berzofsky JA, Helman LJ, Mackall CL. Pilot trial of tumor-specific peptide vaccination and continuous infusion interleukin-2 in patients with recurrent Ewing sarcoma and alveolar rhabdomyosarcoma: an inter-institute NIH study. *Med Pediatr Oncol* 2002, 38 (3): 158-164
- Dalerba P, Frascella E, Macino B, Mandruzzato S, Zambon A, Rosolen A, Carli M, Ninfo V, Zanovello P. *MAGE, BAGE and GAGE Gene Expression in Human Rhabdomyosarcomas*. *Int J Cancer* 2001, 93: 85-90
- Dalmau J, Graus F, Cheung NK, Rosenblum MK, Ho A, Cañete A, Delattre JY, Thompson SJ, Posner JB. Major histocompatibility proteins, anti-Hu antibodies, and paraneoplastic encephalomyelitis in neuroblastoma and small cell lung cancer. *Cancer* 1995, 75(1):99-109
- Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*. 2002, 3(11):991-8. Review
- Edwards RH, Chatten J, Xiong QB, Barr FG. Detection of gene fusions in rhabdomyosarcoma by reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay of archival samples. *Diagn Mol Pathol* 1997; 6: 91-97
- Engert A, Gottstein C, Bohlen H et al. Cocktails composed of ricin A-chain immunotoxins against different antigens on Hodgkin and Sternberg-Reed (H-RS) cells have superior antitumor effects against H-RS cells in vitro and solid Hodgkin's tumors in mice. *Int J Cancer* 1995, 63: 304-309
- Fausser S, Aslanukov A, Roepmann R, Ferreira PA. Genomic organization, expression, and localization of murine Ran-binding protein 2 (Ran BP2) gene. *Mammalian Genome* 2001, 12: 406-415
- Ferreira PA, Nakayama TA, Travis GH. Interconversion of red opsin isoforms by the cyclophilin-related chaperone protein Ran-binding protein 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, 18 (94): 1556-1561
- Ferreira PA, Nakayama TA, Pak WL, Travis GH. Cyclophilin-related protein RANBP2 acts as chaperone for red/green opsin. *Nature* 1996, 383(6601):637-640
- Ferrara A, Nonn M, Sehr P, Schreckenberger C, Pawlita M, Durst M, Schneider A, Kaufmann AM. Dendritic cell-based tumor vaccine for cervical cancer II: results of a clinical pilot study in 15 individual patients. *J Cancer Res Clin Oncol* 2003, 129 (9): 521-530
- Gadner H, Gaedicke G, Niemeier C, Ritter J (Hrsg): *Pädiatrische Hämatologie und Onkologie*

Heidelberg: Springer Medizin Verlag 2006

- Gallego Melcón S, Sánchez de Toledo Codina J. Molecular biology of rhabdomyosarcoma. *Clin Transl Oncol* 2007, 9 (7): 415-419
- Garrett TJ, Takahashi T, Clarkson BD, Old LJ. Detection of antibody to autologous human leukemia cells by immune adherence assays. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977, 74 (10): 4587-4590
- Gaugler B, Van den Eynde B, Van der Bruggen P et al. Human Gene MAGE-3 codes for an antigen recognized on a melanoma by autologous cytolytic T lymphocytes. *J Exp Med* 179: 912-930
- Götz C. Identifikation von Tumorantigenen des embryonalen Rhabdomyosarkoms durch serologische Analyse einer Tumor-cDNS Expressionsbibliothek (SEREX) mit Untersuchung ihrer cDNS-Sequenz, mRNA-Expression und Immunogenität. Dissertation an der Medizinischen Fakultät der TU München. 2006
- Goggon D, Acheson ED. Do phenoxyherbicide cause cancer in man? *Lancet* 1983; 1057-1059
- Graus F, Dalmou J, Rene R, Tora M, Malats N, Verschuuren JJ, Cardenal F, Vinolas N, Garcia del Muro J, Vadell C, Mason WP, Rosell R. Anti-Hu antibodies in patients with small-cell lung cancer: association with complete response to therapy and improved survival. *J Clin Oncol* 1997, 15: 2866-2872
- Grisendi S. RANBP2 resolves sister centromeres. *Nat Cell Biol* 2008, 10(5):512
- Grunebach, F., Muller, M.R. and Brossart, P. (2005) New developments in dendritic cell-based vaccinations: RNA translated into clinics. *Cancer Immunol Immunother* 2005, 54 (6): 517-525
- Hachitanda Y, Toyoshima S, Akazawa K, Tsuneyoshi M. N-myc gene amplification in rhabdomyosarcoma detected by fluorescence in situ hybridization: its correlation with histologic features. *Mod Pathol* 1998; 11:1222-1227
- Hamanaka Y, Suehiro Y, Fukui M, Shikichi K, Imai K, Hinoda Y. Circulating anti-MUC1 IgG antibodies as a favorable prognostic factor for pancreatic cancer. *Int J Cancer* 2003, 103 (1): 97-100
- Harms D, Schmidt D, Treuner J. Soft tissue sarcomas in childhood. A study 262 cases including 169 cases of rhabdomyosarcoma. *Z Kinderchir* 1985, 40:140-145
- Hillier La Deana et al. Generation and annotation of the DNA sequences of human chromosomes 2 and 4. *Nature* 2005, 434: 724-731
- Hui KF, Grosveld. Rejection of transplantable AKR leukaemia cells following MHC DNA-mediated cell transformation. *Nature* 1984, 311 (5988):750-2
- Hutten S, Flotho A, Melchior F, Kehlenbach RH. The Nup358-RanGAP Complex Is Required for Efficient Importin α/β -dependent Nuclear Import. The nuclear pore component Nup358 *Mol Biol Cell*. 2008, 19(5):2300-10. Epub 2008
- Hutten S, Wälde S, Spillner C, Hauber J, Kehlenbach RH. promotes transportin-dependent nuclear import. *J Cell Sci*. 2009, 122(Pt 8):1100-10
- Hsu FJ, Benike C, Fagnoni F, Liles TM, Czerwinski D, Taidi B, Engleman EG, Levy R. Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 1996, 2 (1): 52-58
- Ishida H, Matsumura T, Salgaller ML, Ohmizono Y, Kadono Y, Sawada T. MAGE-1 and MAGE-3 or -6 expression in neuroblastoma-related pediatric solid tumors. *Int J Cancer* 1996, 69 (5):

- Jäger D, Potential target antigens for immunotherapy identified by serological expression cloning (SEREX). *Methods Mol Bio* 2007, 360: 319-326
- Jäger D, Taverna C, Zippelius A, Knuth, A. Identification of tumor antigens as potential target antigens for immunotherapy by serological expression cloning. *Cancer Immunol Immunother* 2004, 53 (3): 144-147
- Jäger E, Ringhoffer M, Altmannsberger M, Arand M, Karbach J, Jäger D, Oesch F, Knuth A. Immunoselection in vivo: independent loss of MHC class I and melanocyte differentiation antigen expression in metastatic melanoma. *Int J Cancer* 1997. 71 (2): 142-147
- Jäger E, Stockert E, Zidianakis Z, Chen YT, Karbach J, Jäger D, Arand M, Ritter G, Old LJ, Knuth A. Humoral immune responses of cancer patients against "Cancer-Testis" antigen NY-ESO-1: correlation with clinical events. *Int J Cancer* 1999, 84 (5): 506-510
- Jäger E, Jäger D, Karbach J, Chen YT, Ritter G, Nagata Y, Gnjatic S, Stockert E, Arand M, Old LJ, Knuth A. Identification of NY-ESO-1 epitopes presented by human histocompatibility antigen (HLA)-DRB4*0101-0103 and recognized by CD4(+) T lymphocytes of patients with NY-ESO-1-expressing melanoma. *J Exp Med* 2000, 191 (4): 625-630
- Jäger E, Chen YT, Drijfhout JW, Karbach J, Ringhoffer M, Jäger D, Arand M, Wada H, Noguchi Y, Stockert E, Old LJ, Knuth A. Simultaneous humoral and cellular immune response against cancer-testis antigen NY-ESO-1: definition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2-binding peptide epitopes. *J Exp Med* 1998, 187 (2): 265-270
- Jäger E, Gnjatic S, Nagata Y, Stockert E, Jäger D, Karbach J, Neumann A, Rieckenberg J, Chen YT, Ritter G, Hoffman E, Arand M, Old LJ, Knuth A. Induction of primary NY-ESO-1 immunity: CD8+ T lymphocyte and antibody responses in peptide-vaccinated patients with NY-ESO-1+ cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, 97 (22): 12198-12203
- Jäger E, Nagata Y, Gnjatic S, Wada H, Stockert E, Karbach J, Dunbar PR, Lee SY, Jungbluth A, Jäger D, Arand M, Ritter G, Cerundolo V, Dupont B, Chen YT, Old LJ, Knuth A. Monitoring CD8 T cell responses to NY-ESO-1: correlation of humoral and cellular immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, 97 (9): 4760-4765
- Jäger D, Jäger E, Knuth A. Immune responses to tumor antigens: implications for antigen specific immunotherapy of cancer. *Clin Pathol* 2001, 54: 669-674
- Kaatsch P, Spix C. Jahresbericht Dt. Kinderkrebsregister 2002, Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik , S 72. Johannes Gutenberg-Universität Mainz
- Kaufman HL, Disis ML. Immune system versus tumor: shifting the balance in favor of DCs and effective immunity. *J Clin Invest* 2004, 113 (5): 664-667
- Keith M, Skubitz MD, D'Adamo DR. Sarcoma. *Mayo Clin Proc* 2007, 82 (11): 1409-1432
- Kelly KM, Womer RB, Sorensen PH et al. Common and variant gene fusions predict distinct clinical phenotypes in rhabdomyosarcoma. *J Clin Oncol* 1997; 15: 1831-1836
- Kessels HW, Van Den Boom MD, Spits H, Hooijberg E, Schumacher TN. Changing T cell specificity by retroviral T cell receptor display. *Proc Natl Acad Sci U S A* 200, 97 (26): 14578-14583
- Kipriyanov SM, Le Gall F. Recent advances in the generation of bispecific antibodies for tumor immunotherapy. *Curr Opin Drug Discov Devel* 2004, 7 (2): 233-242
- Klingebiel T, Boos J, Beske F, Hallmen E, Int-Veen C, Dantonello T, Treuner J, Gadner H, Marky I, Kazanowska B, Koscielniak E. Treatment of children with metastatic soft tissue sarcoma

- with oral maintenance compared to high dose chemotherapy. Report of the HD CWS-96 trial. *Ped Blood Cancer* in print. 2008
- Knuth A, Jager D, Jager E. Cancer immunotherapy in clinical oncology. *Cancer Chemother Pharmacol* 2000, 46 Suppl: S46-51
- Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of pre-de-fined specificity. *Nature* 1974, 256: 495-497
- Koepp DM, Silver PA. A GTPase controlling nuclear trafficking: Running the right way or walking RANdomly? *Cell* 1996, 87: 1-4
- Koscielniak E, Harms D, Henze G, Jurgens H, Gadner H, Herbst M, Klingebiel T, Schmidt BF, Morgan M, Knietig R, Treuner J. Results of treatment for soft tissue sarcoma in childhood and adolscens: a final report of the German Cooperative Soft Tissue Sarcoma Study CWS-86. *J Clin Oncol* 1999; 17:3706-3719
- Kumar S, Perlman E, Harris CA, et al. Myogenin is a specific marker for rhabdomyosarcoma: an immunohistochemical study in parafin-embedded tissues. *Mod Pathol* 2000; 13: 988-993
- Ladenstein R, Hartmann O, Koscielniak T, Philip. Megatherapy with stem cells rescue in solid tumors. *Pediatric Oncology* 2004. Pinkerton R, Plowman PN, Pieters R (eds). London Arnold: 538-569
- Leaphart C, Rodeberg D. Pediatric surgical oncology: Management of rhabdomyosarcoma. *Surgical Oncology* 2007, 16: 173-185, Review
- Leuschner I, Harms D. Pathologische Anatomie der Rhabdomyosarkome des Kindes- und Adoleszentenalters. *Pathologie* 1999; 20: 87-97
- Liau LM, Lallone RL, Seitz RS, Buznikov A, Gregg JP, Kornblum HI, Nelson SF, Bronstein JM. Identification of a human glioma-associated growth factor gene, granulin, using differential immuno-absorption. *Cancer Res.* 2000, 60(5):1353-6
- Ligibel JA, Winer EP. Trastuzumab/chemotherapy combinations in metastatic breast cancer. *Semin Oncol* 2002, 29 (3 Suppl 11): 38-43
- Linardic CM. PAX3-FOXO1 fusion gene in rhabdomyosarcoma. *Cancer letters* 2008, doi:10.1016/j.canlet.2008.03.035
- Loughlin FE, Mansfield RE, Vaz PM, McGrath AP, Setiyaputra S, Gamsjaeger R, Chen ES, Morris BJ, Guss JM, Mackay JP. The zinc fingers of the SR-like protein ZRANB2 are single-stranded RNA-binding domains that recognize 5' splice site-like sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, 106(14):5581-6
- Lounsbury KM, Beddow AL, Macara IG. A family of proteins that stabilize the Ran/TC4 GTPase in its GTP-bound conformation. *J Biol Chem.* 1994, 15;269(15): 11285-11290
- Mahvi DM, Shi FS, Yang NS, Weber S, Hank J, Albertini M, Schiller J, Schalch H, Larson M, Pharo L, Gan J, Heisey D, Warner T, Sondel PM, Immunization by particle-mediated transfer of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene into autologous tumor cells in melanoma or sarcoma patients report of a phase I/IB study. *Hum Gene Ther* 2002, 13: 1711-1721
- Mancin HJ, Hornicek FJ. Diagnosis, classification, and management of soft tissue sarcomas. *Cancer Control* 2005, 12 (1): 5-21
- Mandelboim O, Berke G, Fridkin M, Feldman M, Eisenstein M, Eisenbach L. CTL induction by a tumor-associated antigen octapeptide derived from a murine lung carcinoma. *Nature* 1994, 369 (6475): 67-71

- Markiewicz MA, Kast WM. Progress in the development of immunotherapy of cancer using ex vivo-generated dendritic cells expressing multiple tumor antigen epitopes. *Cancer Invest* 2004, 22 (3): 417-434
- Mautner JJ, Jaffee EM, Pardoll DM. Tumor-specific CD4+ T cells from a patient with renal cell carcinoma recognize diverse shared antigens. *Int J Cancer* 2005, 115: 752-759
- Mautner J, Milosevic S, Behrends U. Identifying T helper cell antigens: DANI Direct Antigen Identification 2005. Ascension technology offer Ref. Nr. TO 01-00649
- McKeage K, Perry CM. Trastuzumab: a review of its use in the treatment of metastatic breast cancer overexpressing HER2. *Drugs* 2002, 62 (1): 209-243
- Mc Laughlin P, Grillo-López AJ, Link BK et al. Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: Half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol* 1998, 16: 2825-2833
- Melchior F, Guan T, Yokoyama N, Nishimoto T, Gerace L. GTP hydrolysis by Ran occurs at the nuclear pore complex in an early step of protein import. *J Cell Biol.* 1995, 131(3): 571-81
- Melchior F, Gerace L. Mechanisms of nuclear protein import. *Curr Opin Cell Biol.* 1995, 7(3): 310-8. Review
- Milosevic S, Behrends U, Christoph H, Mautner J. Direct mapping of MHC class II epitopes. *J Immunol Methods* 2005, 06: 28-39
- Milosevic S, Behrends U, Adhikary D, Mautner J. Identification of MHC class II-restricted viral antigens and epitopes by a novel bacterial expression cloning approach. *J Virol* 2006, 80: 10357-10364
- Minenkova O, Pucci A, Pavoni E, De Tomassi A, Fortugno P, Gargano N, Cianfriglia M, Barca S, De Placido S, Martignetti A, Felici F, Cortese R, Monaci P. Identification of tumor-associated antigens by screening phage-displayed human cDNA libraries with sera from tumor patients. *Int J Cancer* 2003, 106 (4): 534-544
- Mischo A, Wadle A, Watzig K, Jager D, Stockert E, Santiago D, Ritter G, Regitz E, Jager E, Knuth A, Old L, Pfreundschuh M, Renner C. Recombinant antigen expression on yeast surface (RAYS) for the detection of serological immune responses in cancer patients. *Cancer Immun* 2003, 3- 5
- Morgan RA, Dudley ME, Yu YY, Zheng Z, Robbins PF, Theoret MR, Wunderlich JR, Hughes MS, Restifo NP, Rosenberg SA. High efficiency TCR gene transfer into primary human lymphocytes affords avid recognition of melanoma tumor antigen glycoprotein 100 and does not alter the recognition of autologous melanoma antigens. *J Immunol* 2003, 171 (6): 3287-3295
- Morgenstern DA, Rees H, Sebire NJ, Shipley J, Anderson J. Rhabdomyosarcoma Subtyping by Immunohistochemical Assessment of Myogenin: Tissue Array Study and Review of the Literature. *Pathol Oncol Res* 2008, 21. [Epub ahead of print]
- Muranski P, Boni A, Wrzesinski C, Citrin DE, Rosenberg SA, Childs R, Restifo NP. Increased intensity lymphodepletion and adoptive immunotherapy--how far can we go? *Nat Clin Pract Oncol* 2006, 3(12): 668-81. Review
- Navarro MS, Bachant J. RANBP2: a tumor suppressor with a new twist on TopoII, SUMO, and centromeres. *Cancer Cell* 2008, 13(4):293-5.
- Neilson DE, Adams MD, Orr CM, Warman ML et al. Infection-triggered familial or recurrent cases of acute necrotizing encephalopathy caused by mutations in a component of the nuclear pore, RANBP2. *Am J Hum Genet.* 2009;84(1):44-51.

- Nothwang HG, Rensing C, Kübler M, Denich D, Brandl B, Stubanus M, Haaf T, Kurnit D, Hildebrandt F. Identification of a novel Ran binding protein 2 related gene (RANBP2L1) and detection of a gene cluster on human chromosome 2q11-q12. *Genomics* 1998;47 (3): 383-92
- Ostrand-Rosenberg S. CD4+ T Lymphocytes: a critical component of antitumor immunity. *Cancer Invest* 2005, 23 (5): 413-419
- Papaefthymiou MA, Giaginis CT, Theocharis SE. DNA repair alterations in common pediatric malignancies. *Med Sci Monit* 2008, 14 (1): RA 8-15
- Parham D, Ellison DA. Rhabdomyosarkoma in Adults and Children. *Arch Pathol Lab Med* 2006, 130: 1454-1465
- Park K, Van Rijn R, McHugh K. The role of radiology in paediatric soft tissue sarcoma. *Cancer Imaging* 2008, 8: 102-115
- Paulino AC Okcu MF. Rhabdomyosarcoma. *Curr Probl Cancer* 2008, 32: 7-34
- Pfreundschuh M. Exploitation of the B cell repertoire for the identification of human tumor antigens. *Cancer Chemother Pharmacol* 2000, 46 Suppl, S3-7
- Pfreundschuh M, Shiku H, Takahashi T, Ueda R, Ransohoff J, Oettgen HF, Old LJ. Serological analysis of cell surface antigens of malignant human brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1978, 75 (10): 5122-5126
- Pieper R, Christian RE, Gonzales MI, Nishimura MI, Gupta G, Settlage RE, Shabanowitz J, Rosenberg SA, Hunt DF, Topalian SL. Biochemical identification of a mutated human melanoma antigen recognized by CD4(+) T cells. *J Exp Med.* 1999;189(5):757-66
- Pisters PWT, O'Sullivan B, Maki RG. Evidence-Based Recommendations for Local Therapy for Soft Tissue Sarcomas. *Journal of Clinical Oncology* 2007, 25 (8): 1003-1008
- Preuss KD, Zwick C, Bormann C, Neumann F, Pfreundschuh M. Analysis of the B-cell repertoire against antigens expressed by human neoplasms. *Immunol Rev* 2002, 188: 43-50
- Probst-Kepper M, Stroobant V, Kridel R, Gaugler B, Landry C, Bresseur F, Cosyns JP, Weynand B, Boon T, Van Den Eynde BJ. An alternative open reading frame of the human macrophage colony-stimulating factor gene is independently translated and codes for an antigenic peptide of 14 amino acids recognized by tumor-infiltrating CD8 T lymphocytes. *J Exp Med.* 2001, 193(10):1189-98
- Proudfoot O, Pouniotis D, Sheng KC, Loveland BE, Pietersz GA. Dendritic cell vaccination. *Expert Rev Vaccines.* 2007, 6(4):617-33. Review
- Restifo NP, Esquivel F. Defective presentation of endogenous antigens by a murine sarcoma. Implications for the failure of an anti-tumor immune response. *J Immunol* 1991, 147 (4):1453-9
- Rini B. Recent clinical development of dendritic cell-based immunotherapy for prostate cancer. *Expert Opin Biol Ther* 2004, 4 (11): 1729-1734
- Robbins PF, El-Gamil M, Li YF, Zeng G, Dudley M, Rosenberg SA. Multiple HLA class II-restricted melanocyte differentiation antigens are recognized by tumor-infiltrating lymphocytes from a patient with melanoma. *J Immunol* 2002, 169 (10): 6036-6047
- Robbins PF, El-Gamil M, Li YF, Kawakami Y, Loftus D, Appella E, Rosenberg, SA. A mutated beta-catenin gene encodes a melanoma-specific antigen recognized by tumor infiltrating lymphocytes. *J Exp Med* 2006, 183 (3): 1185-1192
- Robbins PF, El-Gamil M, Li YF, Topalian SL, Rivoltini L, Sakaguchi K, Appella E, Kawakami Y,

- Rosenberg SA. Cloning of a new gene encoding an antigen recognized by melanoma-specific HLA-A24-restricted tumor-infiltrating lymphocytes. *J Immunol* 1995, 154 (11): 5944-5950
- Rodolfo M, Luksch R, Stockert E, Chen YT, Collini P, Ranzani T, Lombardo C, Dalerba P, Rivoltini L, Arienti F, Fossati-Bellani F, Old LJ, Parmiani G, Castelli C. Antigen-specific immunity in neuroblastoma patients: antibody and T-cell recognition of NY-ESO-1 tumor antigen. *Cancer Res* 2003, 63 (20): 6948-6955
- Rößler S. Identifikation von Antigenen eines großzelligen Medulloblastoms mit Hilfe der autologen serologischen Analyse einer Tumor cDNA-Expressionsbibliothek (SEREX). Dissertation an der Medizinischen Fakultät der TU München 2006
- Rosenberg SA. Cancer vaccines based on the identification of genes encoding cancer regression antigens. *Immunol Today* 1997, 18 (4): 175-182
- Rosenberg SA, Yang JC, Schwartzentruber DJ, Hwu P, Marincola FM, Topalian SL, Restifo NP, Dudley ME, Schwarz SL, Spiess PJ, Wunderlich JR, Parkhurst MR, Kawakami Y, Seipp CA, Einhorn JH, White DE. Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nat Med* 1998, 4 (3): 321-327
- Rosenberg SA, White DE. Vitiligo in patients with melanoma: normal tissue antigens can be targets for cancer immunotherapy. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* 1996, 19 (1), 81-84
- Rosenberg SA. Development of cancer immunotherapies based on identification of the genes encoding cancer regression antigens. *J Natl Cancer Inst* 1996, 88: 1635-1644
- Roskrow MA, Ziber A, Souquet M, Dilloo D. Tumor vaccines-application to childhood cancer. *Klin Pädiatr* 1999, 211: 336-346
- Ross JS, Gray K, Gray GS, Worland PJ, Rolfe M. Anticancer antibodies. *Am J Clin Pathol* 2003, 119 (4): 472-485
- Rush MG, Drivas G, D'Eustachio P. The small nuclear GTPase Ran: how much does it run? *Bioessays*. 1996, 18(2):103-12. Review
- Sahara H, Shastri N. Second class minors: molecular identification of the autosomal H46 histocompatibility locus as a peptide presented by major histocompatibility complex class II molecules. *J Exp Med* 2003, 197: 375-385
- Sahin U, Tureci O, Schmitt H, Cochlovius B, Johannes T, Schmits R, Stenner F, Luo G, Schoberl I, Pfreundschuh M. Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, 92 (25): 11810-11813
- Saitoh H, Cooke CA, Burgess WH, Earnshaw WC, Dasso M. Direct and indirect association of the small GTPase ran with nuclear pore proteins and soluble transport factors: studies in *Xenopus laevis* egg extracts. *Mol Biol Cell* 1996, 7(9): 1319-34
- Scanlan MJ, Simpson AJ, Old LJ. The cancer/testis genes: review, standardization, and commentary. *Cancer Immun* 2004, 4:1. Review
- Scanlan MJ, Gure AO, Jungbluth AA, Old LJ, Chen YT. Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy. *Immunol Rev* 2002, 188: 22-32
- Scanlan MJ. Identification of human tumor antigens by serological analysis of recombinant cDNA expression libraries (SEREX). *Curr Protoc Immunol* 2005, 20:Unit 20.7
- Scarcella DL, Chow CW, Gonzales MF, Economou C, Brasseur F, Ashley DM. Expression of MAGE and GAGE in high-grade brain tumors: a potential target for specific

- immunotherapy and diagnostic markers. *Clin Cancer Res* 1999, 5 (2): 335-341
- Schmitz R, Cochlovius B, Treitz G, Regitz E, Ketter R, Preuss KD, Romeike B.F, Pfreundschuh M. Analysis of the antibody repertoire of astrocytoma patients against antigens expressed by gliomas. *Int J Cancer* 2002, 98 (1): 73-77
- Seliger B. Strategies of tumor immune evasion. *BioDrugs* 2005, 19 (6): 347-354
- Seliger B, Huber C. Immune escape-Mechanismen von humanen Tumoren. *Onkologie* 1999, 5:668-678
- Shiku H, Takahashi T, Resnick L.A, Oettgen H.F, Old L.J. Cell surface antigens of human malignant melanoma. III. Recognition of autoantibodies with unusual characteristics. *J Exp Med* 1977, 145 (3): 784-789
- Simpson AJ, Caballero OL. Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nat Rev Cancer* 2005, 5 (8): 615-625
- Slater O, Shipley J. Clinical relevance of molecular genetics to paediatric sarcoma. *J Clin Pathol* 2007, 60: 1187-1194
- Soiffer R, Lynch T, Mihm M, Jung K, Rhuda C, Schmollinger JC, Hodi FS, Liebster L, Lam P, Mentzer S, Singer S, Tanabe KK, Cosimi AB, Duda R, Sober A, Bhan A, Daley J, Neuberg D, Parry G, Rokovich J, Richards L, Drayer J, Berns A, Clift S, Cohen LK, Mulligan RC, Dranoff G. Vaccination with irradiated autologous melanoma cells engineered to secrete human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor generates potent antitumor immunity in patients with metastatic melanoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, 95: 13141-13146
- Soussi T. p53 Antibodies in the sera of patients with various types of cancer: review. *Cancer Res* 2000, 60 (7): 1777-1788
- Spiessl B, Beahrs OH, Hermanek P, Hutter RVP, Scheibe O, Sobin LH, Wagner G. UICC, International Union against Cancer, TNM Atlas. Illustrated Guide to the TNM/pTNM Classification of Malignant Tumors. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1993
- Szepeswol J, Fletscher J, Casales EA, Murison GL. Experimentally produced synovial sarcoma in mice. *Oncology* 1985; 42: 61-67
- Tanzarella S, Lionello I, Valentini B, Russo V, Lollini PL, Traversari C. Rhabdomyosarcomas are potential target of MAGE-specific immunotherapies. *Cancer Immunol Immunother* 2004, 53 (6): 519-524
- Türeci O, Sahin U, Zwick C, Koslowski M, Seitz G, Pfreundschuh M. Identification of a meiosis-specific protein as a member of the class of cancer/testis antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, A 95 (9), 5211-5216
- Türeci O, Sahin U, Schobert I, Koslowski M, Schmitt H, Schild HJ, Stenner F, Seitz G, Rammensee HG, Pfreundschuh M. The SSX-2 gene, which is involved in the t(X;18) translocation of synovial sarcomas, codes for the human tumor antigen HOM-MEL-40. *Cancer Res* 1996, 56 (20): 4766-4772
- Türeci O, Schmitt H, Fadle N, Pfreundschuh M, Sahin U. Molecular definition of a novel human galectin which is immunogenic in patients with Hodgkin's disease. *J Biol Chem* 1997, 272 (10): 6416-6422
- Wang RF, Wang X, Atwood AC, Topalian SL, Rosenberg SA. Cloning genes encoding MHC class II-restricted antigens: mutated CDC27 as a tumor antigen. *Science* 1999, 284(5418):1351-4
- Wittekind C, Wagner G: TNM-Klassifikation maligner Tumoren. Springer, Berlin, Heidelberg, New

York 1997

- Usener D, Gerhardt A, Schadendorf D, Eichmüller S. Seroreactivity against MAGE-A und LAGE-1 proteins in melanoma patients. *Br J Dermatol* 2003, 149: 282-288
- Usui M, Ishii S, Yamawaki S, Hirayama T. The occurrence of soft tissue sarcomas in three siblings with Werner's syndrome. *Cancer* 1984; 54:2580-2586
- Van Bleek GM, Nathanson SG. Isolation of an endogenously processed immunodominant viral peptide from the class I H-2Kb molecule. *Nature* 1990, 348 (6298): 213-216
- Van de Corput L, Chaux P, Van der Meijden ED, De Plaen E, Falkenburg JH, Van der Bruggen P. A novel approach to identify antigens recognized by CD4 T cells using complement-opsinized bacteria expressing a cDNA library. *Leukemia* 2005, 19: 279-285
- Van den Eynde BJ, Boon T. Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Int J Clin Lab Res* 1997, 27(2): 81-6. Review
- Van den Eynde BJ, van der Bruggen P. T cell defined tumor antigens. *Curr Opin Immunol* 1997, (5): 684-93. Review
- Van den Eynde B, Peeters O, De Backer O, Gaugler B, Lucas S, Boon T. A new family of genes coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *J Exp Med* 1995, 182 (3): 689-698
- Van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, Knuth A, Boon T. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 1991, 254 (5038): 1643-1647
- Viatte S, Alves PM, Romero P. Reverse immunology approach for the identification of CD8 T-cell-defined antigens: advantages and hurdles. *Immunol Cell Biol* 2006, 84(3):318-30. Review
- Virasch N, Kruse CA. Strategies using the immune system for therapy of brain tumors. *Hematol Oncol Clin North Am* 2001, 15 (6): 1053-1071
- Walterhouse D, Watson A. Optimal management strategies for rhabdomyosarcoma in children. *Paediatr. Drugs* 2007, 9 (6): 391-400
- Wang HY, Wang RF. Regulatory T cells and cancer. *Curr Opin Immunol* 2007, 19 (2): 217-223
- Wang LF, Zhu HD, Miao SY, Cao DF. Molecular cloning and characterization of novel testis-specific nucleoporin-related gene. *Archives of Andrology* 1999, 42: 71-84
- Wang RF, Robbins PF, Kawakami Y, Kang XQ, Rosenberg SA. Identification of a gene encoding a melanoma tumor antigen recognized by HLA-A31-restricted tumor-infiltrating lymphocytes. *J Exp Med* 1995, 181 (2): 799-804
- Wilken N, Senécal JL, Scheer U, Dabauvalle MC. Localization of the Ran-GTP binding protein RanP2 at the cytoplasmic side of the nuclear pore complex. *Eur J Cell Biol.* 1995, 68 (3): 211-219
- Wu J, Matunis MJ, Kraemer D, Blobel G, Coutavas E. Nup358, a cytoplasmically exposed nucleoporin with peptide repeats, Ran-GTP binding sites, zinc fingers, a cyclophilin A homologous domain, and a leucine-rich region. *J Biol Chem* 1995, 270(23):14209-13
- Wölfel M, Jungbluth AA, Garrido F, Cabrera T, Meyen-Southard S, Spitz R, Ernestus K, Berthold F. Expression of MHC class I, MHC class II, and cancer germline antigens in neuroblastoma. *Cancer Immunol Immunother* 2005, 54 (4): 400-406
- Yee C, Thompson JA, Byrd D, Riddell SR, Roche P, Celis E, Greenberg PD. Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with

metastatic melanoma in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, 99 (25): 16168-16173

Yokoyama N, Hayashi N, Seki T, Panté N, Ohba T, Nishii K, Kuma K, Hayashida T, Miyata T, Aebi U, et al. A giant nucleopore protein that binds Ran/TC4. *Nature*. 1995, 376(6536):184-8

Yuan XJ, Chan G CF, Chan SK, Shek T, Kwong D LW, Wei W, Ha SY, Chiang A KS. Treatment outcome of rhabdomyosarcoma in Hong Kong Chinese children. *Hong Kong Med J* 2008, 14: 2

8 **Abbildungs-/ Tabellenverzeichnis**

- Abb. 1** Klassisches embryonales RMS
- Abb. 2** Botryoides RMS
- Abb. 3** Spindelzelliges RMS
- Abb. 4** Alveoläres RMS
- Abb. 5** Graphische Darstellung der Translokation t(2;13)(q35;q14)
- Abb. 6** Graphische Darstellung der SEREX-Analyse
- Abb. 7** Vektorkarte des pBluescript Phagemids (a) und Sequenz der rekombinanten MCS (b)
- Abb. 8** Ausschluss von rekombinanten IgG und Färbeartefakten
- Abb. 9** Agarosegelelektrophorese der Restriktionsprodukte von pMU-RMS-248-210
- Abb. 10** Agarosegelelektrophorese der Restriktionsprodukte von pMU-RMS-248-292
- Abb. 11** Sequenz des cDNA-Inserts von pMU-RMS-248-210 bzw. pMU-RMS-248-292
- Abb. 12** Längste Homologe der cDNA des Ag MU-RMS-248-210/292 in der GenBank
- Abb. 13** Längste Homologe der cDNA des Ag MU-RMS-248-210/292 in der Serex-Datenbank
- Abb. 14** Graphische Darstellung der molekularen Charakteristika von RANBP2 auf Proteinebene
- Abb. 15** Aminosäuresequenz der Proteine RANBP2 und MU-RMS-248-210/292
- Abb. 16** Charakterisierung der PCR-Produkte mit den Primerpaaren se2/an2 und se3/an3
- Abb. 17** Charakterisierung der PCR-Produkte mit dem Primerpaar se1/an1
- Abb. 18** mRNA-Expressionsanalyse von MU-RMS 248-210/292 mittels RT-PCR
- Abb. 19** m-RNA-Expressionsanalyse der Spleißvariante BS-63 mittels RT-PCR
-
- Tab. 1** Allgemeine Risikogruppierung
- Tab. 2** TNM-Klassifikation der Weichteilsarkome
- Tab. 3** Histopathologisches Grading von Weichteilsarkomen
- Tab. 4** Präoperative Stadieneinteilung der Weichteilsarkome
- Tab. 5** Postchirurgische Stadieneinteilung nach dem Protokoll der CWS-96
- Tab. 6** Homologierecherche zur cDNA des Ag MU-RMS-248-210/292
- Tab. 7** Heterologe Serumanalyse des rekombinanten Antigens MU-RMS-248-210/292

9 Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Stefan Burdach, Direktor der Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin der Technischen Universität München, danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Klinik durchführen zu können.

Herrn Prof. Dr. med. Georg W. Bornkamm, ehemaliger Leiter des Instituts für Klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik des Helmholtz Zentrums München, und Herrn Prof. Dr. Stefan Müller-Weihrich, ehemaliger Leiter der Abteilung für pädiatrische Onkologie und Hämatologie der Kinderklinik Schwabing, welcher diese Arbeit bis zu seinem frühen Tode mitermöglicht hat, möchte ich für Ihre Unterstützung danken.

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Frau PD Dr. med. Uta Behrends für die Stellung des Themas dieser Arbeit, für die ausgezeichnete Einführung in das Arbeitsthema, die mein vollstes Interesse für diese Arbeit geweckt hat, für die stets begleitende fachlich exzellente und menschlich wertvolle Betreuung und für ein immerwährend offenes Ohr.

Den Kollegen der übrigen Arbeitsgruppe, insbesondere Herrn Dr. rer. nat. Josef Mautner, Frau Brigitte Lechner und Frau Colette Zobywalski danke ich für die freundliche Unterstützung und stets angenehme Arbeitsatmosphäre, die die Arbeit im Labor um so vieles erleichtert hat.

Schließlich danke ich meinen Eltern, meinem Bruder und meinem Freund für die große Unterstützung und stets aufmunternden Worte, die vor allem zur endgültigen Fertigstellung der Arbeit beigetragen haben.

10 Erklärung an Eides Statt nach Anlage 5 PromO

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die der Fakultät für Humanmedizin der Technischen Universität München zur Promotionsprüfung vorgelegte Arbeit mit dem Titel

Serologische Analyse einer Tumor-cDNS Expressionsbibliothek aus Gewebe eines alveolären Rhabdomyosarkoms

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

unter der Anleitung und Betreuung durch Priv.-Doz. **Dr. med. U. Behrends**

ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung nur die gemäß § 6 Abs. 5 angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe die Dissertation in dieser oder ähnlicher Form in keinem anderen Prüfungsverfahren als Prüfungsleistung vorgelegt.

Ich habe den angestrebten Doktorgrad noch nicht erworben und bin nicht in einem früheren Promotionsverfahren für den angestrebten Doktorgrad endgültig gescheitert.

Die Promotionsordnung der Technischen Universität München ist mir bekannt.

München, den _____

Unterschrift