

Identifikation von Antigenen eines großzelligen
Medulloblastoms mittels der autologen
serologischen Analyse einer Tumor cDNA-
Expressionsbibliothek
(SEREX)

Sabine Rößler

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

Identifikation von Antigenen eines großzelligen
Medulloblastoms mittels der autologen serologischen
Analyse einer Tumor cDNA-Expressionsbibliothek
(SEREX)

Sabine Rößler

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

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. St. Burdach
2. Univ.-Prof. Dr. Th. A. Meitinger

Die Dissertation wurde am 19.12.2005 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 19.07.2006 angenommen.

Meinen Eltern gewidmet

Teile der vorliegenden Dissertation wurden vorveröffentlicht in:

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

International Journal of Cancer. 2003 Aug 20;106(2):244-51.

Inhaltsverzeichnis:

<i>Abkürzungsverzeichnis:</i>	III
1. Einleitung	1
1.1. Einführung in das Arbeitsthema	1
1.2. Fragestellung der Arbeit	1
1.3. Das Medulloblastom	2
1.3.1. Definition	2
1.3.2. Epidemiologie	3
1.3.3. Stadieneinteilung	3
1.3.4. Ätiologie	4
1.3.5. Klinische Symptomatik	5
1.3.6. Diagnose	5
1.3.7. Operation	5
1.3.8. Bestrahlung und Chemotherapie	6
1.3.9. Prognose	8
1.4. Das Immunsystem und seine Besonderheiten im Gehirn	9
1.4.1. Das angeborene und das adaptive Immunsystem	9
1.4.2. Aktivierung und Funktion von B- und T-Lymphozyten	9
1.4.3. Immunologische Besonderheiten des Gehirns	11
1.5. Immuntherapie von Hirntumoren	12
1.5.1. Nicht antigenspezifische Strategien	12
1.5.2. Mechanismen der immunologischen Tarnung von Hirntumoren	13
1.6. Tumorantigene	13
1.6.1. Definition und klinische Bedeutung von Tumorantigenen	13
1.6.2. Identifizierung von Tumorantigenen mittels zytotoxischer T-Lymphozyten	14
1.6.3. Identifizierung von Tumorantigenen durch Antikörper	16
1.6.4. Das SEREX-Verfahren	17
1.6.5. Tumorantigene von Hirntumoren	20
2. Material und Methoden	21
2.1. Material	21
2.1.1. Antibiotika	21
2.1.2. Bakterien	21
2.1.3. Chemikalien	21
2.1.4. Elektrophoresegel	23
2.1.5. Enzyme	23
2.1.6. Geräte	23
2.1.7. Gewebe-cDNAs	24
2.1.8. Kits	24
2.1.9. Medium	24
2.1.10. Oligonukleotide	25
2.1.11. Patientenserum	25
2.1.12. Phagen	25
2.1.13. Puffer	25
2.1.14. Software und Datenbanken	26
2.1.15. Tumor-cDNA-Expressionsbibliothek	26
2.1.16. Verbrauchsmaterial	26
2.2. Methoden	27
2.2.1. Einführung in das SEREX-Verfahren	27
2.2.2. Präparation der bakteriellen Wirtszellen	28

2.2.3.	Herstellen der cDNA-Expressionsbibliothek	29
2.2.4.	Titerbestimmung der cDNA-Bibliothek	31
2.2.5.	Amplifikation der cDNA-Bibliothek	31
2.2.6.	Bestimmung des Anteils rekombinanter Klone („Blue-White Test“)	31
2.2.7.	Präadsorption der Seren	32
2.2.8.	Screening: Plaque-Assay	34
2.2.9.	Charakterisierung der positiven Klone	35
2.2.10.	Subklonierung durch „in vivo excision“	36
2.2.11.	DNA-Präparation und Analyse	38
2.2.12.	Homologierecherche	40
2.2.13.	Heterologe Serumanalyse	41
2.2.14.	Homologe Serumanalyse	41
2.2.15.	mRNA-Expressionsanalyse mithilfe von PCR und Gewebe-cDNA	41
3.	<i>Ergebnisse</i>	43
3.1.	Phagenbibliothek	43
3.2.	SEREX-Screening	43
3.3.	Restriktionsanalyse der positiven Klone	43
3.4.	Sequenzanalyse	45
3.5.	Homologierecherche	49
3.6.	Korrelation der Antikörpertiter mit dem klinischen Verlauf	55
3.7.	Heterologe Serumanalyse	57
3.8.	Gewebeexpression der mRNA MU-MB-20.240 und FLJ25047	59
4.	<i>Diskussion</i>	61
4.1.	Neue cDNA-Homologe der identifizierten Antigene	61
4.2.	Funktion der putativen Antigen-Homologe	62
4.3.	Mögliche Mechanismen der Immunogenität der gefundenen Antigene	64
4.4.	Bedeutung der Antikörper als Verlaufsparemeter	66
4.5.	Mögliche prognostische Bedeutung der Antikörper	68
4.6.	Beitrag von neuen Antigenen zum Verständnis der Tumorbiologie	69
4.7.	Therapeutische Bedeutung neuer Antigene	69
4.8.	CD8⁺- und CD4⁺- T-Lymphozyten in der Tumor-Immunantwort	76
4.9.	Modifikationen und Limitationen der SEREX-Methode	78
4.10.	Abschließende Bemerkungen	79
5.	<i>Zusammenfassung</i>	80
6.	<i>Literaturverzeichnis</i>	82
7.	<i>Anhang</i>	99
7.1.	Danksagung	99
7.2.	Lebenslauf	100

Abkürzungsverzeichnis:

aa	<i>amino acids</i>
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
APC	Antigen präsentierende Zellen
BCG	<i>Bacille Calmette Guérin</i>
bp	Basenpaare
CCG	<i>Children's Cancer Group</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CT	Computertomographie
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten
DC	dendritische Zellen
DLI	<i>donor lymphocyte infusion</i>
ddH ₂ O	destilliertes Wasser
d. h.	das heisst
DTH	<i>delayed type hypersensitivity</i>
EFT	<i>Ewing family tumor</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EtOH	Ethanol
ELISA	<i>enzyme linked immuno sorbent assay</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage-colony stimulating factor</i>
GPOH	Gesellschaft für pädiatrische Onkologie und Hämatologie
g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
Gy	Gray
HIT	Hirntumoren
HSP	Hitzeschockprotein
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kb	Kilobasen
KM	Knochenmark
LAK	lymphokinaktivierte Killerzellen
LB-Medium	Luria Bertani Medium

mAk	monoklonaler Antikörper
MB	Medulloblastom
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
NK	natürliche Killerzellen
NPCSP	<i>nasopharyngeal carcinoma susceptibility protein</i>
NSE	Neuronen-spezifische Enolase
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
ORF	<i>open reading frame</i>
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PFS	<i>progression free survival</i>
pfu	<i>plaque forming units</i>
PNET	primitiver neuroektodermaler Tumor
POG	<i>Pediatric Oncology Group</i>
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SEREX	<i>serological analysis of recombinant cDNA expression libraries</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF- β	<i>transforming growth factor-β</i>
THL	T-Helfer Lymphozyten
TIL	tumorinfiltrierende Lymphozyten
ÜLR	Überlebensrate
ZNS	zentrales Nervensystem

Grundsätzlich werden die international üblichen Abkürzungen der SI-Einheiten verwendet.

1. Einleitung

1.1. Einführung in das Arbeitsthema

Pro Jahr erkranken in Deutschland ca. 1800 Kinder an einer malignen Erkrankung, am häufigsten sind mit ca. 20% die Tumoren des zentralen Nervensystems (ZNS). Innerhalb dieser stellt das Medulloblastom (MB) die zweitgrößte Gruppe dar. Trotz Fortschritten in der konventionellen Therapie können bisher nur zwei von drei betroffenen Kindern dauerhaft geheilt werden. Diese haben zudem oft an schweren Spätfolgen der Therapie wie neurokognitiven und endokrinologischen Störungen zu leiden. Beim großzelligen MB handelt es sich um eine Unterart mit besonders schlechter Prognose. Alternative Therapieoptionen sind daher dringend notwendig.

Die Aktivierung des Immunsystems gegen Strukturen des Tumors ist ein vielversprechender Ansatz, der derzeit in vielen experimentellen Studien untersucht wird. Eine essentielle Voraussetzung dafür ist die Identifizierung geeigneter Tumorantigene. Bisher wurde Antigenen (Ag), die zytotoxische T-Zellen (CTL) aktivieren, viel Aufmerksamkeit geschenkt, da diese in der Lage sind, Tumorzellen direkt zu zerstören. In letzter Zeit erkennt man mehr und mehr die zentrale Bedeutung von T-Helferzellen (THL) in der Generierung einer komplexen und langanhaltenden Immunantwort. Die SEREX-Methode erlaubt einen indirekten und sehr effizienten Nachweis von THL-Ag. In verschiedenen Malignomen des Erwachsenenalters konnten auf diese Weise bereits zahlreiche neue und auch klinisch interessante Ag identifiziert werden.

Das Ag-Repertoire kindlicher Tumoren wurde bisher noch kaum untersucht. Daher war es naheliegend, das SEREX-Verfahren auf einen besonders aggressiven pädiatrischen Tumor, das großzellige MB, anzuwenden.

1.2. Fragestellung der Arbeit

Es sollte untersucht werden, ob im Serum einer kindlichen MB-Patientin hochtitrig Antikörper (Ak) gegen Ag des autologen Tumors vorhanden waren. Im positiven Fall sollten die Ag kloniert werden, und die Titer der Ag-spezifischen Ak im zeitlichen Verlauf beobachtet werden, um eine mögliche Korrelation zum klinischen Krankheitsverlauf der Patientin zu ermitteln. Durch Vergleich der cDNA-Sequenzen der Ag mit cDNA-Einträgen

der GenBank und SEREX-Datenbank wurde nach Homologien und Verwandtschaften zu bereits bekannten Genen gesucht. Die Reaktivität von Seren gesunder Probanden und anderer Krebspatienten mit den rekombinant exprimierten Ag sowie mRNA-Expressionsanalysen der Ag in gesunden Geweben sollten die Spezifität der gefundenen Ak bzw. Ag klären.

1.3. Das Medulloblastom

1.3.1. Definition

Das MB ist ein hochmaligner embryonaler Tumor aus der Gruppe der primitiven neuroektodermalen Tumoren (PNET), der seinen Sitz im Kleinhirn und dort vor allem im Vermisbereich hat. Wesentlich seltener ist er auf eine Kleinhirnhemisphäre begrenzt. Die Zellen ähneln proliferierenden, embryonalen, neuroepithelialen Zellen. Sie sind klein mit schmalen zytoplasmatischen Saum, ovalen oder rübenförmigen Kernen mit grobscholligem Chromatin und kleinen Nukleoli. Es wird eine Vielzahl an neuronalen Differenzierungs-Ag exprimiert, darunter Vimentin, Nestin, Synaptophysin, Neurofilament (NF) und Neuronenspezifische Enolase (NSE). Aus dem Expressionsmuster dieser Ag kann auf den Reifegrad der Ursprungszelle geschlossen werden (Fung und Trojanowski, 1995). Morphologie und Immunhistochemie variieren je nach Tumortyp leicht, man unterscheidet Medullomyoblastome, melanotische MB, undifferenzierte MB, MB mit neuronaler Differenzierung und desmoplastische MB.

Einen weiteren Subtyp, der sich durch aggressiveres Verhalten und schlechtere Prognose auszeichnet, stellt das großzellige MB (Giangaspero et al., 1992) dar, welches im Fall unserer Patientin vorlag. Hier sind die Zellen größer mit deutlich sichtbarem Zytoplasmasaum, großen, vesikulären Kernen und prominenten Nukleoli. Das Expressionsmuster an neuronalen Ag ist ähnlich dem der anderen Typen, man findet eine Expression von NSE und Synaptophysin, z. T. auch von NF und Vimentin.

Verschiedene molekulargenetische Veränderungen in Proto-Onkogenen oder Tumor-Suppressor-Genen liefern einen Hinweis auf mögliche Entstehungsmechanismen des MB. So können zum Beispiel eine vermehrte Expression der Proto-Onkogenprodukte c-myc und PAX 5, zweier Transkriptionfaktoren, die eine Rolle in der Zellzyklusregulation und der Differenzierung von Hirngewebe spielen (Kozmik et al., 1995), sowie eine Amplifikation des *erbB1*-Onkogens beobachtet werden (Gilbertson, 2002). Auf der anderen Seite treten bei

einem Teil der MB Defekte von Tumor-Suppressor-Genen wie *PTCH* (*patched*) und *APC* (*adenomatöse polyposis coli*) auf. Diese genetischen Läsionen wurden auch beim Gorlin- bzw. Turcot-Syndrom identifiziert. Bei beiden treten gehäuft MB auf, vergesellschaftet mit Basalzellkarzinomen (Gorlin) bzw. Dickdarmtumoren (Turcot) (Kim et al., 1999). Weitere häufige genetische Veränderungen betreffen Deletionen auf dem kurzen Arm des Chromosoms 17 (Gilbertson, 2002) oder Vorhandensein eines Isochromosoms 17 (Michiels et al., 2002). Für alle genannten Veränderungen konnte bisher kein Einfluss auf das biologische Verhalten des Tumors nachgewiesen werden (Gilbertson, 2002).

1.3.2. Epidemiologie

Die Tumoren des ZNS sind mit etwa 20% aller Krebserkrankungen im Kindesalter die größte Diagnosegruppe unter den soliden pädiatrischen Tumoren. In Deutschland erkranken jährlich 2,5/100000 Kinder neu an einem Hirntumor. 80% aller kindlichen Hirntumoren sind neuroepithelialen Ursprungs. Astrozytome sind mit ca. 50% die größte Gruppe, gefolgt von den MB mit 25% und Ependymomen mit 10%. Nur 3-4% der Tumoren entstehen im Rückenmark, ca. 1/3 supratentoriell, ca. 2/3 infratentoriell (Kaatsch et al., 2001).

Bei den infratentoriellen Tumoren handelt es sich überwiegend um MB und Kleinhirnastrzytome. Ein Altersgipfel der MB liegt zwischen dem 4. und 8. Lebensjahr. Hirntumoren können jedoch auch im Säuglingsalter oder sogar konnatal auftreten. Jungen sind 2-3 mal häufiger betroffen als Mädchen (Kaatsch et al., 2001).

1.3.3. Stadieneinteilung

Das MB wächst lokal infiltrierend, zum Beispiel in den Hirnstamm, aber auch in den 4. Ventrikel und *per continuitatem* entlang der Liquorwege. Eine ZNS-Metastasierung durch Dissemination von Tumorzellen über die Liquorwege kann initial bei 1/4 der Kinder im lumbal gewonnenen Liquor und bei 1/3 der Kinder mittels intrakranieller oder spinaler Magnetresonanztomographie (MRT) bzw. Computertomographie (CT) nachgewiesen werden. Eine systemische Metastasierung wird initial nur selten beobachtet. Die Klassifizierung nach Chang (Chang et al., 1969) ist international anerkannt (siehe Tab. 1).

	Tumorgröße/-ausdehnung
T1	Tumordurchmesser < 3 cm und begrenzt auf Kleinhirnwurm, Dach des 4. Ventrikels oder Kleinhirnhemisphäre
T2	Tumordurchmesser = 3 cm; dringt in eine Nachbarstruktur (zum Beispiel Kleinhirnschenkel) ein oder füllt den 4. Ventrikel teilweise aus
T3a	Tumor dringt in zwei Nachbarstrukturen ein oder füllt den 4. Ventrikel vollständig aus mit Ausdehnung zum Aquädukt, Foramen Magendii oder Foramina Luschkae und Hydrozephalus internus
T3b	Tumor füllt den 4. Ventrikel vollständig aus und infiltriert den Hirnstamm/Boden des 4. Ventrikels
T4	Ausdehnung jenseits des Aquädukts bis ins Mittelhirn oder in den 3. Ventrikel oder Ausdehnung bis zum oberen Halsmark
M0	Kein Anhalt für Metastasen
M1	Mikroskopischer Tumorzellnachweis im Liquor
M2	Makroskopische Metastasen im zerebellaren u/o zerebralen Subarachnoidalraum u/o in den supratentoriellen Ventrikeln
M3	Makroskopische Metastasen im spinalen Subarachnoidalraum
M4	Metastasen außerhalb des ZNS

Tab. 1: Modifizierte Klassifikation des MB nach Chang

* Ein signifikanter Liquorbefall, d. h. ein Stadium M1, liegt sicher vor, wenn 14 Tage postoperativ noch Tumorzellnester oder mehrere Einzelzellen, die immunzytochemisch als PNET-Zellen identifizierbar waren, im lumbalen Liquor gefunden wurden.

1.3.4. Ätiologie

Die Ätiologie der Hirntumoren ist unbekannt. Das Risiko, an einem Hirntumor zu erkranken, wird durch eine Schädelbestrahlung im Rahmen einer Leukämitherapie oder *Tinea capitis* erhöht. Neben radioaktiver Strahlung werden Nitrosamine und Hydrazine zu effektiven ZNS-Karzinogenen gerechnet (Paulino und Fowler, 2005; Pazzaglia et al., 2002). Eine Reihe hereditärer Syndrome ist bisher beschrieben, die eine erhöhte Inzidenz von Hirntumoren aufweisen. Im Falle des MB sind dies das Turcot- und Gorlin-Syndrom (Evans et al., 1991; Mastronardi et al., 1991).

1.3.5. Klinische Symptomatik

Die Vorgeschichte ist meist kurz, größtenteils weniger als vier Wochen. Es ist zwischen einer allgemeinen Hirndrucksymptomatik und einer Herdsymptomatik zu unterscheiden. Führend sind Hirndruckzeichen wie Kopfschmerzen, (morgendliches Nüchtern-) Erbrechen, Wesensveränderungen und Sehstörungen. Daneben können Lähmungen aller Hirnnerven auftreten, am häufigsten sind der *N. abducens* und der *N. facialis* betroffen. Eine Stauungspapille wird lediglich bei 50% der MB gefunden. Die zerebelläre Herdsymptomatik äußert sich in Ataxie, Hypotonie, Nystagmus oder Intentionstremor (Bianchi et al., 1984).

1.3.6. Diagnose

Nach neurologischer Untersuchung und Fundusspiegelung steht die bildgebende Untersuchung des Schädels durch Sonographie, CT und/oder MRT an erster Stelle der Primärdiagnostik. Die MRT ist in der Lage, den Tumor, das peritumorale Ödem und umgebendes Hirngewebe anatomisch exakt darzustellen, was für die Planung der Operation und Bestrahlung wichtig ist. Darüber hinaus ist eine MRT des Spinalkanals sowie eine initiale liquorzytologische Untersuchung obligat. Mit spinalen Tumorabsiedlungen ist in 15-25% der Fälle zu rechnen, supratentorielle und extraneurale Metastasen sind selten (Park et al., 1983). Mit Hilfe der MRT ist meist bereits eine Verdachtsdiagnose möglich. Die endgültige Diagnose ist jedoch nur histologisch zu stellen.

1.3.7. Operation

Die Beseitigung des meist bestehenden hypertensiven Hydrozephalus geht in der Regel der eigentlichen Tumoroperation voraus. Wegen der Gefahr der Tumoraussaat sollte ein ventrikulo-peritonealer Shunt vermieden und der externen Ventrikeldrainage der Vorzug gegeben werden. Nach Öffnung der Liquorpassage durch die Resektion des Tumors benötigen nur ca. 20% der Kinder einen permanenten ventrikulo-peritonealen Shunt. Die Ziele der Operation bestehen in der möglichst vollständigen Resektion des Tumors und in der Gewinnung von Material für die histologische Beurteilung. Die topographische Beziehung zu wichtigen Hirnnerven und Kerngebieten verbietet eine radikale Resektion im Gesunden, um

schwere neurologische Defizite zu vermeiden. Mikrochirurgische Operationstechniken ermöglichen heutzutage die vollständige Resektion unter Schonung benachbarter Strukturen bei über der Hälfte der Kinder.

1.3.8. Bestrahlung und Chemotherapie

Die postoperative Therapie besteht generell aus einer Kombination aus Bestrahlung und Chemotherapie. Je nach Protokoll kommen Kombinationen der Medikamente Cyclophosphamid, Vincristin, Cis- bzw. Carboplatin, Lomustin, Methotrexat und Etoposid zum Einsatz. Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose des MB bei der hier untersuchten Patientin wurden betroffene Kinder in Deutschland je nach Alter und Vorhandensein von Metastasen in eine von vier Risikogruppen eingeteilt und nach den Studienprotokollen für Hirntumoren (HIT 91) (Kortmann et al., 1999; Kortmann et al., 2000) (Alter > 3 Jahre) bzw. HIT SKK 92 (Rutkowski et al., 2005) (Alter < 3 Jahre) der Gesellschaft für pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH) behandelt.

Kinder über drei Jahren ohne Metastasen wurden als Standardrisiko-Patienten eingestuft. Postoperativ erhielten sie eine mit Vincristin kombinierte kraniospinale Bestrahlung (35,2 Gy) mit Aufsättigung in der Tumorregion (54 Gy) in Kombination mit Erhaltungstherapie oder „Sandwich-Therapie“, die eine Chemotherapie vor und nach der Bestrahlung vorsah. Es hat sich herausgestellt, dass die Erhaltungstherapie in diesem Kollektiv zu einer besseren progressionsfreien 4-Jahres-Überlebensrate (4-J PFS) führte als die so genannte „Sandwich-Therapie“ (79% vs. 60% 4-J PFS).

Zu ähnlichen Ergebnissen kam die CCG-921-Studie der nordamerikanischen Children's Cancer Group (CCG) bei der allerdings eine verminderte kraniospinale Strahlendosis (23,4 Gy) eingesetzt wurde (5-J PFS 79%) (Packer et al., 1999).

Bei über dreijährigen Patienten mit Metastasen war dagegen die „Sandwich-Therapie“ effektiver; mit dieser Therapieform wurde in der HIT 91-Studie eine 4-J PFS von ca. 55% (Kortmann et al., 1999; Kortmann et al., 2000) und in der CCG-921-Studie eine 5-J PFS von 63% (Zeltzer et al., 1999) erreicht. Alternativ wurde bei gutem Ansprechen auf die erste Chemotherapie in der GPOH-Studie eine Hochdosischemotherapie und autologe Stammzellentransplantation vorgeschlagen.

Bei Kindern unter drei Jahren wurde wegen des hohen Risikos für neurokognitive Folgeschäden aufgrund der Bestrahlung versucht, letztere durch primäre postoperative

Chemotherapie auf ein Alter über drei Jahre zu verschieben oder ganz zu vermeiden. Bei schlechtem Ansprechen musste trotzdem schon vorher auf die Bestrahlung zurückgegriffen werden. Mit einer Therapie entsprechend HIT SKK 92 war mit einem 4-J PFS von ca. 61% bei fehlender bzw. 27% bei nachweisbarer Metastasierung zu rechnen (Rutkowski et al., 2005).

Zu ähnlichen Ergebnissen kam eine Studie der nordamerikanischen Pediatric Oncology Group (POG), in der Kinder bis zu einem Alter von vier Jahren nicht bestrahlt, sondern nur mit Chemotherapie behandelt wurden; die Überlebensrate nach fünf Jahren (5-J ÜLR) betrug insgesamt 31,5% und bei totaler Tumorresektion ohne Metastasen 69% (Duffner et al., 1999; Duffner et al., 1993).

In der Nachfolgestudie der HIT 91, der HIT 2000, wird vor allem der Effekt einer sogenannten hyperfraktionierten Bestrahlung untersucht. Die hyperfraktionierte Strahlentherapie besitzt das Potential, die biologische Wirksamkeit der Behandlung gegenüber Tumorgewebe zu erhöhen, gleichzeitig das Normalgewebe zu schonen und auf diesem Weg das Risiko für Spätfolgen zu verringern. Patienten der Standardrisiko-Gruppe erhalten jetzt randomisiert entweder eine konventionelle Strahlentherapie mit einer verminderten kraniospinalen Dosis (23,4 Gy) ähnlich dem Konzept der CCG-Studie (Packer et al., 1999) oder eine hyperfraktionierte Bestrahlung mit sowohl kraniospinal (36 Gy) als auch lokal höheren Dosen (60 Gy hintere Schädelgrube, 68 Gy Tumorregion).

Bei Kindern über vier Jahren mit Metastasen wird die hyperfraktionierte Bestrahlung der Neuroachse mit nochmals erhöhter Dosis (40 Gy) durchgeführt, sie erhalten außerdem Erhaltungskemotherapie und „Sandwich-Therapie“. Vorbild für die Bestrahlungsmodalitäten sind Pilotstudien aus den USA, die vor allem bei Kindern mit Metastasen vielversprechende Ergebnisse erzielten (Allen et al., 1996; Marymont et al., 1996; Prados et al., 1999). Die bestrahlungsrelevante Altersgrenze wird jetzt bei vier Jahren gezogen. Die guten Ergebnisse, die bei Kindern unter drei Jahren in der HIT-SKK 92 erzielt wurden, rechtfertigten den Versuch, auch bei den 3-3,9-jährigen in der Primärtherapie auf die Bestrahlung zu verzichten. Patienten unter vier Jahren ohne Metastasen erhalten fünf statt bisher drei Zyklen Chemotherapie. Patienten unter vier Jahren, die auf eine 96 h-Infusion mit CARBO/VP-16 gut ansprechen, erhalten eine Tandem-Hochdosischemotherapie mit autologer Stammzellentransplantation.

Die Ergebnisse der multizentrischen Studie HIT 2000 stehen noch aus, da die Laufzeit vom 01.01.2001 bis zum 31.12.2005 terminiert ist.

1.3.9. Prognose

Insgesamt ist die Prognose des MB trotz Ausreizung konventioneller Methoden noch immer schlecht. Unumstritten ist der ungünstige Einfluss von Metastasen bei Diagnosestellung, von einem Residualtumor, der größer als 1,5 cm ist und von einem Alter unter vier Jahren. Die 10-Jahresüberlebensrate aller Patienten betrug laut einer Zusammenschau der Ergebnisse im Jahre 2002 unabhängig vom Stadium der Erkrankung 40-50% (Freeman et al., 2002) (Vgl. Kapitel 1.3.8.).

Auf molekularer Ebene wurden zwei Signalübertragungswege gefunden, die einen Einfluss auf das biologische Verhalten des Tumors und damit auf die Prognose haben. Die Expression des Neurotrophin 3 (NT3)- Rezeptors Tyrosinkinase C (TrKC) kann zur Apoptose der Tumorzellen führen und somit die Prognose verbessern (Gilbertson, 2002; Kim et al., 1999), während die Expression der *epidermal growth factor* (EGF)-Rezeptoren HER-2 und HER-4 vor allem bei Koexpression zu einer erhöhten Zellproliferation führt und die Prognose signifikant verschlechtert (Gilbertson, 2002; Gilbertson et al., 1997).

Die Prognose ist zudem durch Spätfolgen der Therapie belastet. Folgen der operativen Entfernung des Tumors können Hemiparesen, bulbäre Dysfunktionen wie Dysarthrie, Dysphagie, Dysmetrie, Abduzensparese oder Rumpfataxie und Mutismus sein (Dennis et al., 1996). Nach Ganzhirnbestrahlung treten bei über 80% der Patienten Beeinträchtigungen wie Intelligenzminderung, Verlust perzeptiver, motorischer und sprachlicher Fähigkeiten, Störungen der Konzentration und der Gedächtnisleistung sowie emotionale und Verhaltensstörungen auf. Die geistige Entwicklungsverzögerung, die zu einer deutlichen Verminderung des Intelligenzquotienten und oftmals großen schulischen Problemen mit der Notwendigkeit einer speziellen Förderung führt, ist umso ausgeprägter, je jünger das Kind und je höher die Strahlendosis war (Dennis et al., 1996; Hoppe-Hirsch et al., 1990). Doch auch bei verringerter Strahlendosis in Kombination mit adjuvanter Chemotherapie ist der Verlust an Intelligenz beträchtlich (Bailey et al., 1995; Deutsch et al., 1996; Ris et al., 2001; Silber et al., 1992).

Darüber hinaus werden neuroendokrinologische Funktionsstörungen durch die Bestrahlung der Hypothalamus-Hypophysenachse beobachtet. Die häufigste ist der Minderwuchs, verursacht durch einen Mangel an Wachstumshormon und vermindertes Wachstum der bestrahlten Wirbelsäule (Clayton und Shalet, 1991; Spoudeas et al., 1996). Außerdem kommen Unterfunktion der Schilddrüse und Störungen der Pubertätsentwicklung vor.

Die Ergebnisse konventioneller Therapie bei MB-Patienten sind also keineswegs zufriedenstellend. Da es sich zudem um eine in der Pädiatrie häufige Tumorentität handelt, sind verstärkte Bemühungen um neue klinische Marker und neue Therapiekonzepte wie Immun- oder Gentherapie besonders dringend notwendig.

1.4. Das Immunsystem und seine Besonderheiten im Gehirn

1.4.1. Das angeborene und das adaptive Immunsystem

Die Aufgabe des Immunsystems ist es, die funktionelle Integrität des Organismus gegen Angriffe von außen (zum Beispiel pathogene Keime) und innen (neoplastische Transformation) aufrechtzuerhalten.

Die erste Bastion der körpereigenen Abwehr stellt der angeborene Teil des Immunsystems dar (*innate immunity*). Er besteht aus Faktoren wie Komplement oder *toll-like-receptor* tragenden Phagozyten, die bestimmte konservierte Strukturen auf Bakterien, Viren oder Pilzen erkennen und diese zerstören. Im Hirngewebe kommt diese Funktion in begrenztem Umfang Mikrogliazellen zu. Komplement findet sich auch in der interstitiellen Gewebsflüssigkeit des Gehirns und im Liquor, allerdings in weit geringeren Konzentrationen als im Plasma (Walker et al., 2003).

Für die hohe Mutationsrate und das Neuauftreten von Mikroorganismen ist dieser Abwehrmechanismus jedoch nicht ausgerichtet, deshalb existiert zusätzlich eine zweite, sogenannte adaptierte Schiene der Immunabwehr (*adaptive immunity*). Eine große Anzahl B- und T-Lymphozyten werden in jedem Individuum synthetisiert, die spezifische Ag-Rezeptoren tragen. Durch den Mechanismus des *gene-rearrangement* verschiedener Gensegmente wird eine genügend große Vielfalt von B- und T-Zellrezeptoren hergestellt, die auf jede denkbare antigene Bedrohung reagieren kann (Bassing et al., 2002).

1.4.2. Aktivierung und Funktion von B- und T-Lymphozyten

B-Lymphozyten erkennen freies Ag im Körper oder auf Ag-präsentierenden Zellen (*antigen presenting cells*, APC), internalisieren dieses und präsentieren es auf MHC-II-Molekülen, was eine Stimulierung durch THL mit der gleichen Spezifität zur Folge hat. Die B-Zellen

entwickeln sich zu Plasmazellen und sezernieren Ak, die an unprozessierte Ag binden können. Im Laufe der Reifung machen sie THL-abhängig ein *class-switching* durch und bilden dann IgG statt IgM (Zubler, 2001). Zellen, die mit gebundenem Ak „gekennzeichnet“ sind, werden vom Komplementsystem lysiert oder von Fresszellen (Makrophagen, Granulozyten) vernichtet.

Die Ag-Erkennung durch CD8⁺- und CD4⁺- T-Lymphozyten verläuft komplexer und benötigt prozessierte Ag, die auf MHC-I bzw. -II-Molekülen von APC präsentiert werden. Die wichtigsten APC sind die dendritischen Zellen (*dendritic cells*, DC).

MHC-I-Moleküle werden außerdem von den meisten somatischen Zellen exprimiert und präsentieren ca. 8-10 Aminosäuren (*amino acids*, aa) lange Peptide, die vor allem aus dem Inneren der Zellen, aber auch aus der Umgebung stammen (*cross-priming*). Vor allem DC benutzen *cross-priming*, um externe Ag (apoptotische oder nekrotische infizierte Zellen, Tumorzellen) über verschiedene Mechanismen zu internalisieren, ins Zytoplasma zu transportieren und dann über MHC-I Moleküle zu präsentieren (Melief, 2003). Nach Bindung des Antigens im Kontext von MHC-I-Molekülen können CD8⁺-CTL die Zielzellen lysieren (Berzofsky et al., 2004).

APC, hämatopoetische Zellen und Thymusepithelzellen verfügen zusätzlich noch über MHC-II-Moleküle. Durch Stimulation mit Interferon- γ kann die Expression von MHC-II-Molekülen auch auf anderen Zelltypen induziert werden. Diese präsentieren ca. 13-17 aa lange Peptide, die vorwiegend aus extrazellulärem Milieu, aber, wie in den letzten Jahren belegt, auch aus dem Zellinnern stammen (zum Beispiel durch Autophagie (Nimmerjahn et al., 2003)), und Liganden für den TCR von CD4⁺-THL darstellen. CD4⁺-THL stimulieren durch Zytokinausschüttung sowohl CTL als auch B-Lymphozyten und Zellen der antigenunspezifischen Immunabwehr (Makrophagen, Granulozyten). Aufgrund ihres Zytokinsekretionsverhaltens werden CD4⁺-THL in T-Helfer-1 (Th1) und -2 (Th2) unterteilt. Th1 sind am *priming* von naiven CD8⁺- Zellen und an der Aktivierung von Gedächtnis-CD8⁺- Zellen beteiligt. Im Weiteren sind sie für die Aufrechterhaltung der CD8⁺- Antwort erforderlich, indem sie IL-2 ausschütten, was für Wachstum und Proliferation von CD8⁺- Zellen unverzichtbar ist (Wang, 2001). Während Th1 Zellen als Helfer für die zelluläre Immunantwort fungieren, sind Th2 Zellen auf der humoralen Seite tätig. Unter ihrem Einfluss entwickeln sich B-Zellen zu Plasmazellen und sezernieren spezifische Ak. Zytotoxische CD4⁺- T-Lymphozyten sind in der Lage, Zellen, die den geeigneten Komplex aus Ag und MHC-I bzw. MHC-II tragen, zu lysieren (Knutson und Disis, 2005). Eine Untergruppe von CD4⁺- Zellen, sogenannte regulatorische T-Zellen, sind unabhängig von antigener Stimulation im

Blut vorhanden und unterdrücken viele Immunprozesse, sie sind an der Aufrechterhaltung von Selbst-Toleranz und Unterdrückung von Autoimmunprozessen beteiligt (Sakaguchi, 2005). Eigene Proteine, die auf den MHC-Molekülen exprimiert werden, führen in der Regel zu einer Toleranz des Immunsystems (Goodnow et al., 2005), als fremd erkannte Moleküle führen im Kontext mit den geeigneten kostimulatorischen Molekülen zur Auslösung einer Immunantwort. Das Fehlen von ausreichender Kostimulation kann Toleranz und Anergie induzieren (Lenschow et al., 1996; Mocellin et al., 2004). Die Lymphozyten durchlaufen nach Stimulation eine klonale Expansion.

1.4.3. Immunologische Besonderheiten des Gehirns

Ein effektiver immunologischer Schutz gegen Angriffe von außen und innen ist besonders für ein nicht erneuerbares Gewebe wie das Gehirn von Bedeutung. Allerdings sind überschießende Immunreaktionen für das Gehirn bedrohlich. Verschiedene Hinweise sprachen lange Zeit dafür, das Gehirn als immunprivilegiert (*immunoprivileged site*) anzusehen. Zum einen beobachtete man eine gewisse Separation des Gehirns vom peripheren, humoralen und zellulären Immunsystem durch die Blut-Hirn-Schranke. Sogenannte *tight junctions* zwischen den Endothelzellen von Hirngefäßen und die dichte Gruppierung von Astrozyten um diese limitieren die parazelluläre Diffusion und den transzellulären Fluss. Dadurch wird der Zugang von Pathogenen, aber auch von Bestandteilen des Immunsystems zum Gehirn erschwert. Letzteres ist sinnvoll, um schwere Entzündungsreaktionen, die das Gewebe durch erhöhten Hirndruck gefährden würden, zu verhindern. Zudem ist die Expression von MHC-I und vor allem MHC-II-Molekülen im Gehirn sehr gering ausgeprägt (Walker et al., 2003). Mehrere tierexperimentelle Transplantationsmodelle, in denen eine Abstoßung peripherer Transplantate, aber eine Toleranz von Transplantaten im Gehirn beobachtet wurden (Weller und Fontana, 1995), schienen diese Auffassung zu bestätigen.

Inzwischen konnte aber gezeigt werden, dass sowohl der afferente als auch der efferente Arm der Immunabwehr im Gehirn funktionieren. So finden sich zum Beispiel hirntumorspezifische T-Lymphozyten oder Ak im peripheren Blut betroffener Patienten. Ob die entsprechenden Ag aus dem Gehirn in Lymphknoten drainiert oder von APC dorthin transportiert werden, ist bisher nicht geklärt (Harling-Berg et al., 1991). Auch das Eindringen aktivierter T-Lymphozyten in Hirngewebe bei intakter Blut-Hirn-Schranke ist belegt (Butcher und Picker, 1996; Hickey et al., 1991; Irani und Griffin, 1996). Eine durch Trauma oder Entzündung

beeinträchtigte zelluläre Barriere oder Tumorneogenese erleichtern diesen Vorgang. Im Gehirn interagieren aktivierte T-Lymphozyten nochmals mit APC, was je nach deren Aktivierungszustand zu einer Herunterregulierung oder Verstärkung der Immunantwort führen kann. Als APC-Kandidaten im Hirn werden Kapillarperizyten, Hirnmakrophagen/Mikrogliazellen und Astrozyten diskutiert (Walker et al., 2003).

1.5. Immuntherapie von Hirntumoren

1.5.1. Nicht antigenspezifische Strategien

Die Beobachtung, dass Hirntumorpatienten Immunantworten gegen ihren Tumor generieren können, gab Anlass zu immunotherapeutischen Ansätzen. Verschiedene Verfahren wurden getestet, einschließlich systemischer oder lokaler Infusionen von Lymphozyten, Zytokinen, Tumorzellen oder DC. So verwendeten Hayes et al. den adoptiven Transfer von lymphokinaktivierten Killerzellen (LAK) zur Behandlung von malignen Gliomen. Durch Leukapherese gewonnene Leukozyten wurden vier bis fünf Tage ex vivo mit IL-2 aktiviert und dann in die chirurgische Resektionshöhle implantiert (Hayes et al., 2001). Eine Kombination von Tumorzell-Vakzinierung und adoptivem Transfer wurde bei Patienten mit malignen Gliomen (Plautz et al., 2000) und bei Patienten mit Astrozytom Grad III/IV (Holladay et al., 1996) eingesetzt. Auf eine Vakzinierung mit bestrahlten Tumorzellen intradermal bzw. subkutan plus Zytokin (GM-CSF) bzw. *Bacille Calmette Guérin* (BCG) als Adjuvans folgte die Gewinnung von Lymphozyten aus drainierenden Lymphknoten bzw. Blut. Nach erneuter Stimulation wurden sie wieder intravenös verabreicht. Weitere Ansätze waren die Verabreichung alloreaktiver Lymphozyten gegen MHC-Moleküle auf den Hirntumorzellen, die im restlichen Hirn weitgehend fehlen (Kruse et al., 1997) oder Vakzinierung mit Tumorzelllysat-beladenen DC (Heimberger et al., 2000), z. T. in Kombination mit verschiedensten stimulatorischen Zytokinen wie IL-2, IL-4 oder GM-CSF (Virasch und Kruse, 2001). Bei einigen Patienten konnten so partielle oder komplette Remissionen bei limitierter Toxizität der Behandlung erreicht werden, die Überlebensraten haben sich aber insgesamt nicht signifikant verbessert.

1.5.2. Mechanismen der immunologischen Tarnung von Hirntumoren

Gehirntumoren verfügen über eine Vielzahl von Mechanismen, die gegen sie gerichtete Immunantwort zu beeinträchtigen (*immune-escape*). Vor allem Gliome, aber auch andere zerebrale Tumoren sezernieren den Wachstumsfaktor *transforming growth factor- β* (TGF- β), der die Reifung und Ag-Präsentation von APC, sowie die Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen verhindert und zu deren Apoptose führen kann (Walker et al., 2003; Weller und Fontana, 1995). Auch zellvermittelte Interaktionen können zur Immunsuppression des Wirtes führen. Viele Tumoren, u. a. Astrozytome exprimieren membrangebundenen Fas-Liganden, der bei Kontakt mit dem Fas-Rezeptor auf T-Zellen apoptotisch wirkt (Bodey et al., 1999). Weitere immunsuppressive Moleküle sind das nicht-klassische MHC-Molekül HLA-G, das die Aktivierung natürlicher Killerzellen (NK-) und T-Zellen unterdrücken soll, sowie CD70, dem eine proapoptotische Rolle für periphere mononukleäre Zellen des Blutes (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) zugeschrieben wird. Beide werden in der Literatur jedoch kontrovers diskutiert (Bainbridge et al., 2001; Jacquot, 2000; Wischhusen et al., 2002). Strategien zur Umgehung der oben genannten Mechanismen und die molekulare Charakterisierung von tumorassoziierten Ag sollten einen deutlichen Fortschritt in der Immuntherapie gegen Hirntumoren erbringen.

1.6. Tumorantigene

1.6.1. Definition und klinische Bedeutung von Tumorantigenen

Tumorzellen unterscheiden sich biologisch wesentlich von ihren nicht-malignen Ursprungszellen. Diese Differenzen sind durch während der Tumorentwicklung erworbene genetische Veränderungen bedingt und führen unter anderem auch zur Bildung qualitativ oder quantitativ veränderter molekularer Strukturen in den Krebszellen. Werden solche tumorassoziierten Strukturen vom spezifischen Immunsystem des tumortragenden Wirtes erkannt, spricht man von Tumor-Ag (Chen, 2000).

Diese werden in drei Kategorien unterteilt. Tumorspezifische Ag treten nur in einer Tumorentität auf, gemeinsame (*shared*) Tumor-Ag finden sich entitätsübergreifend in mehreren Arten von Tumoren, und von tumorassoziierten Ag spricht man, wenn diese ebenfalls in Normalgewebe auftreten, jedoch nur in beschränktem Umfang oder nur in

bestimmten Entwicklungsstufen. Demgegenüber gibt es sogenannte tumorabhängige Auto-Ag, die unverändert auch in Normalgewebe vorkommen, aber aufgrund bislang ungeklärter Mechanismen nur bei Tumorpatienten eine Immunantwort auslösen, und klassische, nicht tumorabhängige Auto-Ag, die in Tumor- und Normalgewebe vorkommen und auch bei gesunden Personen nachweisbare Immunantworten auslösen (Chen, 2000; Pfreundschuh, 2000; Preuss et al., 2002) (Vgl. Kapitel 1.6.3). Solange die Gewebeexpression eines Ag nicht quantitativ untersucht ist, kann serologisch nur in Tumor-Ag (Immunantwort nur bei Tumorpatienten) und Auto-Ag (Immunantwort auch bei gesunden Kontrollen) differenziert werden.

Die potentielle klinisch-therapeutische Bedeutung von Tumor-Ag ergibt sich aus der Tatsache, dass die Ag-abhängige Immunerkennung neoplastischer Zellen zur Initiierung von zytotoxischen Effektormechanismen führen und die Elimination von Krebszellen bewirken kann (Vgl. Kapitel 4.8.). Daneben ist aber auch ein Beitrag von Tumor-Ag und Tumor-Ag-abhängigen Immunantworten zur Diagnose beispielsweise eines Rezidivs oder einer neoplastischen Ursache von unklaren neurologischen Symptomen belegt (Vgl. Kapitel 4.4. und 4.3.). Entsprechend ist es eine zentrale Zielsetzung der Tumorimmunologie, diese Strukturen molekular zu definieren.

1.6.2. Identifizierung von Tumorantigenen mittels zytotoxischer T-Lymphozyten

Der genetische Ansatz

Der sogenannte genetische Ansatz wurde erstmals 1991 von der Arbeitsgruppe um Thierry Boon beschrieben (van der Bruggen et al., 1991). Durch Kokultur menschlicher Tumorzellen und autologer Lymphozyten wurden zunächst Klone von tumorspezifischen CTL generiert. Resistente Tumorzell-Abkömmlinge, die die CTL-Kokultur überlebten, wurden Ag-Verlust-Varianten genannt. Diese Tumorzell-Varianten wurden mit der aus einer antigentragenden Tumorzelllinie generierten cDNA-Bibliothek transfiziert, und die Transfektanten auf eine Erkennung durch die tumorspezifischen CTL gescreent. Im positiven Fall proliferierten die CTL und setzten ein Zytokin frei, dessen Konzentration im Zellüberstand gemessen werden konnte. Nach fraktionierter Transfektion der cDNA-Bibliothek und Analyse der entsprechenden Transfektanten in T-Zell-Assays konnte schließlich die Ag-cDNA aus den erkannten Transfektanten isoliert und sequenziert werden. Das genetische Verfahren wurde durch Einsatz von kommerziell erhältlichen Zellen der Affeniere, sogenannte COS-Zellen,

so vereinfacht, dass die aufwendige Generation autologer Ag-Verlust-Varianten des Tumors entbehrlich wurde (De Plaen et al., 1997). Um die verantwortlichen T-Zell-Epitope neuer Tumor-Ag zu kartieren, wurden anschließend immer kleinere Abschnitte der Ag-cDNA in die antigenpräsentierenden Tumor- bzw. COS-Zellen transfiziert, und die Erkennung durch die tumorspezifischen CTL getestet.

Mittels des genetischen Ansatzes wurde in der Melanomzelllinie MZ2-MEL das erste humane Tumor-Ag identifiziert (van der Bruggen et al., 1991). Dieses, MAGE-1 genannte, Ag wird mit Ausnahme von Hodengewebe nicht in normalen Geweben exprimiert und gehört damit zu der inzwischen großen Familie der sogenannten *Cancer/Testis* (CT) -Ag. *Tyrosinase* (Brichard et al., 1993), *MART-1* (Coulie et al., 1994), *BAGE* und *GAGE* (Boel et al., 1995; Coulie et al., 1994; Van den Eynde et al., 1995) sind weitere Beispiele für Gene, die für Tumor-Ag in Melanomzelllinien kodieren.

Rosenberg et al. modifizierten den genetischen Ansatz, um gezielt nach solchen Tumor-Ag zu suchen, die *in vivo* zu Tumorregressionen beitragen (Rosenberg, 1997). Bei der Identifizierung solcher *tumor regression antigens* wurden zunächst tumorinfiltrierende Lymphozyten (TIL) gewonnen und *in vitro* mit autologen Tumorzellen kokultiviert. Die *in vitro* tumortoxischen TIL wurden selektioniert und dem Patienten wieder zugeführt. Wenn ihre Applikation *in vivo* eine Tumorregression auslöste, wurden sie anstelle der aus peripherem Blut generierten CTL in den klassischen genetischen Ansatz eingesetzt. Auf diese Weise wurden die drei Differenzierungsantigene des Melanoms MART-1, gp100, Tyrosinase, sowie das aus einem alternativen offenen Leserahmen (*open reading frame*, ORF) translatierte TRP-1 (Wang et al., 1995), β -Catenin mit einer einzelnen Basenmutation (Robbins et al., 1996) und p15 (Robbins et al., 1995) identifiziert.

Der biochemische Ansatz

Der biochemische Ansatz basierte auf der Eluierung von Peptiden aus den MHC Molekülen mittels Säurebehandlung (Falk et al., 1991; Van Bleek und Nathenson, 1990). Die gesamte auf diese Weise gewonnene Peptidfraktion eines Tumors wurde chromatografisch aufgetrennt, und Surrogatzellen mit leeren MHC-Molekülen wurden mit den einzelnen Peptidfraktionen beladen. Die Peptid-beladenen Surrogatzellen konnten anschließend mit spezifischen CTL getestet werden. Positive Fraktionen des Eluats wurden weiter chromatographisch aufgetrennt und in derselben Weise getestet, bis einzelne Peptide identifiziert waren, die die CTL-Antwort auslösten. Durch den sogenannten Edman-Abbau konnten die Peptide sequenziert werden. Mit diesem technisch äußerst aufwendigen

Verfahren konnte von der Gruppe um Hans-Georg Rammensee in einem humanen malignen Melanom ein 9 aa langes Peptid, ein Teil von Pmel 17, einem für Melanozyten und Melanome spezifischen Protein, identifiziert werden, das von spezifischen CTL von fünf verschiedenen Melanompatienten erkannt wurde (Cox et al., 1994) sowie eine Mutante des murinen Connexin 37 (Mandelboim et al., 1994).

Nachteile der CTL-basierten Verfahren

Nachteile all dieser Ansätze sind, dass sie auf sehr zeit- und kostenintensiven Verfahren beruhen und darüber hinaus die Verfügbarkeit von vorcharakterisierten, tumorspezifischen CTL-Klonen und von Tumorzelllinien voraussetzen. Da viele Tumorarten, einschließlich nahezu aller typisch pädiatrischen Entitäten, sehr schwer *in vitro* zu kultivieren sind, blieb die Anwendung der genannten Verfahren im Wesentlichen auf maligne Melanome und Nierenzellkarzinome beschränkt.

1.6.3. Identifizierung von Tumorantigenen durch Antikörper

Die autologe Typisierung

Die Analyse serologischer Antworten gegen Tumoren hat eine lange Tradition. Bereits in den 70er Jahren entwickelte die Gruppe um Lloyd Old die sogenannte autologe Typisierung. Hierbei wurde untersucht, ob und wie häufig Patienten Serum-Ak gegen Oberflächenantigene kultivierter autologer Tumorzellen aufwiesen, und ob die Ag auf den einzelnen Tumor beschränkt waren oder in weiteren Tumoren und Normalgewebe exprimiert wurden.

Der Nachweis spezifisch gebundener Serum-Ak erfolgte über den sogenannten *mixed hemadsorption assay* (Carey et al., 1976) bzw. *immune adherence assay* (Garrett et al., 1977) mittels gebundener Erythrozyten im Lichtmikroskop. Um zu prüfen, ob Tumorzell-bindende Ak auch an Zellen anderer Tumoren oder Normalgewebe banden, wurde das betreffende Serum in aufwendigen Präadsorptionstests mit diesen Gewebearten vorinkubiert und die primär erkannten Tumorzellen im Anschluss getestet. Gemeinsame Ag führten zur Depletion der spezifischen Ak aus dem Serum und entsprechend negativem Ergebnis der nachfolgenden Inkubation mit den primär positiven Tumorzellen. Auf diese Weise konnten bereits drei Klassen von Ag nachgewiesen werden; Ag der Klasse I, deren Expression auf autologe Tumorzellen beschränkt war (tumorspezifische Ag), Ag der Klasse II, die auf autologen und allogenen Tumorzellen, nicht aber auf normalen Zellen vorkamen (*shared* Tumor-Ag) und Ag

der Klasse III, die sowohl auf malignen als auch auf benignen Zellen von Mensch und Tier gefunden wurden (Auto-Ag). Ag der letzten Gruppe wurden am häufigsten beobachtet. Auf diese Weise wurden maligne Melanome (Carey et al., 1976; Shiku et al., 1976; Shiku et al., 1977), Leukämiezellen (Garrett et al., 1977), Hirntumore (Pfreundschuh et al., 1978) und Nierenzellkarzinome untersucht. Allerdings konnten insgesamt nur wenige Ag identifiziert werden; ihre molekulare Charakterisierung war nicht möglich.

Nachweis von Serum-Antikörpern gegen zytotoxische T-Lymphozyten- oder monoklonale Antikörper-definierte Tumor-Ag

Anfang der 90er Jahre wurde erstmals nach Serum-Ak gegen Tumor-Ag gesucht, die primär mit Hilfe von CTL oder monoklonalen (m)Ak identifiziert worden waren, so zum Beispiel gegen p53, HER-2/neu und c-myc bei Patienten mit Bronchial-, Mamma- bzw. kolorektalem Karzinom (Schlichtholz et al., 1994). Mittels klassischer immunologischer Methoden wie *Western Blotting* und ELISA wurden bei einem großen Teil der Patienten Ak gegen die rekombinanten Tumor-Ag nachgewiesen. Im Rahmen dieser Studien wurde erstmals der Gedanke laut, die spezifischen Ak zur Tumorfrüherkennung oder zur spezifischen Immuntherapie von Tumoren zu verwenden.

1.6.4. Das SEREX-Verfahren

Durch die Kombination molekularer Klonierungstechniken mit der autologen Typisierung wurde 1995 von der Arbeitsgruppe um Ugur Sahin, Özlem Türeci und Michael Pfreundschuh das SEREX-Verfahren entwickelt (Sahin et al., 1995). Diese serologische Strategie verfolgt die molekulare Charakterisierung von Tumor-Ag durch Expressionsklonierung aus cDNA-Banken unter Nutzung des Ak-Reservoirs von Tumorpatienten.

Aus einer frischen oder kryokonservierten Tumorprobe wird zunächst eine cDNA-Bibliothek hergestellt, und diese in Expressionsvektoren auf der Basis von lytischen λ -Bakteriophagen kloniert. Mit den rekombinanten Phagen werden *E. coli*-Bakterien infiziert, und in diesen die rekombinante Expression der Tumorproteine induziert. Die rekombinanten Proteine werden auf Nitrozellulose übertragen. Dort werden sie mit verdünntem und gegen Bestandteile des Vektorsystems präadsorbiertem, autologen Patientenserum inkubiert. Klone, die hochtitrige IgG-Serum-Ak gebunden haben, können nun mit einem zweiten, gegen den Fc-Teil humanen IgGs gerichteten und Enzym-gekoppelten Ak mittels einer Farbreaktion nachgewiesen

werden. Über die Anfärbung der rekombinanten Proteine eines Klons auf der Nitrozellulose kann der entsprechende Plaque auf der Bakterienkulturplatte identifiziert, und aus diesem über einfache Klonierschritte die entsprechende Tumor-cDNA isoliert und schließlich sequenziert werden.

Vorteile und Limitationen des SEREX-Verfahrens

Die SEREX-Methode ist durch folgende Eigenschaften charakterisiert (Preuss et al., 2002; Türeci et al., 1997):

- i) Da keine Zellkulturen und präetablierten CTL benötigt werden, können auch Tumorarten untersucht werden, die nicht *in vitro* kultiviert werden können.
 - ii) Durch Verwendung nativen oder kryokonservierten Tumormaterials werden *in vitro* Artefakte wie Ag-Verlust oder -Neoexpression, wie sie im Verlauf von Zellkulturen vorkommen können, ausgeschlossen. Die Ergebnisse repräsentieren das *in vivo* relevante Ag-Set.
 - iii) Das Patientenserum wird in einer Verdünnung von mindestens 1:100 verwendet, dadurch werden nur IgG-Ak mit relativ hohem Titer bzw. nur solche Ag nachgewiesen, die höchstwahrscheinlich von THL erkannt wurden.
 - iv) Die cDNA-Bibliothek repräsentiert die gesamte mRNA der Tumorzellen. Dadurch wird, im Gegensatz zur autologen Typisierung, bei der nur Oberflächenantigene analysiert werden, ein breiteres Spektrum an Proteinen getestet.
 - v) Das gleichzeitige Vorliegen von rekombinantem Protein und cDNA im lytischen Plaque erlaubt die direkte Sequenzierung der gefundenen Ag.
 - vi) Die Freisetzung von periplasmatischen Proteinen während der Phagen-induzierten Bakterienlyse erlaubt zumindest eine teilweise Faltung der rekombinanten Proteine und ermöglicht somit die Identifikation von linearen und nicht linearen Epitopen.
 - vii) Die gewebsspezifische Verteilung eines gefundenen Ag kann auf der Basis der cDNA-Sequenz mittels Northern Blot und/oder Reverser Transkription und Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) analysiert werden.
 - viii) Die cDNA-Bibliothek kann dergestalt modifiziert werden, dass das Screening zum Beispiel auf amplifizierte Gene oder CT-Ag fokussiert wird.
- Allerdings kann SEREX nicht das gesamte Ag-Spektrum eines Tumors erfassen. Glykosylierte Epitope oder Epitope, die während der Expression in Bakterien strukturelle Veränderungen durchmachen, entgehen der Entdeckung. Außerdem werden Ag, die keine Ak-Antwort hervorrufen, verpasst.

SEREX-definierte Antigene

Mit SEREX wurde eine Fülle von Ag gefunden, teilweise auch solche, die früher bereits von CTL erkannt worden waren (Türeci et al., 1996; van der Bruggen et al., 1991). Dies bestätigte die integrierte Arbeitsweise des Immunsystems, das auf Ag mit einer kombinierten B-Zell- und T-Zell-Antwort reagiert. Die Vielzahl von identifizierten Ag lässt sich aufgrund ihrer Expressionseigenschaften und molekularen Alterationen in folgende Klassen einteilen:

CT - Ag: Diese sind Mitglieder von Multigenfamilien und liegen auf dem X-Chromosom. Sie werden zu den tumor-assoziierten Antigenen gerechnet, da sie sich in einer Reihe von menschlichen Malignomen, jedoch, bis auf den immunologisch geschützten Hoden, nicht in Normalgeweben finden. Zu dieser Ag-Gruppe zählen zum Beispiel HOM-MEL-40 (Türeci et al., 1996), MAGE-1 (De Smet et al., 1996), HOM-TES-14 (Türeci et al., 1998) und NY-ESO-1 (Chen et al., 1997). Die Aktivierung dieser Gene in Tumorzellen steht zumindest in einigen Fällen in Zusammenhang mit einer Genom-Demethylierung, was die Bindung von Transkriptionsfaktoren erleichtert (De Smet et al., 1996).

Differenzierungsantigene: Diese Ag sind zelltypspezifisch, d. h. sie kommen auf Tumorzellen und verwandten normalen Zellen bestimmter Entwicklungsstufen gleichermaßen vor, zum Beispiel das vom *Tyrosinase*-Gen kodierte Ag auf Melanomen und Melanozyten (Brichard et al., 1993), oder HOM-GLIO-2.4, ein Gliafibrillenprotein, das in einem Astrozytom nachgewiesen wurde (Pfreundschuh, 2000).

Mutierte Genprodukte: Dazu zählt zum Beispiel die mutierte Version des p53 Tumorsuppressors im kolorektalen Karzinom (Scanlan et al., 1998).

Fusionsprodukte: Sie resultieren aus einer chromosomalen Translokation (Obata et al., 2000).

Spleissvarianten: Auf Tumorzellen beschränkte Spleissvarianten, unter Umständen mit Einbeziehung von Intronsequenzen (Bilbe et al., 1992; Scanlan et al., 1998).

Überexprimierte Ag: Sie sind nicht strikt tumorspezifisch, aber im Vergleich zu Normalgeweben durch verstärkte Transkription oder Genamplifikation stark überexprimiert. Dadurch überschreiten sie die Toleranzschwelle des Immunsystems und werden immunogen (Brass et al., 1997; Brass et al., 1999; Türeci et al., 1997). In diese Gruppe fallen die meisten der bisher mit SEREX detektierten Tumor-Ag.

Virale Ag: Darunter fällt zum Beispiel das env-Protein des Retrovirus HERV-K-10, das in einem Nierenzellkarzinom gefunden wurde (Ono et al., 1986).

Tumor-abhängige Autoantigene: Diese werden in gesunden und malignen Geweben in ähnlichem Ausmaß exprimiert, führen aber nur bei Tumorpatienten zu einer Immunantwort

(Pfreundschuh, 2000). Der Grund dafür könnten posttranslationale Modifizierungen oder Änderungen in der Ag-Prozessierung und -Präsentation sein (Skipper et al., 1996).

Nicht Tumor-abhängige Autoantigene: Deren Immunogenität und Expression sind unabhängig von neoplastischen Erkrankungen (Pfreundschuh, 2000).

1.6.5. Tumorantigene von Hirntumoren

In den letzten Jahren stellte sich heraus, dass einige Tumor-Ag, die ursprünglich in extrakraniellen Krebszellen gefunden worden waren, auch in menschlichen Hirntumoren vorkommen, zum Beispiel die CT-Antigene MAGE-E1 in menschlichem Gliomen (Sasaki et al., 2001), SSX-2, SSX-4, HOM-TES-14 und MAGE-3 in Astrozytomen, SART-1 in malignen Gliomen und Schwannomen (Imaizumi et al., 1999) sowie MAGE-1, MAGE-3, GAGE-1 und GAGE-3 in MB (Scarcella et al., 1999). Zusätzlich wurden durch die SEREX-Technologie in verschiedenen Hirntumoren weitere Tumor-Ag identifiziert, zum Beispiel GFAP, Bax-Inhibitor I, Ran-binding protein-2, SP40,40, TCP-1 und Calnexin in Astrozytomen (Schmits et al., 2002) oder GLEA-2 und PHF-3 in Glioblastomen (Fischer et al., 2001; Struss et al., 2001).

Eine SEREX-Analyse von typisch pädiatrischen malignen Hirntumoren war zu Beginn dieser Arbeit nicht publiziert worden; eine kurz zuvor gestartete Analyse eines kleinzelligen MB zeigte allerdings bereits vielversprechende Ergebnisse. In der vorliegenden Arbeit sollte die SEREX-Methode deshalb zum ersten Mal auf ein großzelliges MB einer fünfjährigen Patientin angewendet werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Antibiotika

Tetrazyklin (SIGMA, # T 7660):	Stammlösung :	10 mg/ml in 70% EtOH (lichtgeschützt bei - 20°C)
	Gebrauchslösung :	15 µg/ml
Ampicillin (MERCK, # 1.00278):	Stammlösung :	10 mg/ml in 70% EtOH
	Gebrauchslösung :	50 µg/ml
Kanamycin (SIGMA, # K-4000):	Stammlösung :	10 mg/ml H ₂ O
	Gebrauchslösung :	50 µg/ml

2.1.2. Bakterien

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

SOLR™ (Fa. Stratagene, # 200298)

2.1.3. Chemikalien

Biomol, Hamburg:

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

Stammlösung : 50 mg/ml (in 100% DMF)

Gebrauchslösung : 1:2000 (in 1× CDS)

Nitroblue Tetrazoliumchloride (NBT), (# 06428):

Stammlösung : 100 mg/ml (in 70% DMF)

Gebrauchslösung : 1:2000 (in 1× CDS)

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

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

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

5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid (X-Gal), (# 300201 (1 g))

Stammlösung : 250 mg/ml in DMF 99%

Dianova, Hamburg:

Sekundär-Ak: AP-gekoppelter anti-human IgG-Fc-Ak aus der Ziege

Fermentas, St. Leon-Rot:

Gene Ruler™ 1kb DNA Ladder (# SM 0311)

6 x Loading Dye Solution (# 0611)

Gibco BRL:

Agarose (# 15510-027)

Select Agar (# 30391-023)

Select Peptone 140, (# 30392-021)

Select Yeast Extract (# 30393.020)

Invitrogen, Carlsbad, USA:

100 mM dNTP Set PCR Grade (# 10297-117)

Gene Ruler™ 1kb DNA plus Ladder (# 1241400)

Agarose, Electrophoresis Grade (# 15510-027)

Merck, Darmstadt:

Chloroform (zur Analyse, # 1.02445)

Ethanol absolut (# 1.00983.2500)

Ethidiumbromid (# 1.11608.0030)

Glycerin 87% (zur Analyse, # 1.04094)

HCl 32% (zur Analyse, # 1.00319)

Kaliumchlorid (# 1.04936)

Natriumazid (reinst, # 106688): Stammlösung : 10%

Gebrauchslösung: 0,0125%

NaCl (# 1.06404.5000)

NaOH (# 6498)

Natriumhydrogenphosphat (# 1.06586)

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (# 1.08382.2500)

Nestle, Frankfurt:

Glücksklee Magermilchpulver (Deutschland AG, Reformhaus)

Sigma, Steinheim:

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

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

Gebrauchslösung : 1:200 (in TBS)

Maltose, (# M-5885):

Stammlösung: 20%

Gebrauchslösung : 0,2%

MgSO₄ - 7 H₂O, (# M-5921):

Stammlösung: 1 M (steril)

Gebrauchslösung: 0,01 mM

Thimerosal (# T 2299):

Stammlösung: 10%

Gebrauchslösung: 0,0125%

Stratagene, La Jolla, USA

Ethylenediaminetetraacetic acid-disodium salt (EDTA), (# 300071)

2.1.4. Elektrophoresegel

3 g Agarose

200 ml TAE-Puffer, aufkochen

4 µl Ethidiumbromid

2.1.5. Enzyme

Taq DNA Polymerase (# 18038-240)

EcoRI (Stratagene, # 500480)

XhoI (Stratagene, # 501140)

2.1.6. Geräte

Analysen-Waage (Mettler)

Bakterienschüttler (New Brunswick Scientific)

Beheiztes Wasserbad, Typ WB 22 (Memert)

Brutschrank (Heraeus Instruments)

Dampfsterilisator Varioklav 300 E (H+P)

Gelelektrophoresekammer mit Powersupply (peqlab)

Kühlzentrifuge Sigma 2K15 (Sigma)
PCR-Gerät iCycler (Biorad)
Photometer, Uvikon-Spectrophotometer 922 (Bio-Tek Kontron)
Pipetus-Akku Pipettierhilfe (Hirschmann Laborgeräte)
Mikrowelle (Privileg)
Schwenktisch (IKA Labortechnik)
Standzentrifuge (Sorvall Instruments)
Rüttler, Vortex Genie 2 (Scientific Industries)
Tischwaage (Mettler)
Tischzentrifuge Centrifuge 5415C (Eppendorf)
Überkopffrotator (Heidolph)
Ultraschallhomogenisator (Branson)
UV-Transilluminator Gel Doc 2000 (Biorad)

2.1.7. Gewebe-cDNAs

Human multiple tissue cDNA panel I + II (Becton Dickinson. # 636742, # 636743)
MB-cDNA-Bibliotheken (Dr. Uta Behrends)

2.1.8. Kits

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

2.1.9. Medium

LB-Medium: 10 g Peptone
 5 g Select Yeast-Extract
 10 g NaCl
 ad 1 Liter dd H₂O, autoklavieren

LB-Tet-Platten: 7 g Select Agar
 ad 400 ml LB-Medium, autoklavieren
 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, autoklavieren
Gebrauchslösung : 52°C

2.1.10. Oligonukleotide (MWG-Biotech)

20.240_*sense*: 5'-TAGCCTTTCTGACGATCAGC-3'

20.240_*antisense*: 5'-TTATCGGGGCCATCCTTCTT-3'

2.1.11. Patientenserum

Das Patientenserum stammte von klinisch gesunden Probanden im Alter von 0-30 Jahren sowie von pädiatrischen Patienten mit MB oder anderem Malignom. Die Proben wurden nach Einwilligung der Sorgeberechtigten bzw. gesunden, erwachsenen Probanden an der Kinderklinik der Technischen Universität München entnommen.

2.1.12. Phagen

EX Assist™ (Stratagene, # 200450)

2.1.13. Puffer

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

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 ddH₂O auffüllen und mit 32%
HCl auf pH 7,5 einstellen

TBST (pH 7,5): 2 Liter TBS + 10 ml Tween 20, Tris (pH 9,5, 1 M)
120 g Tris auf 1 Liter ddH₂O (pH mit HCl)

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

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

2.1.14. Software und Datenbanken

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

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

ENSEMBL: <http://www.ensembl.org>

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

2.1.15. Tumor-cDNA-Expressionsbibliothek

Das Tumormaterial entstammte einem spinal metastasierten, großzelligen MB einer fünfjährigen Patientin. Es war während der klinisch notwendigen primären Resektion entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff asserviert worden. Aus den kryokonservierten Tumorgewebeproben war mRNA isoliert, mithilfe des ZAP cDNA Synthese Kits (Stratagene) in cDNA umgeschrieben, in den λ -Vektor Uni-ZAP XR (Stratagene) kloniert, die rekombinanten Vektoren zu Phagen verpackt (Gigapack III Gold *packaging extract*, Stratagene), und die entstandene Phagen-Primärbibliothek amplifiziert worden. Die amplifizierte Phagenbibliothek wurde von Dr. Uta Behrends zur Verfügung gestellt. Dabei enthielt die Primärbibliothek mehr als 1×10^6 Klone.

2.1.16. Verbrauchsmaterial

Faltenfilter (Durchmesser 240 mm) (S&S GmbH Dassel)

Gestopfte Pipettenspitzen (ART Molecular Bio Products)

Greiner-Petrischalen (M&B Stricker)

Nitrocellulose Blotting Membran, 0,45 μ m (Sartorius Göttingen)

Parafilm (American National Can)

Polypropylene Round-Bottom Tubes (Becton Dickinson)

Polypropylene Conical Tubes (Becton Dickinson)

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

2.2. Methoden

2.2.1. Einführung in das SEREX-Verfahren

Die von Sahin und Türeci etablierte SEREX-Methode ermöglicht erstmals die molekulare Identifikation von tumoralen Ag mit Hilfe der humoralen Immunantwort des autologen Wirts. Aus kryokonserviertem oder frischem Biopsie-Material eines Tumors wird zunächst mRNA isoliert und diese in cDNA umgeschrieben. Die so gewonnene cDNA-Bibliothek wird unidirektional in λ -ZAPII Vektoren kloniert, zu Phagenpartikeln verpackt, mit diesen in *E. coli*-Bakterien transfiziert und amplifiziert. Nach Ausplattieren der transfizierten Bakterien auf Agarplatten sind lytische Plaques auf dem Bakterienrasen zu erkennen, in denen jeweils ein rekombinantes Ag angereichert vorliegt. Diese Ag werden auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und mit autologem Serum inkubiert. Ak, die gegen die exprimierten Ag gerichtet sind, binden an den entsprechenden Stellen auf der Folie. Durch die Verwendung eines sekundären Ak, der gegen den Fc-Teil humaner IgG-Ak gerichtet und an alkalische Phosphatase gekoppelt ist, und eine anschließende enzymatische Farbreaktion lassen sich positive Klone sichtbar machen. Durch Identifikation der entsprechenden Plaques auf der Bakterienplatte können die Phagenklone isoliert, nach Monoklonalisierung in Plasmidform überführt und das inklonierte cDNA-Insert kann sequenziert werden (Abb. 1).

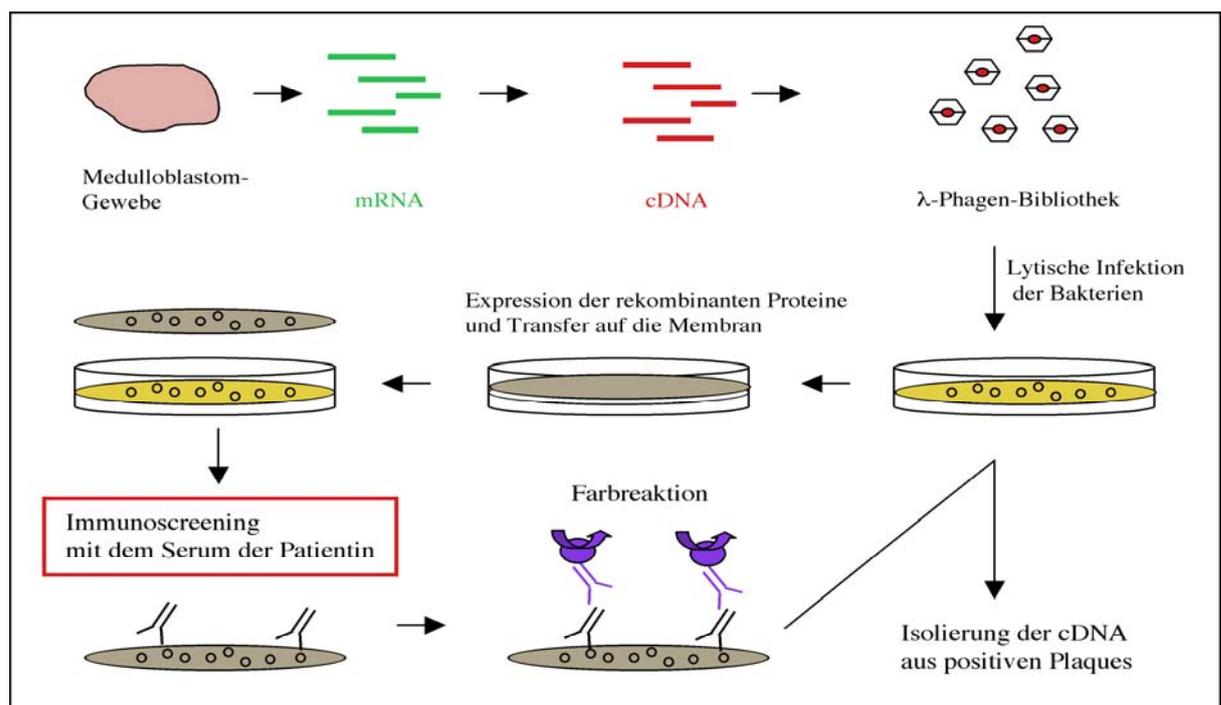


Abb. 1: Schematischer Überblick über die einzelnen Schritte des SEREX-Verfahrens

2.2.2. Präparation der bakteriellen Wirtszellen

Die verwendeten Bakterienstämme XL1-Blue MRF⁺ und SOLR waren im Stratagene *cDNA-Synthesis Kit* als Glycerolstocks enthalten. Über ihre Tetrazyklin- bzw. Kanamycinresistenz ließen sich die erforderlichen Mengen selektiv anzüchten.

Anfertigen von Glycerolstocks

Die Glycerolstocks der Bakterien wurden auf LB-Tetrazyklin-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden einzelne Kolonien in 50 ml LB Medium mit 12,5 µg Tetrazyklin auf einem Schwenktisch bis zur mittleren logarithmischen Wachstumsphase (OD₆₀₀ ca. 0,5) gezüchtet. Anschließend wurde die Bakteriensuspension für 10 min bei RT mit 1500 × g zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 5 ml LB-Medium aufgenommen, aliquotiert und mit 40 Vol% Glycerol versetzt. Die so präparierten Bakterien wurden bei - 80°C gelagert.

Präparation für den Transfektionsansatz

Ein Aliquot des Stammes XL1-Blue MRF⁺ wurde zur selektiven Anzüchtung auf einer LB-Tet-Agarplatte über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden zehn Kolonien von der Platte gepickt, in 50 ml LB-Medium mit 500 µl 20% Maltose, 500 µl 1 M MgSO₄ und 75 µl Tetrazyklin-Stammlösung angeimpft und auf einem Horizontalschüttler bei 37°C gezüchtet. Maltose und MgSO₄ erleichterten später die Phagenanheftung an die Bakterien. Als die Bakterien die exponentielle Wachstumsphase (OD₆₀₀ = 0,5-0,9) erreicht hatten, wurde die Kultur 10 min bei 500 × g zentrifugiert. Das Pellet wurde in sterilem 0,01 M MgSO₄ resuspendiert und auf eine OD₆₀₀ von 0,5 eingestellt.

Die Bakterienlösung war bei 4°C gelagert drei Tage zu gebrauchen und musste danach wieder frisch hergestellt werden. Ebenso wurde die Bakterienstammpalte jede Woche erneuert, indem eine einzelne Kolonie von der alten Stammpalte auf einer neuen LB-Tet-Platte ausgebracht und diese über Nacht bebrütet wurde.

Transfektion mit λ-Bakteriophagen

Die XL1-Blue MRF⁺ Bakterien wurden, wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, für die Transfektion vorbereitet. Pro Transfektionsansatz wurden 600 µl der Bakteriensuspension 0,01 M MgSO₄ (OD₆₀₀ = 0,5) mit einer geeigneten Menge der Phagenlösung (< 250 µl)

vermischt, zur optimalen Phagenanheftung 15 min bei 37°C inkubiert, und schließlich mit 6 ml Topagar (im Wasserbad bei 52°C flüssig gehalten) auf vorgewärmte (37°C) LB-Tet-Platten ausgebracht. Wenn eine Proteininduktion erwünscht war, wurden dem Ansatz 30 µl Isopropylthiogalactosid (IPTG) zugesetzt. Wenn ein *Blue-White*-Test geplant war, wurden außerdem 50 µl 5-Brom-4-Chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid (X-Gal) zugegeben (vgl. Kapitel 2.2.6). Die Platten wurden nach Festwerden des Topagars ca. 6-8 Stunden über Kopf bei 37°C bebrütet. Die lytischen Plaques sollten einen endgültigen Durchmesser von ca. 2 mm haben.

2.2.3. Herstellen der cDNA-Expressionsbibliothek

Die in dieser Arbeit verwendete primäre cDNA-Expressionsbibliothek eines MB der oben beschriebenen 5-jährigen Patientin war freundlicherweise von Dr. Uta Behrends zur Verfügung gestellt worden. Sie enthielt ca. 1×10^6 rekombinante Phagen (*plaque forming units*, pfu). Aus einer kryokonservierten Gewebeprobe war mit Hilfe des messenger RNA Isolation-Kit (Stratagene) mRNA isoliert und diese mittels des ZAP-cDNA® *synthesis kit* in cDNA umgeschrieben und unidirektional in den λ-Phagenvektor Uni-ZAP XR kloniert worden. Die rekombinante λ-Phagen-DNA war anschließend mittels des *Gigapack® III Gold cloning Kit* zu funktionellen Phagen verpackt, und der Phagengehalt der primären Bibliothek nach Transfektion in den Bakterienstamm XL1-Blue MRF^c ermittelt worden. Dieses Vektorsystem vereinte hohe Effizienz in der Konstruktion einer λ-Phagen-Bibliothek mit der Bequemlichkeit eines Plasmidsystems mit *Blue-White*-Selektion (Vgl. Kapitel 2.2.6). Der Uni-ZAP XR-Vektor konnte DNA-*inserts* bis zu einer Größe von 10 kb aufnehmen. Das in ihm enthaltene pBluescript® Phagemid (Abb. 2) konnte durch *in vivo* Exzision herausgeschnitten und nach Transfektion in den Bakterienstamm SOLR aufgereinigt und sequenziert werden. Die *multiple cloning site* (MCS) befand sich innerhalb des β-*Galactosidase*-Gens, welches durch Einklonierung von Fremd-cDNA unterbrochen und damit funktionslos wurde, was die Unterscheidung rekombinanter und nicht rekombinanter Phagen erlaubte.

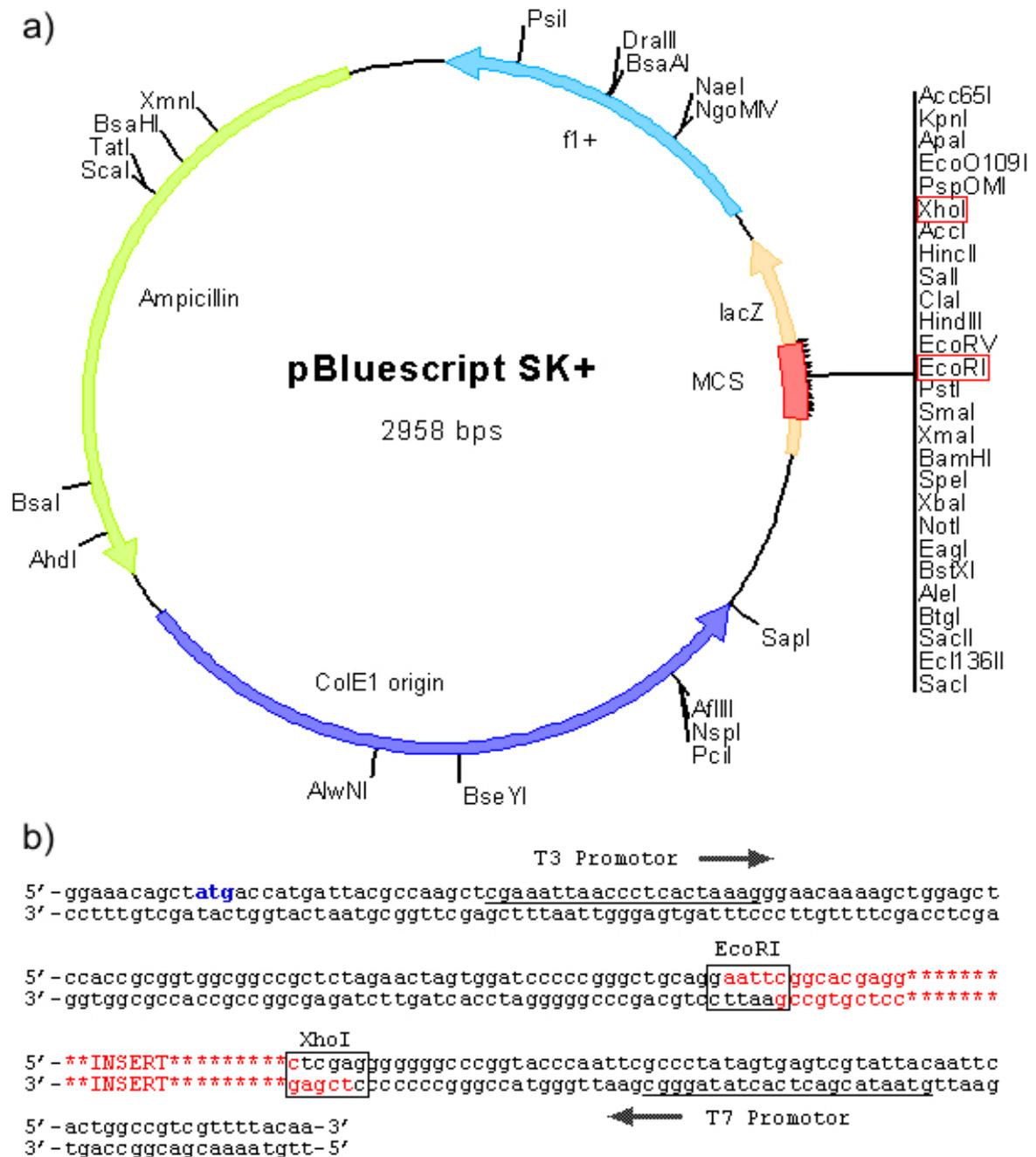


Abb. 2:

Zirkuläre Vektorkarte (a) und Polylinkersequenz (b) des pBluescript® SK+ Phagemids (2958 bp)

(a) **Vektorkarte:** Ampicillin (bp 1975-2832): Ampicillinresistenz für antibiotische Selektion des Phagemids, f1 (+) origin (bp 6-462): Replikationsstartpunkt für den filamentösen Phagen, ColE origin (bp 1032-1912): Replikationsstartpunkt des Plasmids, wird bei Abwesenheit von Helferphagen benutzt, *LacZ*-Gen (lac Promotor: bp 816-938): Dieser Teil des *lacZ*-Gens ermöglicht die *Blue-White*-Selektion von rekombinanten Phagen. Der induzierbare *lacZ*-Promotor stromaufwärts des *lacZ*-Gens erlaubt die Expression eines Fusionsproteins mit dem β -Galaktosidasegenprodukt, MCS (bp 657-759): *multiple cloning site*, flankiert von den T3- und T7- RN-Promotoren. Rechts in der Spalte sind die verschiedenen Enzymschnittstellen dargestellt, die in der Arbeit verwendeten Schnittstellen von XhoI und EcoRI sind rot umrandet.

(b) **Polylinkersequenz:** Blau dargestellt ist das ATG-Startcodon des Vektors, unterstrichen der T3- und der T7-Promotor sowie rot die Lage des inklonierten Inserts.

2.2.4. Titerbestimmung der cDNA-Bibliothek

600 µl der Bakteriensuspension wurden wie in Kapitel 2.2.8. beschrieben mit je 10 µl verschieden verdünnter Phagenlösungen ($1:10^2$ - $1:10^6$ mit 0,01 M $MgSO_4$) transfiziert und auf vorgewärmte LB-Tet-Agarplatten gegossen. Nach 6-8 h Bebrütung bei 37°C wurden die pfu auf zwei bis drei Platten, auf denen die Plaques nicht zu dicht lagen, ausgezählt und der Mittelwert für den Titer der Phagenlösung berechnet.

2.2.5. Amplifikation der cDNA-Bibliothek

Die primäre cDNA-Bibliothek wurde zur Herstellung eines titerstabilen Stocks mit Anreicherung seltener Transkripte amplifiziert. Dazu wurden je 5×10^4 pfu der primären cDNA-Bibliothek mit 600 µl Bakteriensuspension wie in Kapitel 2.2.8. beschrieben auf frisch gegessene Agarplatten ausplattiert und über Nacht bis zu einer Größe der einzelnen Plaques von 1 mm Durchmesser bebrütet. Die Platten wurden anschließend mit jeweils 6-8 ml SM-Puffer überschichtet und über Nacht auf einem Schwenktisch inkubiert, um die Phagen aus den Plaques zu lösen. Am nächsten Tag wurden die Phagensuspensionen von den Platten abgenommen und gepoolt. Durch Hinzufügen von 5 Vol% Chloroform wurden die Bakterien abgetötet. Nach Abzentrifugieren des Zelldebris bei $2000 \times g$ für 10 min wurde der Überstand mit den Phagen, mit 0,3 Vol% Chloroform versetzt und bei 4°C gelagert. Von der so gewonnenen Phagensuspension wurde wiederum der Titer bestimmt, und ein Aliquot mit 7 Vol% DMSO versetzt und bei - 80°C asserviert.

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

Die MCS des λ -ZAP II Vektors war im *lacZ*-Gen lokalisiert, das für das Enzym β -Galaktosidase kodiert. Die Induktion dieses Genes erfolgte durch Zugabe von IPTG, das den lac-Repressor durch Konformationsänderung vom Promotor löste. Bei Expression bewirkte das Enzym β -Galaktosidase den Abbau des Lactoseanalogons X-Gal zum dunkelblauen Reaktionsprodukt 5,5-Dibrom-4,4-Dichlorindigo. Bei rekombinanten Klonen war das *lacZ*-Gen durch die aus dem Tumor stammende einklonierte DNA unterbrochen, ihnen fehlte also

die Enzymaktivität der β -Galaktosidase. Sie bildeten nach Induktion weiße lytische Plaques auf der Agarplatte, während Klone ohne Insert blau erschienen.

Zu 600 μ l Arbeitslösung von XL1-Blue MRF['] wurden ca. 3000 pfu der cDNA-Bibliothek gegeben und 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 einer LB-Tet-Agarplatte ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Ligationseffizienz ließ sich anhand der weissen Plaques im Verhältnis zur Gesamtzahl der lytischen Plaques bestimmen. Bei ausreichender Kloniereffizienz sollte der Anteil rekombinanter, weisser Plaques mehr als 9/10 der gesamten Plaquemenge ausmachen.

2.2.7. Präadsorption der Seren

Die Präadsorption der Seren gegen *E. coli*- und Phagen-Ag war notwendig, um Ak zu depletieren, die an Bestandteile des Vektorsystems banden und auf diese Weise zu einer starken Hintergrundfärbung geführt hätten.

Gewinnung nicht-rekombinanter Phagen

Auf der *Blue-White*-Agarplatte (Vgl. Kapitel 2.2.6.) wurde eine blaue Phagenkolonie ausgestochen und in 500 μ l SM-Puffer 1 h stark geschüttelt. Zelldebris und Agarreste wurden bei 13000 rpm in einer Tischzentrifuge abgetrennt. Der Überstand mit den enthaltenen Phagen wurde mit 20 μ l Chloroform versetzt und bei 4°C aufbewahrt.

Herstellung der Adsorptionssäulen

50 ml einer Übernachtskultur XL-1 Blue MRF['] wurden bei RT mit 1500 \times g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 5 ml TBS gelöst und mit einem Ultraschallhomogenisator 5 - 8 sec auf Eis sonifiziert und damit 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. Diese Lösung lysierter Bakterien wurde, ebenfalls mit dem Ultraschallhomogenisator, weiter aufgeschlossen. Beide Ansätze wurden jeweils in ein mit 2 ml Kieselgel (Glutaraldehyd aktivierte Silikatmatrix) gefülltes Falconröhrchen gefüllt und für

4 h bei RT oder über Nacht bei 4°C in einem Überkopfroter gedreht. Dabei wurden die Bakterien- bzw. Phagenbestandteile der einzelnen Kulturen an die Säulenmatrix gebunden. Nach Abnehmen der Bakteriensuspension wurden die Säulen gewaschen (3 × 30 min mit 35 ml TBS/0,01% Na-Azid) und standen als sogenannte „mechanische“ bzw. „lytische“ Säulen für die Präadsorption zur Verfügung.

Herstellung von lytischen Folien

600 µl einer Arbeitslösung von XL1-Blue MRF' wurden mit nicht rekombinanten Phagen transfiziert, auf einer LB-Tet-Agarplatte ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Plaques sollten den Bakterienrasen möglichst durchlysieren. Die Proteine wurden auf eine Nitrozellulosefolie übertragen. Nach Waschen und Blocken der Folien wie in Kapitel 2.2.8. beschrieben konnten sie sofort zur Präadsorption verwendet oder trocken aufbewahrt werden.

Präadsorption des Patientenserums

Das Serum wurde 1:10 mit 0,2% Magermilchpulver in TBS verdünnt und à 20 ml auf eine der vorbereiteten Säulen gegeben. Jedes Serum wurde jeweils 6-12 h nacheinander mit einer lytischen und einer mechanischen Säule inkubiert. Anschließend wurde es auf einem Schwenktisch bei RT jeweils 4 h mit fünf lytischen Folien in Folge inkubiert. Darauf folgte die Verdünnung auf eine Konzentration von 1:100 mit 0,2% Magermilchpulver in TBS und die Konservierung mit 0,025% Na-Azid und 0,025% Thimerosal. Bei Lagerung im Kühlschrank bei 4°C konnte das Serum mehrere Wochen verwendet werden, einmal im Monat mussten zum Schutz vor Keimwachstum erneut 0,025% Na-Azid hinzugegeben werden.

Die gebrauchten Säulen wurden je dreimal eine halbe Stunde mit Tris pH 3 eluiert, mit TBS äquilibriert und bei 4°C aufbewahrt. Sie konnten noch zwei weitere Male für neues Serum desselben Patienten verwendet werden.

2.2.8. Screening: Plaque-Assay

Transfektion, Induktion der rekombinanten Proteinsynthese und Proteinübertragung auf Nitrozellulose

600 µl der Bakteriensuspension wurden mit einer geeigneten Menge (ca. 3000 pfu/Ansatz) der Phagenlösung 15 min bei 37°C unter wiederholtem leichten Schwenken inkubiert. Zu diesem Ansatz wurden 6 ml auf 52°C vorgewärmter Top-Agar und 30 µl IPTG-Stammlösung gegeben. Nach dem Ausplattieren auf vorgewärmte Agarplatten wurden diese über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die Plaques sollten idealerweise einen Durchmesser von 2 mm haben. Daraufhin wurde eine zurechtgeschnittene und beschriftete Nitrozellulosefolie luftblasenfrei aufgelegt, und ihre Position auf der Platte mittels mehrerer Einstiche mit einer Kanüle markiert. Die Membranen wurden für einen optimalen Proteintransfer 2 h im Brutschrank auf den Platten belassen.

Immunfärbung

Nach 30 min bei 4°C ließen sich die Folien gut abziehen und wurden in TBS-T gesammelt. Die Asservierung der Platten erfolgte bei 4°C. Auf einem Schwenktisch wurden die Folien 30 min in TBS-T geschüttelt, Agarreste danach mit den Fingern sorgfältig abgestreift. Anschließend wurden die Folien weitere 15 min in frischem TBS-T gewaschen. Die folgende Inkubation mit 5% Magermilchpulver in TBS für 1 h bewirkte das Blocken unspezifisch bindender Reste der Nitrozellulosefolie. 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 präadsorbierten, 1:100 verdünnten Patientenserum inkubiert. Am nächsten Morgen wurde das Serum abgenommen, über einen Faltenfilter gereinigt und wieder bei 4°C asserviert. Die Folien wurden 3 × 10 min in jeweils frischem TBS geschüttelt, danach wieder auf einzelne Petrischalen verteilt und für 1-2 h bei RT mit dem sekundären Ak (1:2500 verdünnt in 0,5% Magermilchpulver in TBS) überschichtet und sanft geschüttelt. Nach weiteren zwei Waschschrritten zu je 15 min in TBS erfolgte die Immunfärbung. Der sekundäre Ak gegen das Fc-Fragment des Serum-IgG war mit alkalischer Phosphatase gekoppelt. Im alkalischen Milieu (pH 9,5-10,5) setzte das Enzym das Reaktionsprodukt 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat (BCIP) zu einem Niederschlag von Indigo um. Das ebenfalls zugesetzte Tetrazoliumbromid wurde bei dieser Reaktion zum purpurfarbenen Diformazan reduziert und fungierte als Farbverstärker. Die Entwicklung mit

den beiden Farbstoffen erfolgte bei 37°C im Dunkeln, um einen lichtinduzierten Eigenumsatz der Substrate zu vermeiden. Durch Abspülen mit ddH₂O wurde die Reaktion bei ausreichender Färbung nach ca. 2 h beendet.

2.2.9. Charakterisierung der positiven Klone

Isolierung

Die auf der Folie angefärbten Klone ließen sich mit Hilfe der Einstichmarkierungen von der Folie auf die Agarplatte zurückverfolgen. Der entsprechende Plaque auf der Agarplatte wurde, wenn möglich, einzeln (monoklonaler Ausstich) und ansonsten gemeinsam mit negativen Nachbarplaques aus dem Agar ausgestochen (polyklonaler Ausstich). Das Agarstück wurde in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß mit 500 µl SM-Puffer überschichtet und eine Stunde stark geschüttelt, um die Phagen zu lösen. Monoklonal gestochene positive und negative Klone wurden separat eluiert. Anschließend wurde 30 sec bei RT und 13000 × g zentrifugiert, der Überstand abgenommen, mit 25 µl Chloroform versetzt und geschüttelt. In diesem Zustand konnte die Phagenlösung bei 4°C aufbewahrt werden, wurde vor Gebrauch aber nochmals kurz zentrifugiert.

Ausschluss von IgG-Klonen und Färbeartefakten

In jedem durchbluteten Tumorgewebe finden sich B-Zellen, die IgG-mRNA exprimieren. Einige der Phagenklone trugen also cDNA-Inserts mit IgG-Sequenzen. Wenn diese Sequenzen für den Fc-Teil des IgG kodierten, band das rekombinante Protein den sekundären Ak direkt, wurde daraufhin angefärbt, und der Klon erschien auf der Folie falsch positiv. Um IgG-kodierende von Ag-kodierenden Klonen unterscheiden zu können, wurde der Klon in *Plaque-Assays* sowohl mit als auch ohne Serum (nur mit TBS) eingesetzt. Rekombinante Ag waren nur nach Inkubation mit Serum sichtbar, während IgG in beiden Fällen eine Anfärbung zeigten.

Desweiteren konnten Färbeartefakte auftreten: Der ausgestochene Klon entsprach in diesem Fall weder einem IgG noch einem Ag. Die Färbung auf der Folie war durch Randeffekte, Falten oder Verunreinigung zustande gekommen. Artefakte waren dadurch zu erkennen, dass sowohl mit Serum als auch mit TBS inkubierte Membranen negativ waren oder ein Gemisch

aus vermeintlich positivem und negativem Klon gleich stark und damit unspezifisch gefärbt war.

Zum Ausschluß von IgG und Färbeartefakten wurden die neu gewonnenen Phagenlösungen 1:10² und 1:10³ verdünnt und à 10 µl in den Transfektionsansatz für je einen *Plaque-Assay* eingesetzt. Wenn der positive Klon auf der Platte monoklonal gestochen worden war, musste nicht-rekombinanter Phage als Kontrolle hinzugemischt werden. Vor der Zugabe von Serum bzw. TBS wurde die abgezogene Nitrozellulosefolie eines jeden Klons halbiert und je eine Hälfte mit Serum bzw. mit TBS inkubiert. Nach der Färbung konnten die fraglichen Klone beurteilt werden.

Monoklonalisierung

Der Ausschluss von IgG-Klonen oder Artefakten und die Vereinzelung positiver Klone liefen in einem Schritt ab. Bei einer der gewählten Verdünnungen war es in der Regel möglich, einen innerhalb eines polyklonalen Gemisches einzeln liegenden positiven Klon auszustechen. Das Agarstück wurde wie oben beschrieben weiterbehandelt, und der Titer der positiven Phagenlösung wie in Kapitel 2.2.4. beschrieben bestimmt. Vor weiteren Arbeitsschritten wurde die Monoklonalität einer so gewonnenen Phagenlösung durch einen weiteren *Plaque-Assay* mit Serum bestätigt. Alle Plaques mussten dann auf der Folie gleich stark angefärbt sein.

2.2.10. Subklonierung durch „*in vivo excision*“

Einführung

Um das Tumorantigeninsert weiteranalysieren und sequenzieren zu können, benötigte man die DNA des rekombinanten Vektors in reiner Form. Der große λ-Vektor (Uni-ZAP-XR) war für die Konstruktion der cDNA-Bibliothek gut geeignet, weil er in seiner MCS Fremd-DNA mit einer Länge von bis zu 10 kb aufnehmen konnte und eine hohe Klonierungseffizienz besaß, d. h. dass die verschiedenen Tumor-cDNAs mit hoher Wahrscheinlichkeit in der Phagen-Bibliothek repräsentiert waren. Ausserdem machte das Infektions- und Lyseverhalten des Phagenvektors die Suche nach rekombinanten Proteinen relativ einfach. Für die Aufreinigung der Tumor-cDNA war der Phagenvektor dagegen schlecht geeignet, weil die Isolierung so großer extrachromosomaler DNA-Moleküle sehr aufwendig, die Ausbeute gering und die

Reinheit für Restriktionsanalysen und Sequenzierung ungenügend ist. Kleinere Plasmidvektoren (hier: pBluescript) lassen sich dagegen mit hoher Ausbeute in reiner Form von der bakteriellen DNA trennen.

Das Klonierungssystem von Stratagene kombinierte die Vorteile von λ -Phagen und pBluescript-Vektoren. Das Tumor-cDNA-Insert war in einen kleinen Bereich der großen λ -ZAP-DNA einkloniert worden, der die kompletten Sequenzen eines pBluescript-Vektors enthielt und über die sogenannte ‚*in vivo excision*‘ von jener kopiert werden konnte. Diese Kopie konnte mit Hilfe von filamentösen (f1) Helferphagen erfolgen. Wenn XL1-Blue MRF⁺-Bakterien mit rekombinanten λ -Phagen und diesen f1-Phagen koinfiziert wurden, erkannten die f1-Replikationsenzyme auf dem Uni-ZAP-XR-Vektor je ein Start- und ein Stoppsignal und replizierten einen Bereich, der den Sequenzen des pBluescript-Vektors samt einklonierter Tumor-DNA entsprach. Die einzelsträngigen DNA-Kopien wurden dann zirkularisiert, in Hüllproteine verpackt und als rekombinante f1-Phagen aus der Zelle sezerniert. Eine Abtrennung dieser rekombinanten Helferphagen von λ - und nicht-rekombinanten Helferphagen konnte man durch eine Passage im *E. coli*-Stamm SOLR erreichen. Die λ -Phagen konnten nicht in SOLR eindringen, weil diese zu den λ -resistenten *E. coli*-Stämmen gehörten. Die nicht-rekombinanten Helferphagen konnten sich in SOLR nicht vermehren, weil ihr Genom eine sogenannte *amber*-Mutation trug, die von SOLR nicht unterdrückt werden konnte (*non suppressor*). Aufgrund des Ampicillin-Resistenz-Gens in der pBluescript-DNA konnten die mit rekombinanten Helferphagen infizierten SOLR selektiv angezüchtet, und einzelne Kolonien für die Plasmidpräparation gepickt werden.

Arbeitsprotokoll

Je eine Kolonie der beiden Stämme XL1-Blue MRF⁺ und SOLR (Kanamycin statt Tetrazyklin) wurde separat in LB-Tet-Medium (5 ml LB-Medium, 50 μ l 20% Maltose, 50 μ l 1 M MgSO₄, 7,5 μ l Tetrazyklin) bzw. 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. Am nächsten Tag wurden beide Bakteriensuspensionen 5 min bei 1000 \times g zentrifugiert, das Pellet mit 0,01 M MgSO₄ resuspendiert und auf eine OD₆₀₀ von 1,0 eingestellt.

Zu 200 μ l der Arbeitslösung von XL1-Blue MRF⁺ wurden 250 μ l unverdünnte Phagenlösung eines positiven Klons und 1 μ l „EX-Assist“ Helferphage gegeben, und der Ansatz für 15 min bei 37°C unter leichtem Schwenken inkubiert. Nach Hinzufügen von 3 ml vorgewärmten LB-

Tet-Medium wurde 3 h bei 37°C auf einem Schwenktisch inkubiert. Der Infektionsansatz wurde für 20 min auf 70°C erhitzt und danach 15 min bei 1000 × g zentrifugiert. Der Überstand, der die exzidierten pBluescript-Phagemide enthielt, wurde asserviert.

In einem Doppelansatz wurden je 200 µl der SOLR-Arbeitslösung mit 10 bzw. 100 µl dieses Überstandes vermengt, 15 min bei 37°C inkubiert und dann auf eine LB-Amp-Platte ausplattiert. Die am nächsten Morgen erkennbaren Ampicillin-resistenten Kolonien enthielten den pBluescript-Vektor mit dem zu charakterisierenden Insert. Die Platte konnte mit Parafilm abgedichtet bei 4°C aufbewahrt werden.

2.2.11. DNA-Präparation und Analyse

Mini-Präparation von Plasmid-DNA

Dieses Verfahren diente der Schnellaufreinigung von Plasmid-DNA (modifizierte alkalische Lyse nach Birnboim und Doly, 1979). Die DNA war sauber genug für Restriktionsanalysen, nicht jedoch für Klonierungen oder Sequenzierung.

Zu Beginn wurden vier Kolonien auf der SOLR-Platte gepickt, die mit Hilfe der ‚*in vivo exzidierten*‘ Phagemide hergestellt worden war (Vgl. Kapitel 2.2.10.), und die Bakterien über Nacht in separaten Schüttelkulturen in 5 ml LB-Amp-Medium bei 37°C angezchtet. Am nächsten Tag wurden 1,5 ml jeder Kultur in einer Tischzentrifuge 5 min bei RT mit 8000 rpm zentrifugiert. Zum chemischen Aufbrechen der im Pellet befindlichen Bakterienzellen wurden nacheinander 100 µl P1 (50 mM Sucrose, 25 mM Tris pH 8, 10 mM EDTA) und 100 µl P2 (1% SDS, 0,2 M NaOH) hinzugegeben, und zusätzlich 1 µl Ribonuclease, um RNA-Moleküle abzubauen. Anschließend wurden mit 100 µl P3 (600 ml 5 M KOAc pH 5,3, 115 ml Eisessig, ddH₂O ad 1 Liter) die Proteine gefällt. Die chromosomale Bakterien-DNA haftete den Bakterienproteinen an, konnte also, solange sie intakt war, mit diesen abzentrifugiert werden. Deshalb durfte in den vorhergehenden Arbeitsschritten nicht stark geschüttelt werden, um sie nicht zu zerstören. Nach Zentrifugation mit ca. 13000 rpm für 20 min bei RT wurde der Überstand in ein neues Gefäß überführt und die Plasmid-DNA durch 750 µl 100% EtOH gefällt. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation mit 15000 rpm sedimentiert, in einem kopfüber gestelltem Eppendorfgefäß kurz angetrocknet und in 100 µl 1 × TE pH 7,5 wieder aufgelöst. Die mäßig reine DNA konnte jetzt in Restriktionsanalysen eingesetzt werden, die einer groben Abschätzung der Größe und evtl. Redundanz der cDNA-Inserts dienen. Alle

Klone mit eindeutig verschiedenem Restriktionsmuster wurden mit Hilfe der Maxi-Präparation aufgearbeitet, und die einklonierten cDNA-Inserts sequenziert.

Maxi-Präparation von Plasmid-DNA

Die Plasmid-Maxi-Präparation mit Hilfe eines Kits der Firma Qiagen ergab gegenüber der oben beschriebenen Mini-Präparation DNA höherer Reinheit, wie sie für die nachfolgende Sequenzierung benötigt wurde.

Ausgangsmaterial waren 400 μ l einer „Mini-Präp“-Kultur in 400 ml LB-Amp Medium, die über Nacht bei 37°C auf einem Schwenktisch inkubiert wurden. Daraufhin wurde 15 min mit 6000 \times g bei 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 10 ml P1 vollständig resuspendiert. Nach Zugabe von 10 ml P2 ließ man den Ansatz 5 min bei RT stehen. Die Zugabe von 10 ml vorgekühltem P3 bewirkte die Ausfällung der Proteine in weißen Flocken, die durch Zentrifugation mit 30000 \times g für 30 min bei 4°C und anschließende Filtration durch Gaze abgetrennt werden konnten. Der Überstand wurde sofort auf eine mit 10 ml Puffer QBT äquilibrierte Qiagen-Tip-20 Säule gegeben, die Plasmid DNA band hierbei an die Säulenmatrix. Nach zweimaligem Waschen der Säule mit je 30 ml Puffer QC wurden die Plasmide mit 15 ml Puffer QF eluiert. Die Fällung der DNA erfolgte durch Zugabe von 10,5 ml Isopropanol und Zentrifugation bei 15000 \times g für 30 min bei 4°C. Das Pellet wurde zweimal vorsichtig mit je 5 ml 70% EtOH gewaschen und wieder abzentrifugiert (15000 \times g, 10 min, 4°C). Nach Verwerfen des EtOH wurde das Pellet luftgetrocknet und in 400 μ l sterilem ddH₂O gelöst. Die Konzentration der DNA-Lösung wurde im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt.

DNA-Restriktionsanalyse

Die Plasmid-DNA wurde durch Restriktion mit verschiedenen Enzymen, für die sich eine Schnittstelle in der MCS fand, analysiert. Im Falle einer einzigen Schnittstelle in der MCS wurde das Plasmid linearisiert, und es entstand ein einziges Fragment mit der Größe von Vektor (2,9 kb) plus Insert. Wenn mit Enzymen wie EcoRI und XhoI gearbeitet wurde, deren Schnittstellen das Insert 5' bzw. 3' flankierten, fiel das Insert aus dem Vektor heraus. Wenn sich darüberhinaus unbekannte Schnittstellen für die eingesetzten Enzyme im Insert befanden, entstanden zusätzliche Fragmente.

Es wurden 1 µg der Plasmid-DNA (aus Mini- oder Maxipräp), je 1 µl des jeweiligen Enzyms, 2 µl des entsprechenden Puffers und 2 µl 1:10 verdünnter BSA-Puffer mit ddH₂O auf ein Endvolumen von 20 µl aufgefüllt. Diese Restriktionsansätze wurden für 1-2 h bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 3 µl Ficoll- Blaumarker wurden die Ansätze ebenso wie 0,5 µg des Längenstandards auf ein ethidiumbromidhaltiges 1,5%-iges TAE-Agarosegel aufgetragen. Nach erfolgter elektrophoretischer Auftrennung konnte man die ethidiumbromidmarkierten DNA-Fragmente auf einem UV-Transilluminator erkennen und fotografieren. Durch Vergleich mit den Banden des Längenstandards ließ sich die Größe des Inserts abschätzen.

Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde von der Firma Sequiserve in Vaterstetten, Deutschland, durchgeführt. Nach Bestimmung der DNA-Konzentration einer Plasmidpräparation wurden davon 20 µl auf eine Konzentration von mindestens 0,1 µg/µl eingestellt und zum Sequenzieren mit den firmeneigenen T3- und T7-Primern geschickt. Wenn es sich um ein Fragment mit einer Länge von mehr als 1000 bp handelte, waren in der Regel zusätzliche Sequenzierungen mit spezifischen Primern notwendig, die anhand der ermittelten Sequenz ausgesucht worden waren.

Die Bezeichnung der erhaltenen Sequenzen erfolgte analog zu bereits veröffentlichten SEREX-Ag mittels des Standortes des Labors (MU), des Tumortyps (MB), der internen Labornummer des Tumors (20) und der Nummer der Platte, auf der der Klon gefunden wurde.

2.2.12. Homologierecherche

Die GenBank-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) und die SEREX-Datenbank (<http://www.licr.org/SEREX.html>) wurden mit Hilfe Computer-gestützter Recherchen nach Homologien zu den gefundenen Tumor-cDNA-Sequenzen durchsucht. Signifikante cDNA-Homologie wurde als mehr als 98%-ige Übereinstimmung über eine Länge von mehr als 100 bp definiert. In der vorliegenden Arbeit gefundene neue Sequenzen wurden in die GenBank eingespeist, die entsprechenden Zugangsnummern sind in **Tab. 2** angegeben.

2.2.13. Heterologe Serumanalyse

Die Ag-kodierenden Phagen wurden ca. 1:10 mit Phagenbibliothek verdünnt, und damit *E. coli* XL1-Blue MRF'-Bakterien infiziert. Der anschließende *Plaque-Assay* wurde wie in Kapitel 2.2.8. beschrieben durchgeführt, bis auf die Tatsache, dass 1:100 verdünntes, allogenenes Serum eingesetzt wurde. Die allogenen Serumproben stammten von 40 klinisch gesunden jungen Erwachsenen, die jünger als 30 Jahre waren, und 39 weiteren pädiatrischen Patienten mit bösartigen Erkrankungen der Kinderklinik und -Poliklinik des Städtischen Krankenhauses Schwabing und der Technischen Universität in München. Die Proben wurden nach entsprechender Aufklärung und Einverständniserklärung seitens der Patienten bzw. ihrer Erziehungsberechtigten abgenommen und verarbeitet.

2.2.14. Homologe Serumanalyse

Um den Verlauf der Titer einer Ak-Antwort gegen die Zeit und in Korrelation mit klinischen Ereignissen wie Operation, Bestrahlung, Chemotherapie, Wiederauftreten der Erkrankung oder Metastasenbildung verfolgen zu können, wurde von der untersuchten Patientin mehrmals im Abstand von ca. sechs Monaten Serum abgenommen und auf Reaktivität mit ihren positiven Klonen untersucht.

Der Titer von reaktiven Ak gegen rekombinante Klone wurde bestimmt, indem das Serum in Verdünnungsreihen von 1:10² bis 1:10⁵ wiederholt in *Plaque-Assays* getestet wurde.

2.2.15. mRNA-Expressionsanalyse mithilfe von PCR und Gewebe-cDNA

Die Analyse der mRNA Expression des Klons MU-MB-20.240 wurde mit cDNA aus Normalgeweben (MTCTM Panel I und II, BD) und vier verschiedenen MB (einschließlich des primär untersuchten) unter Verwendung folgender Oligonukleotidprimer durchgeführt:

sense: 5'-TAGCCTTTCTGACGATCAGC-3'

antisense: 5'-TTATCGGGGCCATCCTTCTT-3'

(MU-MB-20.240, AY131227, bp 1350-1369 und bp 1702-1683)

Jede PCR-Reaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 50 μl angesetzt und enthielt 5 μl MTCTM cDNA oder 3 μl Tumor cDNA-Bibliothek, 5 μl PCR-Puffer mit MgCl_2 , 1 U Platinum[®] Taq DNA Polymerase, 1 μl dNTP und je 1 μl *sense* und *antisense* Primer (10 pmol/ μl). Der initialen Denaturierung bei 95°C (1 min) schlossen sich 40 Zyklen an. Jeder Zyklus bestand aus einem Denaturierungsschritt bei 95°C (1 min) gefolgt von 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.

3. Ergebnisse

3.1. Phagenbibliothek

Um den Titer der Phagenlösung nach der Amplifikation zu bestimmen, wurden die pfu auf drei Platten ausgezählt, auf denen jeweils entweder 10 μl einer 1:10⁵ oder 5 μl einer 1:10⁴ verdünnten Phagenlösung ausgebracht worden waren. Aus der gezählten Anzahl von pfu errechnete sich ein Phagentiter von $9,5 \times 10^6$ pfu/ μl . Die amplifizierte Phagenbibliothek enthielt etwa 5×10^{10} pfu und war damit erfolgreich um mehr als das 10⁴-fache von der primären Phagenbibliothek (ca. 1×10^6 pfu) amplifiziert worden. Der *Blue-White* Test ergab ein Verhältnis von rekombinanten zu nicht rekombinanten Phagen von 100:1, was eine hohe Effizienz der Klonierung und ausgezeichnete Qualität der Phagenbibliothek anzeigte.

3.2. SEREX-Screening

Durch das Screening von ca. einer Million Phagenklone wurden insgesamt fünf verschiedene positive Klone identifiziert, von denen zwei für IgG und drei für Ag kodierten. Die Ag-Klone wurden mit MU-MB-20.201, MU-MB-20.220 und MU-MB-20.240 benannt. Die molekularen Charakteristika dieser Ag wurden tabellarisch zusammengefasst (Tab. 2) und in den folgenden Kapiteln detailliert beschrieben.

3.3. Restriktionsanalyse der positiven Klone

Um die Größe des Inserts grob abzuschätzen und evtl. redundante Klone zu identifizieren, wurde eine Restriktionsanalyse durchgeführt. Es wurden die Enzyme EcoR1 und Xho1 eingesetzt, die stromaufwärts bzw. stromabwärts der cDNA-Insertion in der MCS schnitten und somit das Insert aus dem Vektor mobilisierten. EcoR1 hatte keine Schnittstelle in den Inserts der drei Klone, führte also zu einer Linearisierung des Plasmids, wohingegen MU-MB-20.220 eine Schnittstelle für Xho1 enthielt; in der Gelelektrophorese des Doppelverdaus fanden sich folglich drei statt zwei Banden. Durch Vergleich mit dem kommerziell erworbenen DNA-Größenmarker konnten die Größen der einzelnen Fragmente abgeschätzt werden. Die Länge des Inserts von MU-MB-20.201 wurde auf ca. 2500 Basenpaare (bp), die

der Inserts von MU-MB-20.220 und MU-MB-20.240 auf ca. 1400 bzw. 1800 bp geschätzt (Abb. 3).

Bezeichnung	MU-MB-20.201	MU-MB-20.220	MU-MB-20.240
GenBank Acc. No.	AY131226	AY130010	AY131227
Chromosom	6	6	16
DNA Homologie (Acc. No.)	C6orf60 (BC009055, NM_024581)	RP4-626B19 (AL035087)	RP11-46C24 (AC009113)
cDNA Homologie (GenBank Acc. No.)	FLJ13942 (AK024004) DKFZp434B051 (AL136767)	PRDM13 (NM_021620)	NPCSP (BC017437, NM_013275, AK025964) FLJ25074 (AK057803)
cDNA Homologie (SEREX-Datenbank)	NGO-St-98 MO-TES-14		NW-TK 31 TC 70
Biologische Bedeutung	---	Tumor Suppressor?	<i>ankyrin repeat</i> Protein
Neue Charakteristika auf cDNA-Ebene	einzelne bp längeres 5'Ende	einzelne bp kürzeres 3'Ende	205 bp Deletion neue interne Sequenzen
Neue Charakteristika auf Protein-Ebene	2x D>Y Längeres Aminoende	keine	<i>frame shift</i> => Alternatives Carboxylende Langes Protein mit neuen internen Sequenzen

Tab. 2: Molekulare Charakteristika der neuen Ag und mögliche biologische Bedeutung von cDNA-Homologen in den Datenbanken

Aufgeführt sind die GenBank-Zugangsnummern der identifizierten Klone, das jeweils kodierende Chromosom sowie Homologien mit DNAs und cDNAs. Die mögliche biologische Bedeutung wurde nach Angaben von Autoren der GenBank-Einträge und durch Literaturrecherche ermittelt. Neue Charakteristika der cDNA im Vergleich zu GenBank-Homologen sind stichwortartig zusammengefasst. Die postulierten Proteinprodukte entsprechen dem größten ORF, der in allen Fällen zur vorhergesagten Proteinsequenz der am besten homologen cDNA korrespondierte.

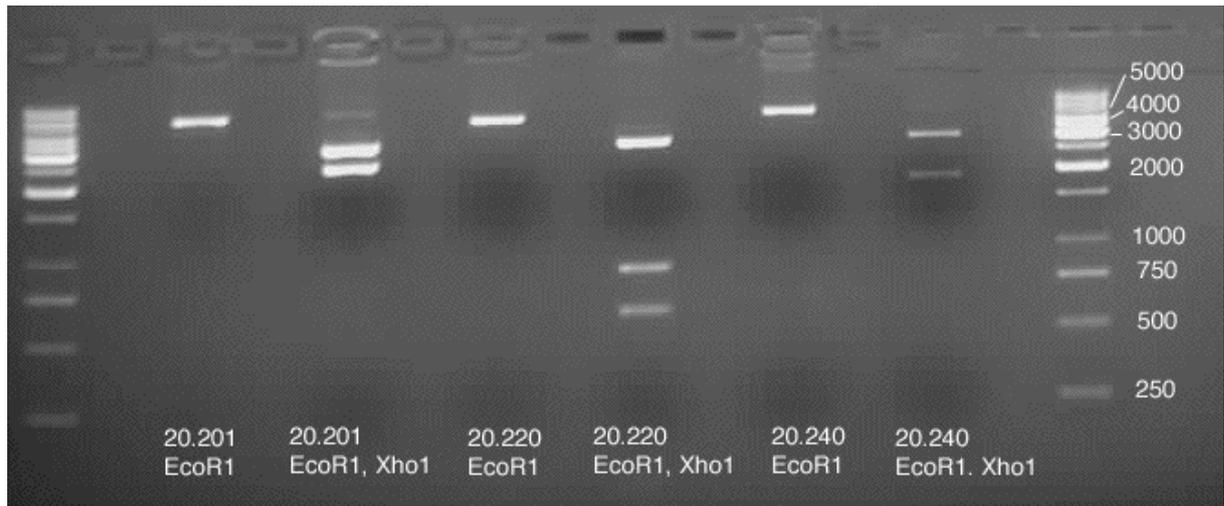


Abb. 3: Restriktionsanalyse der drei mit SEREX isolierten Phagemide

Maxi-Präparationen von MU-MB-20.201, -20.220 und -20.240 wurden jeweils mit EcoR1 bzw. EcoR1 und Xho1 geschnitten. Beim Schneiden mit EcoR1 alleine (Spalte 1, 3, 5) wurde das Plasmid linearisiert, die Bande zeigte die Größe des Plasmids (ca. 3000 bp) + Größe des Inserts. Beim Verdau mit beiden Enzymen wurden Plasmid und Insert getrennt. Bei ca. 3000 bp fand sich die Bande der Plasmid-DNA, darunter die Bande(n) des(r) Inserts. Die Größe der Inserts ließ sich etwa auf 2500 bp, 1400 bp (800 bp + 600 bp) und 1800 bp schätzen.

3.4. Sequenzanalyse

MU-MB-20.201

Die cDNA MU-MB-20.201 (AY131226) war 2345 bp lang und enthielt ab bp 2318 einen Poly-A-Schwanz (Abb. 4). Ab bp 2299 fand sich das Polyadenylierungssignal „aataaa“. Sieben ATG-definierte ORF konnten gefunden werden. Die Bezeichnung (1), (2) oder (3) ordnete die ORF einem der drei alternativen Leseraster des cDNA-Inserts zu. Der erste und längste ORF (2) war 5' inkomplett und endete an bp 2047. Er kodierte für ein Ag mit einer Größe von mehr als 681 aa. Dieser ORF lag *in frame* mit dem stromaufwärts gelegenen ATG des Vektors. Da die verbindenden Sequenzen kein *in frame* gelegenes Stoppsignal enthielten, war die Translation des Ag in *E. coli* möglicherweise am ATG des Vektors initiiert worden war. Fünf weitere ATG-definierte ORF waren wesentlich kürzer und kodierten putative Genprodukte mit einer Größe von 48 aa (bp 679-825) (1), 38 aa (bp 1848-1964) (3), 33 aa (bp 876-977) (3), 28 aa (bp 2177-2263) (2) und 21 aa (bp 123-188) (3).

```

1   ggaacttaaa aacctgcaaa gtagattgga agaggaggtg actcaattaa acgaggccca
61  ttctaagact ttggaagaat tagcttggaa gcaccatatg gcaattgaag ctgtccacag
121 taatgcaatt agggataaga aaaaactgca aatggatttg gaagaacaac ataacaagaa
181 taaactaac ctggaagagg ataaaaatca gcttcaacaa gagctagaaa acctaaagga
241 agtactggaa gacaagttga atacagccaa tcaagagatt ggccacctcc aagatatggt
301 aaggaaaagt gaacaaggtc ttggctctgc agaaggactt attgctagtc ttcaggactc
361 ccaggaaaag cttcagaatg agcttgactt gactaaagac agcctaaagg agaccaagga
421 tgctctatta aatgtggagg gtgagctaga acaagaaagg caacagcatg aagaaacaat
481 tgctgccatg aaagaagaag agaagctcaa agtggacaaa atggcccatg acttagaaat
541 taagtggact gaaaatctta gacaagagtg ttctaaactt cgtgaagagt taaggcttca
601 acatgaagag gataagaagt cagcaatgtc tcaacttttg cagttgaaag atcgagagaa
661 aaatgcagca agagattcat ggagagaaga agtagaagat ctcttaaacc agatttcctt
721 gctgaaacag aatctggaga tacagctttc ccagtctcag acttctttgc aacaactgca
781 agcccagttt acgcaagaac gacagcggct tacgcaagag ctgagaagaat tagaggagca
841 acatcagcaa agacacaaat cattaaaaga agcacatgtc cttgcatttc aaactatgga
901 agaggaaaag gaaaaggagc aaagagctct tgaaaatcat ttacaacaga agcattctgc
961 agagcttcaa tcactaaaag atgcacacag agagtcaatg gagggcttcc ggatagaaat
1021 ggaacaggaa cttcagactc ttcggtttga attagaatat gaaggaaaagg ctatgcttgc
1081 ttccttgccg tcagaactca accatcaaca tgcagctgca attgatttgt tacggcataa
1141 tcatcatcaa gaattggcag ctgctaaaat ggaattagag agaagcatag acatcagcag
1201 aagacagagt aaggagcaca tatgtagaat tacagatcta caagaggaat taagacacag
1261 agagcatcac atctctgaat tgtataagga ggttcagcac cttcatgaga atataagtgc
1321 cctaaccaaa gaactggaat ttaaggggaa agaaattctc agaatacгаа gtgaatctaa
1381 ccaacagata aggttgcatt aacaagattt aaacaagaga cttgaaaaag agttggatgt
1441 catgacagca gaccacctca gagagaaaaa tatcatgctg gcagatttta ataagactaa
1501 cgagctactc aaggaaataa atgccgcttt acaagtgtca ttagaagaaa tggaaagaaa
1561 atatctaagt agagaatcaa aaccagaaga tatacagatg attacagaat taaaagccat
1621 gcttacagaa agagaccaga tcataaagaa actaattgag gataataagt tttatcagct
1681 ggaattagtc aatcgagaaa ctaacttcaa caaagtgttt aactcaagtc ctactgttgg
1741 tgttattaat ccattggcta agcaaaagaa gaagaatgat aaatcaccaa caaacagggtt
1801 tgtgagtgtt cccaatctaa gtgctctgga atctggtgga gtgggcaatg gacatcctaa
1861 ccgctggat cccattccta attctccagt ccacgatatt gagttcaaca gcagcaaacc
1921 acttccacag ccagtgccac ctaaagggcc caagacattt ttgagtctctg ctcagagtga
1981 agcttctcca gtggcttctc cagatcccca gcgccaggag tggtttgccc ggtacttccac
2041 attctgaaag aattgtgttg gcacagctct gtatagactg ttactaagag catgacttta
2101 tacagattgt tatgtaaata ggctttccta tgtcaaacac tgtgaatgag aaagtatttg
2161 tctctccaac ttgaaaatgc actgtatttc ctgtgatatt tattggaatc attctataag
2221 gtactatatt atgtgtgtaa ttataactgt tatttttatt tgagatggaa gagtctttaa
2281 cctttgtaat tactgcataa taaattttgt tagaatcaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
2341 aaaaa

```

Abb. 4: Sequenz der MU-MB-20.201 mRNA (AY131226)

Gezeigt ist die 2345 bp lange mRNA-Sequenz der MU-MB-20-201. Sie enthielt ein Polyadenylierungssignal (aataaa) (bp 2299-3004) und ein Stoppsignal (tga) (bp 2045-2047), welches *in frame* mit dem stromaufwärts gelegenen Vektor-ATG lag und den längsten ORF terminierte. Fünf weitere ATG-definierte ORF wurden durch kursiv gezeichnete Start- (grün) und Stop- (rot) Signale markiert und kodierten putative Genprodukte mit einer Größe von 48 aa (bp 679-825) (1), 38 aa (bp 1848-1964) (3), 33 aa (bp 876-977) (3), 28 aa (bp 2177-2263) (2) und 21 aa (bp 123-188) (3).

MU-MB-20.220

Die cDNA MU-MB-20.220 (AY130010) bestand aus 1453 bp, einschließlich eines Polyadenylierungssignals „aataaa“ ab bp 1413 und eines Poly-A-Schwanzes ab bp 1431 (**Abb. 5**). Es fanden sich vier offene Leserahmen. Der erste und längste (2) war 5' inkomplett und endete an bp 628. Er kodierte ein mehr als 208 aa großes Ag und lag *in frame* mit dem stromaufwärts gelegenen Vektor-ATG. Da die verbindenden Sequenzen kein *in frame* gelegenes Stoppsignal enthielten war die Translation des Ag in *E. coli* möglicherweise am ATG des Vektors initiiert worden war. Zwei weitere ATG-definierte ORF waren wesentlich kürzer und kodierten putative Genprodukte mit einer Größe von 130 aa (3) (bp 261-656) und 72 aa (1) (bp 1154-1372).

```

1   cagcgggcct gcagcggccg ccctaagccc cgcgagctg gggtcgctgg ccagcatcga
61   ccgagagatc gccatgcaca atcagcagct gtccgagatg gctgccggga agggtcgctg
121  acgcctggac tcggggacgt tgccaccggc cgtcgcggcg gcgggaggca ccggggcgcg
181  cggcagcggg ggcagcggcg caggtaagcc caagaccggc cacctgtgcc tctactgtgg
241  caagctgtac tcgcgcaagt atggggctcaa gatccacatg cggacgcaca cgggctacaa
301  gccactcaag tgcaaagtct gtctgcggcc cttcggcgac cccagcaatc tcaacaagca
361  catccggctg cagcccagg gcaatacgcc ctaccgctgc gaggttctgc gcaagggtact
421  tgtgcgccgc cgggacctgg agcgacatgt caagtcccgc caccctggcc agagtctgct
481  cgccaaagcg ggcgacggcc cgggtgccga gcccggtat ccccgaggc ctggggatcc
541  caagagcgac gacagtgacg tggacgtctg cttcacagac gaccagagcg accccgaggt
601  tggggggcgc ggggagcgcg acttgtaacg agtcttccc ggaagggcg gggtaggac
661  agagaggagt cgagggttta ttctgcagt agaggaactc ctggtggtgg gaagagggac
721  ccaatggaca aagccgtttt tgttttgag agggcgccag atttgaaca gtgagaggtc
781  ccacatctgg tgctgaaact cagagcaaca gttcagaggt ggcgtaaatc tggccacctg
841  gagagctcga gtgccaccag tacctccgca cccgggctc ctggacttct tggatgagct
901  caccctgaac cgcccaggcg gtctgctctt ggtgttcaga atcacatcaa tgcgaacgct
961  acagcgcctt cgagggcgca gattttaact gccacgtatt ttaagtgtg acttttctgt
1021 ggaggaaatt gtgccttttg aaccgacgtt ttgtgtgtg atttcacgtt agcatttcat
1081 tgcataggca aaacactagt cacaattggg tagatgtgac atccatatac ttgtttacat
1141 tttatctggt ctatgtcaa agactactcc ttgcccatt gaatatatag tggtagcagg
1201 tgtacaaatt ggtcaagttg caattattha tgagagaata atgataaatg taaaatatct
1261 aaagcatgaa tctaagagca cgcaatataa aattttaag aaaatattct atttggtaga
1321 atacaaatgt ggtgtgtgtt gttttataat gactgctgta cagtgggtat agtatttttg
1381 ttttggttcc agattgtgca atctttaaga aaaataaaga tacaaacgag aaaaaaaaaa
1441 aaaaaaaaaa aaa

```

Abb. 5: Sequenz der MU-MB-20.220 mRNA (AY130010)

Gezeigt ist die 1453 bp lange mRNA-Sequenz der MU-MB-20-220. Sie enthielt ein Polyadenylierungssignal (aataaa) (bp 1413-1418) und ein Stoppsignal (taa) (bp 626-628), welches *in frame* mit dem stromauswärts gelegenen Vektor-ATG lag und den längsten ORF terminierte. Zwei weitere ATG-definierte ORF wurden durch kursiv gezeichnete Start- (grün) und Stop- (rot) Signale markiert und kodierten putative Genprodukte mit einer Größe von 130 aa (bp 261-656) (3) und 72 aa (bp 1154-1372) (1).

MU-MB-20.240

Die cDNA MU-MB-20.240 (AY131227) enthielt 1833 bp und ab bp 1827 einen Poly-A-Schwanz (Abb. 6). In diesem Fall konnte kein Polyadenylierungssignal detektiert werden, so dass die Möglichkeit erwogen wurde, dass der bei der Reversen Transkription eingesetzte Poly(T)-Primer artifiziell an eine Adenosin-reiche interne Region der mRNA gebunden hatte. Dazu passend war der erste und längste ORF (1) 5' und 3' inkomplett und *in frame* mit dem stromaufwärts gelegenen Vektor-ATG positioniert, sowie mit einem ATG innerhalb der gezeigten Sequenz (bp 13-15). Er kodierte ein Produkt von mehr als 611 aa Länge. Ein zweiter ATG-definierter ORF (2) kodierte für nur 18 aa (bp 329-385), und ein dritter, wiederum 3' inkompletter (1) ORF für 44 aa (bp 1690->1833).

```

1   tctataccca aaatggaggt taaaagttac actaaaaata acacgattgc accaaagaaa
61   gcgtcccatc gtatcctgtc agacacgtcg gacgaggagg acgcgagtgt caccgtgggg
121  acaggagaga agctgagact ctccggcacat acgatattgc ctggtagtaa gacacgagag
181  ccttctaata ccaagcagca gaaggaaaaa aataaagtga aaaagaagcg aaagaaagaa
241  acaaaaggca gagaggttcg cttcggaaaag cggagcgaca agttctgtct ctcggagtcg
301  gagagcaggt cctcagagag tggggaggat gacagggact ctctggggag ctctggctgc
361  ctcaaggggt ccccgctggt gctgaaggac ccctccctgt tcagctccct ctctgcctcc
421  tccacctcgt ctcacgggag ctctgccgcc cagaagcaga accccagcca cacagaccag
481  cacaccaagc actggcggac agacaattgg aaaaccatct cttccccggc ttggtcagag
541  gtcagttctt tatcagactc cacaaggacg agactgacaa gcgagtctga ctactcctct
601  gagggctcca gtgtggaatc gctgaagcca gtgaggaaga ggcaggagca caggaagcga
661  gcctccctgt cggagaagaa gagccccttc ctgtccagcg cggagggcgc tgtccccaaa
721  ctggacaagg aggggaaagt tgtcaaaaaa cataaaacaa aacacaaaca caaaaacaag
781  gagaagggac agtgttccat cagccaagag ctgaagttga aaagttttac ttacgaatat
841  gaggactcca agcagaagtc agataaggct atactgttag agaatgatct ttccactgaa
901  aacaagctaa aagtgttaaa gcacgatcgc gaccacttta aaaaagaaga gaaacttagc
961  aaaatgaaat tagaagaaaa agaattggctc tttaaagatg aaaaatcact gaagagaatc
1021 aaagacacaa acaaaagacat cagcaggtct tcccgagaag agaaagaccg ttcgaataaa
1081 gcagaaaagg agagatcgct gaaggaaaag tctccgaaag aagaaaaact gagactgtac
1141 aaagaggaga gaaagaagaa atcaaaagac cggccctcaa aattagagaa gaagaatgat
1201 ttaaaagagg acaaaatctc aaaagagaag gagaagatct ttaaagaaga taaagaaaaa
1261 ctcaaaaaag aaaaggttta tagggaagat tctgcttttg acgaatatg taacaaaaat
1321 cagtttctg agaatgaaga caccaaaatt agcctttctg acgatcagcg agatcgggtg
1381 ttttctgact tgtccgattc atcctttgat ttcaaagggg aggacagctg ggactcgcca
1441 gtgacagact acagggacat gaagacgac tctgtggcca agctcatctt ggagacggtg
1501 aaggaggaca gcaaggagag gaggcgggac agccgggccc gggagaagcg agactacaga
1561 gagcccttct tccgaaagaa ggacagggac tatttgata aaaactctga gaagaggaaa
1621 gagcagactg aaaagcataa aagtgtccct ggctaccttt cggaaaagga cgagagaagg
1681 agaagaagga tggccccgat aaggaaagga aggagaagac aaaaccagaa agatacaaaag
1741 agaaatccag tgacaaggac aaaagtgaga aatcaatcct ggaaaaatgt cagaaggaca
1801 aagaatttga taaatgtttt aaagagaaaa aaa

```

Abb. 6: Sequenz der MU-MB-20.240 mRNA (AY131227)

Gezeigt ist die 1833 bp lange mRNA-Sequenz der MU-MB-20.240. Sie enthielt kein Polyadenylierungssignal. Der längste ORF war 5' und 3' inkomplett und kodierte für ein Produkt von mehr als 611 aa Länge. Das ATG an Pos. 13-15 war *in frame* mit dem stromaufwärts gelegenen Vektor-ATG. Zwei weitere ATG-definierte ORF wurden durch kursiv gezeichnete Start- (grün) und Stop- (rot) Signale markiert und kodierten putative Genprodukte mit einer Größe von 18 aa (bp 329-385) (2) und >44 aa (bp 1690- >1833) (1).

3.5. Homologierecherche*MU-MB-20.201*

Die Homologien der cDNA MU-MB-20.201 (AY131226) zu cDNA-Einträgen in die GenBank oder SEREX-Datenbank sind in **Abb. 7** detailliert dargestellt.

Die cDNA MU-MB-20.201 war bis auf zwei Basenaustausche vollständig homolog zur 5' kürzeren und 3' um wenige Basenpaare längeren cDNA FLJ13942 (AK024004, bp 1-1845) aus Retinoblastomgewebe. Die zwei Austausche von Guanin gegen Thymin in der MU-MB-20.201 cDNA (AY131226, bp 1058 und 1283) resultierten bezüglich des längsten ORF (bp <1 - 2047), der auch das putative FLJ13942-Genprodukt kodierte, in Austauschen von Asparaginsäure (D) zu Tyrosin (Y). An diesen Positionen wich die MU-MB-20.201 cDNA von allen Homologen in den Datenbanken ab.

Von der 5' deutlich kürzeren cDNA DKFZp434B0516 aus Hodengewebe (AL136767.1) unterschied sich die MU-MB-20.201 cDNA neben dem bekannten Austausch von Guanin durch Thymin (AY131226, bp1283) durch Fehlen eines 94 bp langen Abschnittes (AY131226, bp 1965/6), der auf Chromosom 6 nicht von typischen Intron-Exon Übergängen flankiert war (www.ensembl.org). Beim Durchsuchen der SEREX-Datenbank fanden sich Homologien zu kurzen cDNAs aus Magenkarzinom- (NGO-St-98) und Hoden-Gewebe (MOTES-14), die sich an fünf bzw. drei Positionen von MU-MB-20.201 unterschieden (bp 1535, 1637/ 1693/4, 1707/8 und 1710 bzw. bp 256, 273 und 298/9).

MU-MB-20.220

Die Homologien der cDNA MU-MB-20.220 (AY130010) zu cDNA-Einträgen in die GenBank oder SEREX-Datenbank sind in **Abb. 8** dargestellt.

Die MU-MB 20.220 cDNA (AY130010) war bis auf zwei Basenaustausche vollständig homolog zur 5' und 3' um wenige Basenpaare längeren *PR-domain-containing 13* (PRDM13) mRNA (NM_021620.1). Die Austausche von Adenin durch Guanin (AY130010, bp 733) und

Cytosin (AY130010, bp 1043) lagen stromabwärts des längsten ORF (bp <1-628), der das Carboxylende des putativen PRDM13-Proteins kodierte, und hatten somit wahrscheinlich keinen Einfluss auf Proteinebene.

Stromabwärts dieser Basendifferenzen fand sich gegenüber genomischen Sequenzen (in der Abbildung nicht dargestellt) von Chromosom 6q16.1-21 in Klon HS626B19 (AL035087.20) ein zusätzlicher Austausch von Adenosin durch Guanidin (Pos. 5571, AY130010 Pos. 1236).

Es fanden sich keine Homologien zu bekannten SEREX-definierten cDNAs.

MU-MB-20.240

Die Homologien der cDNA MU-MB-20.240 (AY131227) zu cDNA-Einträgen in die GenBank oder SEREX-Databse sind in **Abb. 9** dargestellt.

Homologien fanden sich im 5' Bereich von MU-MB-20.240 zu mRNA des *nasopharyngeal carcinoma susceptibility protein* (NPCSP, NM_013275.1) aus fetalem Lebergewebe, von Pos. 1-204, zu dessen rahmenverschobener Variante (BC017437) aus Chorionkarzinomgewebe von Pos. 1-969 und zu einem Abschnitt (Pos. 973-1721) von mRNA FLJ22331fis (AK025964.1), einer dritten Variante aus Nierenepithelzellen von Pos. 1-749, die sich von den obengenannten durch einen Basenaustausch (Cytosin statt Thymin an Pos. 1049) und durch ein fehlendes Thymin (Pos. 1403/4) unterschied. Desweiteren fand sich eine Homologie zu einer SEREX-definierten cDNA aus Hodengewebe von Pos. 254-622 (NW-TK 31). Im 3' Bereich war MU-MB-20.240 homolog zu einer cDNA aus Kleinhirngewebe (FLJ25074, AK057803.1) von Pos. 1354-1826 und zu einer mittels SEREX identifizierten cDNA aus Hodengewebe (TC70) von Pos. 693-1256 mit Ausnahme einer 205 bp langen Deletion an Pos. 1670/71. Im Vergleich mit der genomischen Sequenz auf Chromosom 16 (AC103890.1, bp 103843-104049) fand sich die gleiche Deletion (in der Abbildung nicht gezeigt). Es handelte sich bei dieser Stelle nicht um eine Exon-Intron Grenze. Aus dieser Deletion resultierte eine Leserahmenverschiebung, die einen sehr großen ORF nach sich zog (<1->1833), der die ORF homologer cDNAs überlappte.

Der Sequenzvergleich der putativen Genprodukte von MU-MB-20.240 und der homologen mRNAs ist in **Abb. 10** dargestellt.

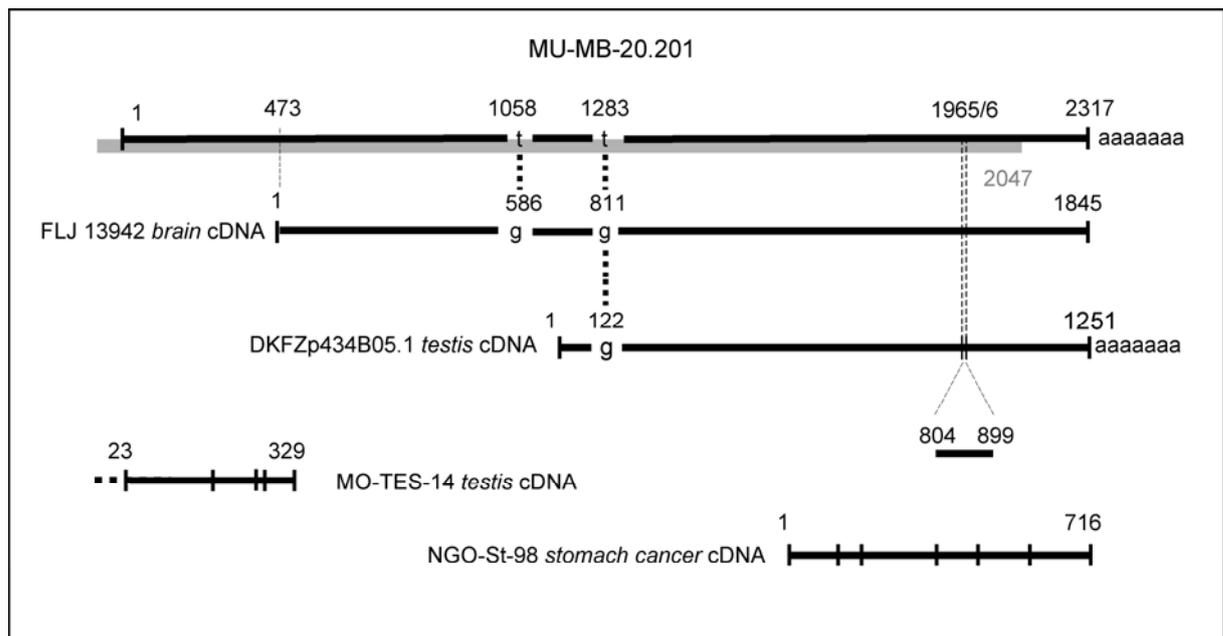


Abb. 7: Homologie der MU-MB 20.201 cDNA zu cDNAs der Datenbanken

Oben wurde das cDNA-*insert* von Klon MU-MB-20.201 vereinfacht dargestellt, der wahrscheinlichste ORF (bp <1-2047) ist grau eingetragen, aaaaaaa bezeichnet den Poly-A-Schwanz. Darunter sind die homologen cDNAs abgebildet. Die am 5' Ende kürzere cDNA FLJ13942 (AK024004) aus Retinoblastomgewebe wies an Pos. 586 und 811 jeweils ein Guanin und nicht ein Thymin wie MU-MB-20.201 auf. Ebenfalls ein Guanin an der entsprechenden Position 122 fand sich in der cDNA DKFZp434B05.1 (AL136767.1) aus Hodengewebe, daneben eine Insertion von 94 bp von Pos. 804-899. In den letzten beiden Zeilen sind Homologien zu kurzen, mit SEREX-identifizierten cDNAs aus Magenkarzinom- (NGO-St-98) und Hoden-Gewebe (MO-TES-14) aufgeführt; die kleinen senkrechten Striche markieren Basenveränderungen gegenüber MU-MB-20.201 (bp 256, 273 und 298/9 bzw. bp 1535, 1637/8, 1693/4, 1707/8 und 1710).

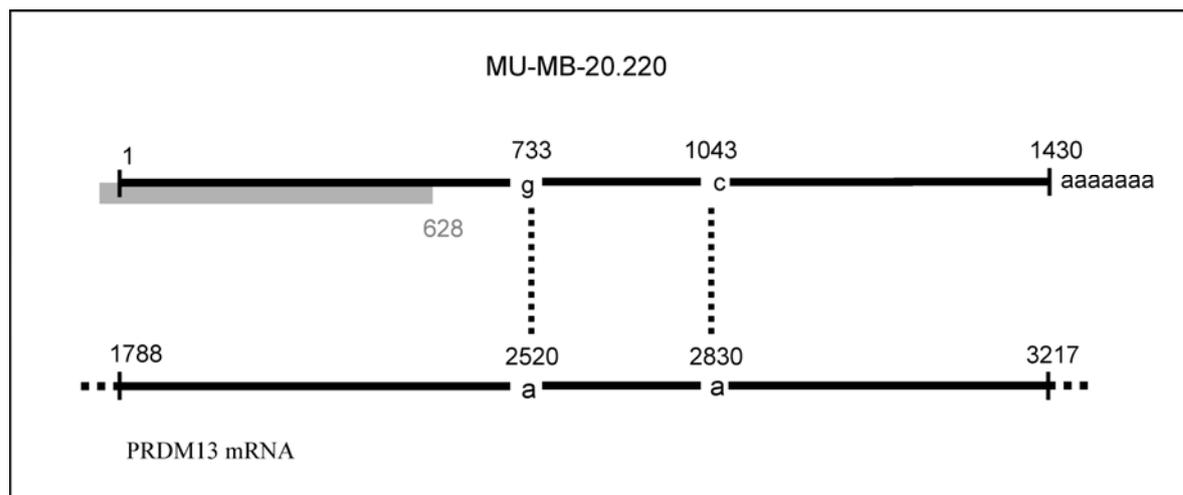


Abb. 8: Homologie der MU-MB 20.220 cDNA zu cDNAs der Datenbanken

Oben wurde der Klon MU-MB-20.220 vereinfacht dargestellt, der wahrscheinlichste ORF (bp <1-62) ist grau eingetragen, aaaaaaa bezeichnet den Poly-A-Schwanz. In der Zeile darunter ist die homologe mRNA des Tumorsuppressorkandidaten *PR-domain containing 13* (PRDM13, NM_021620.1) dargestellt. Zu beobachten war ein zweimaliger Ersatz von Adenin durch Guanin bzw. Cytosin in Pos. 73 und 104 der MU-MB-20.220 cDNA.

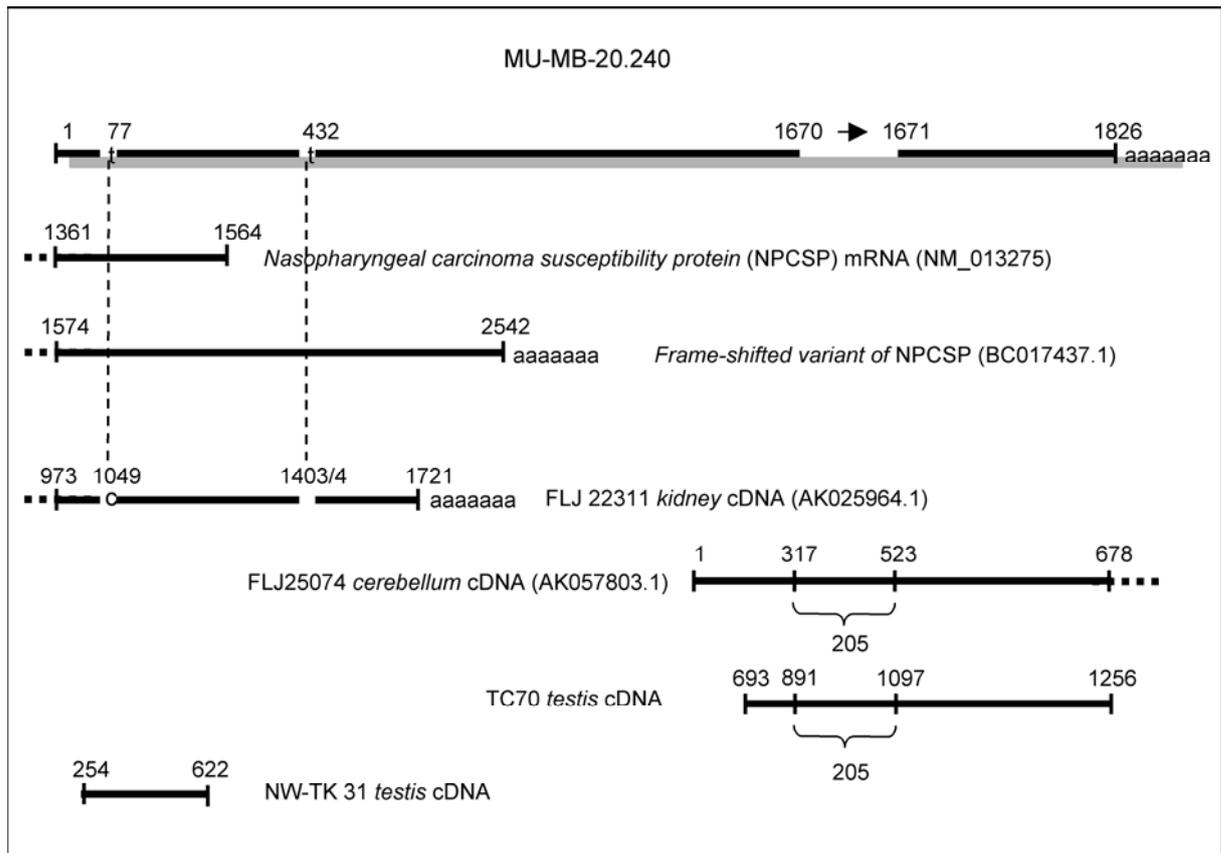


Abb. 9: Homologie der MU-MB 20.240 (AY131227) cDNA zu cDNAs der Datenbanken

Oben wurde der Klon MU-MB-20.240 vereinfacht dargestellt, der größte ORF (bp 13- >1826) ist grau eingetragen, aaaaaaa bezeichnet den Poly-A-Schwanz, der hier wohl durch *false-priming* zustande kam. In den Zeilen darunter die homologen mRNAs des *nasopharyngeal carcinoma susceptibility protein* (NPCSP, NM_013275) und seiner rahmenverschobenen Variante (BC017437.1). MU-MB-20.240 war ferner homolog zu der FLJ22311 cDNA aus Nierengewebe (AK025964.1) mit Ausnahme eines Ersatzes von Cytosin durch Thymin (AY131227, Pos. 77) und eines Thymin in Pos. 432, der keine Base in der homologen Sequenz entsprach. Im Vergleich zu FLJ25074 Kleinhirn cDNA und der SEREX identifizierte TC70 Hoden cDNA fiel in MU-MB-20.240 eine 205 bp lange Deletion in Pos. 1670/71 auf. Eine weitere Homologie zeigte sich zu der mit SEREX identifizierte NW-TK 31-cDNA aus Hodengewebe.

LZ16	MPKGGCPKAPQQEELPLSSDMVEKQTGKKDKDKVSLTK	38
LZ16-fs	MPKGGCPKAPQQEELPLSSDMVEKQTGKKDKDKVSLTK	38
LZ16	TPKLERGDGGKEVRERASKRKLPTAGANGEQKDSDEKQGPERRIKKEPVTRKAGLLFGM	100
LZ-16-fs	TPKLERGDGGKEVRERASKRKLPTAGANGEQKDSDEKQGPERRIKKEPVTRKAGLLFGM	100
FLJ22311	... TLLEAPWHEMEVPRSKKKEKQGPERRIKKEPVTRKAGLLFGM	43
LZ16	GLSGIRAGYPLS ERQQVALLMQMTAEESANSPVDTPKHPQSSTVCQKGTGPSASKTKDKLN	162
LZ16-fs	GLSGIRAGYPLS ERQQVALLMQMTAEESANSPVDTPKHPQSSTVCQKGTGPSASKTKDKVN	162
FLJ22311	GLSGIRAGYPLS ERQQVALLMQMTAEESANSPVDTPKHPQSSTVCQKGTGPSASKTKDKVN	105
LZ16	KRNERGETRLHRAAIRGDARRIKELISEGADVNVKDFAGW TALHEACNRGYDVAKQLLAA	223
LZ16-fs	KRNERGETRLHRAAIRGDARRIKELISEGADVNVKDFAGW TALHEACNRGYDVAKQLLAA	223
FLJ22311	KRNERGETRLHRAAIRGDARRIKELISEGADVNVKDFAGW TALHEACNRGYDVAKQLLAA	166
LZ16	GAEVNTKGLDDDTPLHDAANNGHYKVVKLLRLRYGGNPQQSNRKGE TPLKVANSPTMVNLL	283
LZ16-fs	GAEVNTKGLDDDTPLHDAANNGHYKVVKLLRLRYGGNPQQSNRKGE TPLKVANSPTMVNLL	283
FLJ22311	GAEVNTKGLDDDTPLHDAANNGHYKVVKLLRLRYGGNPQQSNRKGE TPLKVANSPTMVNLL	226
LZ16	LGKGYTSSEESSTESSEEDAPSFAPSSVDGNNTDSEFEKGSSTRPRTQSHRRPRPSRTSML	349
LZ16-fs	LGKGYTSSEESSTESSEEDAPSFAPSSVDGNNTDSEFEKGLKHKAKNPEPQKATAPVKDEY	347
FLJ22311	LGKGYTSSEESSTESSEEDAPSFAPSSVDGNNTDSEFEKGLKHKAKNPEPQKATAPVKDEY	290
NW-TK-31	... ESSEEDAPSFAPSSVDGNNTDSEFEKGLKHKAKNPEPQKATAPVKDEY	50
<u>MU-MB-20.240</u>	... SIPKMEVKS YTKNNTIAPKKASHRILSDTS	30
LZ16	MRTTSRTGFLRWTTSTY	366
LZ16-fs	EFDEDDEQDRVPPVDDKHLKLDYRKETKNSFISIPKMEVKS YTKNNTIAPKKASHRILSDTS	411
FLJ22311	EFDEDDEQDRVPPVDDKHLKLDYRKETKNSFISIPKMEVKS YTKNNTIAPKKASHRIPSDTS	354
NW-TK 31	EFDEDDEQDRVPPVDDKHLKLDYRKETKNSFISIPKMEVKS YTKNNTIAPKKASHRILSDTS	114
<u>MU-MB-20.240</u>	DEEDASVTVTGTEKLRLSAHTILPGSKTREPSNAKQQKEKNKVKKRKKETKGREVRFGRS	92
LZ16-fs	DEEDASVTVTGTEKLRLSAHTILPGSKTREPSNAKQQKEKNKVKKRKKETKGREVRFGRS	473
FLJ22311	DEEDASVTVTGTEKLRLSAHTILPGSKTREPSNAKQQKEKNKVKKRKKETKGREVRFGRS	416
NW-TK-31	DEEDASVTVTGTEKLRLSAHTILPGSKTREPSNAKQQKEKNKVKKRKKETKGREVRFGRS	176
<u>MU-MB-20.240</u>	DKFCSESESESESEGEDDRDSLGSGLKGSPLVLKDPFLFSSLSASSTSSHGSSAAQ KQNPSH	157
LZ16-fs	DKFCSESESESESEGEDDRDSLGSGLKGSPLVLKDPFLFSSLSASSTSSHGSSAAQ KQNPSH	538
FLJ22311	DKFCSESESESESEGEDDRDSLGSGLKGSPLVLKDPFLFSSLSASSTSGALPPRSRTPATQ	482
NW-TK-31	DKFCSESESESESEGEDDRDSLGSGLKG ...	197
<u>MU-MB-20.240</u>	TDQHTKHWRTDNWKTISSPAWSEVSSLDSTRT RLTSSESDYSSEGSSVESLKPVRKRQEHRKR	220
LZ16-fs	TDQHTKHWRTDNWKTISSPAWSEVSSLDSTRT RLTSSESDYSSEGSSVESLKPVRKRQEHRKR	601
FLJ22311	TSTPSTGGQTIGKPFPLPRLGQRSVLYQTPQGRD	515
<u>MU-MB-20.240</u>	ASLSEKSPFLSSAEGAVPKLDEKGVVKKHKTKHKHKHNEKKGQCSISQELKLSFTYEYEDS	283
LZ16-fs	ASLSEKSPFLSSAEGAVPKLDEKGVVKKHKTKHKHKHNEKKGQCSISQELKLSFTYEYEDS	664
<u>MU-MB-20.240</u>	KQKSDKAILLENDLS TENKLVKLDHDFKKEEKLSKMKLEEKEWLFKDEKSLKRIKDTNK	345
LZ16-fs	KQKSDKAILLENDLS TENKLVKLDHDFKKEEKLSKMK ...	704

<u>MU-MB-20.240</u>	DISRSFREEKDRSNKAEKERSLKEKSPKEEKLRLYKEERKKKSKDRPSKLEKKNLKDKEKISKE	409
<u>MU-MB-20.240</u>	KEKIFKEDKEKLLKKEKVYREDSAFDEYCNKNQFLENEDTKFSLSDDRWFSDLSDSDFDK	472
<u>MU-MB-20.240</u>	GEDSWDSPVTDYRDMKSDSVAKLILETVKEDSKERRRDRAREKRKYREPFRRKKDRDYLDK	534
<u>MU-MB-20.240</u>	NSEKRKE QTEKHKSVPGYLSEKDERRRRRMAPIRKGRRRQNQKDTKRNVPVTRTKVRNQSWK	595
FLJ25074	MAPIRKGRRRQNQKDTKRNVPVTRTKVRNQSWK	32
TC70	MAPIRKGRRRQNQKDTKRNVPVTRTKVRNQSWK	32
<u>MU-MB-20.240</u>	NVRRTKNLINVLKRKK . . .	611
FLJ25074	NVRRTKNLINVLKRKKIPRKNIKTHMAKTKKGKRLSTKGKRRRRRLSLGSSQKTSLKKKMTR	94
TC70	NVRRTKNLINVLKRK . . .	47
FLJ25074	KAKRKAGTSQTSSQMRVRTTE TAAWGAGSRWERPATCRGRTASRRRRKDGPRMPPTDTGSL	156
FLJ25074	LTSSTLRGRRTRSPETGERTEGLPTRGETKKRKSLSKSTRRRRIKSPQKSTRTGRTPEQWTPRKIR	220
FLJ25074	KINRSSPRLKRSTLPKTRLKANTKRSRTKNIPRRGSPREVPTRKKACLKSWKKRLSMSTKTP	284
FLJ25074	TIKSARSPLTASRTEGRSRG	304

Abb. 10: Sequenzvergleich der putativen Genprodukte von MU-MB-20.240 und homologen mRNAs

Proteinsequenzen, die sich im putativen MU-MB-20.240-Antigen und in Genprodukten von cDNA-Homologen fanden, sind grau hinterlegt. LZ16 (NP_037407.1), das Produkt der *nasopharyngeal carcinoma susceptibility protein* mRNA (NM_013275) enthielt vier *ankyrin repeats* (unterstrichen) und interagiert darüber wahrscheinlich mit anderen Proteinen. Eine Insertion von Cytosin (pos. 1195/6, NM_013275) bewirkte einen *frame shift* und die Bildung des hypothetischen Chorionkarzinomproteins LZ16-fs (*nasopharyngeal carcinoma susceptibility protein*, clone IMAGE:2962958) (BC017437). Das hypothetische Nierenprotein FLJ22311 (AK025964) leitete sich von cDNA AK025964 mit einem anderen 5'-Ende und einem fehlenden Thymidin an Pos. 2005 (BC017437) ab, was zu einem zweiten *frame shift* und zur Verkürzung im C-Terminus führte. Das hypothetische Hodenprotein NW-TK-31 stammt von einer SEREX-definierten cDNA, deren klonierter Teil 100% homolog zu MU-MB-20.240 und LZ16-fs war. MU-MB-20.240 überlappte LZ-16, LZ16fs, FLJ22311 und NW-TK31 an ihrem C-Terminus und ein hypothetisches Kleinhirnprotein FLJ25074 an seinem N-Terminus. Letzteres wurde von einem kleinen ORF kodiert, der auch in der SEREX-definierten cDNA TC70 lag. Die vorhergesagten Startcodons (*M*) in FLJ22311, NW-TK-31 und MU-MB-20.240 cDNAs wiesen kein vorhergehendes Stopcodon auf, so dass die korrespondierenden Proteine möglicherweise einen noch längeren N-Terminus hatten (...*M*). Die ORFs für NW-TK-31, TC70 und MU-MB-20.240 waren inkomplett (...), das gleiche galt für den LZ16-fs ORF (...). Ein kurzer Poly-A-Terminus ohne vorausgehendes Poly-A-Signal war hier wahrscheinlich die Folge eines *false priming* während der Reversen Transkription.

3.6. Korrelation der Antikörpertiter mit dem klinischen Verlauf

Klinische Verlaufsbeobachtung der mit SEREX untersuchten Patientin

Die 5-jährige Patientin wurde erstmals im Januar 1999 wegen morgendlichen Nüchternerebrechens ohne sonstige Infektzeichen vorgestellt. Wegen unauffälliger Befunde bei der körperlichen Untersuchung, im Labor, am Augenhintergrund und im EEG wurde das Mädchen zunächst im Sinne einer Gastroenteritis symptomatisch behandelt. Vier Tage später ergab sich bei verschlechtertem Allgemeinzustand mit andauerndem Morgenerbrechen, starken Kopfschmerzen und wechselnder Vigilanz der Verdacht auf einen erhöhten Hirndruck, der im CT bestätigt wurde.

Das CT zeigte eine infratentorielle Raumforderung in Höhe des vierten Ventrikels mit konsekutiver Liquorabflussstörung und Hirnödem. Nach externer Liquorableitung und Verdachtsdiagnose eines MB im MRT wurde der Tumor weit möglichst, aber nicht vollständig entfernt. Das postoperative MRT zeigte multiple Abtropfmetastasen im Spinalkanal. Das pathologische Gutachten ergab die Diagnose eines primitiven neuroektodermalen Tumors (pNET), der bei infratentorieller Lage als MB bezeichnet wird. Zytochemisch zeigte das Tumorgewebe eine Expression von Synaptophysin und vereinzelt von NSE.

Die geplante „Sandwich-Chemotherapie“ nach HIT-91 musste nach einer Woche wegen neurologischer Verschlechterung der Patientin mit Paresen beider Beine und des linken Armes sowie einer Fazialisparese und zerebellärem Mutismus abgebrochen werden. Bei ausgeprägter Knochenmarksdepression konnte erst zehn Tage später mit der Strahlentherapie begonnen werden. Das Ansprechen auf eine kraniospinale Bestrahlung mit 35,3 Gy und Tumoraufsättigung auf 55,2 Gy war schlecht und die neurologische Symptomatik u. a. mit Kontrollverlust für Blase und Mastdarm zunächst progredient. Erst nach mehreren Chemotherapiezyklen begann das Mädchen wieder - an der Hand geführt - zu laufen und zu sprechen. Im MRT zeigte sich nach ca. sechs Monaten eine deutliche Tumorrogression. Die Therapie war allerdings kompliziert durch eine schwere Anorexie, verschiedene Virusinfektionen und eine paraneoplastische inadäquate Sekretion von antidiuretischem Hormon (SIADH). Eine MRT-Kontrolle nach elf Monaten bzw. fünf Chemotherapiezyklen zeigte nur noch diskrete Gewebsreste zentral und spinal, allerdings traten in der Folge massiv erhöhte Leberwerte im Labor, multiple Leber-Rundherde im Sonogramm und Bauchschmerzen auf. Es handelte sich um das Auftreten einer Lebermetastasierung des MB

unter Chemotherapie. Aufgrund der infausten Prognose bei Lebermetastasen wurde die Therapie abgebrochen. Der Allgemeinzustand der Patientin verschlechterte sich rasch und sie verstarb knapp ein Jahr nach Diagnosestellung.

Titerverlauf der SEREX-Ag spezifischen Ak

Um mögliche Veränderungen der humoralen Immunantwort im Verlauf der Zeit zu erfassen, wurden der Patientin mit MB nicht nur zum Zeitpunkt der Diagnosestellung, sondern darüber hinaus nach ca. drei, sechs und neun Monaten Serumproben entnommen und mit den SEREX-definierten Klonen in *Plaque-Assays* getestet. Durch Analyse der Proben in Verdünnungen von $1:10^2$ bis $1:10^4$ wurde die maximale Verdünnung definiert, die noch zu einer Erkennung des jeweiligen Ag führte, und somit der jeweilige Ak-Titer festgelegt.

Vor Beginn der Therapie wurde das Ag MU-MB-20.201 von $1:10^3$ verdünntem Serum erkannt, -20.220 und -20.240 nur von $1:10^2$ verdünnten Proben. Die Gesamt-IgG Menge im Serum betrug zu dieser Zeit 571 mg/dl.

Nach kompletter chirurgischer Entfernung des zerebellären Tumors antworteten die multifokalen intrakraniellen und spinalen Metastasen gut auf Radio- und Chemotherapie. Damit einhergehend sanken die Titer der anti-MU-MB-20.220 und -20.240-Ak auf nicht mehr nachweisbare Werte. Gleichbleibend stark zeigten sich dagegen die Titer gegen MU-MB-20.201. Die Gesamt-IgG Menge hatte sich nicht wesentlich vermindert.

Nach einem halben Jahr war die Tumormasse durch Chemotherapie weiter deutlich reduziert worden, der Gesamt-IgG-Spiegel hatte sich wiederum kaum verändert, und die Titer der Ak gegen MU-MB-20.201 und MU-MB-20.240 waren gleichbleibend hoch bzw. nicht nachweisbar. Allerdings fiel zu diesem Zeitpunkt ein drastischer Titeranstieg der Ak gegen MU-MB-20.220 auf das Zehnfache des Ausgangswertes auf (siehe **Tab. 3**).

Drei Monate später wurden bei der Patientin Lebermetastasen festgestellt. Die Patientin verstarb wenige Wochen darauf an der progredienten MB-Erkrankung.

Zeitintervall (Monate)		0	3	6	9
Tumormasse	ZNS	+++	++	+	(+)
	Leber	-	-	-	++
Therapie		-	OP*, RT, CT	CT	CT
IgG/Serum (mg/dl)		571	497	511	n.b.
Ak-Titer	20.201	1000	1000	1000	-
	20.220	100	0	1000	-
	20.240	100	0	0	-

Tab. 3: Korrelation der Ak-Titer gegen die SEREX-definierten Ag mit klinischen Parametern

Gezeigt sind die Ak-Titer gegen MU-MB-20.201, -220 und -240 in Beziehung zu Tumormasse, Therapie und IgG-Titer im Serum im Verlauf der Erkrankung zum Zeitpunkt der Diagnose (0) sowie nach drei, sechs und neun Monaten. Die Tumormasse im ZNS wurde durch Kernspintomographie bestimmt. Die Lebermetastasen wurden sonographisch diagnostiziert. OP*=inkomplette chirurgische Tumorentfernung, RT=Radiotherapie, CT=Chemotherapie. Altersadaptierter normaler IgG-Wert: 400-1200 mg/dl. Titer gegen MU-MB-20.201 blieben im Verlauf der Erkrankung konstant bestehen. Ak gegen MU-MB-20.220 waren nach Therapie und Verkleinerung der Tumormasse nach drei Monaten nicht mehr nachweisbar, nach sechs Monaten stiegen sie auf das 10-fache des Ausgangswertes (rot), bevor nach neun Monaten Lebermetastasen festgestellt wurden. Ak gegen MU-MB-20.240 fielen nach Therapie unter die Nachweisgrenze und stiegen im Verlauf nicht wieder an.

3.7. Heterologe Serumanalyse

Um die Häufigkeit, Spezifität und Stärke der Ak-Antwort gegen die SEREX-definierten Ag zu untersuchen, wurden Seren von 40 gesunden Probanden und insgesamt 39 weiteren pädiatrischen Patienten mit MB (5), Astrozytom (2), Ependymom (2), Gliosarkom (1), Neuroblastom (4), Ewing-Tumor (4), primitivem neuroektodermalem Tumor (PNET) (1), Phäochromozytom (1), Hodgkin-Lymphom (3), Non-Hodgkin-Lymphom (3), akuter lymphatischer Leukämie (ALL) (4), Rhabdomyosarkom (5), Osteosarkom (2), Wilms-Tumor (2) und Hepatoblastom (1) getestet.

Gegen alle drei Ag wurden sowohl bei Patienten mit Krebserkrankungen als auch bei den gesunden Kontrollen Ak gefunden.

Ak gegen MU-MB-20.201 fanden sich bei elf gesunden Probanden und elf Patienten mit malignen Erkrankungen (MB (2/5), Astrozytom (1/2), Gliosarkom (1/1), Neuroblastom (2/4), PNET (1/1), Phäochromozytom (1/1), Hodgkin-Lymphom (2/3) und Rhabdomyosarkom (1/5)).

Ak gegen MU-MB-20.220 zeigten sich bei drei gesunden Probanden und insgesamt acht Patienten mit MB (3/5), PNET (1/1), ALL (2/4), Rhabdomyosarkom (1/5) und Wilms-Tumor (1/2)).

Bemerkenswerterweise fanden sich Ak gegen MU-MB-20.240 bei nur einer gesunden Kontrollperson, aber insgesamt acht Patienten mit MB (3/5), Astrozytom (1/2), Hodgkin-Lymphom (1/3), ALL (1/4), Osteosarkom (1/2) und Wilms-Tumor (1/2).

Bei einigen Tumorentitäten wurden Ak gegen SEREX-definierte Ag mit bemerkenswert hoher Häufigkeit gefunden. So kamen anti-MU-MB-20.220 und -20.240-Ak bei 3/5 der Patienten mit MB sowie anti-MU-MB-20.201-Ak bei 2/3 der untersuchten Patienten mit Hodgkin-Lymphom.

Gegen MU-MB-20.220 und -20.240 zeigten Krebspatienten (je 8/40) deutlich häufiger eine Ak-Antwort als gesunde Patienten (3/40 bzw. 1/40); im Fall der anti-MU-MB-20.201-Ak hingegen war das Verhältnis ausgeglichen (beide 11/40).

Neuroektodermale Malignome (20)				Nicht neuroektodermale Malignome (20)			
Antigen	20.201	20.220	20.240	Antigen	20.201	20.220	20.240
Medulloblastom (5)	2	3	3	Hodgkin-Lymphom (3)	2	0	1
Astrozytom (2)	1	0	1	Non-Hodgkin-Lymphom (3)	0	0	0
Ependymom (2)	0	0	0	ALL (4)	0	2	1
Gliosarkom (1)	1	0	0	Rhabdomyosarkom (5)	1	1	0
Neuroblastom (4)	2	0	0	Osteosarkom (2)	0	0	1
Ewing Tumor (4)	1	0	0	Wilms-Tumor (2)	0	1	1
Peripherer PNET (1)	0	1	0	Hepatoblastom (1)	0	0	0
Phäochromozytom (1)	1	0	0	-	-	-	-

Tab. 4: Häufigkeit von Serum-Ak gegen die SEREX-definierten MB-Ag im Kontext verschiedener Tumorentitäten

In Klammern hinter den Tumoren ist die insgesamt getestete Zahl an Patienten angegeben, in den Spalten unter den Ag MU-MB-20.201, -220 und -240 die Zahl der Patienten, die eine positive Ak-Antwort gegen die entsprechenden Ag zeigten.

Antigen		20.201	20.220	20.240
Kontrollen (40)	1:10 ²	11	3	1
	1:10 ³	6	1	0
	1:10 ⁴	5	0	0
Patienten (40)	1:10 ²	11	8	8
	1:10 ³	7	1	3
	1:10 ⁴	1	0	1

Tab. 5: Titer der Serum-Ak gegen die SEREX-definierten MB-Ag bei pädiatrischen Krebspatienten und gesunden Probanden

In der ersten Spalte ist diejenige Serumverdünnung angegeben, mit welcher die Ak-Antwort gegen die drei gefundenen Ag MU-MB-20.201, -220 und -240 untersucht wurde. In der ersten Zeile sind alle positiven Seren von Kontrollen und Patienten gelistet (Vgl. **Tab. 3**). In den folgenden ist die Anzahl aller Seren aufgeführt, die bei der angegebenen Verdünnung (1:10³ bzw. 1:10⁴) noch eine positive Antwort zeigten.

3.8. Gewebeexpression der mRNA MU-MB-20.240 und FLJ25047

Für das Ag MU-MB-20.240, das bis auf eine Ausnahme nur in Krebspatienten zu einer Ak-Antwort führte und eine neue Deletion aufwies, sollte das mRNA-Expressionsmuster untersucht und mit dem des nicht deletierten Homologs FLJ25047 verglichen werden. Um eine mögliche Tumorspezifität des neuen Ag zu erkennen, wurde sowohl eine repräsentative Sammlung von verschiedenen Normalgewebe-cDNAs als auch cDNA des autologen und drei weiterer, nicht großzelliger MB mit Hilfe der PCR untersucht. Die Ergebnisse sind in **Abb. 11** dargestellt. Die MU-MB 20.240 mRNA (Acc. No. AY131227, bp 1350-1703, 354 bp) fand sich dabei nur in dem autologen, großzelligen MB deutlich exprimiert, während in sechzehn Normalgeweben und drei anderen MB keine spezifischen Transkripte nachgewiesen werden konnten. Die undeletierte, homologe mRNA FLJ25047 (354 bp + 205 bp = 559 bp) fand sich hingegen ubiquitär exprimiert, in den untersuchten Gewebepanels war sie lediglich in Dünndarmgewebe nicht nachzuweisen.

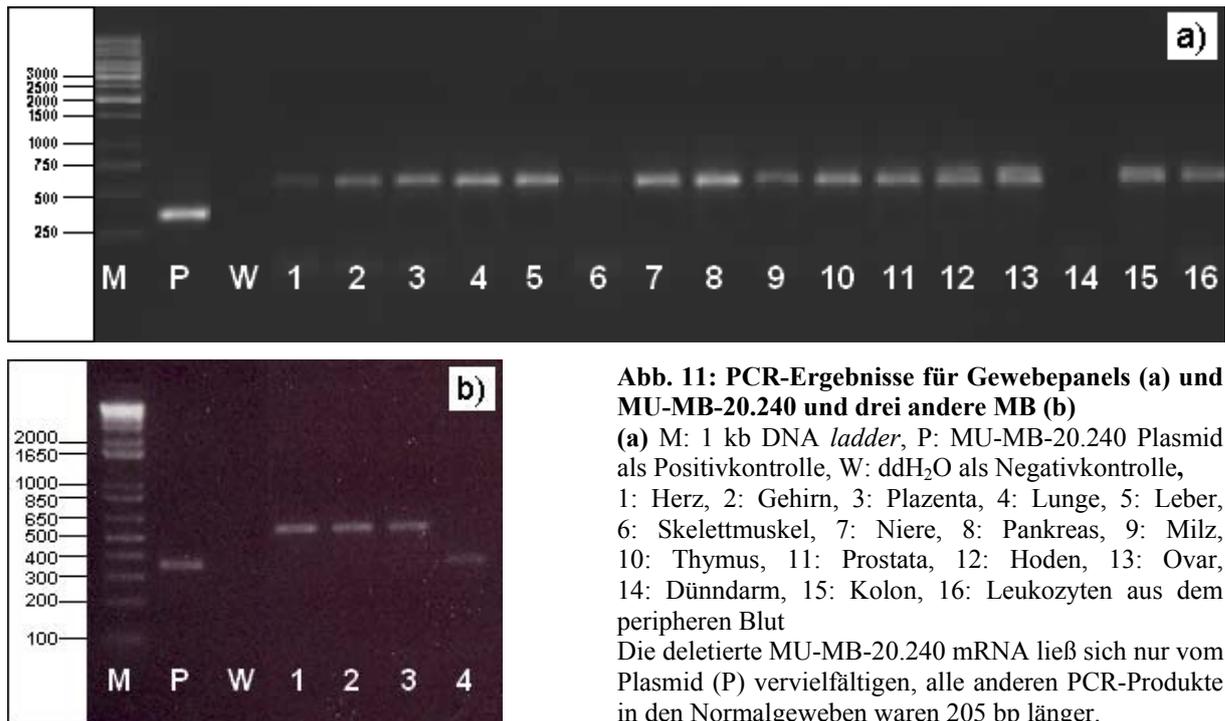


Abb. 11: PCR-Ergebnisse für Gewebepanels (a) und MU-MB-20.240 und drei andere MB (b)

(a) M: 1 kb DNA *ladder*, P: MU-MB-20.240 Plasmid als Positivkontrolle, W: ddH₂O als Negativkontrolle, 1: Herz, 2: Gehirn, 3: Plazenta, 4: Lunge, 5: Leber, 6: Skelettmuskel, 7: Niere, 8: Pankreas, 9: Milz, 10: Thymus, 11: Prostata, 12: Hoden, 13: Ovar, 14: Dünndarm, 15: Kolon, 16: Leukozyten aus dem peripheren Blut

Die deletierte MU-MB-20.240 mRNA ließ sich nur vom Plasmid (P) vervielfältigen, alle anderen PCR-Produkte in den Normalgeweben waren 205 bp länger.

(b) M: 1 kb plus DNA *ladder*, P: MU-MB-20.240 Plasmid als Positivkontrolle, W: ddH₂O als Negativkontrolle, 1: Phagenbibliothek MU-MB-02, 2: Phagenbibliothek MU-MB-17, 3: Phagenbibliothek MU-MB-50, 4: eigene Phagenbibliothek MU-MB-20. Die deletierte MU-MB-20.240 mRNA ließ sich nur vom Plasmid (P) und aus der autologen Phagenbibliothek vervielfältigen, die PCR-Produkte aus den drei anderen MB-Phagenbibliotheken waren 205 bp länger.

4. Diskussion

Die SEREX-Methode, mit der in Tumoren von Erwachsenen zahlreiche Tumor-Ag detektiert wurden, wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals auf ein großzelliges Medulloblastom einer kindlichen Patientin angewandt. Durch Untersuchung der humoralen Antitumorantwort der Patientin konnten drei Ag identifiziert werden. Ein Ag war Produkt eines unbekanntes Gens, zwei wiesen Homologien zu bekannten Genen auf, in einem Fall zu einem Tumorsuppressorkandidaten und in dem anderen Fall zu einem Kofaktor, der die Regulierung hormonabhängiger Transkription beeinflusst. In einem Ag konnte eine neue, tumorspezifische Deletion detektiert werden, was im Hinblick auf immuntherapeutische Ansätze interessant erschien. Die Ak-Titer gegen ein weiteres Ag zeigten eine positive Korrelation mit der Tumorlast im Krankheitsverlauf und haben daher evtl. eine Bedeutung als klinischer Marker.

4.1. Neue cDNA-Homologe der identifizierten Antigene

Die im Ergebnisteil behandelten Homologien entsprechen dem GenBank-Stand bei Abschluss der Experimente bzw. zum Zeitpunkt der Veröffentlichung der Ergebnisse (Behrends et al., 2003). Bis zur Abgabe dieser Arbeit sind neue Homologien hinzugekommen.

Es gibt weitere Spleißvarianten der MU-MB-20.201 cDNA

Die neue FLJ34362fis cDNA aus Hirngewebe (Acc. No. AK091682) war im 5'-Bereich 100% zur MU-MB-20.201 cDNA homolog, unterschied sich aber von letzterer zusätzlich zu den oben genannten Differenzen durch zwei Deletionen von 147 bp bzw. 105 bp. Die deletierten Regionen entsprachen jeweils einem Exon auf dem Chromosom 6, so dass es sich bei der neuen Hirngewebe-mRNA der Datenbank am ehesten um eine Spleißvariante der MU-MB-20.201 mRNA handelte. Eine weitere Homologie fand sich zu der neuen cDNA FLJ45844, die ebenfalls aus Hirngewebe stammte, und der nur das erste der beiden oben beschriebenen Exons fehlte. Beide cDNAs bewiesen, dass das in dieser Arbeit gefundene, lange 5' Ende der MU-MB-20.201-cDNA auch in normalem Hirngewebe vorkam und keine Besonderheit im Medulloblastomgewebe darstellte.

Ein neues MU-MB-20.220 cDNA-Homolog zeigt keine molekularen Variationen

Eine neue cDNA (Acc. No. AY004253) war identisch mit dem bekannten Homolog (NM_021620.1) der MU-MB-20.220 cDNA war und ergab damit keine neuen Aspekte.

Die MU-MB-20.240 cDNA gehört zu einer Familie sehr langer, ubiquitärer Transkripte

Die hypothetische neue, lange *Ankyrin repeat containing cofactor* ANCO 1 mRNA (Acc. No. AY533563) war bis auf die in dieser Arbeit beschriebene 205 bp Deletion 100% homolog zur MU-MB-20.240 cDNA (Zhang et al., 2004), aber sowohl 5' als auch 3' deutlich länger. Sie war auf der Basis des vorbeschriebenen 5' Homologs NPCSP (LZ16)-cDNA, der hier klonierten MU-MB-20.240 cDNA und drei neuen, 3' längeren, aus Plazenta klonierten cDNAs vorhergesagt worden. Die in der vorliegenden Arbeit isolierte mRNA blieb die einzige aus Gewebe isolierte Evidenz für den Sequenzbereich zwischen der LZ16- und den Plazenta-cDNAs.

Zhang et al. untersuchten deshalb mit Hilfe von Northern-Blots die Transkriptlängen *in vivo* (Zhang et al., 2004). Sie fanden ein etwa 10 kb langes Transkript in vielen normalen und maligne entarteten humanen Geweben. Dieses lange Transkript repräsentierte die lange ANCO-1-mRNA und bestätigte das nahezu ubiquitäre Vorkommen der aus MB klonierten ‚Linker‘-Region. Zusätzlich fanden sich in fast allen untersuchten Geweben ca. 3,5 kb lange Transkripte, die eine N-terminale Probe banden, und 7,5 kb lange Transkripte, die mit einer C-terminalen Probe reagierten, so dass das Vorkommen von Spleißvarianten postuliert wurde. Die 2663 aa lange Sequenz des ca. 298 kDa großen hypothetischen ANCO-1 war damit gegenüber dem putativen MU-MB-20.240 N-terminal erweitert, von Aminosäure 382 bis 1120 mit der des putativen Ag MU-MB-20.240 identisch, und aufgrund des *frame shift* C-terminal different.

4.2. Funktion der putativen Antigen-Homologe

Zur Funktion des MU-MB-20.201-Homologs FLJ13942 ist bisher nichts bekannt. Zu den putativen Homologen der beiden anderen Antigene gibt es interessante Evidenzen und Spekulationen.

MU-MB-20.220 gehört möglicherweise zu einer Tumorsuppressorfamilie

Das putative Ag MU-MB 20.220 war homolog zu dem Tumorsuppressorkandidaten PRDM13. Die *PR-domain* definiert eine kleine Familie DNA-bindender Transkriptionsfaktoren vom Zinkfingertyp, die eine Rolle in der Zelldifferenzierung und Tumorgenese spielen. Normalerweise werden von einem Gen dieser Familie zwei Produkte gebildet, wovon das eine die *PR (proline rich)-domain* enthält, das andere nicht. In Malignomen ist das PR⁺ Produkt oft zerstört oder unterexprimiert, während das PR⁻ Produkt immer vorhanden oder überexprimiert ist. Dieses Ungleichgewicht scheint ein wichtiger Grund für das Zustandekommen von Malignität zu sein (Jiang und Huang, 2000). *RIZ*, ein Mitglied der Genfamilie, wurde *in vitro* und im Mausmodell genauer untersucht. Das PR⁺ Produkt RIZ1 wird als Tumorsuppressor angesehen, weil es nach Expression in RIZ1-negativen Hepatomzellen einen G₂/M-Zellzyklusstop bewirken und Apoptose induzieren kann. In vielen menschlichen Krebsarten ist es unterexprimiert (Jiang et al., 1999). Im Gegensatz dazu ist das PR⁻ RIZ2 in normalen und maligne entarteten Zellen immer exprimiert. Mäuse ohne *RIZ1* entwickeln maligne B-Zell-Lymphome (Steele-Perkins et al., 2001) und eine Rekonstitution mit RIZ1 kann die Hepatomentwicklung in RIZ1^{-/-} Mäusen unterdrücken (Jiang et al., 1999). Die Funktion und tumorassoziierte Expression von PRDM13 wurde noch nicht genauer untersucht. Auch liegen bislang keine Informationen darüber vor, ob die *PR-domain* in dem von uns untersuchten MB exprimiert wurde. Die klonierte cDNA-Sequenz war 5' inkomplett und enthielt deshalb den relevanten Sequenzabschnitt nicht.

MU-MB-20.240 trägt nicht die funktionellen Domänen des verwandten Transkriptionsrepressors ANCO-1

Das putative Ag MU-MB-20.240 war homolog zu ANCO1, dessen Lokalisation in nukleären Foci kürzlich demonstriert und durch funktionelle Daten ergänzt wurde (Zhang et al., 2004). ANCO1 erwies sich als negativer Kofaktor für die transkriptionelle Regulation durch Nukleäre Rezeptoren (NR). Diese Rolle als Repressor der Transkription basiert auf der Antagonisierung von p160- Koaktivatoren durch Rekrutierung von Histondeacetylasen (HDAC) an den Koaktivator/NR-Komplex. Die Bindungsdomänen des ANCO-1 für p160 und HDAC befinden sich im C-terminalen Bereich stromabwärts der Homologie mit dem putativen MU-MB-20.240-Genprodukt. Das putative MB-Ag trägt diese C-terminalen Domänen aufgrund des *frame-shifts* nicht und kann somit höchstwahrscheinlich nicht die Liganden-abhängige Aktivierung der Transkription durch NR inhibieren.

4.3. Mögliche Mechanismen der Immunogenität der gefundenen Antigene

Der Mechanismus der Immunogenität von SEREX-definierten Tumorprodukten ist in vielen Fällen unklar. Tumorspezifische Expression, Überexpression im Tumor, molekulare Alteration oder Expression von alternativen ORFs sind in der Literatur beschrieben (siehe Kapitel 1.6.4), sehr oft aber kann keiner dieser Mechanismen nachgewiesen werden.

Ob MU-MB-20.240 als Tumor- oder Autoantigen einzustufen ist, kann nur durch Definition des T-Zell-Epitops geklärt werden

In MU-MB-20.240 wurde eine tumorspezifische Deletion identifiziert, die einen *frame-shift* nach sich zog. Auf diese Weise könnten tumorspezifische T-Zell Epitope entstanden sein, die für die Induktion der Immunantwort verantwortlich waren. Dazu passend fanden sich keine MU-MB-20.240-Ak bei den anderen drei MB-Patienten, deren Gewebe mittels PCR untersucht werden konnte, und die die Deletion nicht aufwiesen. Von den beiden zusätzlichen seropositiven MB-Patienten sowie von den seropositiven Patienten mit anderen Diagnosen war leider kein Tumorgewebe verfügbar, um das Vorkommen der Deletion zu untersuchen. So muss der mögliche Zusammenhang zwischen der molekularen Alteration und der Immunogenität des MU-MB-20.240 Ag vorerst offen bleiben.

Die Tatsache, dass die anti-MU-MB-20.240-Ak bei Krebspatienten mit 20% (8/40) häufig vorkamen, während nur 1/40 (2,5%) der gesunden Freiwilligen eine Seropositivität aufwies, könnte auf einen okkulten Tumor bei letzterem weisen. Für die sogenannten Anti-Hu-Ak wurde eine Bedeutung als wichtiger Tumormarker im Kontext von paraneoplastischen Neuropathien belegt; dies ist besonders dann relevant, wenn der Tumor noch nicht klinisch manifest ist (Graus et al., 2001; Gultekin et al., 2000). Es muss also eine tumorspezifische Immunität für MU-MB-20.240 in Erwägung gezogen werden.

Ebenso könnte es sich bei dem putativen MU-MB-20.240 doch um ein Auto-Ag handeln. Dass Ak gegen Auto-Ag deutlich häufiger und mit höherem Titer bei Krebspatienten vorkommen als bei gesunden Probanden wurde inzwischen mehrfach belegt (Behrends et al., 2002; Behrends et al., 2003) und ist möglicherweise auf eine tumorassoziierte Überexpression der Ag zurückzuführen. Allein die Definition des verantwortlichen T-Zell-Epitops in MU-MB-20.240 wird diese Frage zukünftig klären können.

Da nur die mit SEREX untersuchte Patientin ein großzelliges MB aufwies, während bei allen anderen serologisch oder durch Expressionsanalysen untersuchten MB-Patienten das

häufigere kleinzellige MB vorlag, wäre es denkbar, dass es sich bei der beschriebenen, neuen Deletion um eine für diese Unterart des Tumors charakteristische Veränderung handelte. Momentan liegen keine Serum- und Gewebeprobe eines weiteren Patienten mit großzelligem MB vor, um dieser Frage nachzugehen. Es ist auch in Betracht zu ziehen, dass es sich bei der beschriebenen Deletion um eine individuelle Alteration handelte, die ausschließlich die untersuchte Patientin betraf und möglicherweise mit der Immunogenität nichts zu tun hat.

Bei den Ag MU-MB-20.201 und MU-MB-20.220 handelte es sich definitionsgemäß um tumor-unabhängige Auto-Ag, da Ak auch bei mehreren gesunden Personen nachzuweisen waren. Gegen MU-MB-20.220 traten Ak bei einer größeren Zahl von Tumorpatienten (8/40 = 20%) als von gesunden Probanden (3/40 = 7,5%) auf; eine ähnliche Verteilung ließ sich, wie oben erwähnt, auch bei vielen anderen in der Arbeitsgruppe mit SEREX identifizierten tumorunabhängigen Auto-Ag nachweisen (Behrends et al., 2002; Behrends, 2003 #4; Behrends et al., 2003). Dazu passend waren zum Beispiel auch Ak-Antworten gegen das Protein GLEA2 bei Gliompatienten wesentlich häufiger (20/50) nachzuweisen als bei Gesunden (2/14) (Fischer et al., 2001). MU-MB-20.201 zeigte dagegen keinen Unterschied in der Häufigkeit und Ausprägung der Immunantwort bei Krebspatienten (11/40) verglichen mit Gesunden (11/40).

Der Kontext der Antigenpräsentation kann für die Immunogenität des Antigens entscheidend sein

Das Auffinden von Ak gegen tumorassoziierte Auto-Ag, die auch in vielen Normalgeweben zum Beispiel auf niedrigerem Niveau exprimiert werden und nur in Malignompatienten eine Ak-Antwort auslösen, sowie von Ak gegen nicht krebs-assoziierte Auto-Ag, die keine Expressionsunterschiede in Normal- und Tumorgeweben aufweisen, deren Titer aber im Kontext von Krebs durchaus höher sein kann, lässt vermuten, dass Autoimmunantwort und Anti-Krebsantwort oft zwei Seiten derselben Medaille sind. Ausschlaggebend für die Generation einer nachweisbaren Immunantwort ist in diesen Fällen sicher nicht die Fremderkennung antigener Strukturen. Möglicherweise ist eher der Kontext der Antigenpräsentation entscheidend.

Matzinger et al. (Gallucci und Matzinger, 2001; Matzinger, 1998; Matzinger, 2002; Matzinger, 2002; Matzinger, 2004) postulieren, dass nicht nur die Unterscheidung zwischen „eigen“ und „nicht eigen“, sondern vor allem bestimmte Gefahrensignale das Immunsystem aktivieren. Durch metabolischen Stress, Trauma, Infektion oder Zellzerstörung werden bestimmte Moleküle wie zum Beispiel Hitzeschockproteine, Zytokine und ATP frei, die dafür

sorgen, dass APC den T-Lymphozyten bestimmte Proteine als „gefährlich“ präsentieren und dadurch die Immunantwort initiieren. Erfolgt diese Präsentation in Abwesenheit oder nach Verschwinden von Gefahrensignalen, können die T-Lymphozyten gegen jedes Ag Toleranz zeigen und areaktiv bleiben. Die Beobachtung, dass spontane Tumorregressionen oft im Zusammenhang mit bakteriellen Infekten oder bakteriellen Vakzinen auftreten (Fuchs und Matzinger, 1996), stützt diese Hypothese. Durch die Infektion werden Gefahrensignale freigesetzt, die dem Immunsystem die Zerstörung des Tumors ermöglichen. Da Tumoren selbst nicht dauerhaft Gefahrensignale aussenden, kann das Immunsystem sie in der Regel nicht besiegen. Bei Immuntherapien gegen Tumoren ist es daher wichtig, neben der Boosterung immer wieder neue Gefahrensignale zu schaffen, bis der Tumor nicht mehr nachweisbar ist.

4.4. Bedeutung der Antikörper als Verlaufsparemeter

Die Anti-MU-MB-20.220-Ak sind mögliche Verlaufsmarker

Betrachtet man den zeitlichen Verlauf der Ak-Reaktion gegen die gefundenen Ag, so blieb der Titer der Anti-MU-MB-20.201-Ak passend zu einem Tumor-unabhängigen Auto-Ag von klinischen Parametern unbeeinflusst. Anti-MU-MB-20.240-Ak waren bei Diagnose nur in wenig verdünntem Serum und später gar nicht mehr nachweisbar, was auf eine insgesamt gering ausgeprägte Immungenität schließen ließ.

Interessant war dagegen der Verlauf der Anti-MU-MB-20.220-Ak. Bei Diagnosestellung nur in gering verdünntem Serum nachweisbar und nach der Operation zunächst verschwunden, stiegen sie drei Monate vor dem Auftreten eines klinischen Rückfalls mit Lebermetastasen auf den zehnfachen Ausgangswert an. Dass es sich um einen spezifischen Ak-Anstieg handelte, konnte man am größenordnungsmäßig gleichbleibenden Wert des Gesamt-IgG ablesen. Eine Korrelation zwischen Ak-Titer und Tumormasse war bereits in zwei anderen Publikationen untersucht worden (Behrends et al., 2002; Jäger et al., 1999).

Wiederanstiege der Titer von tumor-assoziierten Antikörpern wurden in publizierten Arbeiten als Alarmsignal vorgeschlagen

Jäger et al. hatten den Ak-Verlauf von zehn NY-ESO-1-positiven Tumorträgern dokumentiert (Jäger et al., 1999). Ein Titeranstieg konnte bei Tumorprogression, allerdings auch bei ausgedehnter Tumornekrose unter konventioneller Therapie beobachtet werden, also zu

Zeiten, zu denen größere Mengen an Ag auftraten. Ein Absinken der Titer zeigte sich bei partiellen Regressionen von Metastasen, aber auch im Falle eines NY-ESO-1-negativen Tumorrezidivs. Die Autoren schlossen darauf, dass ein Titeranstieg als Alarmzeichen gewertet werden kann, aber nicht zwingend mit einer Progression bzw. einem Rezidiv vergesellschaftet sein muß.

Von unserer Arbeitsgruppe durchgeführte Untersuchungen zum Ak-Titerverlauf gegen SEREX-Ag eines Neuroblastoms (Behrends et al., 2002) bestätigten das Postulat, dass Titeranstiege von Ak gegen SEREX-Ag wichtige serologische Indikatoren der Tumormasse sein können. Die Ak-Titer gegen alle untersuchten Neuroblastom-Ag fielen im Laufe der Tumorreduktion durch Operation und Radiochemotherapie primär ab. Mehrere Monate vor der sonographischen Detektion der Krankheitsprogression stiegen die Ak-Titer gegen drei Ag (Hu, 018NAC, 018INX) jedoch wieder an und erreichten maximale Werte zum Zeitpunkt der Rezidiv-Diagnose. Dagegen lagen die Werte der klassischen serologischen Neuroblastommarker Neuronen-spezifische Enolase (NSE) und Laktatdehydrogenase (LDH) bemerkenswerterweise zu Beginn des Anstiegs der SEREX-Ak noch im Normbereich; die Titer der SEREX-Ak hatten demnach durch ihre frühzeitige Titerbewegung zusätzliche klinische Informationen geliefert.

Wie in der vorliegenden Arbeit waren die Titer gegen zwei Neuroblastom-Ag zum Zeitpunkt des Wiederauftretens der Erkrankung zehnfach höher als bei Diagnosestellung. Höhere Ak-Titer im Kontext eines Tumorrezidivs könnten bedingt sein durch die aktivierte Gedächtnisfunktion des Immunsystems, durch eine erhöhte Tumormasse, durch eine gesteigerte Expression des Ag oder, wie im Fall unserer MB-Patientin, durch das Auftreten einer extrakraniellen Tumormanifestation (Lebermetastasen), die dem Immunsystem durch die nun fehlende Blut-Hirn-Schranke besser zugänglich war.

Interessant war die Tatsache, dass es sich bei dem Ag MU-MB-20.220 wie bei dem Neuroblastom-Ag 018NAC definitionsgemäß um ein tumor-unabhängiges Auto-Ag handelte. Die eigene Arbeit liefert damit die zweite Evidenz dafür, dass nicht nur Tumor-Ag, sondern auch tumor-unabhängige Auto-Ag hilfreiche Tumorverlaufsmarker sein können.

Im Rahmen eines Tumorrezidivs kann sich die IgG-Antwort qualitativ und quantitativ ändern

Eine Erklärung für den ausbleibenden Titeranstieg der Ak gegen das potentielle Tumor-Ag MU-MB-20.240 bei Wiederauftreten des Tumors können verschiedene *immune-escape* Mechanismen liefern. Der Selektionsdruck der Wirtsimmunität kann dazu führen, dass Tumoren bestimmte Proteine oder MHC-Moleküle nicht mehr exprimieren; dies wurde bisher

vor allem beim malignen Melanom beschrieben (Jäger et al., 1997; Lehmann et al., 1995; Maeurer et al., 1996). Auch Punktmutationen innerhalb des antigenen Peptids oder flankierender Sequenzen können die Bindung an MHC-Moleküle und somit die Qualität und Stärke der Immunantwort beeinträchtigen (Wiedenfeld et al., 1994; Yellen-Shaw et al., 1997). Bei unserer Patientin wurde der Rezidivtumor nicht mehr operativ entfernt, so dass kein Gewebe für die Untersuchung der Ag-Expression verfügbar war.

Zusammenfassend implizieren die ausgeführten Beobachtungen die mögliche Eignung von Ak gegen SEREX-Ag als Tumormarker und/oder als Verlaufsparemeter. Zwar kann das Verschwinden der Ak oder ein permanent niedriger Ak-Titer nicht als Beweis für Tumorfreiheit gewertet werden, das Ansteigen eines Ak-Titers kann jedoch ein hilfreiches Indiz für eine Tumorprogression bzw. für ein Rezidiv und damit ein wichtiges Frühwarnsystem sein.

4.5. Mögliche prognostische Bedeutung der Antikörper

In einigen Studien konnte Ak gegen Tumor- oder Auto-Ag eine prognostische Bedeutung beigemessen werden. Ak gegen Tumor-Ag der Hu-Proteinfamilie beim kleinzelligen Bronchialkarzinom sind mit einem niedrigerem Tumorstadium, höherer Wahrscheinlichkeit der kompletten Remission nach konventioneller Therapie und damit längerer Überlebenszeit assoziiert (Graus et al., 1997), ähnliches gilt für antineurale und antinukleäre Ak beim nicht kleinzelligen Bronchialkarzinom (Blaes et al., 2000). Hamanaka et al. beobachteten, dass hohe Titer zirkulierender IgG gegen das transmembrane Mucin MUC1 in Patienten mit Pankreaskarzinom mit einem längeren Überleben assoziiert sind, unabhängig von Tumorstadium, Alter oder Geschlecht (Hamanaka et al., 2003). Struss et al. verglichen Überlebenszeiten von 31 Patienten mit *Glioblastoma multiforme*. 18 Patienten mit PHF3-Ak zeigten einen signifikanten Vorteil gegenüber 13 Ak-negativen Patienten (Struss et al., 2001). Hingegen war der Nachweis von Ak gegen p53 in Tumoren der *Mamma*, des *Kolons* oder des Magens mit schlechterer Prognose (Soussi, 2000) und von Auto-Ak gegen das Hitzeschockprotein (HSP) 90 beim Mammakarzinom mit kürzerem Überleben (Conroy et al., 1998) verbunden. Letzteres Beispiel zeigt, dass auch Auto-Ak eine prognostische Bedeutung zukommen kann; sie dürfen deshalb bei der Suche nach Anwendungsgebieten für SEREX-Ak nicht vernachlässigt werden.

Ob die Bildung von Ak einen Einfluss auf die Tumorentwicklung ausübt oder nur die Expression bestimmter Strukturen widerspiegelt, ist unklar. Im Hinblick auf das MB gibt es noch zu wenige Daten, um bezüglich prognostischer Verwertbarkeit von Ak Aussagen treffen zu können. Hierzu sind weitere Studien zur Identifikation neuer Ag und Erfassung der klinischen Verläufe mit großen Fallzahlen nötig.

4.6. Beitrag von neuen Antigenen zum Verständnis der Tumorbiologie

Einige der bisher mit SEREX oder CTL gefundenen Ag trugen zum biologischen Verständnis der Tumorentwicklung bei. Das in Hodgkin-Lymphomen entdeckte Ag HOM-HD-21 stellte sich beispielsweise als neues Mitglied der Galectinfamilie von Adhensionsmolekülen heraus und könnte somit eine wichtige Rolle in der Interaktion zwischen den Tumorzellen des Hodgkin-Lymphoms und den umgebenden CD4⁺-T-Zellen spielen (Türeci et al., 1997). In einem Magenkarzinom wurde mit Hilfe von SEREX ein neues tumorspezifisches Fusionsprodukt aus E-Cadherin und einem bisher unbekanntem Gen identifiziert werden, das möglicherweise pathogenetische Bedeutung hat (Obata et al., 2000). SEREX kann darüber hinaus dazu dienen, Produkte von amplifizierten Tumorgenen zu identifizieren, und somit die biologische Bedeutung der Genamplifikation aufzuklären. Durch Einsatz von cDNA einer amplifizierten Region im Chromosom 3 eines squamösen Lungenkarzinoms in eine autologe SEREX-Analyse konnte zum Beispiel der Translations-Initiationsfaktor eIF-4 γ identifiziert werden (Brass et al., 1997).

Es wäre durchaus möglich, dass die in dieser Arbeit identifizierte tumor-assoziierte Deletion im Transkriptionsregulator ANCO-1 eine pathogenetische Bedeutung hat. Experimente mit MU-MB-20.240-Transfektanten wären in dieser Hinsicht weiterführend.

4.7. Therapeutische Bedeutung neuer Antigene

Prinzipiell stellen sowohl Auto- als auch Tumor-Ag mögliche Ansatzpunkte für die Tumorimmuntherapie dar. Entscheidend ist ihr Expressionsmuster. Tumorspezifische Ag repräsentieren die besten therapeutischen Zielstrukturen, weil das gesunde Gewebe aufgrund der fehlenden Ag-Expression vor dem immunologischen Angriff geschützt ist. Das tumorspezifische Ag MU-MB-20.240 stellt damit ein interessantes, potentielles

immuntherapeutisches Target dar. Prinzipiell kann jedes neu identifizierte Antigen für verschiedene Ag-spezifische Ansätze interessant sein, so zum Beispiel für die Ak-Therapie, den adoptiven T-Zell-Transfer und/oder aktive Impfstrategien.

Die Antikörper-basierte Immuntherapie

Um für eine Ak-Therapie zugänglich zu sein, müssen die Ag an der Zelloberfläche lokalisiert sein, wodurch viele Tumor-Ag ausscheiden (Ross et al., 2004). Dennoch haben sich bereits einige Auto- und Tumor-Ag als Zielstrukturen für die Ak-Behandlung von Tumorpatienten qualifiziert. Zum Teil haben sie die fokussierte Verabreichung von Ak-gekoppelten Medikamenten, pflanzlichen Toxinen, Zytostatika oder Isotopen ermöglicht (Carter, 2001; Goldenberg, 2002; Hemminki, 2002; Milenic, 2002; Ross et al., 2003).

Rituximab ist beispielsweise ein chimärer monoklonaler Ak gegen den CD20-Oberflächenrezeptor von B-Zellen, der die Überlebensrate von Patienten mit B-Lymphomen verbessert hat (Coiffier, 2002; Dillman, 2001). Der monoklonale Ak Trastuzumab, der gegen das überexprimierte Ag Her2/neu gerichtet ist, wird erfolgreich bei Patientinnen mit Brustkrebs (Hortobagyi, 2001; Ligibel und Winer, 2002; McKeage und Perry, 2002) und der Ak Cetuximab, welcher überexprimierten *epidermal growth factor receptor* (EGFR) bindet, bei Patienten mit kolorektalem Karzinom eingesetzt (Reynolds und Wagstaff, 2004; Saltz et al., 2004). Bei Patienten mit Gliomen waren bei direkter Applikation in die Tumor-Resektionshöhle Jod-131-gekoppelte Ak gegen eine Spleissvariante von Tenascin mit verlängertem Überleben und geringeren Reoperationsraten assoziiert (Wikstrand et al., 1999). Obwohl diese Ergebnisse ermutigend sind, stellen Ak-Therapien bei Hirntumoren noch keine gesicherte Therapieoption dar (Boskovitz et al., 2004). Bispezifische monoklonale Ak können Tumorzellen mit Effektorzellen wie T-Zellen, NK-Zellen, Makrophagen etc. oder mit *prodrug converting* Enzymen oder Ribosomen-inhibierenden Proteinen vernetzen (Kipriyanov und Le Gall, 2004) und erscheinen deshalb allgemein vielversprechend.

Der adoptive T-Zelltransfer

Der adoptive Transfer von Ag-spezifischen T-Zellen wird mit Erfolg bei der Behandlung von viralen Infektionen nach Transplantation und von virus-assoziierten Tumoren eingesetzt (Bollard et al., 2004; Rooney et al., 1998; Yee, 2005). Durch die *ex vivo* Selektion und Aktivierung hochreaktiver T-Zellpopulationen können *in vivo* vorhandene immunsuppressive Mechanismen des Wirts umgangen, und außerdem der funktionelle Phänotyp sowie die Spezifität, Anzahl und Avidität der T-Zellen genau definiert werden. Außerdem sind

genetische Modifikationen an den Effektorzellen möglich, die ihre Effizienz steigern können (Clay et al., 1999; Holler et al., 2000; Kessels et al., 2000; Morgan et al., 2003).

Der adoptive T-Zell-Transfer fand unter den soliden Tumoren bisher hauptsächlich beim malignen Melanom Anwendung und zeigte zum Beispiel bei Verwendung von CTL gegen die Ag Mart1/MelanA und gp 100 klinische Teilerfolge (Yee et al., 2002). Eine Lymphodepletion des Empfängers vor adoptivem Transfer scheint dabei förderlich zu sein (Dudley et al., 2001; Robbins et al., 2002), vermutlich aufgrund der Platzbeschaffung im lymphoiden Department, des geringeren Wettbewerbs um Zytokine sowie der Eliminierung von regulatorischen T-Zellen (Riddell, 2004). Darüberhinaus wird untersucht, ob durch den Einsatz von allogenen, Ag-spezifischen T-Zell-Klonen die Toleranz gegenüber Selbst-Ag durchbrochen, und so die Effizienz der adoptiven T-Zell-Immuntherapie gesteigert werden kann (Gao et al., 2003; Morris et al., 2005; Sadovnikova und Stauss, 1996). Die Infusion von allogenen T-Zellen (*donor lymphocyte infusion*, DLI) ist eine effektive Therapie für Leukämiepatienten, die nach allogener Stammzelltransplantation einen Rückfall erleiden. Um nur den *graft-versus-leukemia* Effekt auszunützen und eine *graft-versus-host* Erkrankung zu vermeiden, müssen jedoch noch weit mehr sogenannte *minor* Histokompatibilitäts-Ag (mHAg) definiert werden, die Hämatopoese-restringiert sind und im Kontext der allogenen Transplantation Tumor-Ag ersetzen können (Goulmy, 2004; Marijt et al., 2003; Morris et al., 2005).

Nachteilig sind beim adoptiven Transfer die äußerst zeit- und kostenintensive, technisch anspruchsvolle Isolierung und Expansion der T-Zellen, die bislang einen breiteren Einsatz der verfügbaren Ansätze verhinderte.

Die aktive Vakzinierung

Aktive Vakzinierungen können mit ganzen Proteinen, immundominanten Peptiden, nackter DNA, rekombinanten Viren und Bakterien oder Ag- bzw. Peptid- beladenen oder transfizierten DC erfolgen. Die zusätzliche Gabe von Zytokinen oder Adjuvantien soll zur Verbesserung der Ag-Präsentation und Aufrechterhaltung der immunologischen Antwort beitragen.

Die ersten klinischen Erfolge wurden mit Peptidvakzinen auf der Basis von Melanozyten-Differenzierungs-Ag bei Melanompatienten erzielt (Rosenberg et al., 1998). Diese Ansätze führten in einigen Fällen zum Auftreten einer Vitiligo, was zeigte, dass begleitende Autoimmunreaktionen, hier gegen normale Melanozyten, tolerabel sein können (Rosenberg und White, 1996). Auch durch Peptidevakzine gegen die CT-Ag MAGE-1 und -3 (Knuth et al., 2000), (Marchand et al., 1999) und NY-ESO-1 (Jäger et al., 2000) konnten klinische

Teilerfolge erzielt werden. Durch den Einsatz von nicht-replikativen, rekombinanten Viren soll die Ag-Prozessierung und -Präsentation auf MHC-I Molekülen verbessert werden (Bonnet et al., 2000; von Mehren et al., 2000). Bisher konnten allerdings durch Vakzinierung mit freien Tumor-Ag oder Peptiden keine durchschlagenden Erfolge erzielt werden.

Eine Weiterentwicklung waren deshalb aktive Vakzine auf der Basis der potentesten APC, der DC (Markiewicz und Kast, 2004; Yannelli und Wroblewski, 2004). Im Mausmodell war die Vakzinierung mit DC plus Peptid deutlich effektiver als mit Peptid alleine (Paglia et al., 1996). Die Vakzinierung mit Peptid-beladenen DC führte klinisch in den allermeisten Fällen zu einer nachweislichen Ag-spezifischen CTL-Aktivierung, allerdings nur bei einem geringen Teil der Patienten zu kompletten oder partiellen Krankheitsremissionen (Banchereau et al., 2001; Brossart et al., 2000; Lau et al., 2001; Nestle et al., 1998). Klinische Teilerfolge waren auch mit Ag-beladenen DC beobachtet worden, zum Beispiel bei Patienten mit B-Zell-Lymphomen (Hsu et al., 1996), Prostata- (Rini, 2004) und Zervixkarzinomen (Ferrara et al., 2003). Die Beladung von DC mit kompletten Tumor-Ag hat den Vorteil, dass keine Peptide ausgewählt werden müssen, die dem HLA-Typ des Empfängers angepasst sind. Außerdem ist bei ganzen Ag die Chance gegeben, dass Peptide des Ag auf MHC-I und -II Molekülen präsentiert werden und so zu einer Aktivierung von CD8⁺- CTL und CD4⁺-T-Zellen führen können. Eine stabilere Ag-Präsentation lässt sich allerdings wahrscheinlich durch DNA- oder RNA-Transfer in DC erreichen. (Grunebach et al., 2005; Markiewicz und Kast, 2004).

Ag-spezifische, aktive Vakzinierungsstrategien gegen Hirntumoren wurden bislang nur in Mäusen oder Ratten, allerdings mit recht vielversprechenden Resultaten untersucht (Liau et al., 1999; O et al., 2003; Okada et al., 2001).

Die Rolle von Cancer-Testis-Antigenen in der Tumorummuntherapie

CT-Ag, deren Expression auf Tumoren und Hodengewebe beschränkt ist, werden als vielversprechende Zielstrukturen für die Tumorummuntherapie angesehen (Scanlan et al., 2002), zumal sie in verschiedenen Tumorentitäten sowohl des Erwachsenen- als auch des Kindesalters vorkommen. Wie einleitend bereits beschrieben, wurden die ersten dieser Ag, MAGE-1, BAGE und GAGE, mit Hilfe von CTL-basierten Methoden identifiziert, (Boel et al., 1995; De Plaen et al., 1994; Van den Eynde et al., 1995). Mit Hilfe von SEREX konnten viele neue CT-Ag kloniert werden, zum Beispiel SSX2 (Türeci et al., 1996), NY-ESO-1 (Chen et al., 1997), CT7/MAGE-C1 (Chen et al., 1998), HOM-TES-85 (Sahin et al., 2000), cTAGE-1 (Eichmüller et al., 2001), OY-TES-1 und CAGE (Cho et al., 2002). Das führte zu der Idee, cDNA-Bibliotheken aus Hodengewebe mit Seren von Tumorpatienten zu screenen;

unter anderem wurde dabei das Meiose-spezifische Protein SCP-1 identifiziert (Türeci et al., 1998). Insgesamt sind bisher ca. 20 CT-Genfamilien bekannt.

Bemerkenswerterweise konnten durch SEREX-Recherchen in typischen Malignomen des Kindersalters bisher keine CT-Ag detektiert werden. In der eigenen Arbeitsgruppe waren vier MB, drei Neuroblastome, zwei Rhabdomyosarkome, ein Wilmstumor, ein Osteosarkom und ein Ewingtumor mit SEREX untersucht worden (Behrends et al., 2002; Behrends et al., 2003). Weitere SEREX-Recherchen an typisch pädiatrischen Tumoren wurden bislang nicht publiziert. Die einzige Evidenz für anti-CT-Ag-Ak bei pädiatrischen Malignompatienten sind Ergebnisse von Rodolfo et al., die mittels eines ELISA für NY-ESO-1 im Serum von 10% (3/28) der untersuchten Patienten mit fortgeschrittenen Neuroblastomen Ak nachweisen konnten (Rodolfo et al., 2003).

Die fehlende Identifikation von CT-Ag mit SEREX in Malignomen von Kindern ist überraschend, da eine mRNA-Expression diverser CT-Ag in pädiatrischen Tumoren einschließlich MB gut belegt ist (Corrias et al., 1996; Ishida et al., 1996; Oberthuer et al., 2004; Rodolfo et al., 2003; Scarcella et al., 1999; Wölfl et al., 2005). In der eigenen Arbeitsgruppe war die mRNA-Expression von 17 CT-Ag in verschiedenen pädiatrischen Tumoren untersucht worden. In allen betrachteten Neuroblastomen und in 76% der Tumoren anderer Entität war mindestens eine CT-Ag-mRNA nachgewiesen worden. In dem hier untersuchten, großzelligen MB-20 ließ sich auf mRNA-Ebene eine Expression von MAGE-A2, GAGE-Ag und SSX-4 feststellen (Golbeck, 2005).

Die Diskrepanz zwischen mRNA-Expression und Immunogenität der CT-Ag in pädiatrischen Tumoren ist umso erstaunlicher, als eine gute Übereinstimmung von mRNA- und Proteinexpression zumindest der drei CT-Ag MAGE-A1, MAGE-A3/A6 und NY-ESO-1 in ausgewählten Neuroblastomen durch RT-PCR und immunhistochemische Analysen aufgezeigt werden konnte (Wölfl et al., 2005). CT-Ag könnten demnach aufgrund ihrer relativ häufigen Expression in pädiatrischen Tumoren durchaus eine große Relevanz für immuntherapeutische Ansätze haben, scheinen in diesem Patientenkollektiv aber zumindest bezüglich der B-Zell-Aktivierung nicht sehr immunogen zu wirken.

In Untersuchungen verschiedener Autoren zur Immunogenität von CT-Ag in Tumoren von erwachsenen Patienten (Usener et al, 2003, Stockert et al 1998, Scanlan et al 2004) wurde wiederholt eine häufigere mRNA- als Proteinexpression oder Ak-Antwort gegen CT-Ag beschrieben. Die Arbeitsgruppen schlossen daraus, dass der fehlende Ak-Nachweis sowohl auf eine ungenügende Proteinexpression als auch auf eine niedrige Immunität der Proteine zurückzuführen sein könnte. Ersteres ist eine unabänderliche Einschränkung für CT-Ag-

spezifische Immuntherapieansätze, letzteres könnte vielleicht durch optimierte Impfstrategien überwunden werden.

Bedeutung von Wildtyp-Antigenen für Tumorimpfstoffe

Nishikawa et al. konnten 2001 an einem Mausmodell zeigen, dass eine Koimmunisierung mit SEREX-definierten Wildtyp-Ag und den bekannten tumorspezifischen, MHC-I-restringierten CTL-Ag mERK2 und c-erbB2 zu einer verstärkten tumorspezifischen CD8⁺-Antwort gegen die eingesetzten Ag führte, woraus eine Inhibierung pulmonaler Metastasen resultierte; dies konnte durch eine Behandlung mit mERK2/c-erbB2 alleine nicht erreicht werden (Nishikawa et al., 2001). Im Gegensatz dazu führte die Immunisierung mit den SEREX-Wildtyp-Antigenen alleine zu einem vermehrten Auftreten von pulmonalen Metastasen. Die Gruppe postulierte, dass durch alleiniges Auftreten von Wildtyp-Ag regulatorische CD4⁺/CD25⁺-Zellen aktiviert werden. Diesen wird eine entscheidende Bedeutung bei der Unterdrückung antitumoraler Immunreaktionen (Nishikawa et al., 2003), aber auch von Auto- und Antitransplantat-Immunität (Karim et al., 2002; Sakaguchi et al., 1995; Shevach, 2000; Shevach, 2002) zugesprochen. Bei Mäusen mit leukämischen Tumoren konnte gezeigt werden, dass die einmalige Verabreichung eines CD25-Ak zur Tumor-Regression führte (Onizuka et al., 1999).

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse von Nishikawa et al., dass die Expression von Auto-Ag im Tumor einen erheblichen Einfluss auf die Immunantwort besitzt. Die gleichzeitige Expression von Auto-Ag und tumorspezifischen Ag wirkt offensichtlich synergistisch und hat die Aktivierung von protektiven zytotoxischen T-Zellen zur Folge, während die alleinige Expression von Auto-Ag die immunologische Kontrolle des Tumorwachstums behindert. Es erscheint daher hilfreich, auch das Auto-Ag-Repertoire von Tumoren besser zu verstehen, und die molekulare Struktur von SEREX-definierten Auto-Ag in Tumoren aufzuklären.

Antigenspezifische Impfstoffe für pädiatrische Krebspatienten

Bei pädiatrischen Patienten mit Krebs wurden bisher fast nur Studien mit Tumorzelllysate-gepulsten DC durchgeführt; sie zeigten sehr geringe Ansprechraten, belegten aber eine gute Verträglichkeit und ein geringes Risiko von Autoimmunreaktionen (Geiger et al., 2001). Ag-spezifische Ansätze sind nur ganz vereinzelt beschrieben. So wurden zum Beispiel pädiatrische Patienten mit Rezidiven von EFT und alveolären Rhabdomyosarkomen mit Fusionspeptid (EWS/FLI1 bzw. PAX3/FKHR)-gepulsten DC und Monozyten plus IL-2

vakziniert, was den ungünstigen klinischen Verlauf aber nicht positiv beeinflusste (Dagher et al., 2002). Hauptgrund dafür, dass Ag-spezifische Impfansätze fehlen, ist die Tatsache, dass in typischen Tumoren des Kindesalters erst wenige tumorassoziierte Ag bekannt sind, und die Immunogenität dieser Ag im Kontext pädiatrischer Tumoren noch kaum untersucht wurde.

Um die Eignung und Relevanz des hier isolierten Ag MU-MB-20.240 für immuntherapeutische Ansätze in der pädiatrischen Onkologie zu testen, müssen zukünftig zum einen das Vorkommen der tumorspezifischen Deletion in anderen Tumoren untersucht, und die zelluläre Lokalisation des Ag analysiert werden. Zum anderen muss geprüft werden, ob die tumorspezifische Region des Ag Ak- bzw. T-Zellepitope enthält, und ob letztere - im Kontext häufig vorkommender HLA-Moleküle - zur T-Zellaktivierung führen.

Limitationen der Immuntherapie

Hauptproblem der Ak-Therapie ist die unzureichende Zugänglichkeit vieler solider Tumoren, so dass diese Therapieform vor allem bei hämatologischen Neoplasien oder bei disseminierter Tumorausssaat zum Beispiel innerhalb des Bauch- oder evtl. Liquorraums vielversprechend ist. Demgegenüber sind aktive und passive Impfstoffe, die im Patienten eine Ag-spezifische T-Zellantwort zur Folge haben, auch im Kontext kompakterer Tumorzellareale aussichtsreich. Prinzipiell gilt jedoch für alle Immuntherapieansätze, dass sich die Tumorerkrankung nicht mehr in einem Stadium mit hoher Tumormasse, sondern möglichst im Stadium der minimalen Resttumorlast (MRD) nach Abschluss der konventionellen Therapie befinden sollte.

Die aktive Vakzinierung ist grundsätzlich nur bei Patienten mit einem ausreichend funktionstüchtigen Immunsystem sinnvoll. Bei stark immunsupprimierten Patienten sind eher die passiven Impfkonzeppte zielführend. Das fortgeschrittene Alter vieler erwachsener Tumorkranke geht bereits mit einer gewissen Immunsuppression einher (Finn, 2003). Allerdings zeichnet sich ab, dass erste Vakzinierungsversuche bei Kindern keine deutlich besseren Ergebnisse erzielen (Geiger et al., 2001). Zudem bringt die fortgeschrittene Erkrankung bzw. die intensive Vorbehandlung mit konventionellen Verfahren in der Regel eine ausgeprägte Immunsuppression mit sich.

Ein großes Problem stellen trotz vielfältiger Bemühungen die diversen sogenannten *immune-escape* Mechanismen dar, derer sich Malignome bedienen, um der Immunerkennung zu entgehen. Dazu zählen der Verlust der MHC-Expression, die Herunterregulierung von spezifischen Ag bzw. die Modulation des Ag-Repertoires, die inadäquate Expression von akzessorischen und kostimulatorischen Molekülen und die Sekretion immunsuppressiver Moleküle, die die Funktion von antigenpräsentierenden und Effektorzellen behindern.

Es wird außerdem versucht, dem immunsuppressiven Umfeld von Tumoren proinflammatorische Reize entgegenzusetzen, beispielsweise durch lokale Injektion von CC Chemokine Ligand 20 und CpG; dadurch sollen mehr Effektorzellen angelockt und in ihrer Funktion unterstützt werden (Furumoto et al., 2004). In Tierexperimenten wird außerdem die Expression von Chemokinen in Tumorzellen induziert, um die Migration von APC und T-Zellen in den Tumor zu verstärken (Kaufman und Disis, 2004).

Impfstoffe, die gegen viele verschiedene MHC-I- und -II-Epitope in für den Tumor überlebenswichtigen Ag gerichtet sind, sollten die Überwindung von *immune-escape* Mechanismen erleichtern. Die Identifizierung neuer Tumor-Ag ist daher von entscheidender Bedeutung für die Zukunft.

4.8. CD8⁺- und CD4⁺- T-Lymphozyten in der Tumor-Immunantwort

Die meisten bisher durchgeführten Immuntherapieverfahren zielten auf die Initiierung einer CD8⁺-CTL-Antwort gegen den Tumor ab, weil die CD8⁺-CTL zu einer direkten Tumorerstörung durch Perforation der Zielzelle oder Fas/Fas-Ligand-Interaktion in der Lage sind. Außerdem sind viele Tumoren MHC-I positiv, aber MHC-II negativ. In einem Großteil der tierischen Tumorummuntherapie-Modelle sind die Effektorzellen CD8⁺-CTL (Melief und Kast, 1992; Nishikawa et al., 2001). Außerdem ließ sich beobachten, dass Antitumor-Effekte bestrahlter, GM-CSF-produzierender Melanomzellen, die subkutan verabreicht wurden, durch Depletion von CD8⁺-T-Zellen aufgehoben werden konnten (Sampson et al., 1996).

Die bisher durchgeführten klinischen Studien zeigten jedoch, dass die CD8⁺-CTL-Antwort zu schwach und zu kurzfristig ist, um einen Tumor effektiv zu eradizieren. Dies lenkte vermehrte Aufmerksamkeit auf CD4⁺-T-Zellen, die eine maßgebliche Rolle bei der Regulierung von Ag-spezifischen Immunantworten spielen. In Mäusen konnte gezeigt werden, dass der adoptive Transfer von CD4⁺-T-Zellen ohne CD8⁺-CTL in der Lage ist, eine disseminierte Leukämie zu eradizieren (Greenberg, 1991). Bemerkenswerterweise konnten die CD4⁺-T-Zellen erfolgreich gegen MHC-II negative Tumoren eingesetzt, und ihr Effekt sowohl durch Depletion von CD4⁺- als auch von CD8⁺-T-Zellen verhindert werden. Dies ließ den Schluß zu, dass der antitumorale Effekt über Zytokine (Mumberg et al., 1999) oder auch über Makrophagen und Eosinophile (Greenberg, 1991) vermittelt werden kann, und dass er die Aktivierung von CD8⁺-CTL *in vivo* einschließt. Um optimale Krebsvakzine entwickeln und

beide Zellgruppen aktivieren zu können, müssen demnach möglichst viele Tumor-assoziierte CD4⁺- und CD8⁺- T-Zell-Epitope identifiziert werden (Toes et al., 1999).

Mit den verfügbaren Methoden ist jedoch, wie in der Einleitung ausgeführt, eine direkte Identifikation von CD4⁺-T-Zell-Ag äußerst schwierig und in vielen Fällen nicht zielführend. Dagegen ist der indirekte SEREX-Ansatz äußerst effizient. Da das mit SEREX identifizierte Ag-Repertoire zahlreiche CD4⁺-T-Zell-Epitope enthalten sollte, wird von SEREX-Recherchen ein entscheidender Beitrag zur Entwicklung kombinierter Impfstoffe erwartet.

Die integrierte Arbeitsweise des Immunsystems wird in letzter Zeit immer mehr dadurch bestätigt, dass gegen ein und dasselbe Ag CD4⁺-, CD8⁺- und Ak-Antworten nachgewiesen werden können. NY-ESO-1, ursprünglich mit SEREX in einem Ösophaguskarzinom entdeckt, konnte im selben Patienten in bis zu 90% auch eine starke CTL Antwort auslösen (Jäger et al., 1998; Jäger et al., 2000). Multiple MHC-I-Epitope (Gnjatic et al., 2000; Jäger et al., 1998) und in letzter Zeit auch MHC-II-Epitope (Jäger et al., 2000; Zarour et al., 2000; Zeng et al., 2000) wurden für NY-ESO-1 identifiziert. Umgekehrt wurden gegen CTL-definierte Ag wie MAGE-1 und Tyrosinase hohe Ak-Titer in verschiedenen Malignompatienten gemessen (Stockert et al., 1998). Im CTL-Ag Tyrosinase wurden auch CD4⁺-T-Zell-Epitope definiert (Topalian et al., 1996). Dass das zelluläre und humorale Immunsystem desselben Patienten sogar ein identisches Peptid erkennen kann, wurde kürzlich anhand des *coactosin-like protein* eines Pankreaskarzinoms gezeigt (Nakatsura et al., 2002).

Das indirekte SEREX Screening kann die Identifizierung von T-Zell-Epitopen bedeutend erleichtern. Die verschiedenen Strategien werden als „Reverse Immunologie“ zusammengefasst. So können in serologisch definierten Ag durch computergestützte Recherchen Bindungsmotive für MHC-I und MHC-II-Moleküle ermittelt werden. Die korrespondierenden Peptide können anschließend synthetisiert und auf ihre Fähigkeit, T-Zellen zu stimulieren, untersucht werden. Eine andere Möglichkeit ist die Etablierung von CD8⁺-T-Zell-Klonen durch Inkubation mit SEREX-cDNA transfizierten DC und nachfolgende Spezifitätstestung an Ag-positiven Tumorzelllinien. Außerdem können präetablierte T-Zell-Klone, deren Targets noch nicht klar sind, gegen SEREX-Ag getestet werden (Jäger et al., 2004).

4.9. Modifikationen und Limitationen der SEREX-Methode

Seit Einführung des SEREX-Verfahrens sind verschiedene Modifikationen vorgeschlagen worden, mit denen die Effizienz dieses serologischen Ansatzes gezielt gesteigert werden sollte. Der Einsatz von *Testis*-cDNA-Bibliotheken oder cDNA-Transkripten von amplifizierten Genregionen in das SEREX-screening wurde bereits erwähnt.

Zur Identifikation von differentiell in Tumorgeweben gegenüber korrespondierenden Normalgeweben exprimierten Genen wurde beispielsweise von Liao et al. die sogenannte differentielle Immuno-absorption (DIA) entwickelt (Liao et al., 2000). Bei dieser Strategie wurden Ratten mit Glioblastomgewebe immunisiert, das Antiserum gegen Gehirngewebe absorbiert, das absorbierte Serum über Glioblastom-Affinitätssäulen gegeben, die gebundenen Ak eluiert, und mit diesen Ak eine Glioblastom-cDNA-Expressionsbibliothek gescreent. 28 Glioblastom-spezifische Ag konnten identifiziert werden, von denen allerdings nicht klar ist, ob sie auch im Menschen zu einer Immunantwort führen.

Mittels repräsentativer Differenzanalyse (RDA) können ebenfalls zwischen Tumoren und verwandten Normalgeweben differentiell exprimierte Genprodukte isoliert werden. In einem zweiten Schritt können sie dann mittels SEREX auf ihre Immunogenität untersucht werden. Durch Vergleich von normalem Hautgewebe und einer Melanomzelllinie isolierten Gure et al. auf diese Art und Weise das CT-Ag CT10. Die SEREX-Untersuchung zeigte Ak gegen dieses Ag bei zwei Melanompatienten (Gure et al., 2000).

Eine Erhöhung der Gesamtausbeute an Ag kann auch durch den Einsatz gepoolter Seren mehrerer Patienten mit dem gleichen Tumor erreicht werden. Cho et al. untersuchten mittels eines Pools aus Serum von fünf Patienten mit Magenkarzinom eine Zelllinie dieses Tumors und identifizierten unter zahlreichen Ag das Ag CAGE (Cho et al., 2002). In der eigenen Arbeitsgruppe wurden mit gepoolten Seren bis zu 30 verschiedene Ag in einer einzigen cDNA-Bibliothek gefunden (Dr. Uta Behrends, persönliche Mitteilung).

Eine Modifikation des Expressionssystems, durch die cDNA-Bibliotheken mit größerer Komplexität und geringerem Serumverbrauch gescreent werden können, stellt der sogenannte *phage display* dar. Rekombinante Proteine werden auf der Oberfläche von λ -Phagen exprimiert, durch Affinitätsselektion vor dem eigentlichen Screening wird die Bibliothek für positive Klone angereichert. Auf diese Weise wurden einige neue Ag in Brustkrebsgewebe identifiziert (Minenkova et al., 2003).

Trotz aller Innovationen bleibt das mit SEREX detektierbare Ag-Repertoire beschränkt (Preuss et al., 2002). SEREX ist, wie andere serologische Assays (zum Beispiel *Western Blot* oder ELISA) in seiner Aussagekraft dadurch beeinträchtigt, dass die Proteine hier nicht in ihrer natürlichen Konformation vorliegen. Außerdem sind eukaryont exprimierte Ag posttranslationellen Modifikationen wie Glykosylierung, Phosphorylierung, Methylierung, Acylierung usw. unterworfen, wozu das bakterielle Expressionssystem nicht in der Lage ist. Zudem werden Antigene nicht erfasst, die für Bakterien toxisch sind, so zum Beispiel Membranproteine, die aufgrund hydrophober Regionen leicht verklumpen. Damit sinkt die Chance, Targets für Ak-vermittelte Immuntherapien zu identifizieren. Mischo et al. entwickelten deshalb ein eukaryontisches Expressionssystem („*recombinant expression on yeast surface*“, RAYS), in dem die Ag auf der Oberfläche von Hefezellen exprimiert werden (Mischo et al., 2003). Damit wird möglicherweise die Ausbeute an membranständigen Antigenen gesteigert. Außerdem wird die natürliche Faltung und Glykosylierung weitgehend gewährleistet, so dass zusätzliche eukaryonte Epitope in das *screening* einbezogen werden. Tumorspezifische posttranslationelle Modifikationen werden allerdings auch mit diesem System nicht erfasst.

4.10. Abschließende Bemerkungen

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Immuntherapie von Tumoren noch in den Kinderschuhen steckt. Ein besseres Verständnis der Tumorbiologie und der komplexen Wechselwirkungen zwischen Tumor und Immunsystem sowie die Identifizierung zahlreicher zusätzlicher Ag und weitere methodische Verbesserungen bei der Antigenidentifizierung sind nötig, um weiterreichende Fortschritte zu erzielen.

Neben dem ehrgeizigen Ziel der Therapie dürfen aber auch die Nutzungsmöglichkeiten von Tumor-Ag und -Ak in Diagnose und Prognose von malignen Erkrankungen nicht vernachlässigt werden, die dem Patienten und seinem behandelndem Arzt zur Therapieoptimierung zugutekommen.

5. Zusammenfassung

Das Medulloblastom ist der zweithäufigste Hirntumor im Kindesalter und trotz Ausreizen konventioneller Therapieansätze mit einer ungünstigen Prognose verbunden. Diese ist nicht nur durch die ungenügende Überlebensrate, sondern zusätzlich durch schwere Spätfolgen der Therapie bedingt. Patienten mit großzelligem Medulloblastom haben eine besonders geringe Aussicht auf Heilung. Es wird deshalb dringend nach ergänzenden Therapieoptionen wie zum Beispiel immuntherapeutischen Konzepten gesucht.

Zur Identifizierung immuntherapeutischer Zielstrukturen sind verschiedene zelluläre und humorale Ansätze in Anwendung. Das SEREX-Verfahren bedient sich der autologen, *in vivo* generierten IgG-Antikörperantwort, um Tumor-cDNA-Expressionsbibliotheken auf Tumor-assoziierte Antigene zu testen. Es werden nur Antigene nachgewiesen, die im Tumorpatienten eine hochtitrige Antikörper-Antwort auslösen, was die Beteiligung von CD4⁺-T-Helferzellen voraussetzt.

In der vorliegenden Arbeit wurde das SEREX-Verfahren zum ersten Mal auf ein großzelliges Medulloblastom angewendet. Durch Analyse von ca. 1×10^6 rekombinanten Phagen konnten drei verschiedene Antigene identifiziert werden. Diese wurden einer cDNA-Sequenzierung und Homologierecherche unterzogen. Durch erweiterte autologe und heterologe Serumanalyse wurde das spezifische Antikörper-Vorkommen näher charakterisiert. Von einem Antigen wurde außerdem die gewebsspezifische Expression durch Reverse Transkription und *polymerase chain reaction* betrachtet.

Bei MU-MB-20.201 handelte es sich um das Produkt eines breit exprimierten Gens, dessen Funktion unbekannt ist. Antikörper gegen MU-MB-20.201 waren bei Malignompatienten und gesunden Kontrollen in gleicher Häufigkeit nachzuweisen. Bei der untersuchten Patientin mit Medulloblastom fielen die bei Diagnosestellung hochtitrig vorhandenen Antikörper im Verlauf der Therapie ab und zeigten trotz Krankheitsprogression keinen Wiederanstieg mehr. Es handelte sich damit um ein Auto-Antigen bzw. Auto-Antikörper ohne erkennbare Bedeutung für Tumorthherapie oder Prognose.

Das längste Genprodukt der MU-MB-20.220 cDNA war 100% homolog zu PRDM13, einem Tumorsuppressorkandidaten, über dessen Expression bisher nichts bekannt ist. Die funktionell entscheidende Prolin-reiche Domäne des Homologs lag allerdings außerhalb des in dieser Arbeit klonierten Sequenzabschnitts. Anti-MU-MB-20.220-Antikörper fanden sich bei mehr Tumorpatienten als Kontrollen, so dass ein definitionsgemäß ein Autoantigen zu

postulieren war. Die anti-MU-MB-20.220-Antikörper waren interessanterweise anfangs hochtitrig, fielen dann parallel zum initialen Tumorsprechen unter die Nachweisgrenze ab und stiegen drei Monate vor der klinischen Diagnose des extrakraniellen Rezidivs auf das Zehnfache des Ausgangswertes an, so dass eine mögliche Bedeutung als Verlaufparameter diskutiert wurde.

Das längste Genprodukt der MU-MB-20.240 cDNA zeigte Homologie zu ANCO-1, einem ubiquitär exprimierten putativen Transkriptionsrepressor. Neu war eine 205 bp lange *out-of-frame* Deletion, die in keinem der untersuchten Normalgewebe und heterologen MB zu detektieren war, und die einen gegenüber ANCO-1 alternativen C-Terminus bedingte. Die anti-MU-MB-20.240 waren bemerkenswerterweise in acht Tumorpatienten nachweisbar, hingegen nur bei einer gesunden Person. Da Antikörper prinzipiell Indikatoren okkulten Tumoren repräsentieren können, wurde eine mögliche Tumorassoziation diskutiert, und der Antikörper als Tumormarker vorgeschlagen.

Zusammenfassend zeigte die vorliegende Arbeit, dass das SEREX-Verfahren eine sehr effektive Methode auch zur Antigen-Identifizierung in besonders aggressiven pädiatrischen Malignomen darstellt und zu neuen diagnostischen und therapeutischen Ansätzen für diese problematische Tumorgruppe beitragen kann.

6. Literaturverzeichnis

1. Allen, J.C., Donahue, B., DaRosso, R. and Nirenberg, A. (1996) Hyperfractionated craniospinal radiotherapy and adjuvant chemotherapy for children with newly diagnosed medulloblastoma and other primitive neuroectodermal tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 36 (5), 1155-1161
2. Bailey, C.C., Gnekow, A., Wellek, S., Jones, M., Round, C., Brown, J., Phillips, A. and Neidhardt, M.K. (1995) Prospective randomised trial of chemotherapy given before radiotherapy in childhood medulloblastoma. International Society of Paediatric Oncology (SIOP) and the (German) Society of Paediatric Oncology (GPO): SIOP II. *Med Pediatr Oncol* 25 (3), 166-178
3. Bainbridge, D., Ellis, S., Le Bouteiller, P. and Sargent, I. (2001) HLA-G remains a mystery. *Trends Immunol* 22 (10), 548-552
4. Banchereau, J., Palucka, A.K., Dhodapkar, M., Burkeholder, S., Taquet, N., Rolland, A., Taquet, S., Coquery, S., Wittkowski, K.M., Bhardwaj, N., Pineiro, L., Steinman, R. and Fay, J. (2001) Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34(+) progenitor-derived dendritic cell vaccine. *Cancer Res* 61 (17), 6451-6458
5. Bassing, C.H., Swat, W. and Alt, F.W. (2002) The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination. *Cell* 109 Suppl, S45-55
6. Behrends, U., Jandl, T., Golbeck, A., Lechner, B., Muller-Wehrich, S., Schmid, I., Till, H., Berthold, F., Voltz, R. and Mautner, J.M. (2002) Novel products of the HUD, HUC, NNP-1 and alpha-internexin genes identified by autologous antibody screening of a pediatric neuroblastoma library. *Int J Cancer* 100 (6), 669-677
7. Behrends, U., Schneider, I., Rossler, S., Frauenknecht, H., Golbeck, A., Lechner, B., Eigenstetter, G., Zobywalski, C., Muller-Wehrich, S., Graubner, U., Schmid, I., Sackerer, D., Spath, M., Goetz, C., Prantl, F., Asmuss, H.P., Bise, K. and Mautner, J. (2003) Novel tumor antigens identified by autologous antibody screening of childhood medulloblastoma cDNA libraries. *Int J Cancer* 106 (2), 244-251
8. Berzofsky, J.A., Terabe, M., Oh, S., Belyakov, I.M., Ahlers, J.D., Janik, J.E. and Morris, J.C. (2004) Progress on new vaccine strategies for the immunotherapy and prevention of cancer. *J Clin Invest* 113 (11), 1515-1525
9. Bianchi, E., Podesta, A.F. and Arico, M. (1984) [Clinical course of brain tumors in childhood]. *Minerva Med* 75 (24), 1407-1411
10. Bilbe, G., Delabie, J., Bruggen, J., Richener, H., Asselbergs, F.A., Cerletti, N., Sorg, C., Odink, K., Tarcsay, L., Wiesendanger, W. and et al. (1992) Restin: a novel intermediate filament-associated protein highly expressed in the Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *Embo J* 11 (6), 2103-2113
11. Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7 (6), 1513-1523
12. Blaes, F., Klotz, M., Huwer, H., Straub, U., Kalweit, G., Schimrigk, K. and Schafers, H.J. (2000) Antineural and antinuclear autoantibodies are of prognostic relevance in non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* 69 (1), 254-258

13. Bodey, B., Bodey, B., Jr., Siegel, S.E. and Kaiser, H.E. (1999) 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* 13 (4), 357-373
14. Boel, P., Wildmann, C., Sensi, M.L., Brasseur, R., Renauld, J.C., Coulie, P., Boon, T. and van der Bruggen, P. (1995) BAGE: a new gene encoding an antigen recognized on human melanomas by cytolytic T lymphocytes. *Immunity* 2 (2), 167-175
15. Bollard, C.M., Aguilar, L., Straathof, K.C., Gahn, B., Huls, M.H., Rousseau, A., Sixbey, J., Gresik, M.V., Carrum, G., Hudson, M., Dilloo, D., Gee, A., Brenner, M.K., Rooney, C.M. and Heslop, H.E. (2004) Cytotoxic T lymphocyte therapy for Epstein-Barr virus+ Hodgkin's disease. *J Exp Med* 200 (12), 1623-1633
16. Bonnet, M.C., Tartaglia, J., Verdier, F., Kourilsky, P., Lindberg, A., Klein, M. and Moingeon, P. (2000) Recombinant viruses as a tool for therapeutic vaccination against human cancers. *Immunol Lett* 74 (1), 11-25
17. Boskovitz, A., Wikstrand, C.J., Kuan, C.T., Zalutsky, M.R., Reardon, D.A. and Bigner, D.D. (2004) Monoclonal antibodies for brain tumour treatment. *Expert Opin Biol Ther* 4 (9), 1453-1471
18. Brass, N., Heckel, D., Sahin, U., Pfreundschuh, M., Sybrecht, G.W. and Meese, E. (1997) Translation initiation factor eIF-4gamma is encoded by an amplified gene and induces an immune response in squamous cell lung carcinoma. *Hum Mol Genet* 6 (1), 33-39
19. Brass, N., Racz, A., Bauer, C., Heckel, D., Sybrecht, G. and Meese, E. (1999) Role of amplified genes in the production of autoantibodies. *Blood* 93 (7), 2158-2166
20. Brichard, V., Van Pel, A., Wolfel, T., Wolfel, C., De Plaen, E., Lethe, B., Coulie, P. and Boon, T. (1993) The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J Exp Med* 178 (2), 489-495
21. Brossart, P., Wirths, S., Stuhler, G., Reichardt, V.L., Kanz, L. and Brugger, W. (2000) Induction of cytotoxic T-lymphocyte responses in vivo after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells. *Blood* 96 (9), 3102-3108
22. Butcher, E.C. and Picker, L.J. (1996) Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 272 (5258), 60-66
23. Carey, T.E., Takahashi, T., Resnick, L.A., Oettgen, H.F. and Old, L.J. (1976) Cell surface antigens of human malignant melanoma: mixed hemadsorption assays for humoral immunity to cultured autologous melanoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73 (9), 3278-3282
24. Carter, P. (2001) Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nat Rev Cancer* 1 (2), 118-129
25. Chang, C.H., Housepian, E.M. and Herbert, C., Jr. (1969) An operative staging system and a megavoltage radiotherapeutic technic for cerebellar medulloblastomas. *Radiology* 93 (6), 1351-1359
26. Chen, Y.T. (2000) Cancer vaccine: identification of human tumor antigens by SEREX. *Cancer J* 6 Suppl 3, S208-217

27. Chen, Y.T., Gure, A.O., Tsang, S., Stockert, E., Jager, E., Knuth, A. and Old, L.J. (1998) Identification of multiple cancer/testis antigens by allogeneic antibody screening of a melanoma cell line library. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (12), 6919-6923
28. Chen, Y.T., Scanlan, M.J., Sahin, U., Tureci, O., Gure, A.O., Tsang, S., Williamson, B., Stockert, E., Pfreundschuh, M. and Old, L.J. (1997) A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (5), 1914-1918
29. Cho, B., Lim, Y., Lee, D.Y., Park, S.Y., Lee, H., Kim, W.H., Yang, H., Bang, Y.J. and Jeoung, D.I. (2002) Identification and characterization of a novel cancer/testis antigen gene CAGE. *Biochem Biophys Res Commun* 292 (3), 715-726
30. Clay, T.M., Custer, M.C., Sachs, J., Hwu, P., Rosenberg, S.A. and Nishimura, M.I. (1999) Efficient transfer of a tumor antigen-reactive TCR to human peripheral blood lymphocytes confers anti-tumor reactivity. *J Immunol* 163 (1), 507-513
31. Clayton, P.E. and Shalet, S.M. (1991) Dose dependency of time of onset of radiation-induced growth hormone deficiency. *J Pediatr* 118 (2), 226-228
32. Coiffier, B. (2002) Rituximab in the treatment of diffuse large B-cell lymphomas. *Semin Oncol* 29 (1 Suppl 2), 30-35
33. Conroy, S.E., Sasieni, P.D., Fentiman, I. and Latchman, D.S. (1998) Autoantibodies to the 90kDa heat shock protein and poor survival in breast cancer patients. *Eur J Cancer* 34 (6), 942-943
34. Corrias, M.V., Scaruffi, P., Occhino, M., De Bernardi, B., Tonini, G.P. and Pistoia, V. (1996) Expression of MAGE-1, MAGE-3 and MART-1 genes in neuroblastoma. *Int J Cancer* 69 (5), 403-407
35. Coulie, P.G., Brichard, V., Van Pel, A., Wolfel, T., Schneider, J., Traversari, C., Mattei, S., De Plaen, E., Lurquin, C., Szikora, J.P. and et al. (1994) A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J Exp Med* 180 (1), 35-42
36. Cox, A.L., Skipper, J., Chen, Y., Henderson, R.A., Darrow, T.L., Shabanowitz, J., Engelhard, V.H., Hunt, D.F. and Slingluff, C.L., Jr. (1994) Identification of a peptide recognized by five melanoma-specific human cytotoxic T cell lines. *Science* 264 (5159), 716-719
37. Dagher, R., Long, L.M., Read, E.J., Leitman, S.F., Carter, C.S., Tsokos, M., Goletz, T.J., Avila, N., Berzofsky, J.A., Helman, L.J. and Mackall, C.L. (2002) 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* 38 (3), 158-164
38. De Plaen, E., Lurquin, C., Lethe, B., van der Bruggen, P., Brichard, V., Renauld, J.C., Coulie, P., Van Pel, A. and Boon, T. (1997) Identification of genes coding for tumor antigens recognized by cytolytic T lymphocytes. *Methods* 12 (2), 125-142
39. De Plaen, E., Arden, K., Traversari, C., Gaforio, J.J., Szikora, J.P., De Smet, C., Brasseur, F., van der Bruggen, P., Lethe, B., Lurquin, C. and et al. (1994) Structure, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the MAGE family. *Immunogenetics* 40 (5), 360-369

40. De Smet, C., De Backer, O., Faraoni, I., Lurquin, C., Brasseur, F. and Boon, T. (1996) The activation of human gene MAGE-1 in tumor cells is correlated with genome-wide demethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (14), 7149-7153
41. Dennis, M., Spiegler, B.J., Hetherington, C.R. and Greenberg, M.L. (1996) Neuropsychological sequelae of the treatment of children with medulloblastoma. *J Neurooncol* 29 (1), 91-101
42. Deutsch, M., Thomas, P.R., Krischer, J., Boyett, J.M., Albright, L., Aronin, P., Langston, J., Allen, J.C., Packer, R.J., Linggood, R., Mulhern, R., Stanley, P., Stehens, J.A., Duffner, P., Kun, L., Rorke, L., Cherlow, J., Freidman, H., Finlay, J.L. and Vietti, T. (1996) Results of a prospective randomized trial comparing standard dose neuraxis irradiation (3,600 cGy/20) with reduced neuraxis irradiation (2,340 cGy/13) in patients with low-stage medulloblastoma. A Combined Children's Cancer Group-Pediatric Oncology Group Study. *Pediatr Neurosurg* 24 (4), 167-176; discussion 176-167
43. Dillman, R.O. (2001) The history and rationale for monoclonal antibodies in the treatment of hematologic malignancy. *Curr Pharm Biotechnol* 2 (4), 293-300
44. Dudley, M.E., Wunderlich, J., Nishimura, M.I., Yu, D., Yang, J.C., Topalian, S.L., Schwartzentruber, D.J., Hwu, P., Marincola, F.M., Sherry, R., Leitman, S.F. and Rosenberg, S.A. (2001) Adoptive transfer of cloned melanoma-reactive T lymphocytes for the treatment of patients with metastatic melanoma. *J Immunother* 24 (4), 363-373
45. Duffner, P.K., Horowitz, M.E., Krischer, J.P., Burger, P.C., Cohen, M.E., Sanford, R.A., Friedman, H.S. and Kun, L.E. (1999) The treatment of malignant brain tumors in infants and very young children: an update of the Pediatric Oncology Group experience. *Neuro-oncol* 1 (2), 152-161
46. Duffner, P.K., Horowitz, M.E., Krischer, J.P., Friedman, H.S., Burger, P.C., Cohen, M.E., Sanford, R.A., Mulhern, R.K., James, H.E., Freeman, C.R. and et al. (1993) Postoperative chemotherapy and delayed radiation in children less than three years of age with malignant brain tumors. *N Engl J Med* 328 (24), 1725-1731
47. Eichmuller, S., Usener, D., Dummer, R., Stein, A., Thiel, D. and Schadendorf, D. (2001) Serological detection of cutaneous T-cell lymphoma-associated antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (2), 629-634
48. Evans, D.G., Farndon, P.A., Burnell, L.D., Gattamaneni, H.R. and Birch, J.M. (1991) The incidence of Gorlin syndrome in 173 consecutive cases of medulloblastoma. *Br J Cancer* 64 (5), 959-961
49. Falk, K., Rotzschke, O., Stevanovic, S., Jung, G. and Rammensee, H.G. (1991) Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* 351 (6324), 290-296
50. Ferrara, A., Nonn, M., Sehr, P., Schreckenberger, C., Pawlita, M., Durst, M., Schneider, A. and Kaufmann, A.M. (2003) Dendritic cell-based tumor vaccine for cervical cancer II: results of a clinical pilot study in 15 individual patients. *J Cancer Res Clin Oncol* 129 (9), 521-530
51. Finn, O.J. (2003) Cancer vaccines: between the idea and the reality. *Nat Rev Immunol* 3 (8), 630-641

52. Fischer, U., Struss, A.K., Hemmer, D., Pallasch, C.P., Steudel, W.I. and Meese, E. (2001) Glioma-expressed antigen 2 (GLEA2): a novel protein that can elicit immune responses in glioblastoma patients and some controls. *Clin Exp Immunol* 126 (2), 206-213
53. Freeman, C.R., Taylor, R.E., Kortmann, R.D. and Carrie, C. (2002) Radiotherapy for medulloblastoma in children: a perspective on current international clinical research efforts. *Med Pediatr Oncol* 39 (2), 99-108
54. Fuchs, E.J. and Matzinger, P. (1996) Is cancer dangerous to the immune system? *Semin Immunol* 8 (5), 271-280
55. Fung, K.M. and Trojanowski, J.Q. (1995) Animal models of medulloblastomas and related primitive neuroectodermal tumors. A review. *J Neuropathol Exp Neurol* 54 (3), 285-296
56. Furumoto, K., Soares, L., Engleman, E.G. and Merad, M. (2004) Induction of potent antitumor immunity by in situ targeting of intratumoral DCs. *J Clin Invest* 113 (5), 774-783
57. Gallucci, S. and Matzinger, P. (2001) Danger signals: SOS to the immune system. *Curr Opin Immunol* 13 (1), 114-119
58. Gao, L., Xue, S.A., Hasserjian, R., Cotter, F., Kaeda, J., Goldman, J.M., Dazzi, F. and Stauss, H.J. (2003) Human cytotoxic T lymphocytes specific for Wilms' tumor antigen-1 inhibit engraftment of leukemia-initiating stem cells in non-obese diabetic-severe combined immunodeficient recipients. *Transplantation* 75 (9), 1429-1436
59. Garrett, T.J., Takahashi, T., Clarkson, B.D. and Old, L.J. (1977) Detection of antibody to autologous human leukemia cells by immune adherence assays. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74 (10), 4587-4590
60. Geiger, J.D., Hutchinson, R.J., Hohenkirk, L.F., McKenna, E.A., Yanik, G.A., Levine, J.E., Chang, A.E., Braun, T.M. and Mule, J.J. (2001) Vaccination of pediatric solid tumor patients with tumor lysate-pulsed dendritic cells can expand specific T cells and mediate tumor regression. *Cancer Res* 61 (23), 8513-8519
61. Giangaspero, F., Rigobello, L., Badiali, M., Loda, M., Andreini, L., Basso, G., Zorzi, F. and Montaldi, A. (1992) Large-cell medulloblastomas. A distinct variant with highly aggressive behavior. *Am J Surg Pathol* 16 (7), 687-693
62. Gilbertson, R. (2002) Paediatric embryonic brain tumours. biological and clinical relevance of molecular genetic abnormalities. *Eur J Cancer* 38 (5), 675-685
63. Gilbertson, R.J., Perry, R.H., Kelly, P.J., Pearson, A.D. and Lunec, J. (1997) Prognostic significance of HER2 and HER4 coexpression in childhood medulloblastoma. *Cancer Res* 57 (15), 3272-3280
64. Gnjjatic, S., Nagata, Y., Jager, E., Stockert, E., Shankara, S., Roberts, B.L., Mazzara, G.P., Lee, S.Y., Dunbar, P.R., Dupont, B., Cerundolo, V., Ritter, G., Chen, Y.T., Knuth, A. and Old, L.J. (2000) Strategy for monitoring T cell responses to NY-ESO-1 in patients with any HLA class I allele. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (20), 10917-10922
65. Golbeck, A. (2005) Serologische Identifizierung und Charakterisierung von Tumorantigenen beim Neuroblastom. In *Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit GmbH, Institut für Klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik München*, pp. 147, Ludwig-Maximilians-Universität, Fakultät für Biologie

66. Goldenberg, D.M. (2002) Targeted therapy of cancer with radiolabeled antibodies. *J Nucl Med* 43 (5), 693-713
67. Goodnow, C.C., Sprent, J., de St Groth, B.F. and Vinuesa, C.G. (2005) Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. *Nature* 435 (7042), 590-597
68. Goulmy, E. (2004) Minor histocompatibility antigens: allo target molecules for tumor-specific immunotherapy. *Cancer J* 10 (1), 1-7
69. Graus, F., Keime-Guibert, F., Rene, R., Benyahia, B., Ribalta, T., Ascaso, C., Escaramis, G. and Delattre, J.Y. (2001) Anti-Hu-associated paraneoplastic encephalomyelitis: analysis of 200 patients. *Brain* 124 (Pt 6), 1138-1148
70. Graus, F., Dalmou, J., Rene, R., Tora, M., Malats, N., Verschuuren, J.J., Cardenal, F., Vinolas, N., Garcia del Muro, J., Vadell, C., Mason, W.P., Rosell, R., Posner, J.B. and Real, F.X. (1997) Anti-Hu antibodies in patients with small-cell lung cancer: association with complete response to therapy and improved survival. *J Clin Oncol* 15 (8), 2866-2872
71. Greenberg, P.D. (1991) Adoptive T cell therapy of tumors: mechanisms operative in the recognition and elimination of tumor cells. *Adv Immunol* 49, 281-355
72. Grunebach, F., Muller, M.R. and Brossart, P. (2005) New developments in dendritic cell-based vaccinations: RNA translated into clinics. *Cancer Immunol Immunother* 54 (6), 517-525
73. Gultekin, S.H., Rosenfeld, M.R., Voltz, R., Eichen, J., Posner, J.B. and Dalmau, J. (2000) Paraneoplastic limbic encephalitis: neurological symptoms, immunological findings and tumour association in 50 patients. *Brain* 123 (Pt 7), 1481-1494
74. Gure, A.O., Stockert, E., Arden, K.C., Boyer, A.D., Viars, C.S., Scanlan, M.J., Old, L.J. and Chen, Y.T. (2000) CT10: a new cancer-testis (CT) antigen homologous to CT7 and the MAGE family, identified by representational-difference analysis. *Int J Cancer* 85 (5), 726-732
75. Hamanaka, Y., Suehiro, Y., Fukui, M., Shikichi, K., Imai, K. and Hinoda, Y. (2003) Circulating anti-MUC1 IgG antibodies as a favorable prognostic factor for pancreatic cancer. *Int J Cancer* 103 (1), 97-100
76. Harling-Berg, C.J., Knopf, P.M. and Cserr, H.F. (1991) Myelin basic protein infused into cerebrospinal fluid suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 35 (1-3), 45-51
77. Hayes, R.L., Arbit, E., Odaimi, M., Pannullo, S., Scheff, R., Kravchinskiy, D. and Zaroulis, C. (2001) Adoptive cellular immunotherapy for the treatment of malignant gliomas. *Crit Rev Oncol Hematol* 39 (1-2), 31-42
78. Heimberger, A.B., Crotty, L.E., Archer, G.E., McLendon, R.E., Friedman, A., Dranoff, G., Bigner, D.D. and Sampson, J.H. (2000) Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with tumor homogenate induce immunity against syngeneic intracerebral glioma. *J Neuroimmunol* 103 (1), 16-25
79. Hemminki, A. (2002) From molecular changes to customised therapy. *Eur J Cancer* 38 (3), 333-338
80. Hickey, W.F., Hsu, B.L. and Kimura, H. (1991) T-lymphocyte entry into the central nervous system. *J Neurosci Res* 28 (2), 254-260

81. Holladay, F.P., Heitz-Turner, T., Bayer, W.L. and Wood, G.W. (1996) Autologous tumor cell vaccination combined with adoptive cellular immunotherapy in patients with grade III/IV astrocytoma. *J Neurooncol* 27 (2), 179-189
82. Holler, P.D., Holman, P.O., Shusta, E.V., O'Herrin, S., Wittrup, K.D. and Kranz, D.M. (2000) In vitro evolution of a T cell receptor with high affinity for peptide/MHC. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (10), 5387-5392
83. Hoppe-Hirsch, E., Renier, D., Lellouch-Tubiana, A., Sainte-Rose, C., Pierre-Kahn, A. and Hirsch, J.F. (1990) Medulloblastoma in childhood: progressive intellectual deterioration. *Childs Nerv Syst* 6 (2), 60-65
84. Hortobagyi, G.N. (2001) Overview of treatment results with trastuzumab (Herceptin) in metastatic breast cancer. *Semin Oncol* 28 (6 Suppl 18), 43-47
85. Hsu, F.J., Benike, C., Fagnoni, F., Liles, T.M., Czerwinski, D., Taidi, B., Engleman, E.G. and Levy, R. (1996) Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 2 (1), 52-58
86. Imaizumi, T., Kuramoto, T., Matsunaga, K., Shichijo, S., Yutani, S., Shigemori, M., Oizumi, K. and Itoh, K. (1999) Expression of the tumor-rejection antigen SART1 in brain tumors. *Int J Cancer* 83 (6), 760-764
87. Irani, D.N. and Griffin, D.E. (1996) Regulation of lymphocyte homing into the brain during viral encephalitis at various stages of infection. *J Immunol* 156 (10), 3850-3857
88. Ishida, H., Matsumura, T., Salgaller, M.L., Ohmizono, Y., Kadono, Y. and Sawada, T. (1996) Mage-1 and Mage-3 or -6 expression in neuroblastoma-related pediatric solid tumors. *Int J Cancer* 69 (5), 375-380
89. Jacquot, S. (2000) CD27/CD70 interactions regulate T dependent B cell differentiation. *Immunol Res* 21 (1), 23-30
90. Jäger, D., Taverna, C., Zippelius, A. and Knuth, A. (2004) Identification of tumor antigens as potential target antigens for immunotherapy by serological expression cloning. *Cancer Immunol Immunother* 53 (3), 144-147
91. Jäger, E., Ringhoffer, M., Altmannsberger, M., Arand, M., Karbach, J., Jäger, D., Oesch, F. and Knuth, A. (1997) Immunoselection in vivo: independent loss of MHC class I and melanocyte differentiation antigen expression in metastatic melanoma. *Int J Cancer* 71 (2), 142-147
92. Jäger, E., Stockert, E., Zidianakis, Z., Chen, Y.T., Karbach, J., Jäger, D., Arand, M., Ritter, G., Old, L.J. and Knuth, A. (1999) Humoral immune responses of cancer patients against "Cancer-Testis" antigen NY-ESO-1: correlation with clinical events. *Int J Cancer* 84 (5), 506-510
93. Jäger, E., Jäger, D., Karbach, J., Chen, Y.T., Ritter, G., Nagata, Y., Gnjatich, S., Stockert, E., Arand, M., Old, L.J. and Knuth, A. (2000) 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* 191 (4), 625-630
94. Jäger, E., Chen, Y.T., Drijfhout, J.W., Karbach, J., Ringhoffer, M., Jäger, D., Arand, M., Wada, H., Noguchi, Y., Stockert, E., Old, L.J. and Knuth, A. (1998) Simultaneous humoral and cellular immune response against cancer-testis antigen NY-ESO-1: definition of human

- histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2-binding peptide epitopes. *J Exp Med* 187 (2), 265-270
95. Jäger, E., Gnjatic, S., Nagata, Y., Stockert, E., Jäger, D., Karbach, J., Neumann, A., Rieckenberg, J., Chen, Y.T., Ritter, G., Hoffman, E., Arand, M., Old, L.J. and Knuth, A. (2000) 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* 97 (22), 12198-12203
96. Jäger, E., Nagata, Y., Gnjatic, S., Wada, H., Stockert, E., Karbach, J., Dunbar, P.R., Lee, S.Y., Jungbluth, A., Jäger, D., Arand, M., Ritter, G., Cerundolo, V., Dupont, B., Chen, Y.T., Old, L.J. and Knuth, A. (2000) Monitoring CD8 T cell responses to NY-ESO-1: correlation of humoral and cellular immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (9), 4760-4765
97. Jiang, G., Liu, L., Buyse, I.M., Simon, D. and Huang, S. (1999) Decreased RIZ1 expression but not RIZ2 in hepatoma and suppression of hepatoma tumorigenicity by RIZ1. *Int J Cancer* 83 (4), 541-546
98. Jiang, G.L. and Huang, S. (2000) The yin-yang of PR-domain family genes in tumorigenesis. *Histol Histopathol* 15 (1), 109-117
99. Kaatsch, P., Rickert, C.H., Kuhl, J., Schuz, J. and Michaelis, J. (2001) Population-based epidemiologic data on brain tumors in German children. *Cancer* 92 (12), 3155-3164
100. Karim, M., Bushell, A.R. and Wood, K.J. (2002) Regulatory T cells in transplantation. *Curr Opin Immunol* 14 (5), 584-591
101. Kaufman, H.L. and Disis, M.L. (2004) Immune system versus tumor: shifting the balance in favor of DCs and effective immunity. *J Clin Invest* 113 (5), 664-667
102. Kessels, H.W., van Den Boom, M.D., Spits, H., Hooijberg, E. and Schumacher, T.N. (2000) Changing T cell specificity by retroviral T cell receptor display. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (26), 14578-14583
103. Kim, J.Y., Sutton, M.E., Lu, D.J., Cho, T.A., Goumnerova, L.C., Goritchenko, L., Kaufman, J.R., Lam, K.K., Billet, A.L., Tarbell, N.J., Wu, J., Allen, J.C., Stiles, C.D., Segal, R.A. and Pomeroy, S.L. (1999) Activation of neurotrophin-3 receptor TrkC induces apoptosis in medulloblastomas. *Cancer Res* 59 (3), 711-719
104. Kipriyanov, S.M. and Le Gall, F. (2004) Recent advances in the generation of bispecific antibodies for tumor immunotherapy. *Curr Opin Drug Discov Devel* 7 (2), 233-242
105. Knuth, A., Jager, D. and Jager, E. (2000) Cancer immunotherapy in clinical oncology. *Cancer Chemother Pharmacol* 46 Suppl, S46-51
106. Knutson, K.L. and Disis, M.L. (2005) Tumor antigen-specific T helper cells in cancer immunity and immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 54 (8), 721-728
107. Kortmann, R.D., Timmermann, B., Kuhl, J., Willich, N., Flentje, M., Meisner, C. and Bamberg, M. (1999) HIT '91 (prospective, co-operative study for the treatment of malignant brain tumors in childhood): accuracy and acute toxicity of the irradiation of the craniospinal axis. Results of the quality assurance program. *Strahlenther Onkol* 175 (4), 162-169
108. Kortmann, R.D., Kuhl, J., Timmermann, B., Mittler, U., Urban, C., Budach, V., Richter, E., Willich, N., Flentje, M., Berthold, F., Slave, I., Wolff, J., Meisner, C., Wiestler, O., Sorensen,

- N., Warmuth-Metz, M. and Bamberg, M. (2000) Postoperative neoadjuvant chemotherapy before radiotherapy as compared to immediate radiotherapy followed by maintenance chemotherapy in the treatment of medulloblastoma in childhood: results of the German prospective randomized trial HIT '91. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 46 (2), 269-279
109. Kozmik, Z., Sure, U., Ruedi, D., Busslinger, M. and Aguzzi, A. (1995) Deregulated expression of PAX5 in medulloblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (12), 5709-5713
110. Kruse, C.A., Cepeda, L., Owens, B., Johnson, S.D., Stears, J. and Lillehei, K.O. (1997) Treatment of recurrent glioma with intracavitary alloreactive cytotoxic T lymphocytes and interleukin-2. *Cancer Immunol Immunother* 45 (2), 77-87
111. Lau, R., Wang, F., Jeffery, G., Marty, V., Kuniyoshi, J., Bade, E., Ryback, M.E. and Weber, J. (2001) Phase I trial of intravenous peptide-pulsed dendritic cells in patients with metastatic melanoma. *J Immunother* 24 (1), 66-78
112. Lehmann, F., Marchand, M., Hainaut, P., Pouillart, P., Sastre, X., Ikeda, H., Boon, T. and Coulie, P.G. (1995) Differences in the antigens recognized by cytolytic T cells on two successive metastases of a melanoma patient are consistent with immune selection. *Eur J Immunol* 25 (2), 340-347
113. Lenschow, D.J., Walunas, T.L. and Bluestone, J.A. (1996) CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 14, 233-258
114. Liao, L.M., Black, K.L., Prins, R.M., Sykes, S.N., DiPatre, P.L., Cloughesy, T.F., Becker, D.P. and Bronstein, J.M. (1999) Treatment of intracranial gliomas with bone marrow-derived dendritic cells pulsed with tumor antigens. *J Neurosurg* 90 (6), 1115-1124
115. Liao, L.M., Lallone, R.L., Seitz, R.S., Buznikov, A., Gregg, J.P., Kornblum, H.I., Nelson, S.F. and Bronstein, J.M. (2000) Identification of a human glioma-associated growth factor gene, granulin, using differential immuno-absorption. *Cancer Res* 60 (5), 1353-1360
116. Ligibel, J.A. and Winer, E.P. (2002) Trastuzumab/chemotherapy combinations in metastatic breast cancer. *Semin Oncol* 29 (3 Suppl 11), 38-43
117. Maeurer, M.J., Gollin, S.M., Storkus, W.J., Swaney, W., Karbach, J., Martin, D., Castelli, C., Salter, R., Knuth, A. and Lotze, M.T. (1996) Tumor escape from immune recognition: loss of HLA-A2 melanoma cell surface expression is associated with a complex rearrangement of the short arm of chromosome 6. *Clin Cancer Res* 2 (4), 641-652
118. Mandelboim, O., Berke, G., Fridkin, M., Feldman, M., Eisenstein, M. and Eisenbach, L. (1994) CTL induction by a tumour-associated antigen octapeptide derived from a murine lung carcinoma. *Nature* 369 (6475), 67-71
119. Marchand, M., van Baren, N., Weynants, P., Brichard, V., Dreno, B., Tessier, M.H., Rankin, E., Parmiani, G., Arienti, F., Humblet, Y., Bourlond, A., Vanwijck, R., Lienard, D., Beauvain, M., Dietrich, P.Y., Russo, V., Kerger, J., Masucci, G., Jager, E., De Greve, J., Atzpodien, J., Brasseur, F., Coulie, P.G., van der Bruggen, P. and Boon, T. (1999) Tumor regressions observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide encoded by gene MAGE-3 and presented by HLA-A1. *Int J Cancer* 80 (2), 219-230
120. Marijt, W.A., Heemskerk, M.H., Kloosterboer, F.M., Goulmy, E., Kester, M.G., van der Hoorn, M.A., van Luxemburg-Heys, S.A., Hoogeboom, M., Mutis, T., Drijfhout, J.W., van Rood, J.J., Willemze, R. and Falkenburg, J.H. (2003) Hematopoiesis-restricted minor

- histocompatibility antigens HA-1- or HA-2-specific T cells can induce complete remissions of relapsed leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (5), 2742-2747
121. Markiewicz, M.A. and Kast, W.M. (2004) Progress in the development of immunotherapy of cancer using ex vivo-generated dendritic cells expressing multiple tumor antigen epitopes. *Cancer Invest* 22 (3), 417-434
122. Marymont, M.H., Geohas, J., Tomita, T., Strauss, L., Brand, W.N. and Mittal, B.B. (1996) Hyperfractionated craniospinal radiation in medulloblastoma. *Pediatr Neurosurg* 24 (4), 178-184
123. Mastronardi, L., Ferrante, L., Lunardi, P., Cervoni, L. and Fortuna, A. (1991) Association between neuroepithelial tumor and multiple intestinal polyposis (Turcot's syndrome): report of a case and critical analysis of the literature. *Neurosurgery* 28 (3), 449-452
124. Matzinger, P. (1998) An innate sense of danger. *Semin Immunol* 10 (5), 399-415
125. Matzinger, P. (2002) An innate sense of danger. *Ann N Y Acad Sci* 961, 341-342
126. Matzinger, P. (2002) The danger model: a renewed sense of self. *Science* 296 (5566), 301-305
127. Matzinger, P. (2004) The danger model. *Vox Sang* 87 Suppl 2, 18
128. McKeage, K. and Perry, C.M. (2002) Trastuzumab: a review of its use in the treatment of metastatic breast cancer overexpressing HER2. *Drugs* 62 (1), 209-243
129. Melief, C.J. (2003) Mini-review: Regulation of cytotoxic T lymphocyte responses by dendritic cells: peaceful coexistence of cross-priming and direct priming? *Eur J Immunol* 33 (10), 2645-2654
130. Melief, C.J. and Kast, W.M. (1992) Lessons from T cell responses to virus induced tumours for cancer eradication in general. *Cancer Surv* 13, 81-99
131. Michiels, E.M., Weiss, M.M., Hoovers, J.M., Baak, J.P., Voute, P.A., Baas, F. and Hermsen, M.A. (2002) Genetic alterations in childhood medulloblastoma analyzed by comparative genomic hybridization. *J Pediatr Hematol Oncol* 24 (3), 205-210
132. Milenic, D.E. (2002) Monoclonal antibody-based therapy strategies: providing options for the cancer patient. *Curr Pharm Des* 8 (19), 1749-1764
133. 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. and Monaci, P. (2003) Identification of tumor-associated antigens by screening phage-displayed human cDNA libraries with sera from tumor patients. *Int J Cancer* 106 (4), 534-544
134. Mischo, A., Wadle, A., Watzig, K., Jager, D., Stockert, E., Santiago, D., Ritter, G., Regitz, E., Jager, E., Knuth, A., Old, L., Pfreundschuh, M. and Renner, C. (2003) Recombinant antigen expression on yeast surface (RAYs) for the detection of serological immune responses in cancer patients. *Cancer Immun* 3, 5
135. Mocellin, S., Rossi, C.R. and Nitti, D. (2004) Cancer vaccine development: on the way to break immune tolerance to malignant cells. *Exp Cell Res* 299 (2), 267-278
136. Morgan, R.A., Dudley, M.E., Yu, Y.Y., Zheng, Z., Robbins, P.F., Theoret, M.R., Wunderlich, J.R., Hughes, M.S., Restifo, N.P. and Rosenberg, S.A. (2003) 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* 171 (6), 3287-3295
137. Morris, E., Hart, D., Gao, L., Tsallios, A., Xue, S.A. and Stauss, H. (2005) Generation of tumor-specific T-cell therapies. *Blood Rev*
138. Mumberg, D., Monach, P.A., Wanderling, S., Philip, M., Toledano, A.Y., Schreiber, R.D. and Schreiber, H. (1999) CD4(+) T cells eliminate MHC class II-negative cancer cells in vivo by indirect effects of IFN-gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (15), 8633-8638
139. Nakatsura, T., Senju, S., Ito, M., Nishimura, Y. and Itoh, K. (2002) Cellular and humoral immune responses to a human pancreatic cancer antigen, coactosin-like protein, originally defined by the SEREX method. *Eur J Immunol* 32 (3), 826-836
140. Nestle, F.O., Alijagic, S., Gilliet, M., Sun, Y., Grabbe, S., Dummer, R., Burg, G. and Schadendorf, D. (1998) Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 4 (3), 328-332
141. Nimmerjahn, F., Milosevic, S., Behrends, U., Jaffee, E.M., Pardoll, D.M., Bornkamm, G.W. and Mautner, J. (2003) Major histocompatibility complex class II-restricted presentation of a cytosolic antigen by autophagy. *Eur J Immunol* 33 (5), 1250-1259
142. Nishikawa, H., Tanida, K., Ikeda, H., Sakakura, M., Miyahara, Y., Aota, T., Mukai, K., Watanabe, M., Kuribayashi, K., Old, L.J. and Shiku, H. (2001) Role of SEREX-defined immunogenic wild-type cellular molecules in the development of tumor-specific immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (25), 14571-14576
143. Nishikawa, H., Kato, T., Tanida, K., Hiasa, A., Tawara, I., Ikeda, H., Ikarashi, Y., Wakasugi, H., Kronenberg, M., Nakayama, T., Taniguchi, M., Kuribayashi, K., Old, L.J. and Shiku, H. (2003) CD4+ CD25+ T cells responding to serologically defined autoantigens suppress antitumor immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (19), 10902-10906
144. O, I., Blaszczyk-Thurin, M., Shen, C.T. and Ertl, H.C. (2003) A DNA vaccine expressing tyrosinase-related protein-2 induces T-cell-mediated protection against mouse glioblastoma. *Cancer Gene Ther* 10 (9), 678-688
145. Obata, Y., Takahashi, T., Sakamoto, J., Tamaki, H., Tominaga, S., Hamajima, N., Chen, Y.T. and Old, L.J. (2000) SEREX analysis of gastric cancer antigens. *Cancer Chemother Pharmacol* 46 Suppl, S37-42
146. Oberthuer, A., Hero, B., Spitz, R., Berthold, F. and Fischer, M. (2004) The tumor-associated antigen PRAME is universally expressed in high-stage neuroblastoma and associated with poor outcome. *Clin Cancer Res* 10 (13), 4307-4313
147. Okada, H., Attanucci, J., Giezeman-Smits, K.M., Brissette-Storkus, C., Fellows, W.K., Gambotto, A., Pollack, L.F., Pogue-Geile, K., Lotze, M.T., Bozik, M.E. and Chambers, W.H. (2001) Immunization with an antigen identified by cytokine tumor vaccine-assisted SEREX (CAS) suppressed growth of the rat 9L glioma in vivo. *Cancer Res* 61 (6), 2625-2631
148. Onizuka, S., Tawara, I., Shimizu, J., Sakaguchi, S., Fujita, T. and Nakayama, E. (1999) Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. *Cancer Res* 59 (13), 3128-3133

149. Ono, M., Yasunaga, T., Miyata, T. and Ushikubo, H. (1986) Nucleotide sequence of human endogenous retrovirus genome related to the mouse mammary tumor virus genome. *J Virol* 60 (2), 589-598
150. Packer, R.J., Goldwein, J., Nicholson, H.S., Vezina, L.G., Allen, J.C., Ris, M.D., Muraszko, K., Rorke, L.B., Wara, W.M., Cohen, B.H. and Boyett, J.M. (1999) Treatment of children with medulloblastomas with reduced-dose craniospinal radiation therapy and adjuvant chemotherapy: A Children's Cancer Group Study. *J Clin Oncol* 17 (7), 2127-2136
151. Paglia, P., Chiodoni, C., Rodolfo, M. and Colombo, M.P. (1996) Murine dendritic cells loaded in vitro with soluble protein prime cytotoxic T lymphocytes against tumor antigen in vivo. *J Exp Med* 183 (1), 317-322
152. Park, T.S., Hoffman, H.J., Hendrick, E.B., Humphreys, R.P. and Becker, L.E. (1983) Medulloblastoma: clinical presentation and management. Experience at the hospital for sick children, toronto, 1950-1980. *J Neurosurg* 58 (4), 543-552
153. Paulino, A.C. and Fowler, B.Z. (2005) Secondary neoplasms after radiotherapy for a childhood solid tumor. *Pediatr Hematol Oncol* 22 (2), 89-101
154. Pazzaglia, S., Mancuso, M., Atkinson, M.J., Tanori, M., Rebessi, S., Majo, V.D., Covelli, V., Hahn, H. and Saran, A. (2002) High incidence of medulloblastoma following X-ray-irradiation of newborn Ptc1 heterozygous mice. *Oncogene* 21 (49), 7580-7584
155. Pfreundschuh, M. (2000) Exploitation of the B cell repertoire for the identification of human tumor antigens. *Cancer Chemother Pharmacol* 46 Suppl, S3-7
156. Pfreundschuh, M., Shiku, H., Takahashi, T., Ueda, R., Ransohoff, J., Oettgen, H.F. and Old, L.J. (1978) Serological analysis of cell surface antigens of malignant human brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75 (10), 5122-5126
157. Plautz, G.E., Miller, D.W., Barnett, G.H., Stevens, G.H., Maffett, S., Kim, J., Cohen, P.A. and Shu, S. (2000) T cell adoptive immunotherapy of newly diagnosed gliomas. *Clin Cancer Res* 6 (6), 2209-2218
158. Prados, M.D., Edwards, M.S., Chang, S.M., Russo, C., Davis, R., Rabbitt, J., Page, M., Lamborn, K. and Wara, W.M. (1999) Hyperfractionated craniospinal radiation therapy for primitive neuroectodermal tumors: results of a Phase II study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 43 (2), 279-285
159. Preuss, K.D., Zwick, C., Bormann, C., Neumann, F. and Pfreundschuh, M. (2002) Analysis of the B-cell repertoire against antigens expressed by human neoplasms. *Immunol Rev* 188, 43-50
160. Reynolds, N.A. and Wagstaff, A.J. (2004) Cetuximab: in the treatment of metastatic colorectal cancer. *Drugs* 64 (1), 109-118; discussion 119-121
161. Riddell, S.R. (2004) Finding a place for tumor-specific T cells in targeted cancer therapy. *J Exp Med* 200 (12), 1533-1537
162. Rini, B. (2004) Recent clinical development of dendritic cell-based immunotherapy for prostate cancer. *Expert Opin Biol Ther* 4 (11), 1729-1734

163. Ris, M.D., Packer, R., Goldwein, J., Jones-Wallace, D. and Boyett, J.M. (2001) Intellectual outcome after reduced-dose radiation therapy plus adjuvant chemotherapy for medulloblastoma: a Children's Cancer Group study. *J Clin Oncol* 19 (15), 3470-3476
164. Robbins, P.F., El-Gamil, M., Li, Y.F., Zeng, G., Dudley, M. and Rosenberg, S.A. (2002) Multiple HLA class II-restricted melanocyte differentiation antigens are recognized by tumor-infiltrating lymphocytes from a patient with melanoma. *J Immunol* 169 (10), 6036-6047
165. Robbins, P.F., El-Gamil, M., Li, Y.F., Kawakami, Y., Loftus, D., Appella, E. and Rosenberg, S.A. (1996) A mutated beta-catenin gene encodes a melanoma-specific antigen recognized by tumor infiltrating lymphocytes. *J Exp Med* 183 (3), 1185-1192
166. Robbins, P.F., el-Gamil, M., Li, Y.F., Topalian, S.L., Rivoltini, L., Sakaguchi, K., Appella, E., Kawakami, Y. and Rosenberg, S.A. (1995) Cloning of a new gene encoding an antigen recognized by melanoma-specific HLA-A24-restricted tumor-infiltrating lymphocytes. *J Immunol* 154 (11), 5944-5950
167. Rodolfo, M., Luksch, R., Stockert, E., Chen, Y.T., Collini, P., Ranzani, T., Lombardo, C., Dalerba, P., Rivoltini, L., Arienti, F., Fossati-Bellani, F., Old, L.J., Parmiani, G. and Castelli, C. (2003) Antigen-specific immunity in neuroblastoma patients: antibody and T-cell recognition of NY-ESO-1 tumor antigen. *Cancer Res* 63 (20), 6948-6955
168. Rooney, C.M., Smith, C.A., Ng, C.Y., Loftin, S.K., Sixbey, J.W., Gan, Y., Srivastava, D.K., Bowman, L.C., Krance, R.A., Brenner, M.K. and Heslop, H.E. (1998) Infusion of cytotoxic T cells for the prevention and treatment of Epstein-Barr virus-induced lymphoma in allogeneic transplant recipients. *Blood* 92 (5), 1549-1555
169. Rosenberg, S.A. (1997) Cancer vaccines based on the identification of genes encoding cancer regression antigens. *Immunol Today* 18 (4), 175-182
170. Rosenberg, S.A. and White, D.E. (1996) Vitiligo in patients with melanoma: normal tissue antigens can be targets for cancer immunotherapy. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* 19 (1), 81-84
171. Rosenberg, S.A., Yang, J.C., Schwartzentruber, D.J., Hwu, P., Marincola, F.M., Topalian, S.L., Restifo, N.P., Dudley, M.E., Schwarz, S.L., Spiess, P.J., Wunderlich, J.R., Parkhurst, M.R., Kawakami, Y., Seipp, C.A., Einhorn, J.H. and White, D.E. (1998) Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nat Med* 4 (3), 321-327
172. Ross, J.S., Gray, K., Gray, G.S., Worland, P.J. and Rolfe, M. (2003) Anticancer antibodies. *Am J Clin Pathol* 119 (4), 472-485
173. Ross, J.S., Schenkein, D.P., Pietrusko, R., Rolfe, M., Linette, G.P., Stec, J., Stagliano, N.E., Ginsburg, G.S., Symmans, W.F., Pusttai, L. and Hortobagyi, G.N. (2004) Targeted therapies for cancer 2004. *Am J Clin Pathol* 122 (4), 598-609
174. Rutkowski, S., Bode, U., Deinlein, F., Ottensmeier, H., Warmuth-Metz, M., Soerensen, N., Graf, N., Emser, A., Pietsch, T., Wolff, J.E., Kortmann, R.D. and Kuehl, J. (2005) Treatment of early childhood medulloblastoma by postoperative chemotherapy alone. *N Engl J Med* 352 (10), 978-986
175. Sadovnikova, E. and Stauss, H.J. (1996) Peptide-specific cytotoxic T lymphocytes restricted by nonself major histocompatibility complex class I molecules: reagents for tumor immunotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (23), 13114-13118

176. Sahin, U., Tureci, O., Schmitt, H., Cochlovius, B., Johannes, T., Schmits, R., Stenner, F., Luo, G., Schober, I. and Pfreundschuh, M. (1995) Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (25), 11810-11813
177. Sahin, U., Koslowski, M., Tureci, O., Eberle, T., Zwick, C., Romeike, B., Moringlane, J.R., Schwechheimer, K., Feiden, W. and Pfreundschuh, M. (2000) Expression of cancer testis genes in human brain tumors. *Clin Cancer Res* 6 (10), 3916-3922
178. Sakaguchi, S. (2005) Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 6 (4), 345-352
179. Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M. and Toda, M. (1995) Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155 (3), 1151-1164
180. Saltz, L.B., Meropol, N.J., Loehrer, P.J., Sr., Needle, M.N., Kopit, J. and Mayer, R.J. (2004) Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor. *J Clin Oncol* 22 (7), 1201-1208
181. Sampson, J.H., Archer, G.E., Ashley, D.M., Fuchs, H.E., Hale, L.P., Dranoff, G. and Bigner, D.D. (1996) Subcutaneous vaccination with irradiated, cytokine-producing tumor cells stimulates CD8+ cell-mediated immunity against tumors located in the "immunologically privileged" central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (19), 10399-10404
182. Sasaki, M., Nakahira, K., Kawano, Y., Katakura, H., Yoshimine, T., Shimizu, K., Kim, S.U. and Ikenaka, K. (2001) MAGE-E1, a new member of the melanoma-associated antigen gene family and its expression in human glioma. *Cancer Res* 61 (12), 4809-4814
183. Scanlan, M.J., Gure, A.O., Jungbluth, A.A., Old, L.J. and Chen, Y.T. (2002) Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy. *Immunol Rev* 188, 22-32
184. Scanlan, M.J., Chen, Y.T., Williamson, B., Gure, A.O., Stockert, E., Gordan, J.D., Tureci, O., Sahin, U., Pfreundschuh, M. and Old, L.J. (1998) Characterization of human colon cancer antigens recognized by autologous antibodies. *Int J Cancer* 76 (5), 652-658
185. Scarcella, D.L., Chow, C.W., Gonzales, M.F., Economou, C., Bresseur, F. and Ashley, D.M. (1999) Expression of MAGE and GAGE in high-grade brain tumors: a potential target for specific immunotherapy and diagnostic markers. *Clin Cancer Res* 5 (2), 335-341
186. Schlichtholz, B., Tredaniel, J., Lubin, R., Zalzman, G., Hirsch, A. and Soussi, T. (1994) Analyses of p53 antibodies in sera of patients with lung carcinoma define immunodominant regions in the p53 protein. *Br J Cancer* 69 (5), 809-816
187. Schmits, R., Cochlovius, B., Treitz, G., Regitz, E., Ketter, R., Preuss, K.D., Romeike, B.F. and Pfreundschuh, M. (2002) Analysis of the antibody repertoire of astrocytoma patients against antigens expressed by gliomas. *Int J Cancer* 98 (1), 73-77
188. Shevach, E.M. (2000) Suppressor T cells: Rebirth, function and homeostasis. *Curr Biol* 10 (15), R572-575
189. Shevach, E.M. (2002) CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol* 2 (6), 389-400

190. Shiku, H., Takahashi, T. and Oettgen, H.F. (1976) Cell surface antigens of human malignant melanoma. II. Serological typing with immune adherence assays and definition of two new surface antigens. *J Exp Med* 144 (4), 873-881
191. Shiku, H., Takahashi, T., Resnick, L.A., Oettgen, H.F. and Old, L.J. (1977) Cell surface antigens of human malignant melanoma. III. Recognition of autoantibodies with unusual characteristics. *J Exp Med* 145 (3), 784-789
192. Silber, J.H., Radcliffe, J., Peckham, V., Perilongo, G., Kishnani, P., Fridman, M., Goldwein, J.W. and Meadows, A.T. (1992) Whole-brain irradiation and decline in intelligence: the influence of dose and age on IQ score. *J Clin Oncol* 10 (9), 1390-1396
193. Skipper, J.C., Hendrickson, R.C., Gulden, P.H., Brichard, V., Van Pel, A., Chen, Y., Shabanowitz, J., Wolfel, T., Slingluff, C.L., Jr., Boon, T., Hunt, D.F. and Engelhard, V.H. (1996) An HLA-A2-restricted tyrosinase antigen on melanoma cells results from posttranslational modification and suggests a novel pathway for processing of membrane proteins. *J Exp Med* 183 (2), 527-534
194. Soussi, T. (2000) p53 Antibodies in the sera of patients with various types of cancer: a review. *Cancer Res* 60 (7), 1777-1788
195. Spoudeas, H.A., Hindmarsh, P.C., Matthews, D.R. and Brook, C.G. (1996) Evolution of growth hormone neurosecretory disturbance after cranial irradiation for childhood brain tumours: a prospective study. *J Endocrinol* 150 (2), 329-342
196. Steele-Perkins, G., Fang, W., Yang, X.H., Van Gele, M., Carling, T., Gu, J., Buyse, I.M., Fletcher, J.A., Liu, J., Bronson, R., Chadwick, R.B., de la Chapelle, A., Zhang, X., Speleman, F. and Huang, S. (2001) Tumor formation and inactivation of RIZ1, an Rb-binding member of a nuclear protein-methyltransferase superfamily. *Genes Dev* 15 (17), 2250-2262
197. Stockert, E., Jager, E., Chen, Y.T., Scanlan, M.J., Gout, I., Karbach, J., Arand, M., Knuth, A. and Old, L.J. (1998) A survey of the humoral immune response of cancer patients to a panel of human tumor antigens. *J Exp Med* 187 (8), 1349-1354
198. Struss, A.K., Romeike, B.F., Munnia, A., Nastainczyk, W., Steudel, W.I., Konig, J., Ohgaki, H., Feiden, W., Fischer, U. and Meese, E. (2001) PHF3-specific antibody responses in over 60% of patients with glioblastoma multiforme. *Oncogene* 20 (31), 4107-4114
199. Toes, R.E., Ossendorp, F., Offringa, R. and Melief, C.J. (1999) CD4 T cells and their role in antitumor immune responses. *J Exp Med* 189 (5), 753-756
200. Topalian, S.L., Gonzales, M.I., Parkhurst, M., Li, Y.F., Southwood, S., Sette, A., Rosenberg, S.A. and Robbins, P.F. (1996) Melanoma-specific CD4+ T cells recognize nonmutated HLA-DR-restricted tyrosinase epitopes. *J Exp Med* 183 (5), 1965-1971
201. Türeci, O., Sahin, U. and Pfreundschuh, M. (1997) Serological analysis of human tumor antigens: molecular definition and implications. *Mol Med Today* 3 (8), 342-349
202. Türeci, O., Schmitt, H., Fadle, N., Pfreundschuh, M. and Sahin, U. (1997) Molecular definition of a novel human galectin which is immunogenic in patients with Hodgkin's disease. *J Biol Chem* 272 (10), 6416-6422
203. Türeci, O., Sahin, U., Zwick, C., Koslowski, M., Seitz, G. and Pfreundschuh, M. (1998) Identification of a meiosis-specific protein as a member of the class of cancer/testis antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (9), 5211-5216

204. Türeci, O., Sahin, U., Schobert, I., Koslowski, M., Scmitt, H., Schild, H.J., Stenner, F., Seitz, G., Rammensee, H.G. and Pfreundschuh, M. (1996) 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* 56 (20), 4766-4772
205. Van Bleek, G.M. and Nathenson, S.G. (1990) Isolation of an endogenously processed immunodominant viral peptide from the class I H-2Kb molecule. *Nature* 348 (6298), 213-216
206. Van den Eynde, B., Peeters, O., De Backer, O., Gaugler, B., Lucas, S. and Boon, T. (1995) A new family of genes coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *J Exp Med* 182 (3), 689-698
207. van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van den Eynde, B., Knuth, A. and Boon, T. (1991) A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254 (5038), 1643-1647
208. Virasch, N. and Kruse, C.A. (2001) Strategies using the immune system for therapy of brain tumors. *Hematol Oncol Clin North Am* 15 (6), 1053-1071
209. von Mehren, M., Arlen, P., Tsang, K.Y., Rogatko, A., Meropol, N., Cooper, H.S., Davey, M., McLaughlin, S., Schlom, J. and Weiner, L.M. (2000) Pilot study of a dual gene recombinant avipox vaccine containing both carcinoembryonic antigen (CEA) and B7.1 transgenes in patients with recurrent CEA-expressing adenocarcinomas. *Clin Cancer Res* 6 (6), 2219-2228
210. Walker, P.R., Calzascia, T., de Tribolet, N. and Dietrich, P.Y. (2003) T-cell immune responses in the brain and their relevance for cerebral malignancies. *Brain Res Brain Res Rev* 42 (2), 97-122
211. Wang, R.F. (2001) The role of MHC class II-restricted tumor antigens and CD4+ T cells in antitumor immunity. *Trends Immunol* 22 (5), 269-276
212. Wang, R.F., Robbins, P.F., Kawakami, Y., Kang, X.Q. and Rosenberg, S.A. (1995) Identification of a gene encoding a melanoma tumor antigen recognized by HLA-A31-restricted tumor-infiltrating lymphocytes. *J Exp Med* 181 (2), 799-804
213. Weller, M. and Fontana, A. (1995) The failure of current immunotherapy for malignant glioma. Tumor-derived TGF-beta, T-cell apoptosis, and the immune privilege of the brain. *Brain Res Brain Res Rev* 21 (2), 128-151
214. Wiedenfeld, E.A., Fernandez-Vina, M., Berzofsky, J.A. and Carbone, D.P. (1994) Evidence for selection against human lung cancers bearing p53 missense mutations which occur within the HLA A*0201 peptide consensus motif. *Cancer Res* 54 (5), 1175-1177
215. Wikstrand, C.J., Cokgor, I., Sampson, J.H. and Bigner, D.D. (1999) Monoclonal antibody therapy of human gliomas: current status and future approaches. *Cancer Metastasis Rev* 18 (4), 451-464
216. Wischhusen, J., Jung, G., Radovanovic, I., Beier, C., Steinbach, J.P., Rimmer, A., Huang, H., Schulz, J.B., Ohgaki, H., Aguzzi, A., Rammensee, H.G. and Weller, M. (2002) Identification of CD70-mediated apoptosis of immune effector cells as a novel immune escape pathway of human glioblastoma. *Cancer Res* 62 (9), 2592-2599

217. Wölfl, M., Jungbluth, A.A., Garrido, F., Cabrera, T., Meyen-Southard, S., Spitz, R., Ernestus, K. and Berthold, F. (2005) Expression of MHC class I, MHC class II, and cancer germline antigens in neuroblastoma. *Cancer Immunol Immunother* 54 (4), 400-406
218. Yannelli, J.R. and Wroblewski, J.M. (2004) On the road to a tumor cell vaccine: 20 years of cellular immunotherapy. *Vaccine* 23 (1), 97-113
219. Yee, C. (2005) Adoptive T cell therapy: Addressing challenges in cancer immunotherapy. *J Transl Med* 3 (1), 17
220. Yee, C., Thompson, J.A., Byrd, D., Riddell, S.R., Roche, P., Celis, E. and Greenberg, P.D. (2002) 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 U S A* 99 (25), 16168-16173
221. Yellen-Shaw, A.J., Wherry, E.J., Dubois, G.C. and Eisenlohr, L.C. (1997) Point mutation flanking a CTL epitope ablates in vitro and in vivo recognition of a full-length viral protein. *J Immunol* 158 (7), 3227-3234
222. Zarour, H.M., Storkus, W.J., Brusica, V., Williams, E. and Kirkwood, J.M. (2000) NY-ESO-1 encodes DRB1*0401-restricted epitopes recognized by melanoma-reactive CD4⁺ T cells. *Cancer Res* 60 (17), 4946-4952
223. Zeltzer, P.M., Boyett, J.M., Finlay, J.L., Albright, A.L., Rorke, L.B., Milstein, J.M., Allen, J.C., Stevens, K.R., Stanley, P., Li, H., Wisoff, J.H., Geyer, J.R., McGuire-Cullen, P., Stehbens, J.A., Shurin, S.B. and Packer, R.J. (1999) Metastasis stage, adjuvant treatment, and residual tumor are prognostic factors for medulloblastoma in children: conclusions from the Children's Cancer Group 921 randomized phase III study. *J Clin Oncol* 17 (3), 832-845
224. Zeng, G., Touloukian, C.E., Wang, X., Restifo, N.P., Rosenberg, S.A. and Wang, R.F. (2000) Identification of CD4⁺ T cell epitopes from NY-ESO-1 presented by HLA-DR molecules. *J Immunol* 165 (2), 1153-1159
225. Zhang, A., Yeung, P.L., Li, C.W., Tsai, S.C., Dinh, G.K., Wu, X., Li, H. and Chen, J.D. (2004) Identification of a novel family of ankyrin repeats containing cofactors for p160 nuclear receptor coactivators. *J Biol Chem* 279 (32), 33799-33805
226. Zubler, R.H. (2001) Naive and memory B cells in T-cell-dependent and T-independent responses. *Springer Semin Immunopathol* 23 (4), 405-419

7. Anhang

7.1. Danksagung

Zum Schluss möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Stefan Burdach als Direktor der Kinderklinik und -Poliklinik Schwabing der Technischen Universität München für Durchsicht, Korrektur und Begutachtung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Georg W. Bornkamm als Leiter des GSF-Instituts für Klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik München, für die Möglichkeit, einen Großteil der Laborarbeit in seinem Institut durchzuführen.

Herrn Prof. Dr. Stefan Müller-Weihrich als ehemaligem Leiter der Abteilung für pädiatrische Onkologie und Hämatologie der Kinderklinik Schwabing, welcher diese Arbeit ermöglicht und bis zu seinem zu frühen Tode mitbetreut hat.

Ganz besonders Frau Dr. Uta Behrends für die bestmögliche Betreuung, für immerwährende Ansprechbarkeit, ihre Geduld, den einen oder anderen großen Motivationsschub und die Nikolausessen !

Herrn Dr. Josef Mautner und Frau Brigitte Lechner für die Einführung in die Methodik sowie Hilfe und Ratschläge bei Problemen.

Stefan Pirson und Dr. Rainer Haseneder für das Korrekturlesen, die Hilfe bei Abbildungen und bei anderen Problemen am PC.

Meinen Eltern für die Finanzierung meiner Ausbildung, ihre Unterstützung und ihr reges Interesse am Fortgang der Arbeit.

7.2. Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Name: Rößler
Vorname: Sabine
Geburtsdatum: 07. 04. 1976
Geburtsort: Marktredwitz
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

1982 – 1986: Grundschule Neusorg
1986 – 1995: Otto-Hahn-Gymnasium Marktredwitz,
Allgemeine Hochschulreife

Hochschulbildung:

1995 – 1997: Medizinstudium, vorklinischer Studienabschnitt,
Universität Regensburg
1997 – 2002: Medizinstudium, klinischer Studienabschnitt,
Technische Universität München

Berufstätigkeit:

2002 – 2004: Ärztin im Praktikum, Kinderklinik Rosenheim
seit 1. April 2004: Assistenzärztin,
wissenschaftliche Mitarbeit in der Kinderklinik Schwabing
der Technischen Universität München