

Charakterisierung von Tumorantigenen des
kutanen T-Zell Lymphoms:
Serologische Immunantwort und
Expressionsanalyse

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Friederike Fellenberg

geb. am 07.10.1975 in Kassel

Würzburg, 2003

Eingereicht am: 15.9.2003

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Rainer Hedrich

Gutachter : Prof. Dr. Dirk Schadendorf

Gutachter: Prof. Dr. Manfred Scharl

Tag des Promotionskolloquiums: 19.12.2003

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Die vorliegende Arbeit wurde am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) Heidelberg in der Abteilung „Klinische Kooperationseinheit für Dermato-Onkologie“ (Prof. Dr. Dirk Schadendorf) in der Arbeitsgruppe Tumorantigene (Dr. rer. nat. Stefan Eichmüller) durchgeführt.

Erklärung gemäß §4 Abs 3 der Promotionsordnung

Punkt 3: Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Punkt 5: Diese Dissertation wurde nicht in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt.

Punkt 8: Ich habe noch keine akademischen Grade erworben oder versucht zu erwerben.

Würzburg, den 15.9.03

Friederike Fellenberg

Inhaltsverzeichnis:

1	EINLEITUNG	1
1.1	Kutane Lymphome	1
1.1.1	Kutanes T-Zell Lymphom (CTCL)	1
1.2	Tumorantigene	6
1.2.1	Antigendetektion	7
1.2.2	Antigenklassen.....	8
1.2.3	Tumorantigene des kutanen T-Zell Lymphoms	14
1.3	Immuntherapie	15
1.3.1	Antikörpertherapien.....	17
1.3.2	Vakzinierungstypen	19
1.3.3	Immuntherapie des CTCL	20
1.4	Ziel der Arbeit	20
2	MATERIAL UND METHODEN	22
	MATERIAL	22
2.1	Lösungen	22
2.1.1	Humanseren und Patientenmaterial	22
2.1.2	Zelllinien.....	24
2.1.3	Bakterienstämme	25
2.1.4	Medien für Bakterien und für Proteinaufreinigung	25
2.1.5	Lösungen für cDNA/RT-PCR	26
2.1.6	Lösungen für RNA/Northern Blot.....	26
2.1.7	Lösungen für Epitopmapping/Western Blot/Immunhistologie	27
2.1.8	Lösungen für die Zellkultur	28
2.1.9	Lösungen für GST-ELISA.....	28
2.2	Geräte/Reagenzien/Computerprogramme	30
2.2.1	Computerprogramme	31
2.2.2	Geräte.....	31

2.2.3	Alphabetische Liste der verwendeten Chemikalien	32
2.2.4	Verbrauchsmaterial.....	34
2.2.5	Fertige Kits	34
METHODEN.....		36
2.3	Rapid Amplification of cDNA ends (RACE)	36
2.4	RNA-Expressionsanalysen.....	37
2.4.1	RNA Gewinnung	37
2.4.2	Herstellung von cDNA	38
2.4.3	RT-PCR	39
2.4.4	Northern Blot.....	42
2.5	DNA Klonierungen.....	43
2.5.1	Plasmide.....	43
2.5.2	Restriktionsverdau	44
2.5.3	Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP) Behandlung.....	44
2.5.4	Gelextraktion	44
2.5.5	Ligation.....	45
2.5.6	Herstellung kompetenter Bakterien.....	45
2.5.7	Transformation	45
2.5.8	Klonierungsstrategien.....	45
2.5.9	Sequenzierung	46
2.5.10	Computer-Programme	48
2.6	Protein-Expressionsanalyse.....	48
2.6.1	Proteinexpression und His-Aufreinigung	48
2.6.2	Aufreinigung der Fusionsproteine mit GST	50
2.6.3	Antikörperherstellung und Proteinansequenzierung	50
2.6.4	Protein-Isolation	52
2.6.5	Western Blot.....	53
2.7	Methoden der Zellkultur	55
2.7.1	Kultivierung von Zellen.....	55
2.7.2	Passagieren von Zellen	55
2.7.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	55

2.7.4	Bestimmung der Zellzahl.....	56
2.8	Serologische Untersuchungen	56
2.8.1	SEREX.....	57
2.8.2	Enzyme Linked-Immunsorbent-Assay (ELISA).....	57
2.8.3	Statistische Methoden.....	60
2.9	Interferon Gamma (IFN-γ) Assay.....	61
2.10	Epitopmapping	62
2.11	Immunhistologie.....	63
2.11.1	Zytospins	63
2.11.2	Kryoschnitte.....	64
2.12	FACS	64
3	ERGEBNISSE	66
3.1	Etablierung des ELISA.....	67
3.1.1	ELISA mit aufgereinigten His-Fusionsproteinen.....	67
3.1.2	GST-Xtag ELISA	67
3.2	Tumorantigen se2-2.....	75
3.2.1	Identifikation und Homologie	75
3.2.2	Serologie.....	75
3.2.3	Proteinmotive.....	76
3.2.4	Expressionsanalyse der se2-2 mRNA.....	76
3.2.5	Expressionsanalyse von se2-2 Protein.....	76
3.3	Guanylat Bindendes Protein-5 (GBP-5).....	78
3.3.1	Identifikation und Homologie	78
3.3.2	Serologie.....	80
3.3.3	Proteinmotive.....	80
3.3.4	Expressionsanalyse von GBP-5 mRNAs.....	81
3.3.5	Expressionsanalyse der Proteine GBP-5a/b und GBP-5ta	83
3.4	Interferon-gamma (IFN-γ) Induktions Assay.....	93

3.4.1	Zelluläre Lokalisation von GBP-5 nach IFN- γ Induktion	94
4.	DISKUSSION	96
4.1.	Verwendung von Tumorantigenen	96
4.1.1	Prognostik und Diagnostik	96
4.1.2	Immuntherapie	98
4.2	GST-Xtag ELISA	99
4.2.1	Reaktivitäten im se57-1, se70-2, cTAGE-1 und GBP-5ta ELISA	100
4.2.2	se57-1	101
4.2.3	Follow-up von immunbehandelten Patienten	102
4.2.4	Validierung des GST-Xtag ELISA für CTCL assoziierte Antigene	103
4.3	Tumorantigene mit bekannter Funktion	106
4.3.1	Familie der Guanylat-bindenden Proteine	106
4.3.2	Tumorantigene GBP-5ta und GBP-5a/b	108
4.3.3	GBP-5ta: ein potentielles Onkogen	111
5	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	114
6	SUMMARY AND PERSPECTIVES	116
7	LITERATUR	118
8	ANHANG	151
8.1	Anhang 1: Eigene Veröffentlichungen	151
8.1.1	Artikel	151
8.1.2	Tagungsbeiträge	151
8.2	Anhang 2: Protein Alignment der humanen GBPs	153
8.3	Anhang 3: RT-PCR Expressionanalyse GBP-5	155

Abbildungsverzeichnis:

<i>Abbildung 1-1: SEREX Methode</i>	8
<i>Abbildung 1-2: Das Onkogen Ras</i>	10
<i>Abbildung 1-3: Autoimmunantwort auf Tumorzellen</i>	17
<i>Abbildung 2-1: RACE-PCR</i>	37
<i>Abbildung 2-2: GAPDH-PCR</i>	39
<i>Abbildung 2-3: PCR-Programm</i>	41
<i>Abbildung 2-4: Sequenzier-PCR</i>	47
<i>Abbildung 3-1: Schematischer Aufbau des GST-Xtag ELISA</i>	68
<i>Abbildung 3-2: Titration der Antigene für den GST-Xtag ELISA</i>	69
<i>Abbildung 3-3: Reaktivitäten im ELISA gegen se57-1, se70-2, cTAGE-1 und GBP-5ta</i>	70
<i>Abbildung 3-4: GST-Xtag ELISA mit Seren von immunbehandelten Patienten</i>	74
<i>Abbildung 3-5: mRNA Alignment, Klon se2-2</i>	75
<i>Abbildung 3-6: se2-2 Proteinexpression</i>	77
<i>Abbildung 3-7: Chromosomales Alignment von GBP-5ta und GBP-5 mit Chromosom 1</i>	78
<i>Abbildung 3-8: RT-PCR mit Primer Paar I und II</i>	82
<i>Abbildung 3-9 : SDS-PAGE und Western Blot mit GBP-5ta His-tag Eluaten</i>	84
<i>Abbildung 3-10: Titration der präabsorbierten GBP-5ta Antikörper</i>	86
<i>Abbildung 3-11: Western Blot der CTCL Zelllinien und Kontrollgewebe mit K25</i> <i>(monospezifisch) und K26 (bispezifisch)</i>	89
<i>Abbildung 3-12: Analyse der PBMC mit bispezifischen K26</i>	89
<i>Abbildung 3-13: Western Blot mit CTCL Tumorgewebe mit dem bispezifischen K26</i>	90
<i>Abbildung 3-14: Western Blot mit Melanom Zelllinien mit dem bispezifischen K26</i>	91
<i>Abbildung 3-15: Zelluläre Lokalisation von GBP-5ta und GBP-5a/b</i>	92
<i>Abbildung 3-16: Western Blot der IFN-γ induzierten CTCL Zelllinien</i>	94
<i>Abbildung 3-17: Western Blot Induktionskontrolle</i>	94

Tabellenverzeichnis:

<i>Tabelle 1-1: Tumorantigenklassen.....</i>	<i>11</i>
<i>Tabelle 1-2: Wirkungen von Antikörpertherapien</i>	<i>18</i>
<i>Tabelle 2-1: Humanseren.....</i>	<i>22</i>
<i>Tabelle 2-2: Zelllinien.....</i>	<i>24</i>
<i>Tabelle 2-3: Antikörper.....</i>	<i>30</i>
<i>Tabelle 2-4: cDNA Herstellung.....</i>	<i>39</i>
<i>Tabelle 2-5: PCR-Materialien</i>	<i>40</i>
<i>Tabelle 2-6: Primer.....</i>	<i>40</i>
<i>Tabelle 2-7: Kontrollgewebe.....</i>	<i>41</i>
<i>Tabelle 2-8: RT-PCR Proben.....</i>	<i>42</i>
<i>Tabelle 2-9: Primer für Klonierung in die TOPO-Expressionsvektoren und in pGEX4T3tag</i>	<i>46</i>
<i>Tabelle 2-10: Sequenzier Primer</i>	<i>47</i>
<i>Tabelle 2-11: Boost Schema zur GBP-5ta und se2-2 Antikörper Herstellung</i>	<i>51</i>
<i>Tabelle 2-12: Western Blot Reagenzien</i>	<i>54</i>
<i>Tabelle 3-1: Überblick über alle verwendeten Klone</i>	<i>66</i>
<i>Tabelle 3-2: Antikörperreaktivitäten im GST-se57-1tag ELISA.....</i>	<i>71</i>
<i>Tabelle 3-3: Antikörperreaktivitäten im GST-se70-2tag ELISA.....</i>	<i>72</i>
<i>Tabelle 3-4: Antikörperreaktivitäten im GST-cTAGE-1tag ELISA.....</i>	<i>72</i>
<i>Tabelle 3-5: Antikörperreaktivitäten im GST-GBP-5ta ELISA.....</i>	<i>73</i>
<i>Tabelle 3-6: RT-PCR und Western Blot Analyse von se2-2.....</i>	<i>77</i>
<i>Tabelle 3-7: Protein und DNA Homologie der verschiedenen Mitglieder der humanen GBPs</i> <i>.....</i>	<i>79</i>
<i>Tabelle 3-8: Proteinmotive von GBP-1, GBP-5a/b und GBP-5ta im Vergleich *</i>	<i>81</i>
<i>Tabelle 3-9: RT-PCR Analyse von GBP-5 Spleißvarianten mit Antigen-spezifischen Primern</i> <i>.....</i>	<i>83</i>
<i>Tabelle 3-10: Zusammenfassung der generierten anti-GBP-5 Antikörper und ihrer</i> <i>Verwendung</i>	<i>87</i>
<i>Tabelle 3-11: Vergleichende Analyse der RT-PCR für GBP-5ta/GBP-5b (Primer Paar I) und</i> <i>GBP-5a (Primer Paar II) und Western Blot mit dem bispezifischen K26</i>	<i>88</i>
<i>Tabelle 3-12: FACS Analyse der GBP-5ta Antikörper</i>	<i>92</i>
<i>Tabelle 4-1: Vergleich der Seroreaktivität der CTCL und Kontrollseren im SEREX und im</i> <i>ELISA</i>	<i>104</i>

Abkürzungsverzeichnis:

Acc. Nr.	Accession Nummer
AML	Akute myeloische Leukämie
Amp	Ampicillin
APC	Antigen präsentierende Zelle (antigen presenting cell)
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	"Bovine Serum Albumin" (Rinderserumalbumin)
CAPS	3-Cyclohexylamino-1-propansulfonsäure
CBCL	Kutanes B-Zell Lymphom (cutaneous B-cell lymphoma)
CD	Oberflächen Protein (cluster of differentiation)
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CTCL	Kutanes T-Zell-Lymphom (cutaneous T-cell lymphoma)
CT-Antigene	Cancer Testis Antigene
CTL	Zytotoxische T-Zelle (cytotoxic T-cell)
CTLA	Kutanes Lymphozyten Antigen
CL	Kutane Lymphome (cutaneous lymphomas)
DC	Dendritische Zelle (dendritic cell)
DMPC	Dimethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
<i>EDTA</i>	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	Fluorescence-Activated Cellsorter
FCS	Fetales Rinderserum
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
GAGE	Tumorspezifisches Antigen, analog zu MAGE benannt
GAPDH	Glycerin-Aldehyd 3-Phosphat-Dehydrogenase
GBP	Guanylat bindendes Protein
GDP	Guanidindiphosphat
GMP	Guanidinmonophosphat
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanidintriphosphat
HeLa	Zelllinie aus einem Gebärmutterhalskarzinom

HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid
HH	Zelllinie aus einem CTCL
His	Histidin
HRP	Horseradish peroxidase
HYREX	DNA Hybridisierung Analyse an rekombinant exprimierten cDNA Banken (hybridization screening of recombinantly expressed cDNA libraries)
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HuT 78	Zelllinie aus einem CTCL
IFN γ	Interferon gamma
IL	Interleukin
LAA	Lymphom-assoziierte Antigene
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
MAGE	Melanom assoziiertes Antigen
MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight mass spectrometry
MF	Mycosis fungoides
MyLa	Zelllinie aus einem CTCL
NaAcetat	Natriumacetat
n.t.	Nicht getestet
OD	Optische Dichte
ORF	Offener Leserahmen (open reading frame)
PBMC	Periphere Blut Monozyten
PBS	"Phosphate-Buffered Saline" (phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase Ketten Reaktion (polymerase chain reaction)
Ph	Philadelphia
PH	Wasserstoffexponent (neg. dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration)
PBMC	Periphere Blut-Monozyten
PUVA	Psoralen-Ultra-Violett A
PVDF	Polyvinylidenfluorid
R.T.	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
RAGE	Nierenzellkarzinom assoziiertes Antigen (Renal-cell carcinoma associated antigen)
SCCL	Small-cell carcinoma of the lung
SDS	Sodium-dodecylsulfat
SeAx	Zelllinie aus einem CTCL
SEREX	Serologische Identifikation rekombinant exprimierter cDNA Banken (serological identification of recombinantly expressed cDNA libraries)
SS	Sézary Syndrom

SV40	Simian Virus 40
TAA	Tumorassoziierte Antigene
TCR	T-Zell Rezeptor (T-cell receptor)
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor alpha
U	Units (=Einheiten)
UTR	Untranslated Region
VT	Volumenteil
v/v	"volume per volume"
w/v	"weight per volume"

1 Einleitung

Krebserkrankungen sind die zweithäufigste Todesursache nach den Erkrankungen des Kreislaufsystems. Krebs beinhaltet eine Funktionsstörung in den Regulationsmechanismen der Zelle, die zu unkontrolliertem Wachstum und beschleunigter Reproduktion der Zelle führt. Die geschätzte Zahl an Neuerkrankungen pro Jahr wird in Deutschland mit 162.900 Erkrankungsfällen bei Männern und 173.200 bei Frauen angegeben (Krebsatlas Deutschland, DKFZ; 1999). Eine gezielte und sichere Vernichtung aller Krebszellen in einem Patienten ist besonders in fortgeschrittenen Stadien mit den herkömmlichen Therapie-Ansätzen bislang nur schwer möglich und geht meist über palliative Therapien nicht hinaus.

1.1 Kutane Lymphome

Primär kutane Lymphome, die auf dermatotrope T- oder B-Zellen zurückzuführen sind, treten als lymphoproliferative Erkrankungen sehr unterschiedlicher morphologischer und klinischer Ausprägung und Prognose auf (Burg et al 1984; Sterry et al 1997). Eine Metastasierung in Lymphknoten und innere Organe kann in fortgeschrittenen Stadien auftreten. Die aktuelle Klassifizierung primär kutaner Lymphome der EORTC (European Organization for Research and Treatment of Cancer) orientiert sich primär an der immunologisch charakterisierten Zelle (T-/B-Zelle), sekundär an den Wachstumseigenschaften (follikulär/diffus) und zuletzt am Malignitätsgrad (indolent/aggressiv) (Willemze et al 1997). Kutane Lymphome (CL) treten meist erst im höheren Lebensalter auf (Glass et al 1998) und sind mit einer jährlichen Inzidenz von 0,5-1/100 000 (Weinstock & Horm 1988; Kempf et al 2001) extrem selten, wobei Männer zweimal so häufig betroffen sind wie Frauen (Jahn et al 1998a). Kutane T-Zell Lymphome (CTCL) sind mit 65% neben den kutanen B-Zell Lymphomen (CBCL) mit 25% die am häufigsten vertretenen Non-Hodgkin Lymphome (Burg et al 1994).

1.1.1 Kutanes T-Zell Lymphom (CTCL)

Das CTCL, eine periphere T-Zell Neoplasie, wird durch eine Vielzahl von Ausprägungen vertreten, die zumeist die maligne Proliferation von CD4+ T_H2-Zellen gemeinsam haben (Dummer et al 1996). Das CTCL ist eine sehr heterogene Erkrankung mit vielen Entitäten. Dazu gehören die Mycosis fungoides (MF), das Sézary Syndrom (SS), die pagetoide Retikulose (Woringer-Kolopp), die lymphomatoide Papulose, das CD8 positive T-Zell-Lymphom, das kutane elastolytische Lymphom („Granulomatous slack skin“), das

großzellige CD30 positive (Ki-1) und das CD30 negative T-Zell Lymphom. Das CD30 negative CL und das angiozentrische Lymphom stellen eine sehr aggressive Form dar (Connors et al 2002).

Mycosis fungoides (MF)

Die Mycosis fungoides ist die häufigste Form des CTCL und bisher schwer zu therapieren, progrediert jedoch sehr langsam (Weinstock & Horm 1988). MF Zellen weisen eine charakteristische zerebriforme Morphologie auf und sind CD4⁺, CDw29⁺, CD2⁺, CD3⁺ CD45RO⁺ und CD30⁻ (Burg et al 1997; Slater 1991; Sterry et al 1997). Die MF durchläuft in der Regel in einem Zeitraum von 5 bis 20 Jahren drei Stadien: das Ekzemstadium, das Plaquestadium und das Tumorstadium, in welchem charakteristische pilzartige Hauteffloreszenzen auftreten.

Das Ekzemstadium ist charakterisiert durch leicht atrophische, unterschiedlich große, flächige, ekzemähnliche Herde. Durch Infiltration dieser Herde im Plaquestadium werden die Läsionen dicker, wobei in den Herden scharf begrenzte Flächen gesunder Haut bestehen bleiben können (Sterry et al 1997). Das Tumorstadium wird in der Regel erst nach mehrjährigem Krankheitsverlauf erreicht. Dieses Stadium kennzeichnen multiple bläulich-bräunliche Tumore mit Tendenz zur Ulzeration, und eventuelle Metastasierung in Lymphknoten und inneren Organen wie Milz und Leber (Dummer 1998; Jahn et al 1998b; Sterry et al 1997).

Sézary Syndrom (SS)

Das Sézary Syndrom ist ein Lymphom mittlerer Malignität. Es wird heute als leukämische Variante der MF verstanden und zeigt eine deutlich schlechtere Prognose als die MF. Nach mildem Verlauf über mehrere Jahre kann es explosionsartig zu Knotenbildung mit Übergang in ein hochmalignes, immunoblastisches T-Zell-Lymphom kommen. Das SS ist durch Erythrodermie und generalisierte Lymphadenopathie und durch AP-1 (=Interferon Rezeptor) exprimierende Sézary-oder Lutzner Zellen, die im Blut, den Lymphknoten und der Haut vorkommen, gekennzeichnet. Die Lymphknoten sind vergrößert und zeigen dichte Infiltrate von Sézary-Zellen. Im weiteren Verlauf kann es sogar zum Verlust der Lymphknotenstruktur kommen. Immunhistochemisch sind die Zellen CD3⁺, CD4⁺, CD8⁻, CD45RO⁻ und CD30⁻ (Dummer 1998; Sterry et al 1997).

1.1.1.1 Ursachen

Verschiedene Gründe wurden bislang für die Entstehung von MF und SS diskutiert (Siegel et al 2000). Eine chronische Antigenstimulation durch Kontakt mit Chemikalien (Whittemore et al 1989), bakterielle (Jackow et al 1997) oder virale Infektionen (Poiesz et al 1980), Rauchen, virusmodifizierte Autoantigene und UV-Exposition werden angeführt.

Möglicherweise wird das Wachstum einer malignen CD4⁺ CTCL Zelle von unreifen dendritischen Zellen (DC) stimuliert, wobei als präsentierte Antigene Proteine aus der malignen Zelle selbst fungieren können (Berger et al 2002; Edelson 2001). Ursache für das CTCL können auch Mutationen und Translokationen sein (Siegel et al 2000). Bei der Hälfte der hochgradigen MF-Läsionen jedoch in keinem Frühstadium wurden *p53* Mutationen nachgewiesen (Kapur et al 2001; Lauritzen et al 1995). Chromosomale Abnormalitäten wie die Translokation t(2;5) bewirken eine Differenzierung zu (primären und sekundären) anaplastischen großzelligen CTCLs (Wood et al 1996). Der Region zwischen 1p22 und 1p36 auf Chromosom 1 wird eine Beteiligung an der malignen Transformation eines Lymphoms und der damit verbundenen Progression zugeschrieben (Thangavelu et al 1997). Ein stimulierender Effekt des Chlamydia pneumoniae-assoziierten Sézary T-cell activating factor (SAF) wurde bei SS-Zellen entdeckt (Abrams et al 1999). Einige virale Sequenzen konnten in malignen Lymphom Geweben nachgewiesen werden: das Retrovirus humanes T-Zell lymphotropes Virus Typ 1 (*HTLV-1*), welches ursächlich an der Entstehung der adulten T-Zell Leukämie beteiligt ist (Hall 1994; Kikuchi et al 1997; Zucker-Franklin & Pancake 1994), das humane Herpesvirus-8 (HHV-8) (Pawson et al 1996; Sander et al 1996) und das *EBV* (Shimakage et al 2001).

Auf *Zytokinebene* werden Interleukin-7 (IL-7) und IL-15 als Induktoren des SS und anderer CTCLs beschrieben (Rich et al 1993). IL-7 und IL-15 verhindern den Zelltod der SS-Zelllinie SeAx in dem sie *bcl-2* hochregulieren (Qin et al 2001). Dagegen sind die CTCL Zelllinien HuT-78 und MyLa 2059 IL-7 und IL-15 unabhängig.

1.1.1.2 Epidermotropismus

Epidermotropismus beschreibt den Prozess, durch den T-Lymphozyten in die Haut wandern. Sein molekularer Mechanismus ist sehr komplex und wird vermutlich durch viele Faktoren bedingt. Ein Faktor ist das kutane Lymphozyten Antigen (CTLA), ein Haut-Homing-Rezeptor, der normalerweise nicht auf T-Lymphozyten exprimiert wird, aber auf allen CTCL

Zellen zu finden ist (Rook & Heald 1995). Dieses kutane Lymphozyten Antigen interagiert dabei mit E-Selektin, einem Adhäsionsmolekül auf Endothelzellen der kutanen Gefäße (Rook & Heald 1995). Ebenfalls als mitverantwortlich für den Epidermotropismus gilt das Interferon- γ induzierte Protein-10 (IP-10) welches in MF und SS Läsionen überexprimiert ist (Sarris et al 1995; Tensen et al 1998). Darüber hinaus wurden eine Reihe von Immunabnormalitäten in MF/SS Patienten beschrieben, wie die Herabregulierung von natürlichen Killer Zellen (NK-Zellen), der T-Zell Antwort auf Antigene und von Eosinophilen und dem verstärkten Auftreten von IgE und IgA (Rook & Heald 1995).

1.1.1.3 Diagnose

Die Diagnose wird primär nach klinischen und histologischen Kriterien gestellt, wobei die Unterscheidung zu anderen ekzematösen bzw. chronisch entzündlichen Dermatosen schwer fällt. Beweisend sind nur Pautrier'sche Mikroabszesse, die sich histologisch als abszeßartige Ansammlungen atypischer Lymphozyten in der Epidermis darstellen und in fortgeschrittenen Krankheitsstadien auftreten. Im Blutbild können sich besonders beim SS Sézary-Zellen (kleine Lymphozyten mit hyperchromatischem Kern) finden, aber maligne Zellen können auch generell stadienunabhängig im Blut auftreten (Muche et al 1997). Der Oberflächenmarker CD7 fehlt oft, was mit einer schlechten Prognose korreliert ist. Fortgeschrittene MF/SS können die Expression von CD2, CD5 und manchmal auch CD4 verlieren (Diamandidou et al 1996; Kuzel et al 1991). Die Routinediagnostik umfasst mittlerweile auch die DNA-Analyse des T-Zell Rezeptor (TCR)-Genrearrangement durch PCR oder Southern Blot, bei dem mit einer Sensitivität von 90-95% klonale T-Zell-Proliferationen erkannt werden (Duncan & Heald 1998; Guitart & Kaul 1999) oder über die Analyse des β -Ketten Genrearrangements (Fraser-Andrews et al 2001; Wood et al 1994).

1.1.1.4 Therapien

Durch die Heterogenität der CL und ihrer Seltenheit fehlt es an einheitlichen, wirksamen Therapiekonzepten. Die derzeitigen Therapien lassen sich in lokale und systemische Formen unterteilen.

Die topische (örtliche) Therapie wird lokal auf die Hautoberfläche verabreicht. Verwendet werden im frühen Patch-Stadium Kortikosteroide und Zytostatika, wie Mechlorethamin und Carmustin. Kortikosteroide können durch ihr für T-Zellen lytisches Potential und durch Blockierung der Zytokin-Sekretion partielle Remissionen bedingen. Das Zytostatikum

Mechlorethamin (Ramsay et al 1995; Vonderheid et al 1998), ein Stickstoff-Lost-Derivat, ist eine alkylierende Substanz, die in die Mitose-Phase der Zelle eingreift (Ramsay et al 1995). Auf diesem Wirkmechanismus beruht auch Carmustin (Nitrosoharnstoffderivat), das je nach Stadium eine Remissionsrate von 60-80% aufweist (Zackheim 1994).

Die „*Psoralen plus Ultraviolet light*“-(*PUVA*) Therapie stört die RNA und DNA Synthese. Feranocumarin Psoralen wirkt photosensibilisierend. Nach UV-Bestrahlung (330-430 nm) entstehen mono- oder bifunktionale Thymine, Genmutationen oder Schwesterchromatiden-Austausche. Dabei werden je nach Studie Remissionsraten zwischen 50-85% erzielt (Herrmann et al 1995; Stadler et al 1998). In der SS-Therapie ist die *Photopherese* die effektivste Therapieform (Holloway et al 1992). Dabei werden aus dem Blut entnommene Periphere Blut-Monozyten (PBMC) in Gegenwart von Psoralen mit UVA bestrahlt und reinfundiert. Es wird vermutet, dass die Photopherese oder extrakorporale Phototherapie durch die Zellschädigung Tumorantigene freisetzt, die immunisierend wirksam sind (Crovetti et al 2000). Induzierte T-Zell-Apoptose und Tumor-Nekroses-Faktor alpha (TNF- α)-Freisetzung durch Makrophagen spielen ebenfalls eine Rolle (Miracco et al 1997).

UVB Bestrahlung in frühen Stadien hat durch ihre immunregulatorische Funktion einen günstigen Effekt (Ramsay et al 1992).

Eine der *systemischen* Therapien ist die *Chemotherapie*, die vor allem palliativ zu den lokalen Therapien angewendet wird. Die Ansprechrate beträgt mehr als 30%, allerdings ist die Remission nur von kurzer Dauer (Rosen & Foss 1995).

Retinoide sind Derivate des Vitamin A und zeigen eine antiproliferative Wirkung. Sie finden systemisch eingesetzt in frühen und leicht fortgeschrittenen Tumorstadien Anwendung. Erfolgversprechend sind niedrige Dosierungen in Kombination mit IFN- α , PUVA oder Chemotherapie (Kessler et al 1987; Thomsen et al 1989).

Zytokine oder andere Immunmodulatoren werden in frühen Stadien der CL mit Erfolg eingesetzt. IFN- α und - γ sind in frühen Stadien wirksam. MF/SS Patienten zeigten eine Ansprechrate von 79% im Stadium I und II (Bunn et al 1986; Foon et al 1987).

IL-2 ist ein essentieller Wachstumsfaktor für T-Zellen und kann die T-lymphozytäre Zytotoxizität induzieren und die Aktivität von NK-Zellen steigern. Das CTCL ist eine Neoplasie von Th2 -Zellen (Marolleau et al 1995), und ist dennoch IL-2 unabhängig. Da IL-2 und IL-12 die Th1-Helfer-Zellen induzieren können, hat IL-2 in der Behandlung einen

günstigen Effekt (Baccard et al 1997; Gisselbrecht et al 1994). IL-12 hat einen immunstimulierenden Effekt und induziert die Bildung von IFN- γ (Rook et al 2001).

DAB₃₈₉ IL-2 ist ein Fusionsprotein bestehend aus der zytotoxischen A- und B-Kette vom Diphtherie Toxin gekoppelt an rekombinantes IL-2. DAB₃₈₉ IL-2 bindet an Zellen, die den IL-2-Rezeptor tragen (Nichols et al 1997). Von 35 mit DAB₃₈₉ IL-2 behandelten MF/SS Patienten zeigten 14% eine komplette Remission und insgesamt 37% der Patienten sprachen auf die Therapie an (Saleh et al 1998).

1.2 Tumorantigene

Tumorantigene können sich über verschiedene Wege aus meist physiologisch vorkommenden und auf normalen Zellen exprimierten Antigenen entwickeln (Overwijk et al 1999). Eine Veränderung der molekularen Struktur durch Mutationen, chromosomale Translokationen, verändertes Spleißen, Translation alternativer Leserahmen oder auch durch posttranslationale Modifikationen können die Entstehung von immunogenen Proteinen bewirken (Rosenberg 1999). Auch Variationen der regulatorischen Elemente, wie eine selektive oder differentielle Expression, Genamplifikation, oder eine Expression in einem anderen Zellkompartiment können das Expressionsverhalten modifizieren.

Demgegenüber existieren Antigene bei malignen Erkrankungen, die nicht in normalen gesunden Zellen exprimiert werden. Diese Antigene sind keine körpereigenen sondern "Fremd"-Antigene, die zum Beispiel nach einer bakteriellen oder viralen Infektion auftreten. Gegen diese findet in der Regel immer eine starke Immunantwort statt.

Im Gegensatz zu diesen pathogenen Antigenen induzieren körpereigene Antigene meist nur eine schwache Immunabwehr. Gegen körpereigene Tumorantigene liegt oft eine immunologische Toleranz durch klonale Deletion oder Anergie der T-Zellen vor. Gegen solche Antigene muss die immunologische Toleranzschwelle durchbrochen werden. Wie durch spezifische zytotoxische T-Zellen (CTL) oder reaktive Antikörper bewiesen werden konnte (Hoppe et al 1995; Sahin et al 1995; van der Bruggen et al 1991), versucht der Körper eine Immunantwort gegen den Tumor zu entwickeln, die aber meist zu schwach ist, um den Tumor vollständig zu zerstören.

1.2.1 Antigen-detektion

Eine Vielzahl der bislang bekannten Tumorantigene wurde durch Transfektion genomischer oder cDNA Banken gefunden. Die transfizierten Zellen trugen das geeignete Molekül, das für die Erkennung durch spezifische Antitumor CD8⁺ T-Lymphozyten notwendig ist (Boon 1993; Rosenberg 1996). Auf diese Weise sind eine Reihe von Antigenen, wie MAGE-A1, GAGE und viele der Differenzierungsantigene des Melanoms identifiziert worden.

Ein weiterer methodischer Ansatz für die Suche nach immuntherapeutischen Zielstrukturen ist die Identifizierung von tumorspezifisch exprimierten Transkripten durch *subtraktive cDNA Techniken*. Dazu gehört die „Differential Display Reverse Transcription PCR“ (DDRT-PCR) (Kroes et al 2000), „Representational Difference Analysis“ (RDA) (Gure et al 2000a) und die „Suppression Subtractive Hybridization“ (SSH) (Atalay et al 2002). Sie alle basieren auf differentielltem Screening und subtraktiver Hybridisierung. Inzwischen werden in der Regel Gen Chips („gene microarrays“) für die Analyse der Genexpression verwendet. Die mit diesen Methoden identifizierten Transkripte werden darauf geprüft, ob sie tumorzellspezifische T-Lymphocyten stimulieren können.

Eine andere Methode, die eine humorale Immunantwort gegen den Tumor in Form von Antikörpern voraussetzt, ist *SEREX* („serological identification of tumor antigens by recombinant cDNA expression cloning“) (Eichmüller et al 2001; Sahin et al 1995). Bei vielen Krebserkrankungen konnten spezifische Antikörper gegen körpereigene Antigene beschrieben werden (Pfreundschuh 2000; Pfreundschuh et al 1978; Real et al 1988). Zur Antigen-detektion von den in dieser Arbeit untersuchten Tumorantigenen des CTCL wurde die SEREX-Methode eingesetzt.

In Abbildung 1-1 ist die SEREX Methodik dargestellt. mRNA wird aus Testis- oder Tumor-Gewebe isoliert und zur Herstellung einer Phagenbank verwendet. Eine Lambda-ZAP Phagenbank enthält sogenannte Phagemide, die einen Phagenanteil und ein vollständiges Plasmid (pBluescript) mit cDNA Insert tragen. Phagen lysieren *E. coli* Bakterien, die vor der Lyse Phagenproteine und das im Insert kodierte Protein exprimieren. Nach dem Blotten wird überprüft, ob die exprimierten Proteine durch Antikörper aus Patientenserum erkannt werden. Dieses ist durch Präabsorption der Antikörper gegen *E. coli* und Phagenproteine gereinigt und final 1:100 bis 1:1000 verdünnt. Sichtbar wird die Bindung durch einen zweiten anti-humanen IgG spezifischen Antikörper, an den eine alkalische Phosphatase gekoppelt ist. Ein positiver

werden (Hogdall et al 2002; Lutz & Nowakowska-Swirta 2002). Da diese Mutationen meistens aber einzigartig oder zumindest sehr selten sind, eignen sie sich nicht für eine Immuntherapie verschiedener Patienten. Ausnahmen mit höherer Frequenz sind die Mutationen (Cys24) des Zellzyklusregulators CDK4 (Wölfel et al 1995) und des β -Catenin Genes, welches in 3% bzw. 10% der malignen Melanome beobachtet wurde (Rubinfeld et al 1997).

Oft führt die Mutation eines Gens zum vollständigen Funktionsverlust des Proteins. Ein Beispiel dafür ist das ras-Gen. Ras-Proteine sind als GTP-bindende Proteine Teil eines Signaltransduktionsweges, der Zellwachstum, Differenzierung und weitere zelluläre Prozesse reguliert. Im Normalzustand liegt Ras in inaktiver Form an GDP gebunden an der Innenseite der Zellmembran vor. Bei einem externen Signal, zum Beispiel, wenn ein Wachstumsfaktor an den Transmembranrezeptor bindet, wird das gebundene GDP gegen GTP ausgetauscht. Dadurch nimmt das Ras-Protein seine aktive GTP-bindende Form ein. Dabei unterstützt das GTPase aktivierende Protein (GAP) die schwache GTPase-Funktion von Ras. Durch eine Mutation im ras-Gen verliert Ras diese GTPase Aktivität. Das Ras-Onkogen liegt nun in der GTP gebundenen und damit aktivierten Form vor, so dass die Zelle zu unkontrollierter Proliferation stimuliert wird (Abbildung 1-2) (Macaluso et al 2002). Mutationen im ras-Gen kommen bei 90% aller Pankreaskarzinome vor. Beim Menschen existieren die drei Protoonkogene H-ras, K-ras und N-ras (de Vos et al 1988). Fünf Domänen sind für die GTPase Aktivität von Ras notwendig. Mutationen in diesen Domänen führen zu onkogenem Ras (Macaluso et al 2002).

Antigene können auch durch *Translokation* neu entstandene Fusionsproteine sein. Das sogenannte Philadelphia Chromosom (Ph) entsteht durch eine Translokation t(9;22) und ist charakteristisch für die chronisch myeloische Leukämie (CML). Auf Grund dieser Translokation entsteht ein neues Fusionsprotein, das Bcr/Abl Fusionsprotein. Die Bcr/Abl mRNA wurde in 80% der Ph positiven CML Patienten gefunden (Berke et al 2000) und ist stark immunogen. HLA-abhängige Epitope aus Bcr/Abl konnten identifiziert und CTLs generiert werden (Berke et al 2000; Bocchia et al 1996). Daneben wurde die Immunogenität durch reaktive Antikörper in Seren von Ph⁺ und Ph⁻ CML Patienten und allerdings auch in Kontrollpersonen bestätigt (Talpez et al 2000).

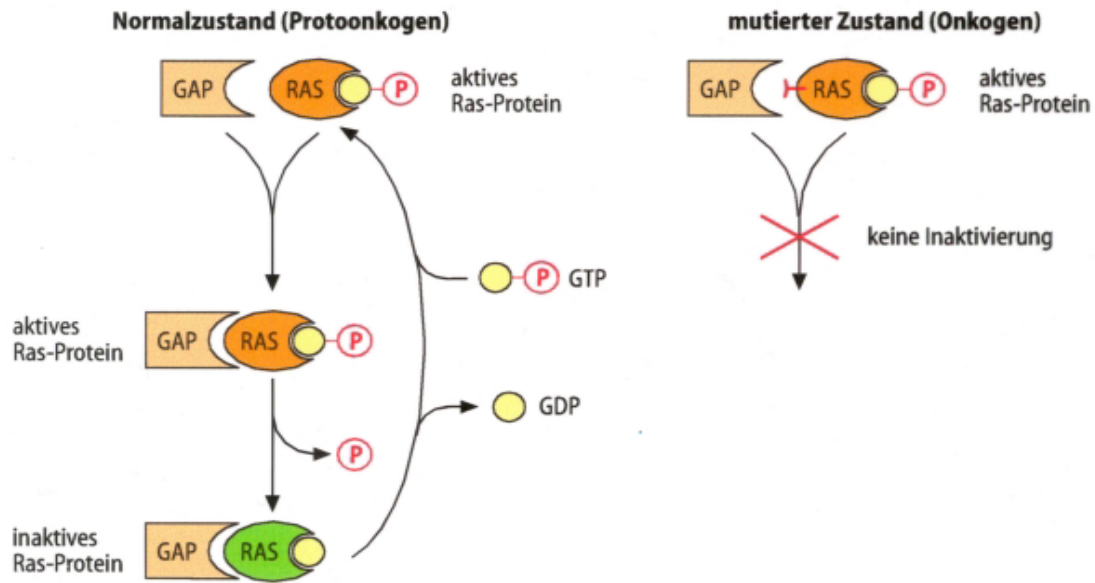


Abbildung 1-2: Das Onkogen Ras

In seinem Normalzustand hydrolysiert Ras mit Hilfe des GTPase aktivierenden Proteins (GAP) GTP zu GDP. Dabei liegt aktives Ras in seiner GTP gebundenen Form und inaktives Ras in seiner GDP gebundenen Form vor. Mutationen in den essentiellen Domänen von Ras blockieren die Hydrolyse von GTP, so dass Ras dauerhaft GTP bindet und damit in seiner aktiven Form verbleibt. Das führt zu einer andauernden unkontrollierten Stimulierung der Zellproliferation (Löffler & Petrides 1998).

NY-LU-12 ist ein SEREX definiertes Antigen, das durch *alternatives Spleißen* des Tumorsuppressorgens g16 entsteht. Durch das alternative Spleißen entsteht ein Frameshift, wodurch NY-LU-12 ein längeres Protein kodiert, gegen das Tumorpatienten reaktive Antikörper besitzen (Güre et al 1998). Zum Tumorantigen NY-Col-38/PDZ73 sind 4 weitere Isoformen bekannt, die durch alternatives Spleißen entstehen (Scanlan et al 1999). Reaktive Antikörper gegen das Spleißprodukt des Restins sind in Kontrollseren und Seren von Krebspatienten zu finden (Bilbe et al 1992). Das Oberflächenantigen CD44 wird alternativ zu verschiedenen mRNAs gespliced, die als prognostischer und metastatischer Faktor diskutiert werden [Seiter et al 1998; Ponta et al 1994; Goodison et al 1999; Goodison et al 1998].

1.2.2.2 Überexprimierte Antigene

Die Überexpression eines Proteins im Tumor kann durch Überschreitung der immunologischen Toleranzschwelle zur Initiation einer Immunantwort führen. Überexprimierte Tumorantigene sind zum Beispiel die Aldolase A (Güre et al 1998) bei Lungenkarzinomen, eIF-4 γ (Brass et al 1997) bei kleinzelligen Lungenkarzinomen und die Carbon-Anhydrase XII (Türeci et al 1998a) bei Nierenzellkarzinomen. Bekanntester Vertreter

dieser ubiquitär exprimierten Antigene ist das Her-2/neu Gen (Ioannides et al 1993; Schwab 1999), welches sich als membranständiges Antigen für eine Therapie mit monoklonalen Antikörpern eignet und bereits klinisch erprobt wird (Herceptin) (Baselga et al 1999).

Myc-L konnte mit einer 10- bis 20-fach höheren Expression in SCCL („Small cell carcinoma of the lung“) beobachtet werden (Nau et al 1985). Anti-Myc-L Antikörper konnten darüber hinaus in Lungenkrebspatienten mit der Überexpression des Proteins korreliert werden.

Tabelle 1-1: Tumorantigenklassen

	<i>Antigenklasse</i>	<i>Beispiele</i>	<i>Referenzen</i>
1	Punkt-Mutation	p53	(Angelopoulou et al 2000)
		CDK4	(Wölfel et al 1995)
		Ras	(Macaluso et al 2002)
	Translokation	bcr / abl	(Berke et al 2000)
	Splice Varianten	NY-Col-38	(Scanlan et al 1998)
		Restin	(Bilbe et al 1992)
2	Überexprimierte Antigene	Her-2/neu	(Hynes & Stern 1994)
		Myc-L	(Nau et al 1985)
		Carbonic Anhydrase XII	(Türeci et al 1998a)
3	virale Antigene	HERV-K10	(Tureci et al 1997)
4	Differenzierungsantigene	Tyrosinase	(Brichard et al 1993)
		TRP1 und TRP2	(Wang et al 1996)
5	Cancer Testis Antigene	MAGE-A	(Rosenberg 1999)
		SSX-2	(Türeci et al 1996)
		NY-ESO-1	(Chen et al 1997)
		cTAGE-1	(Usener et al 2002)

Die Tabelle zeigt eine Klassifikation von Tumorantigenen. Antigene können einerseits durch genetische Alterationen oder Defekte des Gen-Produktes (obere Hälfte der Tabelle), andererseits durch ihre Immunerkennung (siehe untere Hälfte der Tabelle) beschrieben werden (Meese & Comtesse 2002).

1.2.2.3 Virale Antigene

Jede DNA- oder RNA-Virusfamilie besitzt Viren, die zelluläre Transformation induzieren. Virus assoziierte Antigene sind bislang jedoch wenige bekannt. Mit dem „Human Endogenous-“ (HERV-) Retrovirus verwandte Sequenzen machen 1% des menschlichen Genoms aus. HERV-K env und gag Proteine werden in Tumoren der Keimbahn exprimiert was bei 60-85% der Tumorpatienten zu Antikörpern führt (Boller et al 1997; Herbst et al 1998). Auch gegen die Epstein Barr Virus (EBV) Membranproteine LMP2A und LMP2B konnten reaktive Antikörper in Krebspatienten gefunden werden (Lennette et al 1995; Yamamoto et al 1997). Humane Pailliomaviren (HPV) kodieren die Onkoproteine E6 und E7 (Steinwaerder et al 2001). E7 bindet an das Tumor Suppressor Gen pRB während E6 Affinität zu p53 zeigt. Dadurch werden pRB als auch p53 inaktiviert (Munger et al 1992). HPV im besonderen die Subtypen HPV-16 und 18 sind ursächlich an der Entstehung von Cervixkarzinomen beteiligt (Meschede et al 1998). Der Hepatitis B Virus (HBV) und Hepatitis C Virus (HCV) sind in die Entstehung von „hepatocellular carcinoma“ (HCC) involviert (Gentilini et al 1997). „Human T-lymphotropic virus“ (HTLV) verursacht T-Zell Leukämie und wird auch als Ursache des CTCL kontrovers diskutiert (Pancake et al 1995; Wood 1997).

1.2.2.4 Differenzierungsantigene

Vor allem über CTL wurden bei Melanomen Antigene identifiziert, die ansonsten ausschließlich in Melanozyten exprimiert werden und damit zelltypspezifische Antigene darstellen. Diese Antigene, die im Tumor und in differenzierten Normalgeweben exprimiert werden, nennt man Differenzierungsantigene. Beim Melanom sind als autoimmunogene Differenzierungsantigene beispielsweise die Tyrosinase (Brichard et al 1996; Brichard et al 1993), Melan-A/Mart-1 (Coulie et al 1994; Kawakami et al 1994), gp100 (Bakker et al 1994), das „Tyrosinase Related Protein“ 1 und 2 (TRP1/gp75; TRP2) (Wang et al 1996; Wang et al 1995) oder das alternative Spleißprodukt von pMel17/gp100 (Cox et al 1994; Kawakami et al 1995) beschrieben. Die Tyrosinase katalysiert den Schritt des Tyrosins zum Dihydroxyphenylalanin (DOPA), einem Vorläufer des Melanins. Da CTL gegen Differenzierungsantigene auch die differenzierte Ursprungszelle der entsprechenden Neoplasie erkennen, entsteht ein Bruch der Toleranz gegen Selbst-Antigene, was im Falle des Melanoms in einer autoimmunen Nebenwirkung, der Vitiligo, sichtbar wird [Overwijk & Restifo 2000; Kempf et al 2001).

Differenzierungsantigene konnten auch im Rahmen von Leberzellkarzinomen und Hodgkin-Lymphomen wie zum Beispiel SOX (Gure et al 2000b), rab38 aus der rab-Familie (Chen 2000), sowie beim Kolonkarzinom das Galektin 4 (Scanlan et al 1998) und beim Nierenzellkarzinom in Form von RAGE (Gaugler et al 1996) gefunden werden. Ferner können CD Antigene als Differenzierungsantigene gelten. Das CD20 wird beispielsweise bei der Therapie des B-Zell Lymphoms als Erkennungsstruktur benutzt (Flieger et al 2000). Auch der T-Zell Rezeptor (TCR) einer klonalen malignen T-Zelle des CTCLs ist differenzierungsabhängig exprimiert.

1.2.2.5 *Cancer Testis Antigene*

Cancer Testis Antigene (CT-Antigene, oder auch als „cancer germline genes“ bezeichnet) sind durch ihr charakteristisches Expressionsmuster definiert und deshalb vielversprechende Kandidaten für die Immuntherapie (Boon 1993; Old 2001). CT-Antigene sind außer in Tumoren unterschiedlicher Herkunft nur in der Testis zu finden (Old 2001; Scanlan et al 2002). Dieses charakteristische Expressionsprofil lässt vermuten wie die kodierenden Gene reguliert werden. Eine maligne Transformation ist häufig mit einer Demethylierung der CpG Inseln im Genom assoziiert, die eine Aktivierung von normalerweise „ruhigen“ Genen bewirkt (Mintz & Debinski 2000). Bei zumindest einigen Mitgliedern der CT-Antigene steht die Aktivierung in Tumorzellen direkt im Zusammenhang mit der CpG-Demethylierung in Tumoren (De Smet et al 1996). Genauso ist eine Demethylierung in der Testis zu erkennen (Choi & Chae 1991; Choi & Chae 1993). Testisgewebe weist eine reduzierte bis fehlende HLA-Expression als immunprivilegiertes Gewebe auf (Fiszer & Kurpisz 1998), so dass autoimmune Effekte wegfallen. Das erste über CTL-Antwort bei Melanompatienten gefundene CT-Antigen ist MAGE-1 (später umbenannt in MAGE-A1) (van der Bruggen et al 1991). CT-Antigene sind in ihrer Expression nicht auf einen bestimmten Tumor beschränkt, sondern zeigen ein breites Expressionsmuster. Die Expression von MAGE-A1 wurde daher neben dem Melanom auch in anderen Tumoren gefunden (De Plaen et al 1994).

Die meisten CT-Antigene sind auf dem *X-Chromosom* lokalisiert (Ausnahmen: SCP-1 (Kondoh et al 1997), OY-TES-1 (Ono et al 2001) und cTAGE-1 (Eichmüller et al 2001)). NY-ESO-1 ist ebenfalls auf dem X-Chromosom lokalisiert und wurde mittels der SEREX Methode an einer Ösophaguskarzinom Bank gefunden, konnte aber in der Expression vor allem in Lungenkarzinomen bestätigt werden (Chen et al 1997; Lee et al 1999).

Bei den CT-Antigenen handelt es sich meist um *Multigen-Familien*. Die MAGE-A-Familie besteht aus 15 (De Plaen et al 1994) und die GAGE-Familie aus 8 (Van den Eynde et al 1995) Mitgliedern. NY-ESO-1 gehört zu einer Familie mit drei Genen, NY-ESO-1, LAGE-1 (Lethe et al 1998) und ESO3. Das HOM-MEL-40 Antigen wird von SSX-2 kodiert und wurde mittels SEREX am malignen Melanom gefunden (Sahin et al 1995). SSX2 gehört zu einer Familie bestehend aus 5 Mitgliedern mit einer Nukleotidhomologie zwischen 88-95% und einer Proteinhomologie zwischen 77-91% (Güre et al 1997). Das tumorspezifische „cutaneous T-cell Lymphoma associated antigen-1“ (cTAGE-1) gehört zu einer Familie aus insgesamt 11 mRNAs, die durch differentielles Spleißen von vier Genen entstehen (Usener et al 2002).

Den CT-Antigenen konnten bis auf die folgenden Ausnahmen bislang keine Funktionen zugeordnet werden. SCP-1 ist ein Protein, das bei der korrekten Paarung der homologen Chromosomen während der Meiose eine Rolle spielt (Meuwissen et al 1997; Schmekel et al 1996). OY-TES-1 ist in den Akrosomen der Spermien lokalisiert und spielt eine Rolle als Bindungsprotein zu Proacrosin zum Packen und Kondensieren der Acrosin-Zymogene in der akrosomalen Matrix (Ono et al 2001). CT9 („bromodomain testis specific gene product“) ist ein testisspezifischer transkriptionaler Regulator (Scanlan et al 2000). CT15/Fertilinβ ist an der Interaktion der Ei/Spermamembran beteiligt (Primakoff & Myles 2000; Vidaeus et al 1997).

1.2.3 Tumorantigene des kutanen T-Zell Lymphoms

Für das CTCL sind bislang nur wenige immunogene Antigene bekannt (Eichmüller 2002). Da das CTCL eine klonale Proliferation von CD4⁺ Lymphozyten ist, stellt der T-Zell Rezeptor (TCR) eine ideale, spezifische Antigen-Struktur dar (Whittaker 1996). So sind einige TCR-abhängige spezifische Antigene bekannt, die für eine Vakzinierung in Frage kämen (Berger et al 1998). Kürzlich konnten CTL gegen die hypervariable Region CDR3 des TCR generiert werden (Berger et al 2001). Immunogene Peptidfragmente aus Teilen des TCR müssten allerdings für jeden Patienten neu analysiert werden, was in der Routinediagnostik zur Zeit etabliert wird (Reddy et al 2001).

CTCL-spezifische Antigene haben gegenüber dem TCR-Ansatz den Vorteil, dass Therapien nicht individuell für jeden Patienten entwickelt werden müssen. An einer Nonapeptid-Bank konnten mit einer CTCL spezifischen CTL-Linie HLA restringierte Epitope gefunden werden (Linnemann et al 2001; Linnemann et al 2000). Die identifizierten Epitope werden Mimotope genannt, da sie keinen Genen zuzuordnen sind. So konnte erstmals eine zelluläre

Immunantwort gegen ein definiertes Epitop beim CTCL nachgewiesen werden, welches 80% der HLA übereinstimmenden Patienten besitzen.

Bislang konnten von Bagot und Mitarbeitern zwei weitere TCR unabhängige Proteine identifiziert werden. Das Membranprotein p140-KIR, ein „killer immunoglobulin-like receptor“ (KIR), ist ein Oberflächenmarker auf malignen CD4+ Lymphozyten, sowie auf NK-Zellen und einigen CD8+ Zellen (Bagot et al 2001a). Ein weiteres Antigen ist das Transmembranprotein SC-5, welches vor allem bei T-Zell Aktivierung exprimiert wird (Nikolova et al 2002).

Immunologisch relevante CTCL assoziierte Antigene wurden mittels der SEREX Methode identifiziert (Eichmüller et al 2001). Alle detektierten Antigene waren serologisch spezifisch, d.h. nur CTCL-Patienten besaßen reaktive Antikörper gegen die abgeleiteten Proteine, nicht aber die Kontrollpersonen. Durch Screenen einer Testis-Phagen-Bank wurden 14 verschiedene CTCL assoziierte Antigene gefunden. Eine erste RT-PCR Analyse ergab bei 8 Tumorantigenen ein ubiquitäres, bei vier ein differentielles Expressionsmuster und bei zwei weiteren handelte es sich um CT-Antigene. Diese tumorspezifischen Antigene SCP-1 (synaptenomales Protein-1) (Meuwissen et al 1997), welches bereits in anderen SEREX Untersuchungen bei Nierenzellkarzinom-Patienten detektiert werden konnte (Türeci et al 1998b) und cTAGE-1 (Eichmüller et al 2001) kommen für eine Immuntherapie in Frage. Weitere SEREX Untersuchungen einer CTCL-Phagen-Bank erbrachten 9 neue CTCL assoziierte Antigene.

1.3 Immuntherapie

Grundlage einer Immuntherapie ist, dass das Immunsystem auch neoplastische Zellen lysieren kann, genauso, wie es fremde oder virusinfizierte Zellen tötet. Das Ziel ist, das Potential des körpereigenen Immunsystems auszunutzen, wie es besonders eindrucksvoll bei Abstoßungsreaktionen gegen transplantierte Organe oder auch bei spontanen Regressionen von Tumoren, besonders bei Melanomen und Nierenzellkarzinomen (Gromet et al 1978) beobachtet werden kann. Immuntherapien basieren darauf, dass Krebszellen spezifische Antigene exprimieren. Um dieses Potential zu nutzen und zu fördern, ist die Identifikation von tumorassoziierten Antigenen von großer Bedeutung. Auch in der Diagnostik und für die Prognose von Tumorerkrankungen spielen Antigene eine immer größer werdende Rolle. Schon länger werden in der Tumortherapie unspezifisch Immunstimulanzen wie zum Beispiel Interferone und Zytokine eingesetzt. Allerdings zeigten sie bislang keine

befriedigenden Erfolge. Die ersten Versuche, das eigene Immunsystem im Kampf gegen den Tumor zu rekrutieren, bestanden darin, das eigene Tumorgewebe einzusetzen (Berd et al 1990; Livingston et al 1985). Damit Antigene als immunogen vom Immunsystem erkannt werden, muss eine Tumorzelle von einer Antigen präsentierenden Zelle (APC) aufgenommen werden (Abbildung 1-3). Die Tumor-Proteine werden HLA Klasse I und II präsentiert und so von CD8⁺ und von CD4⁺ T-Zellen erkannt. Die CD8⁺ Zelle differenziert sich zu einer zytotoxischen T-Zelle (CTL), die eine Tumorzelle mittels HLA I präsentiertem Antigen lysieren kann. Die CD4⁺ Zelle induziert naive B-Zellen zur antigenspezifischen Differenzierung, so dass reife Plasma-B-Zellen spezifische Antikörper sezernieren. Immuntherapien versuchen zum Beispiel eine schon erfolgte CTL Antwort zu stimulieren, indem eine APC mit einem tumorspezifischen Antigen als Stimulanz injiziert wird. Alternative immuntherapeutische Ansätze benutzen Antikörper, die membranständige Proteine erkennen. Soweit diese Antigene spezifisch sind, können so Tumorzellen entweder über die Aktivierung des Komplementsystems oder über eine antikörpervermittelte Zytotoxizität abgetötet werden.

Für viele Neoplasien (wie bei HNO-Tumoren, Melanomen, Mamma-, Ovarial- oder Kolonkarzinomen) sind bereits eine Vielzahl von verschiedenen Tumorantigenen identifiziert worden. Jedoch ist die Erkennung dieser Antigene in einer Immunabwehr bei einem Krebspatienten nicht zufriedenstellend. Dies kann an *Immune-Escape Mechanismen* liegen (Bagot et al 2001b; Geertsen et al 1999; Ni et al 2001) oder daran, dass die Krebszellen bei Progression diese Antigene verlieren, wie für das Melanom beschrieben wurde (Chen 2000; Marincola et al 1996; Sahin et al 1999). Ferner konnten bisher keine Tumorantigene identifiziert werden, deren Expression auf alle Tumore einer Entität zutrifft. So ist es notwendig, in einer Immuntherapie viele verschiedene Tumor-Antigene einzusetzen, um eine maximale Erkennung aller Patienten zu gewährleisten und möglichen Escape Mechanismen vorzubeugen.

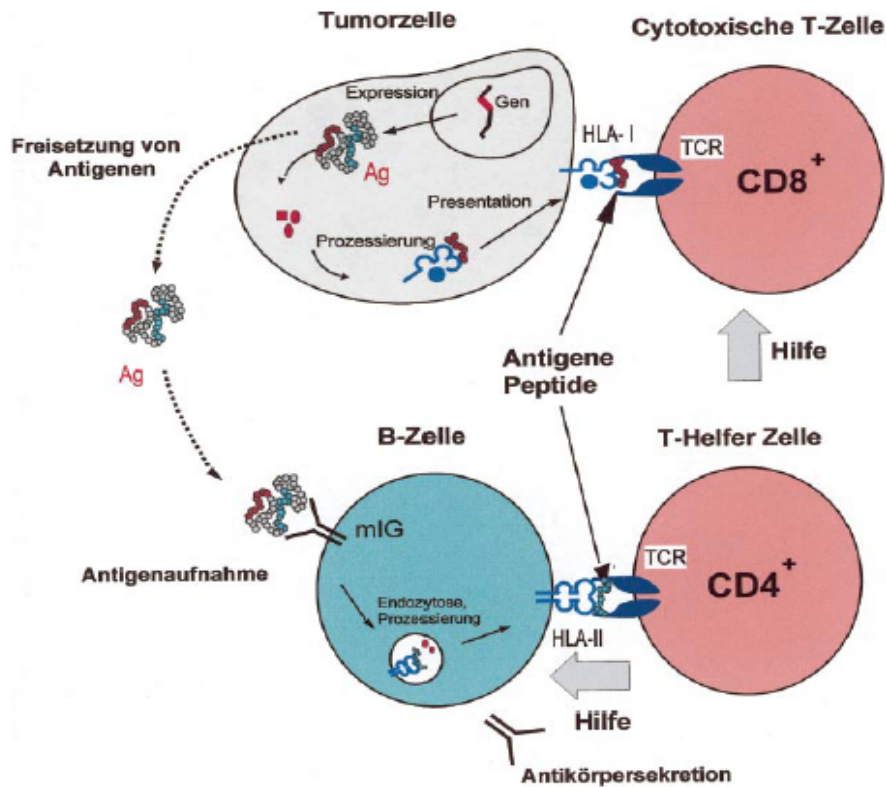


Abbildung 1-3: Autoimmunantwort auf Tumorzellen

Integrierte Immunantwort gegen Tumorantigene (Sahin et al 1999). Zellproteine werden zu Peptidfragmenten degradiert, ins endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert, auf HLA-Klasse-I-Moleküle (HLA-A, -B und -C) geladen und so an der Zelloberfläche präsentiert. Lediglich derart präsentierte Peptidpitope sind für CD8⁺ zytotoxische T-Lymphozyten mittels ihres spezifischen T-Zell-Rezeptors (TCR) erkennbar. Jedes Allel der hochpolymorphen HLA-Moleküle bindet als Restriktionselement ein unterschiedliches Spektrum an Peptiden. Das wird durch sterische Bedingungen und Ladungsverteilungen in der Bindungstasche vorgegeben. HLA-Klasse-II-Moleküle (HLA-DR, -DQ, -DP) dienen der Präsentation von endozytierten Antigenen an CD4⁺ Helfer-T-Lymphozyten. Von Tumoren sezernierte oder durch Tumorzellyse freigesetzte Proteinantigene werden durch spezifische B-Zellen über deren membrangebundenes Immunglobulin aufgenommen. Wird eine solche B-Zelle von einer T-Helferzelle stimuliert, so sezerniert sie spezifische Immunglobuline der IgG-Klasse.

1.3.1 Antikörpertherapien

Verschiedene Mechanismen führen zum Tod der Krebszellen, wenn sie durch monoklonale Antikörper spezifisch erkannt werden. Direkte und indirekte Effekte einer Antikörpertherapie sind in Tabelle 1-2 zusammengefasst.

C225 ist ein Antikörper, der Wachstumsfaktor-Rezeptoren blockiert und dadurch die Apoptose induziert. Präklinische Studien mit diesem murinen anti-EGFR Antikörper 225 und dem chimären Antikörper C225 zeigten einen signifikanten Anti-Tumor Effekt (Goldstein et al 1995). Das Disialogangliosid GD2 wird auf Melanomzellen exprimiert. Gegen anti-GD2 Antikörper wurde der IA7 Antikörper generiert und dieser wird in ersten klinischen Studien

an Melanompatienten im fortgeschrittenen Stadium evaluiert (Bhattacharya-Chatterjee et al 2000). Der monoklonale Antikörper *17-1A* (Edrecolomab) wurde gegen ein onkofetales Antigen generiert. *17-1A* löst eine antikörperabhängige Zytotoxizität aus und wird bei kolorektalen Karzinomen eingesetzt (Frodin et al 2002). Ein Gangliosid-Antigen, das auf der Oberfläche von Zellen des Humanen Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms, Brust- und Darmkrebs exprimiert wird, wird von *L6* (IgG2a Subtype) erkannt, wodurch die Komplementkaskade aktiviert wird (Goodman et al 1993; Hellstrom et al 1986).

Tabelle 1-2: Wirkungen von Antikörpertherapien

<i>Therapeutischer Effekt monoklonaler Antikörper</i>		<i>Beispiel</i>
<i>Direkter Effekt</i>	Induktion der Apoptose (Trauth et al 1989)	C225
	Blockierung von Wachstumsfaktor-Rezeptoren (Baselga & Mendelsohn 1994)	C225, Herceptin
	Anti-Idiotypen Antwort (Bhattacharya-Chatterjee et al 2000)	1A7
<i>Indirekter Effekt</i>	Antikörper abhängige zelluläre Zytotoxizität (Steplewski et al 1983)	17-1A, L6
	Initiierung der Komplementkaskade (Ballare et al 1995; Hellstrom et al 1986)	L6

Die Tabelle zeigt die verschiedenen Antikörpertherapien und ihre Effekte im Überblick.

Bei malignen Erkrankungen sind bisher nur Rituximab (Handelsname: MabThera, gegen das B-Zell Oberflächenantigen CD20), Trastuzumab (Handelsname: Herceptin gegen das bei Mammakarzinom überexprimierte Her2/neu Membranprotein) und Gemtuzumab (Handelsname: Myotarg gegen CD33 bei rezidivierter akuter myeloischer Leukämie, AML) zugelassen (Carter 2001).

Mit Herceptin gegen Mammakarzinome konnte in Kombination zu herkömmlichen Chemotherapien eine signifikante Steigerung des progressionsfreien Intervalls erreicht werden (Slamon et al 2001). Auch mit Rituximab konnten vielversprechende Ergebnisse in ersten klinischen Untersuchungen beobachtet werden (Onrust et al 1999).

Um die Antikörperantwort zu verstärken, wurden monoklonale Antikörper zum Teil an Toxine gekoppelt bzw. spezifische Sekundärantikörper mit gekoppelten Toxinen generiert

(Clynes et al 2000; Flieger et al 2000). Als Toxine fungieren dabei radioaktive Isotope oder bakterielle Toxine.

1.3.2 Vakzinierungstypen

Impfstrategien gegen Krebs bezwecken die aktive Beteiligung und Unterstützung des Immunsystems, um eine gezielte Immunantwort gegen Tumorzellen zu entwickeln.

Peptid-Vakzinierungen wurden vor allem bei Patienten mit malignem Melanom erprobt. Sie zeigen gute Ansprechraten, jedoch konnten keine Regressionen beobachtet werden (Beispiel: Melanom mit Melan-A/Mart-1 Vakzine (Wang et al 1999).

Vakzinierung mit cDNA, die für ein tumorassoziiertes Antigen kodiert, stellt eine weitere Möglichkeit zur systemischen Tumorbekämpfung dar (Rochlitz 2001). Damit das therapeutische Gen in die Zielzelle gelangt, benutzt man Plasmidvektoren oder virale Vektoren (Naitoh & Beldegrun 1998). Die Gen-Behandlung steht allerdings vor großen Problemen, da die therapeutischen Gene nicht nur in die kranken, sondern auch in die gesunden Zellen des Patienten gelangen und dort ihre Wirkung entfalten. Als Folge können unerwünschte Nebenwirkungen auftreten. Daher ist es notwendig, sichere und effiziente Vektoren zu finden, die spezifisch von Tumorzellen aufgenommen werden oder spezifische Promotoren besitzen, die nur im Tumor aktiv sind.

DC werden mit spezifischen Antigenen oder Tumorlysaten von außen beladen (Melanom: (Nestle et al 1998)), um CD8 Zellen zur Differenzierung anzuregen und dadurch eine starke Immunstimulanz zu erwirken. DC exprimieren alle kostimulatorischen Moleküle und sezernieren IL-12, welches wichtig für die Induktion von Zytotoxizität ist. Da die Beladung HLA abhängig erfolgen muss, können nur spezifische Epitope aus dem Antigen benutzt werden. Idiotyp-beladene autologe DC induzierten bei 4 Patienten mit B-Zell Lymphomen eine messbare Immunantwort, bei einem Patienten wurde sogar eine komplette Remission beobachtet (Hsu et al 1996).

Durch eine Fusion von *autologen Tumorzellen und APCs* (Stuhler & Walden 1994) sollen autologe Antigene an der Oberfläche der APC präsentiert werden, so dass die Identifikation von Tumorantigenen entfällt. Erste Studien zeigen bei Melanomen (Trefzer et al 2000) gute Resonanz der Patienten auf eine solche Therapie. Auch Vakzinierungen mit *autologen Gedächtniszellen* werden diskutiert (Feuerer et al 2001).

Vakzinierungen mit rekombinanten Viren oder Bakterien stellen Strategien dar mit denen versucht wird die APC zu infizieren, um so das spezifische Epitop des Antigens durch die APC über HLA Klasse I und II präsentieren zu lassen (Paschen et al 2000; Paschen et al 1999; Xiang et al 1996).

1.3.3 Immuntherapie des CTCL

Das CTCL ist in verschiedenen Arbeiten als klonale Proliferation von CD4⁺ T-Zellen nachgewiesen worden (Muche et al 1999; Neri et al 1995). Die steigende Dichte von Langerhanszellen (>90 Zellen/mm²) (Meissner et al 1990) und eine größere Anzahl CD8⁺ tumor-infiltrierender T-Zellen (Hoppe et al 1995) ist mit einer besseren Prognose korreliert.

Inzwischen wurde auch beim CTCL bewiesen, dass eine körpereigene Immunantwort gegen den Tumor stattfindet. Berger und Mitarbeiter zeigten, dass autologe zytotoxische CD8-Lymphozyten, HLA-abhängig spezifisch autologe Tumorzellen töten konnten (Berger et al 1996). Diese CTL waren spezifisch gegen Peptide aus dem konservierten Anteil des TCR (Berger et al 1998). Des Weiteren wurden aus einem CTCL-Tumor tumor-infiltrierende T-Lymphozyten isoliert, die zytotoxisch auf frisch isolierte Tumorzellen wirkten (Bagot et al 1998).

So werden mittlerweile auch für das CTCL Immuntherapien, wie sie für das Melanom bereits Anwendung finden, angestrebt (Edelson 2001; Kempf et al 2001). In einer Pilotstudie wurden Infusionen mit Tumorantigen beladenen dendritischen Zellen bei Patienten mit folliculären Lymphomen durchgeführt, die in 3 von 4 Fällen therapeutisch von Nutzen waren (Hsu et al 1997; Hsu et al 1996). Maier und Mitarbeiter behandelten 10 CTCL Patienten mit Tumorlysat beladenen DC, die in 50% in einer messbaren Immunantwort resultierten (Maier et al 2003). Eine CTL Antwort gegen maligne B-Lymphozyten konnten Osterroth und Mitarbeiter durch Immunisierung gegen das Fab-Fragment mit Hilfe von Protein beladenen und transfizierten DCs erhalten (Osterroth et al 2000).

1.4 Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist es, ausgewählte Tumorantigene des CTCL, die mittels SEREX an einer Testis-Phagen-Bank (Eichmüller et al 2001) und einer CTCL-Phagen-Bank (Hartmann et al 2003) identifiziert wurden, auf ihren Wert für Diagnose, Monitoring sowie als Zielstruktur für Vakzinierungs- oder Antikörpertherapien von Krebserkrankungen insbesondere des CTCL zu evaluieren.

se2-2 und GBP-5ta sind zwei CTCL assoziierte Tumorantigene, die ein ATP/GTP bindendes Motiv aufweisen. Das Expressionsmuster beider Tumorantigene wird auf DNA und Proteinebene untersucht. Hierfür werden polyklonale Antikörper generiert und sowohl im Western Blot als auch in der Immunhistologie eingesetzt. Zusätzlich wird die serologische Immunantwort im Hinblick auf eine mögliche Verwendbarkeit in der Diagnostik evaluiert. Hierbei sollen die Antikörperantworten von CTCL- und Melanom-Patienten im Vergleich zu Kontrollseren in einem neu etablierten ELISA untersucht werden.

2 Material und Methoden

In den nachfolgenden Kapiteln sind alle angewandten Methoden beschrieben. Die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen und Materialien, sowie deren Herkunft sind im Materialteil aufgeführt.

Die in dieser Arbeit genauer untersuchten Antigene wurden mit der SEREX Methode an einer Testis- und einer Tumor-Bank identifiziert (Eichmüller et al 2001; Hartmann et al 2003). Von den Klonen (se2-2 und GBP-5ta) wurde mit RT-PCR und Northern Blot die Expression auf DNA-Ebene und mittels Western Blot und Immunhistologie die Expression auf Protein-Ebene untersucht. Anschließend konnten die vorhandenen Ergebnisse zur serologischen Erkennung der Antigene (Eichmüller et al 2001; Hartmann et al 2003) mit denen des neu etablierten GST-Xtag ELISA verglichen werden.

MATERIAL

2.1 Lösungen

2.1.1 Humansen und Patientenmaterial

Alle in der Arbeit verwendeten Humansen (Tabelle 2-10) wurden 1:50 verdünnt im GST-Xtag ELISA eingesetzt. Im SEREX wurden die Seren 1:100 verdünnt. Vor ihrer ersten Verwendung im ELISA wurden die Seren einmalig für 30 min bei 56°C im Wasserbad inaktiviert. In Tabelle 2-11 sind die verwendeten Zelllinien zusammengefasst.

Tabelle 2-1: Humansen

<i>Seren</i>	<i>Anzahl</i>	<i>Geschlecht</i>	<i>Alter</i>	<i>Erhalten in Kooperation mit</i>	
<i>CTCL</i>	SS	7	2m 5w	41-70	Dummer (Zürich)
		29	14m 15w	28-92	Dummer (Zürich)
	CTCL		5	5m	39-71
	SS	4	2m 2w	51-80	Dippel (Mannheim)

	MF	15	11m 4w	20-92	Dippel (Mannheim)
	CTCL	4	1m 3w	51-94	Dippel (Mannheim)
	MF	56	36m 20w	33-93	Willemze (Leiden)
Immunbehandelte CTCLs	Adenovirus	19	9 verschiedene Patienten, Geschlecht ?	?	Dummer (Zürich)
	Masernimpfstoff	45	5 verschied. Patienten, Geschlecht ?	55-66	Dummer (Zürich)
Parapsoriasis	Parapsoriasis	19	16m 3w	39-78	Dippel (Mannheim)
	Parapsoriasis	1	1w	?	Dummer (Zürich)
	CBCL	3	1m 2w	56-80	Dippel (Mannheim)
Melanom	Melanom	19	10m 9w	30-85	Schadendorf (Mannheim)
Kontrollen	Kontrollen	78	38m 39w	41-85	VERA ³
	Kontrollen	117	73m 42w	19-67	Blutbank

¹ CTCL Patienten wurden mit einem Adenovirus immunisiert, ² CTCL Patienten wurden mit einem Masernimpfstoff immunisiert, ³ Ernährungsstudie

2.1.2 Zelllinien

Die Melanomzelllinien stammen von Patienten aus der Dermato-Onkologie in Mannheim und wurden aus Metastasen generiert. Die humane Zelllinie MeWo wurde aus einer Lymphknotenmetastase eines Melanompatienten am Memorial Sloan Kettering Cancer Center New York etabliert.

Die CTCL-Zelllinien wurden durch Kooperationen zur Verfügung gestellt. Alle weiteren Zelllinien wurden von der Tumorbank am DKFZ bezogen. Detaillierte Informationen über diese Linien finden sich unter www.atcc.org.

Tabelle 2-2: Zelllinien

<i>Zelllinie</i>	<i>Herkunft</i>	
	<i>Metastase</i>	
Ma-Mel-04	Harnblase	Humane Melanomzelllinien (Prof. Schadendorf, Klinische Kooperationseinheit für Dermato Onkologie am Universitätsklinikum Mannheim)
Ma-Mel-05	Bauch	
Ma-Mel-12	Bauch kutan	
Ma-Mel-17	kutan	
Ma-Mel-33	kutan	
Ma-Mel-34a	Unterschenkel, kutan	
Ma-Mel-36	linker Oberschenkel, kutan	
Ma-Mel-37a	rechter Oberschenkel, kutan	
Ma-Mel-42	Ascitis	
UKRV-Mel-11a	Lymphknoten	
MeWo	Lymphknoten	Humane Melanomzelllinie (Kern et al 1997)
HuT-78	SS Zelllinie (Gazdar et al 1980)	

HH	Lymphomatoide Papulosis (Starkebaum et al 1991)
MyLa	MF Zelllinie (Kaltoft et al 1992)
SeAx	SS Zelllinie (Kaltoft et al 1987)
T239	Embryonale Nierenzelllinie (Tumorbank, DKFZ)
K562	Erythromyelozytäre Leukämie-Zelllinie (Tumorbank, DKFZ)
Colo320	Adenokarzinom (Tumorbank, DKFZ)
Jurkat	Leukämie-Zelllinie (Tumorbank, DKFZ)
ARA-10	
KG1	

verwendete Zelllinien

2.1.3 Bakterienstämme

Zur DNA Klonierung wurden kommerziell erhältliche (OneShotTM, Fa. Invitrogen) oder selbst hergestellte kompetente TOP10 Bakterien verwendet. Die Expression der Fusionsproteine erfolgte in den Protease reduzierten BL21 Bakterien. Beide Bakterienstämme sind Derivate des *E. coli* K12 Laborstammes.

2.1.4 Medien für Bakterien und für Proteinaufreinigung

LB-Medium: Alle Prozentangaben in w/v: 1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt und 1% NaCl. Einstellung auf pH=7,4. Die Bestandteile wurden in H₂O gelöst und autoklaviert. Bei der Anfertigung von Lb-Agar Platten wurden 1,5% Agar vor dem Autoklavieren hinzugegeben. Für die Herstellung von LB (Amp) wurde in beiden Fällen nach Abkühlen unter 55°C Ampicillin (Stammkonzentration: 100 mg/ml) beigelegt.

SOC-Medium: Alle Prozentangaben in w/v: 2% Bacto-Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 8,6 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄.

Die Bestandteile wurden in Wasser gelöst und autoklaviert. Glucose wurde nach Erkalten der Lösung zugefügt (Glucose Endkonzentration: 0.02 ml).

IPTG-Stamm (0,5 M): 0,6 g auf 5 ml H₂O; sterilfiltriert, portioniert (1 ml); Lagerung bei -20°C.

Puffer für die native His-tag Aufreinigung:

Lysis Puffer: 50 mM NaH₂PO₄ , 0,3 mM NaCl, pH=8

3M Imidazol Stock, pH=8.0

Puffer für denaturierende His-tag Aufreinigung:

Puffer B, pH=8,0: 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM TrisCl, 8 M Urea

Puffer C, pH=6,3 : 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM TrisCl, 8 M Urea

Puffer D, pH=5,9: 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM TrisCl, 8 M Urea

Puffer E, pH=4,5: 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM TrisCl, 8 M Urea

Elutionspuffer für Elution der GST-Fusionsproteine: 50 mM Tris-HCl, 10 mM reduziertes Gluthatione, pH=8

2.1.5 Lösungen für cDNA/RT-PCR

50x TAE: 40 mM TrisCL, 10 mM Na Acetat, 1 mM EDTA, pH=7,8

DNA-Loading buffer: 0,1 M EDTA (pH=8), 0,1% Bromphenolblau, 1% SDS, 50% Glycerin

2.1.6 Lösungen für RNA/Northern Blot

RNA Sample Buffer: 2,5 ml deionisiertes Formamid, 1 ml 37% Formaldehyd, 0,5 ml 10x MOPS, 1 ml DMPC H₂O

RNA-Loading buffer: 50% Glycerin, 1 mM EDTA, 0,4% Bromphenolblau, 0,0004% Ethidiumbromid

10x MOPS: (1000 ml): 400 mM MOPS, 100 mM Na-Acetat, 10 mM EDTA (pH=8)

pH=7, autoklavieren (gelbliche Verfärbung) und lichtgeschützt aufbewahren.

DMPC Wasser: H₂O mit 0,1% Dimethylpyrocarbonat (DMPC) versetzen, ca. 30 min bei R.T. inkubieren, anschließend DMPC durch Autoklavieren inaktivieren.

DNase-Verdünnungspuffer: 25 mM Tris HCl (pH=7,6), Glycerin (final 50%) autoklavieren.

DNase 10× Testpuffer: 1 M Natriumacetat, 50 M MgSO₄, pH=5,0, autoklavieren

50x Denhardt's Reagenz: 0,5 g Ficoll Typ 400 (Fa. Pharmacia), 0,5 g Polyvinylpyrrolidon (Calbiochem), 0,5 g BSA (Pentax Fraktion V, Fa. Sigma), 50 ml H₂O zugeben, sterilfiltrieren und bei -20° C lagern.

Dextransulfat: 33% Dextransulfat mit DMPC Wasser.

Formamid, deionisiert: 500 ml Formamid, 50 g Ionenaustauscherharz, AG 501-X8 Resin (Fa. BioRad).

30 min langsam auf einem Magnetrührer rühren, anschließend das Harz über einen Faltenfilter entfernen und deionisiertes Formamid in ca. 50 ml Portionen bei -20° C lagern.

2 M Tris-HCL-Puffer, pH=8, steril

200 mM EDTA, steril

10% SDS, steril: 50 g SDS auf 500 ml

Hybridisierungslösung: 100 ml 30% Dextransulfat (final: 10%), 30 ml 10% SDS (final: 1%), 45 ml 20 x SSC (final: 3x), 60 ml 50x Denhardt's Reagenz (final: 10x), 65 ml H₂O (steril), portionieren und bei -20° C lagern, vor Gebrauch Lachssperm DNA (fertig: 10 mg/ml, final: 0,1 mg/ml) 10 min kochen und nach kurzem Abkühlen (auf Eis) einsetzen zu der Hybridisierungslösung geben.

Mild Stripping Solution: 5 mM Tris HCl, (pH=8), 2 mM EDTA, (pH=8), 0,1x Denhardt's Lösung

2.1.7 Lösungen für Epitopmapping/Western Blot/Immunhistologie

Isotonischer Puffer: 250 mM Sucrose, 20 mM HEPES, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM H₂O (Millipore-Wasser, autoklaviert) Lagerung bei 4°C.

10% SDS, steril: 50 g SDS auf 500 ml

10% Ammoniumperoxidsulfat (APS): 1 g in 10 ml H₂O in 600 µl Portionen aliquotieren, Lagerung bei -20°C.

0,25% Bromphenolblau (BPB): 50 mg BPB in 20 ml H₂O

5x Sampel-Buffer: 5 ml Glycerin (99%), 1,5 g SDS, 1 ml 0,25% BPB, 7,5 ml H₂O zugeben, 2,5 ml β -Mercaptoethanol

4x Lower Buffer: 1,5 M Trisma Base, 10% SDS auf 500 ml, pH=8,8

4x Upper Buffer: 0,5 M Trisma Base, 10% SDS, pH=6,8

10x Running Buffer: 0,25 M Trisma Base, 1% SDS, 1,92 M Glycin, pH=8,3

10x Transferpuffer : 25 mM Trisma Base , 0,19 M Glycin , 0,037% (w/v) SDS auf 1 l mit H₂O, pH=8,8

1x Transferpuffer: 10% 10x Transferpuffer, 20% Methanol, 70% Millipore-Wasser

PBS/Tween: 25 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl, 0,05% Tween, pH=7,5

Brilliant Blue G: 300 ml Brillant Blue G Konzentrat, 1000 ml mit H₂O zugeben.

Entfärber-Lösung : 20% Methanol, 7% Essigsäure, 73% H₂O

Stripping-Lösung: 6,25 ml 1 M Tris-HCL (pH=6,8), 20 ml 10% SDS, 73,75 ml H₂O, 700 μ l β -Mercaptoethanol

1x CAPS-Puffer: 10 mM CAPS, pH=11

2.1.8 Lösungen für die Zellkultur

Vollmedium: RPMI 1640, 10% FCS, 2 mM Glutamin, 1% PDS

Einfriermedium: 70%Vollmedium, 20% FCS, 10% DMSO

2x Trypsin/EDTA: 10x Trypsin/EDTA 1:5 verdünnt in H₂O

Trypanblau: 1 VT Trypanblau, 1 VT PBS

2.1.9 Lösungen für GST-ELISA

Casein-Blockpuffer: 0,2% (w/v) Casein in PBS-Tween vor Benutzung frisch ansetzen.

Substratpuffer: 100 mM Na-Acetat pH=6 (mit Essigsäure einstellen) Lagerung bei 4°C, mehrere Wochen haltbar.

Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS): PBS (137 mM NaCl, 3 mM KCl, 1,5 mM KH_2PO_4 , 8 mM Na_2HPO_4) wurde als 10x Konzentrat mit H_2O hergestellt und zum Gebrauch mit H_2O auf 1x verdünnt.

Waschpuffer: PBST, PBS mit 0,05% (v/v) Tween-20

Coating-Puffer: 50 mM Carbonatpuffer pH=9,6, 1 Teil 50 mM Na_2CO_3 + 4 Teile 50 mM NaHCO_3 , Lagerung bei 4°C, mehrere Wochen haltbar.

TMB-Stocklösung: 10 mg/ml Tetramethylbenzidin (TMB) in DMSO gelöst.

Lagerung bei -20°C lichtgeschützt mehrere Wochen.

2.2 Geräte/Reagenzien/Computerprogramme

Tabelle 2-3: Antikörper

	Spezifität	Verdünnung	Hersteller	Anwendung
Selbst generierte Antikörper	Rabbit K25	1: 1000/ 1:50- 1:10.000/1:50 1:1000/1:7500	Biogenes	Western-Blot/ GST- XtagELISA /FACS/
	Rabbit K26	/1:50- 1:10.000/ 1:50	Biogenes	Western-Blot / Immunhisto / GST- XtagELISA /FACS/
	Rabbit K41	1:500/1:50- 1:10.000/1:50	Biogenes	Immunhisto / GST- XtagELISA / FACS/
	Rabbit K42	1:1000/1:50- 1:10.000/1:50	Biogenes	Immunhisto / GST- XtagELISA / FACS
	Rabbit Anti 2-2 K43	1: 1000	Biogenes	Western-Blot
Präimmunsereen	Rabbit Anti 2-2 K44	1: 1000	Biogenes	Western-Blot
	Tier 44 (K43)	1:100-1:5000	Biogenes	Western-Blot/ Immunhisto
	Tier 45 (K41)	1:100-1:5000	Biogenes	Western-Blot/ Immunhisto
	Tier 46 (K42)	1:100-1:5000	Biogenes	Western-Blot/ Immunhisto
	Tier 47 (K44)	1:100-1:5000	Biogenes	Western-Blot/ Immunhisto
	Tier 96 (K25)	1:100-1:5000	Biogenes	Western-Blot/ Immunhisto
Primärantikörper	Tier 98 (K26)	1:100-1:5000	Biogenes	Western-Blot/ Immunhisto
	Anti-Xpress-HRP	1: 5000	Invitrogen	Western Blot
	Mouse Anti-Actin Klon:4,monoklonal	1:5000	ICN Biomedicals	Western Blot
	Goat Anti-GST	1: 10.000	Amersham	Western Blot/ GST- XtagELISA
	Mouse Anti-Tag	1:1000	Kooperation mit M. Pawlita	Western Blot/ GST- XtagELISA
	Goat Anti-GBP-1 (N17)	1:500	Santa Cruz Biotechnology	Western Blot/ GST- XtagELISA
	Mouse Anti-ICAM-1	1:500	Santa Cruz Biotechnology	Western Blot
	Mouse-Anti- HLA Klasse I	1:50		Western Blot
Sekundärantikörper	Goat Anti-Rabbit IgG- HRP	1:10.000	Santa Cruz Biotechnology	Western Blot
	Goat Anti-Mouse IgG- HRP	1:10.000	Santa Cruz Biotechnology	Western Blot
	Anti-goat polyclonal IgG HRP	1:10.000	Santa Cruz Biotechnology	Western Blot
	Goat Anti-Rabbit FITC	1 :50	Dianova	FACS
	Goat Anti-Human-HRP	1:10.000	Dianova	Epitopmapping
	Donkey Anti-Human IgG HRP	1:10.000	Dianova	GST-XtagELISA

Verwendete Antikörper im Western Blot, GST-XtagELISA, Immunhistologie, FACS, Epitopmapping.
HRP=horseradish peroxidase

2.2.1 Computerprogramme

DKFZ: HUSAR / GCG package

Prime, Primer => Primersynthese

Map, translate, 2dsweep, DomainSweep, Prosite, Motifs => Peptid-Beschreibung

Gap, Bl2seq, bestfit=> Ähnlichkeitsvergleiche

Malign, Contig, Malign2MSF=>Alignment

Genescan, HMM Gene => Exon-Intron-Strukturen

BlastN2=> Datenbanksuche

KIAA Gen Expression (<http://www.kazusa.or.jp/en/>)

2.2.2 Geräte

- ABI PRISM TM 310 Genetic Analyzer, Fa. Applied Biosystems
- Auto-Spot Robot ASP222, Fa. Abimed
- Becton Dickinson FACS Calibur, Fa. Becton Dickinson
- Biofuge Fresco, Fa. Heraeus Instruments GmbH
- Brutschrank Function Line, Fa. Nuair US AutoFlow
- Casy 1Modell TT, Fa. Schäf System GmbH
- Crosslinker, Fa. Stratagene
- ELISA-Reader μ -Quant, Fa. DEELUX
- Entwickler: Agfa Curix 60, Fa. Agfa
- Feinwaage AG245 Mettler, Fa. Toledo
- Folienschweißgerät, Fa. Severin
- FPLC, Fa. BioRad
- Glaspipetten, 1, 2, 5, 10, 20 ml mit Pipetierhilfe, Fa. BioRad
- Geldokumentation E.A.S.Y. 429 K, Fa. Herolab
- Gel drying frames, Fa. Sigma
- Hybridisierungsofen, Fa. Bachhofer
- Hochdruckhomogenisator, Emulsiflex-C5, Avestin, Heidelberg
- Inkubator / Trockenschrank, Fa. Heraeus
- Kühlschränke (4°C, -20°C, -80°C), Fa. Liebherr, Forma Scientific
- Kühlzentrifuge Biofuge, Fa. Kendro
- Millipore-Anlage, Fa. Millipore
- Mini-Protean® II und III Electrophoresis Cell, Fa. BioRad
- Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell, Fa. BioRad
- Magnetrührer MR 3002, Fa. Heidolph
- Mikroskop DMIL, Fa. Leica
- Mikrowelle Micromat, Fa. AEG
- Neubauer-Zählkammer
- PCR Maschine, Fa. MJ Research
- pH Meter 220, Fa. Mettler-Toledo
- Photometer: BioPhotometer, Fa. Eppendorf
- Pipetten: Fa. Eppendorf, Gilson

- Pipettierhilfe accu-jet, Fa. BRAND
- PowerPac 300 power supply, Fa. BioRad
- Röntgenfilmkassetten, Fa. Dr.Goos
- großer Schüttler für Platten, Fa. GFX
- Schüttler, Fa. IKA
- Sonifikator, Fa. Hielscher
- Sterilbank SterilGard ClassII Type A/B3, Fa. The Baker Company
- Stickstofftank Chronos, Fa. Messer
- Thermoblock, Fa. Eppendorf
- Transilluminator mit Photographiervorrichtung, Fa. BioRad
- Überkopffrotor, Fa. Snijders
- Ultrathurax, Fa. Labortechnik
- Ultrazentrifuge, Fa. Beckman
- UV-Tisch, Fa. Konrad Benda
- Vakuumentrifuge: Speed Vac Concentrator, Fa. Savant
- Vortexer Reax 2000, Fa. Heidolph
- Waage, Fa. Sartorius
- Wasserbäder, Fa. Köttermann Labortechnik/Julabo SW20
- Zentrifuge, Fa. Sorvall RT7

2.2.3 Alphabetische Liste der verwendeten Chemikalien

- 1,4-Dithiotreitol (DTT), Fa. Roth
- 100 bp Ladder, Fa. Natutec
- (α - 32 P]dCTP, Fa. Amersham
- β -Mercaptoethanol, Fa. Merck
- Affinitätsadsorbens: aktiviertes Glutardialdehyd, Fa. Roche
- Antibiotika, Fa. Sigma
Ampicillin: Stamm = 100 mg/ ml H₂O
- Agar, Fa. Difco
- Agarose, Fa. Biozym
- Ammoniumperoxidsulfat (APS), Fa. Roth
- Anti Dig Ap Konjugat, Fa. Roche
- Aprotinin, Fa. Roche
- Biocoll Separating Solution, Fa. Biochrom
- BioRad Protein Assay, Fa. BioRad
- Blocking Reagent, Fa. Roche
- BSA, Rinderserumalbumin (Pentax Fraktion V), Fa. Serva
- Bromphenolblau Natriumsalz, Fa. Merck
- CAPS (3-Cyclohexylamino-1-propansulfonsäure), Fa. Sigma
- Casein, Fa. Sigma
- Chemilumineszenz-Nachweisreagenz ECL, Fa. Amersham-Pharmacia
- Chloroform, Fa. Merck
- CSPD Ready to use, Fa. Roche
- Coomassie Brilliant Blue R, Fa. Gerbu
- Dextransulfat: Na-Salz, Fa. Pharmacia
- Dig Easy Hyb Granules, Fa. Roche
- DMF, Dimethylformamid, Fa. Sigma
- DMPC, Dimethylpyrocarbonat, Fa. Sigma

-
- DMSO: Dimethylsulfoxid, Fa. Merck
 - DNase I, RNase-frei, Fa. Roche
 - Eindeckmedium: VectaShield Mounting Medium, Fa. Vector Laboratories
 - Ethanoldiamin, Fa. Sigma
 - Ethylendiamintetraessigsäure-Disodium (EDTA), Fa. Sigma
 - Ethylenglykol-bis-(2-aminothyl)-tetraessigsäure (EGTA), Fa. Sigma
 - Ethanol, 98%, Fa. Riedel-de-Haen
 - Ficoll Typ 400, Fa. Pharmacia
 - Fmoc Aminosäuren, Fa. Sigma
 - Formaldehydlösung (37%), Fa. Roth
 - Formamid, Fa. Roth
 - fetales Rinderserum (FCS), Fa. Gibco
 - Glucose, Fa. Merck
 - Glutaraldehyd, Fa. Sigma
 - Glycin p.A., Fa. Gerbu
 - Harnstoff, Fa. Fluka
 - Hämatoxylin, Fa. AppliChem
 - N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazine-N'-2-ethansulfonic acid (HEPES), Fa. Gerbu
 - Ionenaustauscherharz, Fa. BioRad
 - Human Interferon- γ , Fa. RD Systems
 - Isopropanol, Fa. Riedel-de-Haen
 - IPTG, Isopropylthiogalactosid, Fa. Sigma
 - Lachssperm DNA-Lösung, Fa. Gibco
 - Kaliumchlorid p.A, Fa. Merck
 - Lambda-Marker, Fa. MBI-Fermentas
 - Lithiumchlorid, Fa. Merck
 - Leupeptin, Fa. Roche
 - Maltose, Fa. Sigma
 - $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, Fa. Sigma
 - $MgSO_4$, Fa. Fluka
 - MOPS (3-[N-morpholino]-2-hydroxypropansulfonic acid), Fa. Sigma
 - Milchpulver, Fa. Fluka
 - Multiple Tissue RNA Panel, Fa. Clontech
 - Multiple Tissue cDNA fetale Panel, Fa. Clontech
 - Na-Citrat-Dihydrat, Fa. Roth
 - NaCl, Fa. Roth
 - NaOH, Fa. Merck
 - Natrium-Acetat, Fa. Fluka
 - Natriumacid, Fa. Sigma
 - Nukleotide, Fa. Promega
 - Phenol, sauer, Fa. Pharmacia
 - PBS (phosphatgepufferte Salzlösung) w/o Ca^{2+} , Mg^{2+} ; Fa. Biochrom KG
 - Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF), Fa. Roche
 - Ponceau-S-Solution, Fa. Sigma
 - Protein-Marker: Kaleidoscope Prestained Standard, Fa. BioRad
 - Polyacrylamid: Rotiphorese® Gel 30, Fa. Roth
 - Polyvinylpyrrolidon, Fa. Calbiochem
 - Restriktionsenzyme: Sma I, Kpn I, BamHI, EcoRI, SalI, XhoI, Fa. Amersham

- Restriktionsenzym-puffer: One for all Puffer, Fa. Amersham
- RNA clean Lösung, Fa. AGS
- RNase Inhibitor, Fa. Roche
- RNase (DNase frei), Fa. Roche
- Sodium Dodecylsulfate (SDS), Fa. Merck
- Sukrose, Fa. Sigma
- Taq-Polymerase, Fa. Natutec
- Temed p.A., Fa. Roth
- Trizma Base, Fa. Sigma
- Trizma HCl, Fa. Sigma
- Triton-X100, Fa. Sigma
- Trypsin/EDTA (10x), Fa. Biochrom KG
- Tryptone, Fa. Difco
- Tween 20, Fa. Sigma
- Yeast extract, Fa. Difco

2.2.4 Verbrauchsmaterial

- Einfrierbox, Fa. Qualilab Bender & Hobein
- Eppendorf Cups 0,2 ml; 0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml, Fa. Eppendorf
- Filter 0,2 μ m, Fa. Sartorius
- Filterpapier 3MM, Fa. Whatmann
- Falcon-röhrchen 15/20 ml, Fa. Falcon
- Dialysierschlauch, Fa. Neolab
- Gewebekulturflaschen, Fa. Greiner
- Kryoröhrchen, Fa. Nalgene Company
- Nitrozellulose-Membranfilter für SEREX-Blotting, Fa. Sartorius
- Nitrozellulosemembran HybondTM-C, Fa. Amersham
- Pasteur Capillary Pipettes, Fa. WU Mainz
- Peg 500-Spacer Nylonmembran, Fa. Genosys
- Pipettenspitzen 1000er, 100er, 10er, Fa. Gilson, Fa. Eppendorf
- Plastikpipetten, Fa. Sarstedt
- Positiv geladene Nylon Membran, Fa. Roche
- PVDF (Poly-vinylidene-difluoride)-Membrane; Fa. Roche
- Rotilab-Spitzenfilter 0,8 μ m, Fa. Roth
- Skalpell; Fa. Feather
- Serum-Monovetten, Fa. Sarstedt
- sterile Rundboden Röhrchen, Fa. Greiner
- Qia Shredder, Fa. Qiagen
- Röntgenfilme: Kodak X-OMATTM, AR, Fa. Sigma
- Standardprospekthülle, Fa. Esselte
- COSTAR 1,2 ml Cluster Tubes im 12x8 Rahmen, Fa. Corning
- ELISA 96-Loch Platten, Polysorb, Nunc, Roskilde, Dänemark
- Zellkulturplatten (6-Loch), Fa. Falcon

2.2.5 Fertige Kits

- ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, Fa. Applied Biosystems
- Alkaline Phosphatase Rabbit IgG ABC Kit, Fa. Linaris

-
- AP Substrat Kit, Fa. Linaris
 - Avidin / Biotin Blocking Kit, Fa. Linaris
 - Qiagen Miniprep Kit (250), Fa. Qiagen
 - Dig DNA labelling Kit, Fa. Roche
 - Qia Amp Tissue Kit (50), Fa. Qiagen
 - JetQuick PCR Purification Kit (50), Fa. Genomed
 - Rneasy Midi Kit, Fa. Qiagen
 - Qia Oligotex mRNA Midi Kit, Fa. Qiagen
 - Random primed DNA labeling Kit, Fa. Roche
 - High Prime Kit, Fa. Qiagen
 - First Strand cDNA Synthese Kit, Fa. Roche

METHODEN

2.3 Rapid Amplification of cDNA ends (RACE)

Um die Existenz der verkürzten Version, GBP-5ta, zu verifizieren, wurden die verkürzten 3' und 5' Enden mittels einer RACE-Polymerase-Ketten-Reaktion(-PCR) verlängert. Für die RACE-PCR, d.h. eine PCR in das "unbekannte" Gen, muss eine spezielle cDNA hergestellt werden. Die 3'-cDNA Synthese nutzt eine normale Reverse Transkriptase (RT) Reaktion mit einem initialen Oligo-d(T)-Primer, der am Poly (A) Ende hybridisiert. Die 5'-cDNA-Synthese wird, wie die 3'-Synthese, durch ein Oligo d(T) am 3' Ende der mRNA gestartet.

Das RACE-PCR System nutzt die Besonderheit aus, dass die Reverse Transkriptase-MMLV nach einer Voll-Längen-Transkription eine terminale Transferase Aktivität übernimmt, die 3 bis 5 Nukleotide (dCTP) am neu synthetisierten Strang anhängt. Die MMLV-Transkriptase hängt nur an voll durchpolymerisierten mRNAs einer solchen Cytosin-reichen Region, so dass dadurch gewährleistet wird, dass nur cDNAs in voller Länge entstehen. An dieser Cytosin-reichen Region kann ein bekanntes Oligo (SMART II Oligo) binden, da es eine Guanin-reiche Region besitzt. Das SMART II-Oligo dient als Primer für die Reverse Transkription in 3' Richtung. Die PCR wurde in Anwesenheit eines Lese-Prüf-Enzyms durchgeführt. Durch die Bindung eines monoklonalen Antikörpers am N-Terminus der Taq Polymerase, der diese damit inhibiert, wird eine „hot start-PCR“ simuliert. Beim initialen Erhitzen auf 95°C wird der Antikörper denaturiert. Auf Grund der bekannten Sequenz an den Enden der cDNAs ist es möglich, diese als Primerbindungsstellen zu benutzen, und eine PCR mit einem Gen-spezifischen zweiten Primer durchzuführen. Aus dem bekannten DNA-Bereich wurde ein Primer mit hoher Hybridisierungstemperatur gewählt und damit eine hohe Spezifität gewährleistet.

Folgender RACE Primer wurde für eine Voll-Längen-Polymerisierung verwendet:

GBP-5ta: 5' RACE, Forward Primer: cca gga gct gct gga cct gca cag gac, Annealing Temperatur: 66°C.

Die Polymerisierungsreaktion wurde schließlich in einer „Touch Down PCR“ (d.h. schrittweise Veränderung der Annealing Temperatur von hoher zu niedriger Stringenz) durchgeführt.

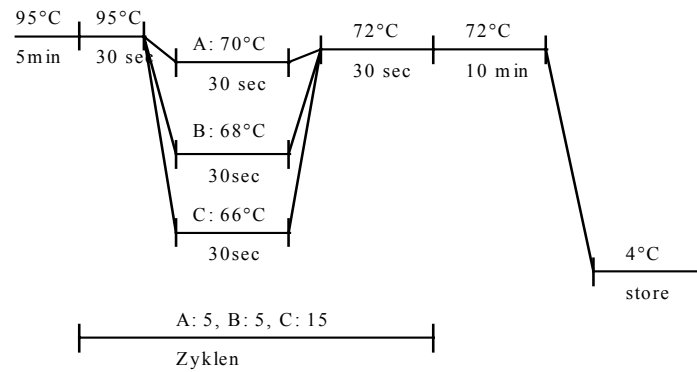


Abbildung 2-1: RACE-PCR

RACE-PCR als „Touch Down PCR“ mit schrittweiser Senkung der Anlagerungsspezifität.

2.4 RNA-Expressionsanalysen

Um die Tumorspezifität der Antigene GBP-5ta, GBP-5a/b und se2-2 zu untersuchen, wurde das RNA-Expressionsspektrum mittels RT-PCR und Northern-Blot und das Protein-Expressionsspektrum mittels Western Blot und Immunhistologie analysiert.

2.4.1 RNA Gewinnung

Für die Expressionsanalysen per PCR und Northern Blot wurde RNA aus verschiedenen Tumorgeweben und Zelllinien isoliert. In flüssigem Stickstoff gekühlte Tumor-Proben / Zell-Pellets wurden mit TriStar Puffer (2 ml pro 100 mg Gewebe bzw. 1×10^7 Zellen) überschichtet, mit einem Ultrathorax mechanisch zerkleinert und mittels eines Ultraschall-Sonifikators weiter zerkleinert.

Nach 15 min Inkubation auf Eis und anschließendem Zentrifugieren (13.000rpm, 4°C, 15 min) befand sich die RNA im Überstand, während das Pellet zur Protein-Isolierung und DNA-Gewinnung verwendet wurde. Der Überstand wurde präzipitiert (1 Volumenteil (VT) RNA-Lösung, 3 VT kaltes 96% EtOH, 1/10 VT NaAc (3 M), 30 min, 4°C, 13.000rpm Zentrifugation, Pellet mit 2 VT 100% EtOH gewaschen, Zentrifugation 20 min, 4°C, 13.000rpm).

DNase Behandlung und Phenol/Chloroform-Extraktion / Fällung

Die RNA Lösung wurde mit DMPC Wasser zu einem Volumen von 88 µl aufgefüllt. Von der 1/10 in DNase Puffer verdünnten DNase wurden 2 µl eingesetzt, mit 10 µl DNase-Testpuffer gemischt und der RNA Suspension zugegeben. Die Lösung wurde für 10 min bei 25°C

inkubiert. Anschließend wurden aus der RNA-Lösung Proteine (u.a. DNase) mittels Phenol/Chloroform extrahiert, indem die Lösung mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform überschichtet, geschüttelt und zentrifugiert (13.000rpm, Raumtemperatur (R.T.), 5 min) wurde. Die wässrige obere Phase enthielt die RNA und wurde mit $2 \times VT$ 96% EtOH, $1/10 VT$ NaAc (3 M) und 70% EtOH gefällt. Das Pellet wurde in DMPC Wasser aufgenommen und bei $-80^{\circ}C$ gelagert.

RNA-Auftrennung

Die RNA wurde in einem 3-(N-Morpholino)propane sulfonic acid (MOPS) - Gel überprüft. Dazu wurden 1-2 μg RNA mit 2 VT RNA-Puffer gemischt und 10 min auf $65^{\circ}C$ erhitzt, damit die RNA einzelsträngig vorlag. Anschließend wurde das Gemisch mit RNA Lade-Puffer (2 μl) in einem 1% Agarose 1x MOPS Gel bei 80 V elektrophoretisch aufgetrennt.

2.4.2 Herstellung von cDNA

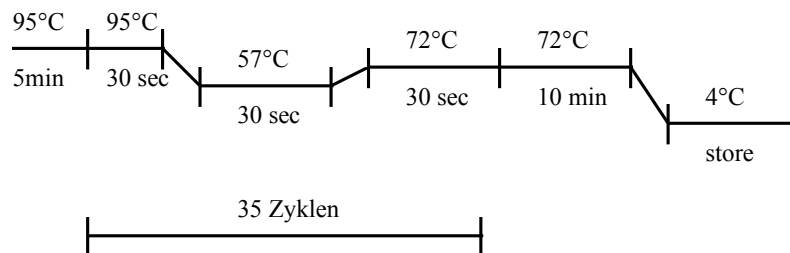
Aus der isolierten Gesamt-RNA wurde eine cDNA hergestellt. Dazu wurde der komplementäre Strang mit Hilfe eines Kits (First Strand cDNA Synthese Kit, Fa. Roche) polymerisiert. Es wurde 1 μg RNA für die cDNA Synthese eingesetzt und nach dem Pipettierschema (Tabelle 2-1) durchgeführt.

Mit Hilfe der Reversen Transkriptase (RT) wurde der komplementäre Strang polymerisiert. Der RNase-Inhibitor sorgt dafür, dass die RNA nicht degradiert wird. Man nutzt Primer, die sich zufällig nach einer statistischen Häufigkeit an die RNA anlagern. Dazu heizt man den Mix 10 min lang auf $25^{\circ}C$ auf (Anlagerungsschritt der Primer). Während der 60 min bei $42^{\circ}C$ polymerisiert die RT von dem Primer aus in 5' Richtung. Die RT wurde durch 5 min Inkubation bei $99^{\circ}C$ inaktiviert. Die hergestellten cDNAs wurden bei $-80^{\circ}C$ gelagert und ihre Qualität mittels einer RT-PCR mit einem Haushalts-Gen, GAPDH (Glycerin-Aldehyd 3-Phosphat-Dehydrogenase), geprüft (Abbildung 2-2).

Tabelle 2-4: cDNA Herstellung

Reagenz	Volumen/ Ansatz	finale Konzentration
10× Reaktionspuffer	2 µl	1×
25 mM MgCl ₂	4 µl	5 mM
Denukleotid-Mix	2 µl	1 mM
Primer: Random	2 µl	1,6 µg
Rnase Inhibitor	1 µl	50 U
AMV Reverse Transkriptase	0,8 µl	20 U
RNA	*	1 µg
H ₂ O (DMPC)	Zugeben 20 µl	

cDNA Herstellung: *RNA liegt als wässrige Lösung unterschiedlicher Konzentration vor und muß daher zusammen mit H₂O 8,2 µl ergeben.

**Abbildung 2-2: GAPDH-PCR**

GAPDH PCR zur Qualitätsbestimmung der cDNA.

2.4.3 RT-PCR

Mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wurde die Expression des gefundenen Antigens in verschiedenen Geweben untersucht. Die PCR ermöglicht, eine geringe Kopienzahl eines DNA-Abschnittes zu amplifizieren. Man benötigt dazu spezifische Oligo-Nukleotide/Primer, die im gewünschten Fragment liegen. Die verwendeten cDNAs wurden aus Geweben anderer Tumore, Zelllinien und diversen Kontrollgeweben hergestellt. Ein PCR-Ansatz enthielt folgende Reagenzien:

Tabelle 2-5: PCR-Materialien

Reagenzien	finale Konzentration
10 x Puffer (NH ₄) ₂ SO ₄ Tris HCl, pH=8 MgCl ₂ Tween 20	1/10 VT, 2,5 µl 16 mM 67 mM 1,5 mM 0,01%
BIOTherm TAQ Polymerase (Fa. Natutech)	1 U
Nukleotide (Fa. Promega)	200 µM
Forward Primer	400 nM
Reverse Primer	400 nM
DMSO	10%
cDNA	0,1-1 ng
H ₂ O steril bidest.	15,5 µl

10x Puffer enthält in fertiger Form obige Zusammensetzung, das DMSO simuliert eine Hot-Start PCR durch Einzelstrangstabilisierung.

Die Primer wurden mittels des GCG Programms Husar *Prime* ausgewählt. In Tabelle 2-6 sind alle für die Expressionsanalyse verwendeten Primer aufgeführt.

Tabelle 2-6: Primer

Primer Name	Forward	Reverse	Produktlänge	Annealing	Herkunft
GAPDH	ggt tac atg ttc caa tat gat tcc ac	tca tat ttg gca ggt ttt tct gac	638 bp	57°C	(Eichmüller et al 2001)
Primer Paar I	tgt tgt aga tca ctt caa ggt gc	cca tat cca aat tcc ctt ggt gtg ag	364 bp	63°C	Neu
Primer Paar II	aga agg aag aaa ctc caa aca cat cc	cca tat cca aat tcc ctt ggt gtg ag	515 /408 bp	48,4°C	Neu
Primer Paar III	cac aag tga aag cag aag ctg a	tta tta aca gtc ctc tgg gcg	267 bp	51°C	Neu
se2-2	cta tga atc caa gac caa agg c	ctc cac ttt ggt cct tgt tag c	539 bp	59°C	(Eichmüller et al 2001)

Die RT-PCR wurden immer mit Positivkontrollen (cDNA aus Testis und 1:100 verdünntem Plasmid) sowie mit Negativkontrollen (H₂O) in mindestens zwei unabhängigen Experimenten durchgeführt.

PCR-Programm

Die verwendete Annealing-Temperatur wurde für jedes einzelne Primer-Paar in der Gradienten-PCR optimiert.

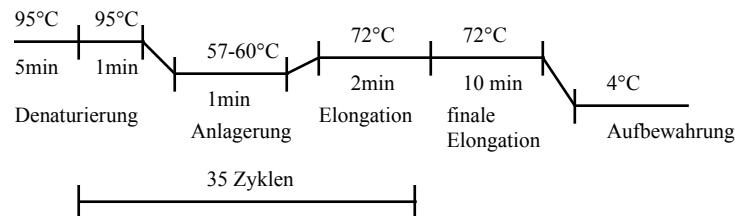


Abbildung 2-3: PCR-Programm

Die Anlagerungstemperatur der Primer wurde unterschiedlich gewählt, die anderen Parameter blieben unverändert.

Die Denaturierung der doppelsträngigen cDNA bei 95°C, der Syntheseschritt der Polymerase bei 72°C, die Zyklenanzahl und der Salzgehalt (MgCl₂) blieben unverändert (Abbildung 2-3). Als Positivkontrolle diente das Plasmid, als Negativkontrolle wurde Wasser verwendet. Die PCR Produkte wurden anschließend in einem Agarosegel nach ihrer Größe aufgetrennt.

PCR-Proben

Zur Überprüfung der Expression in gesunden Normalgeweben wurden RNA-Proben von verschiedenen Geweben in cDNAs umgeschrieben. Ferner wurden cDNA Panels (MTC I, MTC II und fetales Panel) als Kontrollen benutzt. Folgende Gewebe waren darin enthalten (Tabelle 2-7):

Tabelle 2-7: Kontrollgewebe

Umgeschriebene RNA aus eigenen Ressourcen, n=4	Haut PMNC Uterus Brustdrüse
Umgeschriebene Human Total RNA Panel I von Clontech, n=9	Gehirn Herz Placenta Niere Knochenmark Leber Lunge

	Luftröhre Skelettmuskel
Umgeschriebene Human Total RNA Panel II von Clontech, n=5	Kolon Dünndarm Milz Magen Thymus
MTC II von Clontech, n=3	Ovar Testis Prostata
fetales MTC Panel von Clontech, n=8	fetales Gehirn fetales Herz fetale Niere fetale Leber fetale Lunge fetaler Skelettmuskel fetale Milz fetaler Thymus

Hergestellte cDNA aus Kontrollgeweben.

Tabelle 2-8: RT-PCR Proben

Ziele	Gewebe	Zelllinien	Summe
Kontrollen ¹	21		21
Fetale Kontrollen ¹	8		8
CTCL gesamt ²	19	4	23
CBCL	3		3
Melanome	12	8	20
Leukämie – Zelllinien		5	5

cDNAs, die als PCR Proben verwendet worden sind; ¹ Kontrollen: cDNA Panels MTC I, MTC II, fetales Panel, sowie RNA Panel I; ²CTCL, gesamt: Mycosis Fungoides=15, Sézary-Syndrom=4.

Alle cDNAs wurden mittels GAPDH-PCR bezüglich der mRNA Integrität überprüft.

2.4.4 Northern Blot

Im Northern Blot können die Ergebnisse quantifiziert werden. Die RNA wurde in einem MOPS-Gel aufgetrennt. Es wurden 10-20 µg RNA aus Tumorgeweben verwendet, um die Spezifität der Klone zu testen. Das Gel wurde 2x 20 min in 20x SSC getränkt und

anschließend der Kapillarblot aufgebaut. Auf einem Transilluminator wurden die Lauffront der 28S rRNA und 18S rRNA sowie die Slots gekennzeichnet.

Sondenherstellung

Unter Verwendung des High Prime Labeling Kit (Fa. Roche) wurden ca. 25 ng Sonde eingesetzt. Als Sonde wurde das aufgereinigte PCR Produkt am Plasmid gewählt. Die Polymerisierung wurde eine halbe Stunde bei 37°C durchgeführt und mit 1/10 VT 200 mM EDTA (pH=8) gestoppt.

Hybridisierung

Die Nylonmembran wurde mit 2x SSC gespült und zur vorgewärmten Hybridisierungslösung gegeben. Die Prähybridisierung erfolgte 3 Stunden (h) bei 50°C. Anschließend wurde die frisch denaturierte, markierte Sonde dazugegeben und über Nacht bei 55°C hybridisiert. Die Sonde wurde entfernt und konnte, je nach Aktivität an Radioaktivität, noch einmal verwendet werden. Die Membran wurde mit 2x SSC + 0,1% SDS 2x 30 min bei 55°C gewaschen und danach mit verringerter Stringenz mit 0,2x SSC + 0,1% SDS 2x 30 min bei 60°C. Die Membran wurde eingeschweißt und in einer Röntgenfilmkassette fixiert. Der Röntgenfilm lag bis zu 5 Tage bei -80°C auf. Die Sonde wurde 2 h bei 65°C mit Hilfe der „Mild Stripping Solution“ entfernt und der Blot mittels einer Haushaltgen Hybridisierung (GAPDH) überprüft.

2.5 DNA Klonierungen

2.5.1 Plasmide

- Alle in dieser Arbeit verwendeten Tumorantigene lagen für weitere Umklonierungen im Ampicillin resistenten **pBluescript** Vektor (Fa. Stratagene) vor.
- Der **pTrcHisTOPO Vektor** (Fa. Invitrogen) wurde verwendet, um die Antigene (GBP-5ta, se2-2, se57-1, se89-1) als His-tag Fusionsproteine zu exprimieren, und affinitätschromatographisch über Ni²⁺ Agarose aufzureinigen. Die Aufreinigung wurde entweder in einem 50 ml Röhrchen oder mit der FPLC (Fa. BioRad) durchgeführt. Der pTrcHisTOPO Vektor besitzt einen *trc* Promotor, einen lac Operator (lacO) und eine Ampicillinresistenz. In Abwesenheit von Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG) bindet der Lac Repressor an lacO und unterdrückt die Transkription. Bei Zugabe von IPTG wird die Proteinexpression induziert.

- Mit dem Expressionsplasmid **pGEX4T3tag** (Fa. Amersham) wurden die Antigene GBP-5ta, se57-1, se70-2 und cTAGE-1 als Fusionsproteine mit der 26 kDa großen Glutathion S-Transferase (GST) am N-Terminus exprimiert. Das GST Gen enthält ein ATG und eine Ribosombindungsstelle und wird von einem IPTG induzierbaren tac-Promotor betrieben. Der Vektor wurde C-terminal mit einem Unadecapeptid (KPPTPPPEPET) des SV40 T-Antigens (tag) fusioniert (Meschede et al 1998). pGEX4T3tag kodiert für eine Ampicillin Resistenz.

2.5.2 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen (Fa. Amersham) wurden zur präparativen und analytischen Restriktionsspaltung eingesetzt. Die Restriktionsansätze wurden je nach Enzym in den Endkonzentrationen 1x oder 2x OPA-Puffer (Fa. Amersham) angesetzt und bei 37°C oder der vom Hersteller empfohlener Temperatur 1 bis 3 h inkubiert. Es wurde mit einem Enzymüberschuß gearbeitet und darauf geachtet, dass das dabei zugegebene Volumen der Enzymlösung weniger als 10% des Endvolumens betrug, so dass das im Enzymlagerungspuffer enthaltene Glycerin ausreichend verdünnt wurde.

2.5.3 Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP) Behandlung

Um die Religation der Vektor-DNA zu verhindern, wurde sie vor der Gelextraktion mit CIAP (Fa. Amersham) an den aufgeschnittenen Enden dephosphoryliert. CIAP katalysiert die Hydrolyse von 5'-Phosphatenden der DNA. Die Reaktion wurde in Anwesenheit von 10 mM Tris (pH=5,2), 10 mM MgCl₂ und 0,02 U/µl CIAP eine halbe Stunde bei 37°C durchgeführt. Anschließend wurde die CIAP hitzeinaktiviert (85°C, 15 min).

2.5.4 Gelextraktion

Aus dem Agarosegel wurden bei langwelligem UV-Licht Vektor- und Insert-DNA ausgeschnitten und nach Hersteller Protokoll (GelExtraction Kit, Fa. Qiagen) aus dem Gel aufgereinigt. Die Mengen für eine weitere Verarbeitung wurden in einem Agarosegel anhand eines λ-Markers (Fa. MBI-Fermentas) abgeschätzt.

2.5.5 Ligation

Die Ligation wurde mittels 0,1 U/ μ l T4-Ligase in 1x Ligase-Puffer (Fa. Amersham) 5 min bei R.T. durchgeführt. Die molaren Verhältnisse zwischen Insert und Vektor wurden zwischen 1:1 und 5:1 gehalten.

2.5.6 Herstellung kompetenter Bakterien

Die Bakterien (TOP10, BL21) wurden aus einem Glycerolstock auf eine LB-Agar Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit einer Kolonie dieser Platte wurden 100 ml LB-Medium angeimpft. Bei $OD_{600}=0,5$ wurden die Zellen abzentrifugiert (4000rpm, 10 min) und das Pellet in 10 ml kaltem 50 mM $CaCl_2$ aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen 30 min auf Eis inkubiert und dann bei 2600rpm 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 4 ml 50 mM $CaCl_2$ gelöst. Die kompetenten Zellen wurden durch Transformation eines bekannten Plasmids überprüft und dann in 100 μ l Mengen bei -80°C gelagert.

2.5.7 Transformation

Um kompetente Bakterien zu transformieren, wurden die bei -80°C gelagerten Bakterien für 10 min auf Eis aufgetaut. Dann wurden 1-4 μ l Ligationsansatz zugegeben und für eine halbe Stunde auf Eis inkubiert. Der Transformationsansatz wurde 45 sek einem Hitzeschock von 42°C ausgesetzt und danach 2 min auf Eis inkubiert bevor 250 μ l 37°C warmes SOC-Medium zugegeben wurde. Nach Inkubation (1 h, 37°C) wurde der Transformationsansatz in verschiedenen Mengen auf LB(Amp) Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Um die Klonierungsprodukte zu überprüfen, wurden mehrere Einzelkolonien von den Platten gepickt und in 3 ml LB(Amp)-Kulturen über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Aus 1,5 ml der Kulturen wurde die Plasmid-DNA mit Qiagen Miniprep Zentrifugationssäulchen (QIaprep, Fa. Qiagen) nach Protokoll des Herstellers aufgereinigt. Die DNA wurde durch Testverdau mit geeigneten Restriktionsenzymen analysiert. Die Plasmide der Expressionsvektoren wurden zur Proteinexpression in kompetente BL21 Bakterien transformiert.

2.5.8 Klonierungsstrategien

pTrcHisTOPO: Die Inserts wurden mit einer Lese-Prüf-Polymerase (Advantage2PCR Kit, Fa. Clontech) mit den in Tabelle 2-6 aufgeführten Primern aus dem pBluescript Vektor

amplifiziert und 5 min bei R.T. ligiert (4 µl PCR-Produkt + 1 µl Vektor). Anschließend erfolgte die Transformation in kompetente TOP10.

pGEX4T3tag: Ein PCR-Amplifikat mit eingebauten Restriktionsschnittstellen sowie sechs weiteren überhängenden Basen wurde für die Klonierung verwendet (Tabelle 2-6). So konnten die Amplifikate mit den jeweiligen Restriktionsenzymen (se57-1 und cTAGE-1: EcoRI-Sall; se70-2 und GBP-5ta: BamHI-Sall) verdaut werden. Der gleichverdaute Vektor und das verdaute PCR-Produkt wurden geextrahiert und der geschnittene Vektor CIAP behandelt. Anschließend wurden Vektor und PCR-Produkt mit der T4-Ligase ligiert und in kompetente TOP10 transformiert.

Tabelle 2-9: Primer für Klonierung in die TOPO-Expressionsvektoren und in pGEX4T3tag

<i>Tumorantigen</i>	<i>Primer for</i>	<i>Primer rev</i>	<i>Produktlänge</i>	<i>Annealing</i>	Fusions-Protein
2-2 His	acc aac aag cat ttt att c	gat cag cat cag gta tgg	2293 bp	55°C	93,9 kDa 813 AS
57-1 His	atg aca aca gtg aca gtg acc ac	atg aca aca gtg aca gtg acc ac	1017 bp	54°C	42,7 kDa 371 AS
<i>57-1 pGEX</i>	atc ccc <u>gaa ttc</u> ¹ tat gaa aca gtg aca gtg acc ac	agg ttt <u>gtc gac</u> ³ ccg taa cct aat caa cat taa ata	1028 bp	54°C	40,1 kDa 348 AS
<i>70-2 pGEX</i>	ccg cgt <u>gga tcc</u> ² gct ttg aag gct gca cag aaa acc tt	agg ttt <u>gtc gac</u> ³ tct tct cca aga acg aga ttc att gtc ctc	913 bp	60°C	62,1 kDa 545 AS
89-1His	atg ttt cca tat gat tca c	agt tac tac agt tat ttc tc	3118 bp	54°C	121,2 kDa 1071 AS
<i>GBP-5-ta pGEX</i>	ccg cgt <u>gga tcc</u> ² atg gct tta gag atc cac	agg ttt <u>gtc gac</u> ³ ttc cgt ctc tgt g aga gcc	1475 bp	60°C	55,9 kDa 498 AS
GBP-5-ta His	atg gct tta gag atc cac	ttc cgt ctc tgt gag agc ctg g	1451 bp	58°C	59,8 kDa 532 AS
GBP-5ta His/Max	gcc acc atg gct tta gag atc cac	tca ttc cgt ctc tgt gag agc ctg g	1451 bp	60°C	-
GBP-5a/b HisMax	gcc acc atg gct tta gag atc cac	tta gag taa aac aca tgg atc atc gt	1761 bp	60°C	-
<i>cTAGE-1 pGEX</i>	atc ccc <u>gaa ttc</u> ¹ atg ttt gtc atc ata tca	agg ttt <u>gtc gac</u> ³ tct tag att tac tcc ttc	243bp	60°C	37 kDa 74 AS

Die unterstrichenen Basen kennzeichnen die eingebauten Restriktionsschnittstellen (¹EcoRI, ²BamHI, ³Sall) für die Klonierung in den pGEX4T3tag Vektor.

2.5.9 Sequenzierung

Umklonierte cDNA Abschnitte oder PCR-Produkte wurden mit dem ABI PRISM™ 310 Genetic Analyser und dem Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Fa.

Abimed) sequenziert. Dazu wurden i.d.R. Standard Primer aus dem Plasmid verwendet, die das Insert oder die PCR-Primer flankierten (Tabelle 2-7).

Zur Sequenzierung wurden i.d.R. 400 ng Plasmid eingesetzt, welche mit 12,5 μ M Primer und 2 μ l BigDye Mix im Thermocycler mittels des nachfolgenden Programms markiert wurden (Abbildung 2-4). Um die DNA nach der Sequenzier-PCR für die Sequenzierung einsetzen zu können, wurde diese mittels einer Ethanol-Fällung aufgereinigt. Zu einem PCR-Reaktionsansatz wurden 2 μ l 3 M NaAc (pH=5) und 50 μ l EtOH (absolut) gegeben.

Tabelle 2-10: Sequenzier Primer

Primer Name	Sequenz	Vektor
T3	aat taa ccc tca cta aag gg	pBluescript
T7	gta ata cga ctc act ata ggg c	pBluescript
pTrcHis.for	gag gta tat att aat gta tcg	pTrcHisTOPO
pGEX.for	ggg ctg gca agc cac gtt tgg tg	pGEX4T3tag

Primer zur Sequenzierung eines Plasmides.

Die DNA wurde 10 min auf Eis gefällt und daraufhin bei 13.000rpm für 20 min abzentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70% EtOH gewaschen, 10 min bei 13000rpm abzentrifugiert und getrocknet. Das mittels Ethanol-Fällung erhaltene DNA-Pellet wurde in 20 μ l Formamid (Applied Biosystems) für die Sequenzierung aufgenommen. Die Sequenzierung der Plasmide erfolgte mit dem Sequenzierer ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (Fa. Applied Biosystems) nach der Ketten-Abbruch-Methode. Die erhaltenen Sequenzen wurden mittels der GCG / HUSAR Programme ausgewertet.

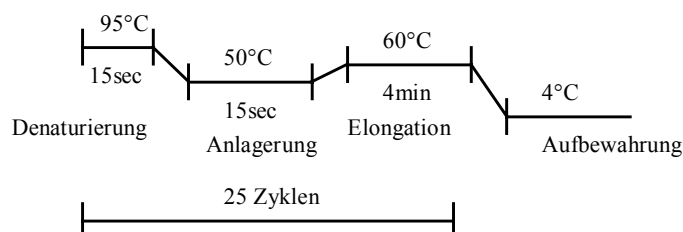


Abbildung 2-4: Sequenzier-PCR

Schematische Darstellung einer Sequenzier PCR.

2.5.10 Computer-Programme

Mittels der GCG-Programme (Husar, DKFZ) wurden Sequenzanalysen, Primerwahl, die Bestimmung der offenen Leserahmen, Datenbank Suchen, Alignments und Protein Programme zu Motiv-Suchen durchgeführt.

2.6 Protein-Expressionsanalyse

2.6.1 Proteinexpression und His-Aufreinigung

Für die Proteinexpression und Aufreinigung ausreichender Mengen rekombinanten Proteins zur Herstellung von Antikörpern wurden die kodierenden Abschnitte der cDNAs von GBP-5ta, se2-2, se57-1, se89-1 in den **pTrcHisTOPO** Vektor kloniert. Die exprimierten Fusionsproteine wurden über die Affinität der N-terminalen sechs Polyhistidine mit Ni²⁺-Agarose aufgereinigt. Mit einer Kolonie, die das jeweilige pTrcHisTOPO-Konstrukt trug, wurde eine 50 ml Vorkultur ü.N. bei 37°C auf einem Rotationsschüttler inkubiert. Die dicht gewachsene Vorkultur wurde in 1 l LB(Amp) überführt und bei 37°C auf einem Rotationsschüttler bis zu einer optischen Dichte (OD₆₀₀ nm gemessen gegenüber LB-Medium) von 0,6 kultiviert. Die Expression der Fusionsproteine wurde mit IPTG (Endkonzentration 1 mM) induziert und die Kultur weitere 3 h unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Die Inkubation während der Induktion wurde z.T. individuell verändert und 3 bis 5 h bei 37°C oder 6 h bei R.T. durchgeführt.

Die Zellen wurden nach der Proteinexpression durch Zentrifugation (5000rpm, 10 min, 4°C) geerntet. Die folgende Aufreinigung der His-tag Fusionsproteine wurde für jedes Protein sowohl nativ als auch denaturierend durchgeführt. Welche Aufreinigung (nativ/denaturierend) und welche Methode geeigneter war, musste für jedes Protein individuell bestimmt werden. Es wurden zwei verschiedene Methoden verwendet: die Aufreinigung im 50 ml Röhrchen durch wiederholtes Abzentrifugieren der Agarose und die automatisierte und dokumentierbare Aufreinigung unter Verwendung der Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC; Fa. BioRad). Mit beiden Methoden konnte das native oder denaturierende Verfahren durchgeführt werden.

Native Aufreinigung

Das Bakterien-Pellet der Expression wurde gewogen und im 2-4fachen Volumen Lysis Puffer pH=8, resuspendiert. Um Proteindegradation zu verhindern, wurde Protease-Inhibitor (Fa.

Roche) zugegeben. Die Bakterien wurden durch Sonifizieren (10x 30 sec) auf Eis aufgeschlossen und danach bei 4°C, 13.000rpm, 1 h zentrifugiert. Der Überstand wurde durch einen Filter mit 0,8 µm Porengröße geklärt, um größere Verunreinigungen abzutrennen. Das geklärte Lysat mit dem löslichen Fusionsprotein wurde mit Ni²⁺-Agarose 5 ml/100 ml (1 ml bindet 1-5 mg rekombinantes Protein) ü.N. bei 4°C schüttelnd inkubiert. Nach dem Binden des Fusionsproteins an die Ni²⁺-Agarose konnte die Aufreinigung im 50 ml Röhrchen oder in der FPLC fortgesetzt werden.

Bei der Aufreinigung im 50 ml Röhrchen wurde die Agarose 10 min mit 20 ml Lysis Puffer pH=8 auf dem Schüttler gewaschen. Anschließend wurde die Ni²⁺-Agarose abzentrifugiert (4000rpm, 10 min, 4°C) und der Waschschrift 3x wiederholt. Die Ni²⁺-Agarose wurde danach 3x mit 10 ml Lysis Puffer pH=6 und 2x mit 10 ml Lysis Puffer pH=8.0 gewaschen. Die Ni²⁺-Agarose wurde nun in eine Kunststoffsäule (Fa. Invitrogen) geschichtet. Die Elution erfolgte in der Säule im Imidazol-Gradienten mit jeweils 1 ml 20 mM, 50 mM, 200 mM, 250 mM, 300 mM, 350 mM, 500 mM Imidazol haltigem Lysis Puffer pH=8. Der Imidazolring ist Teil der Histidinstruktur und Bindungsstelle der Nickel-Ionen. Unter hohen Imidazolkonzentrationen werden die rekombinanten Histidin-gebundenen Proteine aus ihrer Bindung zu den Nickel-Ionen verdrängt.

Die Elutionsproben wurden unter der Säule aufgefangen und im Western Blot mit dem Anti-Xpress Antikörper daraufhin untersucht in welcher der Fraktionen das eluierte Fusionsprotein vorlag.

Die *FPLC* erlaubt gegenüber der Aufreinigung im Röhrchen eine automatisierte Durchführung. Des Weiteren konnte der Erfolg der Waschschrift zeitgleich verfolgt werden, da ein der Säule nachgeschalteter UV-Detektor die abfließenden Partikelmengen misst und aufzeichnet. Durch den Einsatz eines Fraktionssammlers ließen sich die einzelnen Proteinfractionen auffangen. Das Waschen konnte daher flexibel verlängert werden, wenn noch zuviel Verunreinigungen von der Säule kamen. Mit der einmalig im 50 ml Röhrchen gewaschenen Agarose wurde eine FPLC-Säule (Bettvolumen 0,5–2 ml, Fa. Amersham) beladen und an die FPLC angeschlossen. Die Aufreinigung erfolgte wie oben beschrieben mit dem Unterschied, dass ein automatischer Ablauf gewählt wurde und die Waschschrift nach Bedarf verlängert oder verkürzt werden konnten. Die Flussrate der eingesetzten Puffer betrug 1 ml/min.

Denaturierende Aufreinigung: Alle Puffer für die denaturierende Aufreinigung enthielten 8 M Harnstoff. Das Bakterienpellet aus 1 l Expressionskultur wurde in 20 ml Puffer B aufgenommen. 1 ml 50% Ni²⁺-Agarose wurde mit dem geklärten Lysat ü. N. bei 4°C inkubiert. Danach konnte die Aufreinigung im 50 ml Röhrchen oder in der FPLC fortgesetzt werden.

Im 50 ml Röhrchen wurde die Agarose mit den gebundenen Fusionsproteinen abzentrifugiert (10 min, 5000rpm) und 4x mit 10 ml Puffer C gewaschen. Zum Eluieren wurden die Puffer D und E verwendet, wobei zuerst mit 3x 0,5 ml Puffer D und anschließend mit 3x 0,5 ml Puffer E eluiert wurde. Mittels Western Blot wurde die Fraktion detektiert, die das Fusionsprotein enthielt.

Die denaturierende Aufreinigung in der FPLC erfolgte mit den gleichen Puffern und Volumina wie für die denaturierende Aufreinigung im 50 ml Röhrchen.

2.6.2 Aufreinigung der Fusionsproteine mit GST

Für die Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen über ihre Affinität zu Gluthation, wurde das Bakterienpellet pro 1 l Expressionskultur in 10 ml 1x PBS aufgenommen. Die Suspension wurde 10x 30 sek sonifiziert und anschließend zentrifugiert (5000 rpm, 30 min, 4°C). Das Lysat wurde durch einen Filter mit 0,8 µm Porengröße von größeren Verunreinigungen geklärt. 10 ml geklärtes Bakterienlysate wurden mit 0,5 ml 50% „Gluthatione Sepharose 4B“ (200 µl binden 1 mg GST-Fusionsprotein, Fa. Amersham) über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Gluthation Sepharose wurde abzentrifugiert (1000rpm, 5 min, 4°C) und mit 20 ml 1x PBS 4x gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Anschließend wurde das Fusionsprotein mit 1 ml Elutionspuffer (Fa. Amersham) pro 2 ml Gluthation Sepharose für 5-10 min bei R.T. und/oder bei 4°C ü.N. eluiert. Das rekombinante Protein wurde in den Eluat mit dem Anti-GST Antikörper im Western Blot detektiert.

2.6.3 Antikörperherstellung und Proteinansequenzierung

Um die Expression von GBP-5ta und se2-2 auf Proteinebene zu untersuchen, wurden Antikörper gegen rekombinantes His-tag Protein beider Proteine generiert. GBP-5ta und se2-2 wurden denaturierend im 50 ml Röhrchen aufgereinigt. Die rekombinanten Proteine wurden im Western Blot mit dem Anti-Xpress Antikörper detektiert. Rekombinantes GBP-5ta wurde mit der Matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF) ansequenziert (Zentrale Proteinanalytik, DKFZ). Dafür wurde ein SDS-PAGE mit dem

aufgereinigten rekombinanten Protein angefertigt und auf eine in Methanol getränkte Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran geblottet. Als Tank-Puffer wurde 1x CAPS verwendet. Ansonsten unterschied sich der Vorgang nicht vom unten beschriebenen Western Blot. Anschließend wurde die PVDF-Membran in sterilem Amidoschwarz gefärbt, bis die Proteinbanden sichtbar wurden. Danach wurde die Membran mit Wasser gewaschen und getrocknet. Aus der zu sequenzierenden Bande wurde ein ca. 2 mm x 2 mm großes Quadrat ausgeschnitten, welches in MALDI-TOF auf die ersten 13 AS ansequenziert werden konnte.

Da die Eluate mit dem rekombinanten GBP-5ta und se2-2 noch *E.coli* Verunreinigungen enthielten, wurden die Fusionsproteine aus dem Coomassie Gel ausgeschnitten. Dazu wurde das Protein der Eluate in mehreren Coomassie gefärbten Gelen aufgetragen. Ein Streifen aus der Mitte des Gels wurde für jedes Gel auf Nitrocellulosemembran geblottet und das His-tag Protein mittels Anti-Xpress detektiert. Durch Anlegen des entwickelten Streifens an das Coomassie-Gel konnte so sichergestellt werden, dass die richtige Bande zur Antikörper Herstellung ausgeschnitten wurde. Je zwei Kaninchen für die Antigene GBP-5ta und se2-2 wurden mit dem denaturierten rekombinanten Protein aus dem Coomassie Gel immunisiert (Fa. Biogenes).

Tabelle 2-11: Boost Schema zur GBP-5ta und se2-2 Antikörper Herstellung

		<i>Anti GBP-5ta AK</i>				<i>Anti se2-2 AK</i>	
<i>Präimmunseren</i>		Tier 96	Tier 25	Tier 45	Tier 46	Tier 44	Tier 47
<i>Antikörpernamen</i>		K25	K26	K41	K42	K43	K44
<i>Protein</i>	<i>nativ</i>			x	x		
	<i>denaturiert</i>	x	x			x	x
<i>1.Tag</i>	<i>Boost</i>	X	X	X	X	X	X
<i>7.Tag</i>	<i>Boost</i>	X	X	X	X	X	X
<i>14.Tag</i>	<i>Boost</i>	X	X	X	X	X	X
<i>28.Tag</i>	<i>Boost</i>	X	X	X	X	X	X
<i>~ 38.Tag</i>	<i>Boost</i>	X	X	X	X	X	X
	<i>Blutung</i>	20 ml	20 ml	20 ml*	20 ml*	20 ml	20 ml
	<i>Ausblutung</i>	47 ml	67 ml	50 ml	47ml	52 ml	60 ml

Übersicht über die vier gegen denaturiertes und natives His-tag GBP-5ta hergestellten Antikörper. Die Antikörper K43 und K44 wurden gegen denaturiertes His-tag se2-2 Protein generiert. *Von K41 und K42 wurden die Gesamt IgGs über eine ProteinA Säule isoliert.

Für GBP-5ta wurden zwei weitere Antikörper gegen natives Protein aus der nativen Aufreinigung von His-tag Protein unter Verwendung der FPLC hergestellt (Fa. Biogenes). Die mittels FPLC aufgereinigten His-Tag-Proteine wurden anschließend unter Lichtschutz bei 4°C ü. N. gegen 1x PBS pH=7,5 dialysiert. Dafür wurde der Dialysierschlauch mit einer Porengröße von 12-14 kDa 2x für 10 min mit 2% Na-Bicarbonat und 1 mM EDTA (pH=8) in

H₂O und mit 1 mM EDTA Lösung gekocht. Nach dem Spülen mit Wasser konnte der Dialysierschlauch eingesetzt werden.

Pro 1mg Protein wurden 2 verschiedene Kaninchen immunisiert (Tabelle 2-8). Die Präimmunsereen wurden vor der Immunisierung im Western Blot mit rekombinantem His-tag Protein darauf getestet, dass sie keine natürliche Reaktivität gegen das jeweilige Antigen zeigten. In Tabelle 2-8 ist das Immunisierungsschema der Kaninchen dargestellt. Das gelieferte Antiserum wurde mit 0,02% Thimerosal stabilisiert. Die Gesamt IgGs von Anti-GBP-5ta Antikörper K41 und K42 wurden über einen Protein A-Träger aufgereinigt (Fa. BioGenes).

2.6.4 Protein-Isolation

Zur Analyse der Proteinexpression der Tumorantigene wurden Western Blot Analysen durchgeführt. Es wurden zum einen gekaufte Protein-Panels von Normalgeweben der Firma Clontech (Testis, Placenta, Dünndarm, Magen und Brustdrüse) und der Firma BioCat (Knochenmark, Hirn, Dickdarm, Prostata, Skelettmuskulatur und Luftröhre) benutzt, zum anderen wurden Proteine von PBMCs und Tumorzellen mittels des TriFast Kits (Fa. Peqlab) isoliert. Als Positivkontrollen wurde GBP-5ta und se2-2 in einen Expressionsvektor (pTrcHisTOPO, Fa. Invitrogen) kloniert und rekombinant exprimiert.

Gewinnung peripherer mononukleärer Zellen durch Dichtegradientenzentrifugation

Zur Isolierung der PBMCs wurden Buffy-Coat-Konserven von gesunden Spendern von der Blutbank in Heidelberg verwendet.

Die Gewinnung von „Peripheral Blood Mononuclear Cells“ (PBMC) aus Buffy-Coat-Konserven erfolgte durch Dichte-Gradient-Zentrifugation über Ficoll-Trennlösung. Da die Dichte von Ficoll mit 1,077 g/ml identisch ist wie die von Lymphozyten und Monozyten, werden diese durch Zentrifugation in der Interphase angereichert und dort als weißer Ring sichtbar. 2 Teile PBS wurden mit 1 Teil Blut gemischt. 15 ml Ficoll (Biocoll) wurde vorsichtig mit dem Blut überschichtet und 20 min, 1200 rpm bei R.T. zentrifugiert. Die Zellen des Bluts waren nun in mehrere Schichten aufgetrennt: von unten nach oben befanden sich die Erythrozyten, Biocoll, eine weiße dünne Schicht mit den PBMCs und darüber die Granulozyten und Thrombozyten. Die PBMC-Schicht wurde mit der Pipette abgesaugt und in 50 ml PBS aufgenommen. Durch zweimaliges Zentrifugieren (10min, 1200 rpm, R.T.) und

Zugabe von 50 ml PBS wurden die Zellen gewaschen. Die PBMCs wurden als Pellet für die Verwendung im Western Blot bei -80°C aufbewahrt.

Isolierung von CD4⁺ und CD8⁺ Zellen durch MACS (Magnetic Activated Cell Sort)

CD4⁺ und CD8⁺ Zellen wurden aus den gewaschenen PBMCs mit dem „Magnetic cell sorting of human leukocytes“- System (Fa. MACS) isoliert. Die CD4 bzw. CD8 Zellen wurden mit einem Zelltyp spezifischen Antikörper markiert. Der spezifische Antikörper war direkt an superferromagnetische Partikel (MicroBeads) gekoppelt. Die MicroBeads gebundenen Zellen könnten in einem magnetischen Feld über eine Säule von den restlichen Zellen der PBMCs getrennt werden. Die CD4 bzw. CD8 Zellen wurden durch Erhitzen bei 95°C , 5 min von den Beads getrennt und im Sample Puffer zur Verwendung im Western Blot aufgenommen.

Proteinbestimmung nach Bradford

Zur genauen Konzentrationsbestimmung wurde die Extinktion der Proteine mit dem Bradford Reagenz gemessen (BioRad Protein Assay Reagenz, Fa. Biorad) und anhand einer Verdünnungsreihe von Rinderserumalbumin (BSA, Fa. Serva) bestimmt.

2.6.5 Western Blot

Für alle Polyacrylamidgele wurde das BioRad Protean II und III Gel System verwendet. Die Lysate wurden mit einer Proteinkonzentration von $1\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ in SDS-Gel-Probenpuffer (Endkonzentration 1x) aufgenommen und 5 min zum Denaturieren der Proteine auf 95°C erhitzt. Die SDS Mini-Gele wurden mit Sammel- und Trenngel (13,5% Acrylamid) (Tabelle 2-9) gegossen. Als Marker wurden $3\ \mu\text{l}$ des Kaleidoscope Prestained Standards (Fa. BioRad) aufgetragen. Der Gellauf wurde für 1 h bei 150 V Spannung mit frischem 1x Running Buffer durchgeführt.

Tabelle 2-12: Western Blot Reagenzien

<i>Reagenz</i>	<i>Trenngel</i>	<i>Sammelgel</i>
H ₂ O	6 ml	7,4 ml
Polyacrylamid (37%)	7 ml (für ein 16% Gel)	2,1 ml (für ein 5% Gel)
Lower Buffer	4,3 ml	
Upper Buffer		3,3 ml
10% Ammoniumpersulfat	42,2 µl	128,3 µl
Temed	19,1 µl	17,1 µl

Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel für SDS-PAGE.

Färbung mit kolloidalem Coomassie

Ein Polyacrylamidgel konnte 30 min bis 1 h mit Brilliant Blue bei R.T. schüttelnd inkubiert werden, so dass das Protein-Bandenmuster sichtbar wurde. Anschließend wurde das Gel 1-2 h mit Entfärber-Lösung entfärbt. Um das Gel haltbar zu machen, wurde es in Wasser gewaschen und zwischen zwei Gel Trocknungsfolien (Fa. Sigma) in einen Plexiglasrahmen gespannt und bei R.T. mehrere Tage getrocknet.

Blot der Proteine

Weitere SDS-Gele wurden in einer BioRad Naßblotkammer zwischen vier Whatman-Papieren auf eine Nitrozellulosemembran (Fa. Satorius) mit einer Porengröße von 0,45 µm transferiert. Der Transfer wurde mit 1x Transferpuffer eine Stunde bei einer Spannung von 100 V durchgeführt und mit einer Ponceau Rot Anfärbung überprüft (1 min Inkubation in Ponceau S-Lösung, und Abspülen mit PBS-Tween (T)).

Detektion von Proteinen

Unspezifische Antikörper und Proteinbindungsstellen der Membran wurden durch Inkubation (2 h) mit 5% (w/v) Milchpulver (Fa. Roth) in PBS-T gesättigt (blockiert). Alle Schritte wurden bei R.T. auf dem Schüttler durchgeführt. Die Erstantikörper wurden jeweils in 0,5% (w/v) Milchpulver in PBS-T zu der Membran gegeben und eine Stunde inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS-T für 10 min wurden die mit Peroxidase gekoppelten Zweitantikörper eine Stunde inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde die Membran eine Minute mit ECL (Fa. Amersham) inkubiert, dann in eine durchsichtige Doppelfolie gelegt und luftblasenfrei gestrichen. Die Detektion erfolgte in der Dunkelkammer mit Röntgenfilmen

(Kodak X-OMAT™, Fa. Sigma), die zwischen 25 sek und 5 min exponiert und dann entwickelt wurden.

Um die Qualität aller eukaryontischen Proteinproben zu überprüfen, wurde ein Anti- β -Aktin Antikörper verwendet. Es wurde entweder derselbe Blot oder dieselbe Proteinprobe mit Anti- β -Aktin überprüft.

2.7 Methoden der Zellkultur

2.7.1 Kultivierung von Zellen

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden zur Vermeidung von Kontaminationen mit Bakterien, Hefen oder Pilzen in einer sterilen Werkbank mit autoklavierten oder sterilfiltrierten Lösungen und sterilen Geräten durchgeführt. Alle Zelllinien wurden in Vollmedium im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO₂ und in gesättigter Wasserdampf-Atmosphäre kultiviert. Die Zentrifugation der Zellen erfolgte bei 1200rpm, 10 min bei ca. 14 °C.

2.7.2 Passagieren von Zellen

Die Melanomzellen haften als adhärente Zellen über Peptidbindungen am beschichteten Boden der Gewebekulturgefäße. Diese können mit Trypsin gelöst werden. Die Zellen wurden je nach Bedarf und Wachstum geerntet, gezählt und in neues Medium umgesetzt bzw. für weitere Versuche aufgearbeitet.

Bei den CTCL-Zellen, T293 und K562 handelt es sich um Suspensionszelllinien. Diese Zellen wurden durch Abzentrifugieren geerntet, gezählt, einmal in PBS gewaschen und in frischem Vollmedium aufgenommen.

2.7.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Eukaryontische Zellen können in flüssigem Stickstoff gelagert werden. Zum Einfrieren wurden Zellpellets in Einfriermedium aufgenommen, in 1 ml Aliquots (5×10^6 - 1×10^7 Zellen/ml) auf Kryoröhrchen aufgeteilt und in vorgekühlte Einfriergefäße gegeben. Die Zellen wurden zunächst auf -80°C heruntergekühlt und nach 24-48 h in flüssigen Stickstoff überführt. Aufgrund der bei Raumtemperatur toxischen Eigenschaften des DMSO muß bis zum Zeitpunkt des Einfrierens ständig gekühlt und möglichst rasch gearbeitet werden.

Um die Zelllinien zu rekultivieren, wurden die tiefgefrorenen Zellen bei 37°C aufgetaut. Das vollständige Auftauen der Zellen ist hierbei zu vermeiden, um die toxische Wirkung des Einfriermediums so gering wie möglich zu halten. DMSO entzieht den Zellen während des Einfrierens aufgrund seiner hygroskopischen Eigenschaften Wasser und verhindert so die Bildung zellschädigender Eiskristalle. Nach dem Auftauen muß das nun toxische DMSO schonend entfernt werden. Die Zellen wurden in 9 ml warmem Medium aufgenommen, einmal abzentrifugiert und in einer Kulturflasche in Vollmedium ausplattiert.

2.7.4 Bestimmung der Zellzahl

Neubauer-Kammer

Zur Bestimmung von Zellzahl und Lebendzellzahl wurden aus frisch suspendierten Zell-Lösungen Aliquots entnommen, in einer 1:10 Verdünnung mit Trypanblau gefärbt und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Trypanblau lagert sich an Proteinstrukturen des Zytoplasmas an, kann jedoch nur in Zellen mit permeabler Zellmembran eindringen und färbt so selektiv tote Zellen bläulich an. Die Zellzahl wurde mit folgender Formel berechnet:

Zellzahl/ml = Zellzahl aus 16 Kleinquadraten x Verdünnungsfaktor x Kammerkonstante (10^4)

Automatischer Zellzähler Casy

Zur Messung im automatischen Zellzähler Casy wurden die Zellen in einem schwachen Elektrolyten (Casyton) suspendiert. Über ein Widerstandsmessprinzip und eine Pulsflächenanalyse wird die Größenverteilung der Zellen bestimmt. Anhand dieser Größenverteilung der Zellen können Zellzahl und Lebendzellzahl abgeleitet werden.

2.8 Serologische Untersuchungen

Zur Bestimmung der Immunogenität der detektierten Phagen cDNA Konstrukte wurde während dieser Arbeit der GST-Xtag ELISA etabliert. Die Phagen-Klone wurden in den pGEX4T3tag Vektor umklontiert und gegen eine große Anzahl an Seren von Tumorpatienten und gegen Seren gesunder Spender getestet. Um das immunogene Antikörper-Epitop von GBP-5ta zu identifizieren, wurden Epitopmapping Experimente durchgeführt.

2.8.1 SEREX

Die Identifikation der CTCL assoziierten Tumorantigene se2-2, se57-1, se70-2 und cTAGE-1 sowie das sekundäre Screenen mit Patientenseren mit der SEREX Methode (Pfreundschuh 2000) wurde von Anita Dahlke und Dirk Usener übernommen (Eichmüller et al 2001).

Tanja Hartmann identifizierte GBP-5ta in einer Tumorbank und führte das sekundäre Screenen der Seren durch (Fellenberg et al 2003). Die Phagen GBP-5a und GBP-5b wurden im HYREX identifiziert (Fellenberg et al 2003).

2.8.2 Enzyme Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA)

Die ELISA Methode ermöglicht die quantitative oder zumindest semiquantitative Bestimmung von Antigen oder Antikörper. Die Methode wurde zuerst von Engvall und Perlmann beschrieben (Engvall & Perlman 1971). In dieser Arbeit wurden ELISA mit 4 unterschiedlichen Antigenen in einer neuen Form des GST-Xtag ELISA als serologische Tests zum Nachweis von Antikörpern gegen Tumorantigene des CTCLs etabliert. Diese am Deutschen Krebsforschungszentrum von P. Sehr, M. Pawlita und C. Gänzler entwickelte Methode wurde in den USA zum Patent angemeldet (US 60/305259). Die in *E. coli* überexprimierten Proteinantigene enthielten GST als Fusionspartner. Durch Bindung des GST an immobilisiertes Glutathion wurde das lösliche Antigen in einem Schritt auf der ELISA Platte aus dem bakteriellen Lysat immobilisiert und aufgereinigt. Die Herstellung des Glutathion-Caseins wurde von P. Sehr durchgeführt.

2.8.2.1 GST-Xtag ELISA

Expression und Präparation der Antigene

Um die GST-Fusionsproteine zu exprimieren, wurde eine 25 ml Vorkultur der BL21 Bakterien, die das pGEX-Plasmid trugen, in LB(Amp) angeimpft und ü.N. bei 37°C auf einem Rotationsschüttler inkubiert. Die dicht gewachsene Vorkultur wurde komplett in 1 l LB(Amp) überführt und bei R.T. auf einem Rotationsschüttler bis zu einer optischen Dichte von 0,5 kultiviert. Die optische Dichte der Expressionskultur wurde während der Expressionsphase mehrmals kontrolliert. Die GST-tag Expressionskultur wurde bei 37°C inkubiert, die GST-Xtag Kulturen bei R.T.. Um die Expression zu induzieren, wurde IPTG zur Kultur gegeben (IPTG Endkonzentration 0,25 mM). Nachdem die induzierten Kulturen insgesamt 6 h gewachsen waren, wurden sie für 5 min bei 6000 U/min in einer Sorvall

Zentrifuge mit SLA3000-Rotor abzentrifugiert und die Überstände verworfen. Die Sedimente aus einem Liter Bakterienkultur wurden in 20 ml PBS resuspendiert und bei -20°C eingefroren. Nach dem Auftauen der resuspendierten Bakterien bei R.T. im Wasserbad wurde pro Liter Kultur eine halbe, in 1 ml Wasser gelöste Tablette Protease Inhibitor Cocktail Complete TM (Fa. Roche) und DTT (Endkonzentration 2 mM) zugegeben, um Degradation der Proteine und Bildung neuer, unspezifischer Disulfidbrücken zu vermindern. Danach wurden die Bakterien in zwei Durchgängen mit einem Hochdruckhomogenisator Emulsiflex-C5 unter ständiger Kühlung aufgeschlossen und sofort danach 30 min bei 4°C und 30.000g zentrifugiert und somit geklärt. Von den Lysaten wurde zuvor ein kleiner Teil für die Auftrennung in Proteingelen zurückgehalten, die Sedimente der Zentrifugation wurden verworfen. Die Proteinkonzentration der 30.000g Überstände (im Weiteren als geklärte Lysate bezeichnet) wurde mittels Bradford Reagenz (200 μl Bradford Reagenz, 790 μl Wasser, 10 μl des 1:10 in Wasser verdünnten geklärten Lysats) bestimmt, wobei eine OD von 0,1 bei einer Wellenlänge von $\lambda=595$ nm gegenüber dem Leerwert ohne Protein, einer Proteinmenge (BSA) von 1,75 μg zugeordnet wurde. Die Konzentration der Lysate wurde zunächst parallel zu der Konzentration des geklärten Lysats bestimmt, die Werte wichen aber kaum voneinander ab, man konnte somit die Konzentration des Lysates mit der des geklärten Lysats gleichsetzen. Die vermessenen, geklärten Lysate wurden in 200 μl und 400 μl Proben portioniert und bei -20°C gelagert. Kurz vor Gebrauch wurden einzelne Aliquots in einem Wasserbad bei R.T. aufgetaut; die nicht benötigten Reste wurden verworfen.

Antigen-Titration

Bei allen ELISA Versuchen, die hier beschrieben werden, betrug das Standardvolumen 100 μl pro Loch der 96-Loch ELISA Platte, falls nicht anders angegeben. Die 96-Loch Platte (Polysorb, Fa. Nunc) wurde mit 2 ng/ μl Glutathion-Casein in 50 mM Na-Carbonat-Puffer (pH=9,6) ü.N. bei 4°C beschichtet. Die Platte wurde ausgeschüttet und einmal kurz auf einem Papierhandtuchstapel ausgeklopft. Der Schritt zur Blockierung frei gebliebener Protein Bindungsstellen der Plattenoberfläche wurde mit einer 0,2%igen (w/v) Lösung von Casein in PBS-T (Block-Puffer) 1 h bei 37°C mit 180 μl Block-Puffer pro Loch durchgeführt. Die bei der Blockierung zusätzlichen 80 μl pro Loch stellten dabei sicher, dass über dem Standardvolumen von 100 μl keine unspezifische Anlagerung der weiteren ELISA Reagenzien stattfand. Nach der Blockierung wurde die Platte ausgeschüttet und einmal auf einem Papierhandtuchstapel ausgeklopft. Alle weiteren Schritte des ELISA, mit Ausnahme der Farbreaktion, wurden im Block-Puffer durchgeführt. Da alle ELISA Reagenzien im

Überschuss auf die Platte gegeben wurden, musste zwischen den Schritten die Platte gewaschen werden. Dabei wurde das gesamte Loch mit PBS-T (250 µl) jeweils dreimal gewaschen. Am Ende des Waschvorgangs wurden die Platten auf einem Papierhandtuchstapel mehrfach ausgeklopft. Danach wurde darauf geachtet, dass die Platten binnen 5 min wieder befüllt wurden, um eine Austrocknung zu verhindern.

Die ü.N. gecoateten und blockierten Platten wurden mit einer Verdünnungsreihe der Antigene beladen. Die Anfangskonzentration jedes Antigens war 1 µg Lysat-Protein/µl Block-Puffer. Es wurden Doppelproben für jede Verdünnungsstufe auf die Platte pipettiert und 1 h bei R.T. inkubiert. Nach dem Waschen der Platte wurden als Erstantikörper ein Maus anti-tag in einer Verdünnung von 1:1000 oder ein Ziege anti-GST (1:10.000) zugegeben und eine Stunde bei R.T. inkubiert. Nach dem Waschen wurde ein mit Peroxidase gekoppelter Zweitantikörper Ziege Anti-Maus oder Ziege Anti-Ziege, beide in einer Verdünnung von 1:10.000, 1 h bei R.T. inkubiert. Nach dem erneuten Waschen wurde die Farbreaktion mit 10 µg/ml Tetramethylbenzidin (TMB) und 0,003% (v/v) H₂O₂ als Substrat in Substratpuffer (0,1 M Natriumacetat, pH=6,0) durchgeführt und nach 5 bis 8 min mit 50 µl 1 M Schwefelsäure pro Loch abgestoppt. Die OD wurde am ELISA Lesegerät bei einer Wellenlänge von $\lambda=450$ nm gemessen. Hierzu wurden die Meßwerte gegen die Titrationsstufen linear/linear oder linear/logarithmisch aufgetragen. Der linear/linear Liniengraph diente zur Bestimmung der Sättigungsmenge des Antigens und der linear/logarithmische Graph zeigte den Titrationsverlauf.

Vorinkubation der Seren zur Blockierung unspezifischer Reaktionen

Humanseren wurden 1:50 in Block-Puffer, der 0,25 µg/µl GST-tag Lysat enthielt, verdünnt und mindestens 45 min in Cluster Tubes (Fa. COSTAR) bei R.T. inkubiert, bevor sie im ELISA verwendet wurden. Diese Präabsorption verhinderte das Entstehen von Hintergrundreaktionen mit bakteriellen Proteinen und den GST- und tag-Anteilen der Antigen Fusionsproteine.

Test der Seren

In allen folgenden Tests wurden die ELISA 96-Loch Platten ü.N. mit Glutathion-Casein beschichtet und die Antigene in Spalten auf die Platte aufgebracht. Jedes Serum wurde zusätzlich zu den Antigenen auch einmal mit GST-tag untersucht. Dieser Hintergrundwert wurde von der Reaktivität mit dem Antigen subtrahiert. Jedes Serum wurde mit GST-tag in

Block-Puffer vorinkubiert und am selben Tag auf zwei verschiedenen ELISA Platten untersucht.

Nach der Blockierung der ELISA Platte wurden Antigene und GST-tag zu einer Konzentration von 0,25 µg/µl Lysatprotein in Block-Puffer verdünnt und auf die Platte aufgetragen. Nach 1 h Inkubation bei R.T. wurde die Platte gewaschen, die vorinkubierten Seren in die Platte gefüllt und für 1 h bei R.T. inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die gebundenen humanen IgG Antikörper mittels polyklonalem, Peroxidase-gekoppeltem Esel anti-human IgG Antikörper in einer 1:10.000 Verdünnung detektiert. Die Inkubationszeit betrug 1 h bei R.T. Nach dem Waschen der Platten wurde die Farbreaktion durchgeführt (s.o. Titration der Antigene) und die OD im ELISA Lesegerät gemessen. Die netto OD-Werte wurden mit Hilfe des Hintergrundwertes für beide Tests berechnet.

2.8.3 Statistische Methoden

Serumreaktivitäten

Da jedes Serum zusätzlich zu den Antigenen auch mit GST-tag im ELISA getestet wurde, konnte die Hintergrundreaktivität von der Reaktivität mit dem Antigen abgezogen und somit eine netto optische Dichte (netOD) berechnet werden. Alle angegebenen Werte sind Mittelwerte aus zwei Messungen und wurden in milliOD (mOD) Einheiten angegeben.

Statistik der Cut-offs für se57-1, se70-2, cTAGE-1 und GBP-5ta

Um entscheiden zu können, ob ein Serum in einem ELISA Test positiv oder negativ reagierte, wurde für jedes Antigen ein spezifischer Cut-off Wert aus den Meßwerten der Kontrollgruppe berechnet. Von der Normalverteilung der Reaktivitäten ausgehend, wurde iterativ der Mittelwert + 3x Standardabweichung unter Wegfall der außerhalb dieser Grenzen liegenden Meßwerte berechnet. Der Cut-off für den jeweiligen ELISA ist ein Wert, bei dem kein Meßwert mehr wegfällt.

Boxplot (Tukey)

Die Verteilung der ELISA Reaktivitäten einer Serumgruppe mit einem GST-Xtag Antigen wurde in Boxplots nach Tukey (Tukey 1977) dargestellt. Die Box beinhaltet die Werte zwischen der 25 und der 75 Perzentile, also die mittleren 50% der Werte (Interquartile Range, IQR). Der Strich innerhalb der Box zeigt den Median der Werte an. Werte, die einen bis zwei Steps (1 Step=1,5 x IQR) oberhalb der oberen Quartile oder unterhalb der unteren Quartile

liegen, werden als Ausreißer (Outlier) bezeichnet. Werte außerhalb dieser Grenzen werden im Boxplot durch Kreise gekennzeichnet. Die senkrechten Linien auf und unter der Box erstrecken sich bis zum letzten Wert, der kein Outlier ist.

Kruskal-Wallis Test

Der Kruskal-Wallis Test ist ein Rangtest, der nur auf den Relationen „größer“, „kleiner“ und „gleich“ basiert (Chan & Walmsley 1997). Dieser Test ist auch dann anwendbar, wenn die Daten nicht normal verteilt sind und auf Transformationen verzichtet wird. In dieser Arbeit wurde er verwendet, um mehrere unabhängige Gruppen miteinander zu vergleichen. Es wurde errechnet, ob es überhaupt einen Unterschied zwischen den einzelnen getesteten Serengruppen (Kontrollen, CTCL, Melanome, Parapsoriasis) für das jeweilige Antigen gibt. Lag der berechnete Wert unter der Signifikanzgrenze $p=0,05$, war das Ergebnis signifikant.

Der U-Test von Mann-Whitney (Mann-Whitney-U-Test)

Der U-Test vergleicht die Rangplätze zweier Gruppen und zeigt an, ob eine der beiden Gruppen zu höheren Meßwerten tendiert, als die andere. Hier wurde der Test angewendet, um die Reaktivitäten zweier Serumgruppen im selben GST-Xtag ELISA zu vergleichen. Ein signifikanter U-Test deutet auf unterschiedliche Mediane der beiden Gruppen hin. Die Signifikanzgrenze wurde auf $p=0,05$ festgesetzt. Die Werte der Gruppen wurden nach Größe sortiert und eine Rangfolge festgelegt. Die Ränge jeder Gruppe wurden summiert und ergaben die Rangsummen aus denen die U-Werte und daraus die Wahrscheinlichkeit p berechnet wurden. Der U-Test ist auch für nicht normalverteilte Daten zulässig.

Hodges-Lehmann Schaetzer

Der Hodges-Lehmann Schaetzer Test berechnet den Median der Differenzen zweier Gruppen (Akritas & LaValley 1996).

2.9 Interferon Gamma (IFN- γ) Assay

Im IFN- γ Assay wurde die Induzierbarkeit von GBP-5ta und GBP-5a/b in den CTCL Zelllinien HuT-78, HH, MyLa und SeAx untersucht. Dafür wurden 1×10^7 Zellen mit 10 und 100 Einheiten/ml humanen IFN- γ (Fa. RD Systems) jeweils 12 und 36 Stunden behandelt. Von den behandelten Zellen wurde RNA und Protein gewonnen (PeqGold Trifast, Fa. Peqlab) und im Northern Blot, Western Blot, Immunhistologie und FACS analysiert. Als Kontrollen

dienten jeweils die unbehandelten Zelllinien. Die Proteinextrakte wurden mit dem Anti-GBP-1 (1:500; Fa. Santa Cruz Biotechnology), Anti-HLA Klasse I (1:50) und Anti-ICAM-1 (1:1000; Fa. Santa Cruz Biotechnology) auf Induktion untersucht. Von GBP-1, HLA Klasse I und ICAM-1 ist die IFN- γ Induktion bereits beschrieben worden (Santin et al 1996; Strehlow et al 1994).

2.10 Epitopmapping

Antikörper-Epitopmapping Experimente wurden durchgeführt, um das immunogene Epitop von GBP-5ta zu identifizieren. Mit dem Auto-Spot Robot ASP222 (Fa. Abimed) wurden in 0,1 μ l Aminosäuren auf eine Peg 500-Spacer Nylonmembran (Fa. Genosys) gespottet. Die Peg 500-Spacer besitzen eine freie Aminogruppe, die einen nucleophilen Angriff auf das C-Atom der Carboxygruppe der Aminosäure startet. In den eingesetzten Aminosäuren ist die OH-Gruppe der Carboxygruppe mit einem Pentafluorphenol und ein H der Aminogruppe durch Fmoc substituiert. Das Fmoc ist eine Schutzgruppe, während das Pentafluorphenol einen Elektronensog bewirkt, so dass leichter eine Peptidbindung eingegangen werden kann. Die Aminosäuren sind 1 molar in NMP gelöst. Bei der Bindung einer Aminogruppe an das fmoc wird ein Pentafluorphenolrest freigesetzt. Der Spot der Aminosäure wurde dreimal wiederholt. Im anschließenden Waschschrift wurden die freien Aminogruppen basischer Aminosäuren mittels 4% Essigsäure-Anhydrid Lösung in Dimethylformamid (DMF) inkubiert und unter Freisetzung von Essigsäure die Aminogruppe acetyliert. Damit wird verhindert, dass die Aminogruppe andere Peptidbindungen eingeht. Nach Waschen mit DMF (2x 2min) wird die Membran mit 20% Piperidinlösung (in DMF) 5 min inkubiert. Das Piperiden bewirkt, dass die Fmoc Gruppe der Aminosäure als Fulven-Piperidin Addukt und CO₂ abgespalten wird und die Aminogruppe nun ungeschützt vorliegt. Das Piperidin wurde 10x mit DMF je 2 min gewaschen. Eine Anfärbung der jetzt freien Aminogruppen mit 0,01% Bromphenolblau in DMF diente als Kontrolle, die mit Ethanol 2x 2 min gewaschen und gleichzeitig etwaiges Wasser verdrängt wurde. Die Membran wurde im kalten Luftstrom getrocknet und zur erneuten Peptid-Synthese einer anderen Aminosäure eingesetzt. Auf diese Weise wurde ein Oligo-Peptid synthetisiert. Im letzten Waschschrift wurden zunächst die fmoc Gruppen durch 5 min Inkubation mit 20% Piperidinlösung (danach 10x DMF Waschen) beseitigt und danach alle (auch die α Aminogruppen) durch 0,5 und 5 min Inkubation mit 4% Essigsäure-Anhydrid Lösung acetyliert (EtOH, H₂O frei). Durch ein 1-stündiges Inkubieren mit 5 ml Dichlormethan/5 ml TFA (Abspalten der Schutzgruppen)/250 μ l Triisobutylsilan (Fangen der Reaktionsprodukte) wurden alle

Aminogruppen deacetyliert. Durch 3x Waschen mit Dichlormethan und 3x DMF wurden die Reaktionsprodukte entfernt. Nach dem Entfernen aller Wasserrückstände durch 2x Waschen mit EtOH, konnten die im kalten Luftstrom getrockneten Membrane für eine Antikörper-Inkubation eingesetzt werden.

Die kodierende Sequenz von GBP-5ta wurde in einem 3er Raster auf einer Membran synthetisiert. Die Membran wurde dehydriert, indem fortschreitend von DMF über Ethanol alle 5 min ein höherer TBS Prozentsatz in Ethanol zum Blot gegeben wurde. Unspezifische Antikörper Bindungen wurden ü. N. bei 4°C mit 10% Milch, 5% Sukrose 1x TBS Lösung mit 1x Kasein Block (=Casein Enzym Hyrdolisat, Fa. Genosys) geblockt. Die Membran wurde 3x mit 1x TBS-T (0,3% Tween 20) gewaschen und mit 1:500 in Inkubation-Puffer (TBS-T mit 0,05% Milch, 5% Sukrose und 1x Kasein-Block) verdünntem Patientenserum für 2 Stunden bei R.T. inkubiert. Anschließend wurde wiederum 3x für je 10 min mit TBS-T gewaschen, um die Membrane mittels einem 1:10.000 in Inkubationsbuffer verdünntem Ziege-Anti Mensch IgG (H+L) HRP gekoppeltem Antikörper (Fa. Dianova) für 1 h zu inkubieren. Nach weiterem Waschen 3x mit TBS-T konnten mittels Chemilumineszenz (ECL Staining Kit, Fa. Amersham Bioscience) positive Antikörper–Peptid Bindungen visualisiert werden. Dieser Versuch wurde mit verschiedenen CTCL-Patienten Seren und Kontrollseren durchgeführt.

2.11 Immunhistologie

Das immunhistochemische Markieren von Zellen mit den anti-GBP-5ta Antikörpern K25, K26, K41 und K42 dient dazu die Proteinlokalisierung in der Zelle zu untersuchen. Die Versuche wurden an Zytospins von Tumorzelllinien (Ma-Mel 33, UKRV-Mel 11a, Colo 320, K562, HH, HuT-78, MyLa und SeAx; Tabelle 2-11) und an Kryoschnitten von CTCL Patienten durchgeführt. Die Kryoschnitte wurden in Kooperation mit PD Dr. E. Dippel (Klinik für Dermatologie, Mannheim) gewonnen.

2.11.1 Zytospins

Zur Anfertigung von Zytospins wurden 100 µl von Zellsuspensionen mit ca. 5×10^5 Zellen auf Objektträger gegeben und für 10 Minuten bei 700 rpm zentrifugiert. Der Überstand und wurde mit Hilfe von Filterpapier entfernt. Anschließend wurden die Objektträger mit den Zellen luftgetrocknet und bei -20°C eingefroren.

Die Zytospins wurden 10 min in eiskaltem Aceton fixiert und anschließend 5 min in 10 mM Citratpuffer pH=6 aufgekocht. Nach Abkühlen und 5 min Waschen in 1x PBS wurden

unspezifische Avidin oder Biotin-Bindungen durch je 15 min Inkubation mit Avidin D- und Biotin Lösungen des Avidin/Biotin blocking Kits geblockt. Anschließend wurden die Präparate 3x 5 min in 1x PBS gewaschen, um mittels 5-10% Ziegen Serum in 1x PBS für 20 min gegen unspezifische Antikörper Bindungen geblockt zu werden. Danach wurde der GBP-5ta Primärantikörper (K26 1: 7500, K41 1:500, K42 1:1000) in 1% Ziegen Serum in einer feuchten Kammer inkubiert. Der Sekundärantikörper des ABC Systems erkennt Kaninchen-Antikörper und ist Biotin-gekoppelt. Nach 3x 5 min Waschen wird er in 1x PBS in 10% Ziegen Serum für 30 min inkubiert. Das Avidin und die Biotin-gekoppelte, alkalische Phosphatase des „Alkaline Phosphatase Rabbit“ IgG ABC Kits wurden nach Angaben des Herstellers angesetzt und für 30 min in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach dem Waschen (3x 5 min in 1x PBS) wurden die Proben kurz mit Tris-HCl pH=8,5 abgespült und die Färbung erfolgte mittels des AP-Substrat-Kits nach Herstellerangaben. Die gefärbten Schnitte wurden nach 3x 5 min Waschen in H₂O mit Hämatoxylin (Fa. AppliChem) für 5-10 min gegengefärbt und durch fließendes Wasser gebläut. Zur Konservierung wurden die Schnitte mit Histogel (Fa. Vector) eingedeckt.

2.11.2 Kryoschnitte

Die immunhistochemische Färbung von Tumor-Kryoschnitten wurde gemäß des Protokolls der Zytospins, allerdings ohne vorheriges Kochen in der Mikrowelle, durchgeführt.

2.12 FACS

FACS Färbungen erfolgten mit GBP-5ta positiven Zelllinien. Bei der FACS Färbung wird die Bindung des Antikörpers für jede einzelne Zelle im Durchfluss-System gemessen. Es können auch mehrere Färbungen parallel durchgeführt werden. Bei dieser Messung an intakten Zellen kann die FACS Färbung als Nachweis für membranständige Proteine betrachtet werden. Die Zellen werden hierfür mit PBS gewaschen und auf eine Konzentration von $2-5 \times 10^6$ Zellen / ml eingestellt. 0,1 ml der Zellsuspension wird pro FACS-Reaktion angesetzt ($2-5 \times 10^5$ Zellen/Röhrchen). 2 µl des Antikörpers (1:50 Verdünnung) wurden direkt zu der Lösung gegeben und 30 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit 1-2 ml 2% FCS/PBS Lösung gewaschen, das Pellet wurde mit 100 µl 2% FCS/PBS Lösung mit 2 µl Fluorescein (FITC) markiertem Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) sekundären Antikörper (Fa. Dianova) versetzt und im Dunkeln 30 min bei 4°C schüttelnd inkubiert. Nach abermaligem Waschen mit 1-2 ml 2% FCS/PBS Lösung wurde das Pellet mit 100 µl 1% Formalin fixiert.

Die Fluoreszenz war bis zu 30 Tage nach der Versuchsdurchführung messbar. Die Messung wurde an einem Becton Dickinson FACS Calibur durchgeführt.

3 Ergebnisse

Das Testen von Patientenseren mit der SEREX-Methode ist arbeitsintensiv und zeitaufwendig. Daher wurde eine schnellere Methode zum Screenen vieler Seren etabliert. Mit dieser ELISA Technik konnte für vier Tumorantigene eine größere Anzahl an Seren getestet werden. Es wurden CTCL, Melanom- und Kontrollseren sowie Seren von entzündlichen Parapsoriasis Erkrankungen und von immunbehandelten CTCL-Patienten untersucht. Die Tumorantigene se2-2, GBP-5a/b und dessen verkürzte Form GBP-5ta besitzen ATP/GTP-bindende Motive und gehören damit zu den wenigen Tumorantigenen, von denen ein funktioneller Zusammenhang bekannt ist. GBP-5a/b und GBP-5ta sind hoch homolog zur Familie der GTPasen, zu denen auch das gut untersuchte Ras Onkogen gehört. se2-2, GBP-5ta und GBP-5a/b wurden im Folgenden auf DNA- und Proteinebene charakterisiert und ihr therapeutischer und diagnostischer Wert evaluiert. Für die Proteinanalysen wurden Antikörper gegen rekombinantes se2-2 und GBP-5ta Protein generiert und im Western Blot, Epitopmapping und in der Immunhistologie eingesetzt.

In Tabelle 3-1 sind alle in dieser Arbeit untersuchten CTCL assoziierten Tumorantigene beschrieben.

Tabelle 3-1: Überblick über alle verwendeten Klone

Klon	Größe	ORF		Homologie		RNA Expression	Chromosom
		mRNA	Protein	Gen	EST		
se2-2	2317 bp	3-2315 bp	771 AS	KIAA0373	Brain cDNA clone	differenziell	12
se57-1	3997 bp	174-1181 bp	336 AS	neu	RSV induziertes EST	differenziell	18q21
se70-2	1592 bp	3-920 bp	306 AS	neu	Large cell carcinoma, adipose	differenziell	13q33.3-34
cTAGE-1	1284 bp	14-236 bp	74 AS	neu	cTAGE-1B, cTAGE-1C	Cancer Testis Antigen	18p11.2
GBP-5ta	1981 bp	514-1981 bp	489 AS	GBPs	-	differenziell	1p22.2-3

Übersicht über die mit SEREX an einer Testis-Bank (se2-2, se57-1, se70-2, cTAGE-1) und einer Tumorbank (GBP-5ta) identifizierten Antigene. Die Tabelle fasst die grundlegende Beschreibung der cDNA der Klone, ihres kodierenden Proteins, sowie die chromosomale Lokalisation und die RNA-Expression zusammen.

3.1 Etablierung des ELISA

Der zur Zeit meistgebrauchte immunologische Test basiert auf dem „Enzyme Linked Immunosorbent Assay“ (ELISA). Um den Immunstatus eines Patienten zu untersuchen, eignet sich der „Antibody Capture Assay“. Die ELISA Platten werden dabei mit dem zu untersuchenden Antigen beladen, was eine Bindung der Antikörper aus dem Serum ermöglicht. Die humanen Antikörper können über einen sekundären Peroxidase gekoppelten Antikörper gegen humanes IgG sichtbar gemacht werden. Gegenüber der aufwendigen SEREX Methode bietet der ELISA den Vorteil, eine große Anzahl an Seren in kurzer Zeit testen zu können.

3.1.1 ELISA mit aufgereinigten His-Fusionsproteinen

In einem klassischen ELISA werden die Platten direkt mit aufgereinigtem rekombinanten Protein beschichtet. In Vorversuchen wurden fünf Tumorantigene des CTCL, deren ORF in den pTrcHisTOPO Vektor kloniert wurde, aufgereinigt. Diese Proteine wurden in 50 ml–1000 ml Kulturen rekombinant exprimiert und mittels des His-tag über Ni²⁺-Agarose aufgereinigt. Im Western Blot wurde mit dem Anti-Xpress Antikörper die Proteingröße der rekombinanten Proteine ermittelt. Für alle fünf Antigene stimmte die Größe mit der vorhergesagten (Computerprogramm: „pepstats“) überein. Die Expressionsraten von 3 der 5 Antigene waren allerdings sehr gering, so dass damit keine ELISA Messungen möglich waren. Dagegen zeigten die Antigene se2-2 und GBP-5ta eine hohe Ausbeute von bis zu 2 mg rekombinantem Protein in 6 l Expressionskultur. Diese Fusionsproteine wurden, wie später ausgeführt, zur Generierung von Antikörpern verwendet.

3.1.2 GST-Xtag ELISA

Der GST-Xtag ELISA beinhaltet im Gegensatz zum klassischen „Antibody Capture Assay“ eine entscheidende Vereinfachung: Im GST-Xtag ELISA werden die rekombinanten Antigene direkt auf der Platte aufgereinigt. Diese Methode des GST-Xtag ELISA (Abbildung 3-1) basiert auf der Bindung der Glutathion-S-Transferase (GST) an Glutathion, welches kovalent an Casein gekoppelt, auf eine solide Plastikoberfläche gebunden vorliegt (Sehr et al 2001). Die Antigene werden durch eine Ein-Schritt Aufreinigung direkt aus dem bakteriellen Lysat auf der ELISA Platte von den anderen Lysatbestandteilen abgetrennt.

In dieser Arbeit wurde der GST-Xtag ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen insgesamt vier Tumorantigene etabliert. Die Antigene se57-1, se70-2, das CT-Antigen

cTAGE-1 und GBP-5ta wurden in den pGEX4T3tag Vektor kloniert. Danach wurden die Antigene (X) als Fusionsproteine mit N-terminaler Glutathion S-Transferase (GST) und C-terminalem Markerepitop (tag) als GST-Xtag bakteriell exprimiert. Das einheitliche Markerepitop (tag) am C-Terminus ermöglicht die vergleichende Quantifizierung aller eingesetzten Antigene in einem einheitlichen Verfahren (Abbildung 3-1).

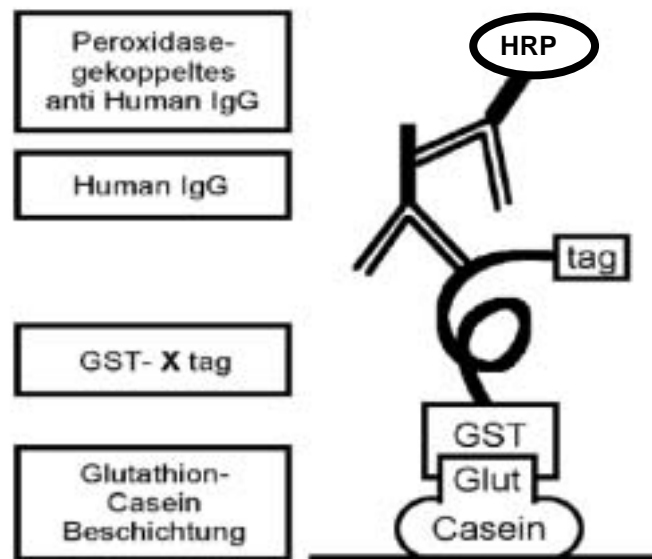


Abbildung 3-1: Schematischer Aufbau des GST-Xtag ELISA

Der GST-Xtag ELISA besteht aus den vier übereinanderstehenden Komponenten. Nachgewiesen werden humane IgG Antikörper, die spezifisch das Antigen (X) erkennen. Der sekundäre Esel-anti humane IgG (H+L) Antikörper ist Peroxidase gekoppelt (HRP=horseradish peroxidase).

Titration der Antigene auf der Platte

Die Lysate wurden titriert, um die Bindungskapazität der Glutathion-Casein beschichteten ELISA Platte möglichst gut auszunutzen und dadurch eine möglichst große für Antikörper zugängliche Antigenmenge zu präsentieren. Sie wurden zwischen 100 und 0,2 µg Lysatprotein/Loch verdünnt und in Duplikaten auf die Platte aufgetragen. Gebundene Antigene wurden über das C-terminale Markerepitop (tag) und das N-terminale GST nachgewiesen.

Die Antigene se57-1, se70-2, cTAGE-1 und GBP-5ta zeigten bei Titrations mit einem Antikörper gegen GST wie auch mit einem Antikörper gegen tag ähnliche Sättigungen. Auch bei Proteinmengen von 100 µg Lysatprotein pro Loch war trotz Sättigung und somit einer eventuellen sterischen Hinderung der Proteine untereinander, nur eine minimale Abnahme der Reaktivität mit den Antikörpern gegen die N-Termini der Antigenproteine erkennbar. Die

Antigene erreichten alle eine Sättigung mit vergleichbaren Lysat-Proteinmengen (10 bis 20 µg) (Abbildung 3-2) und sind sowohl N-terminal, als auch C-terminal für Antikörper zugänglich. Alle Antigene wurden mit 25 µg Lysatprotein pro Loch (0,25 µg/µl) in allen folgenden Versuchen eingesetzt.

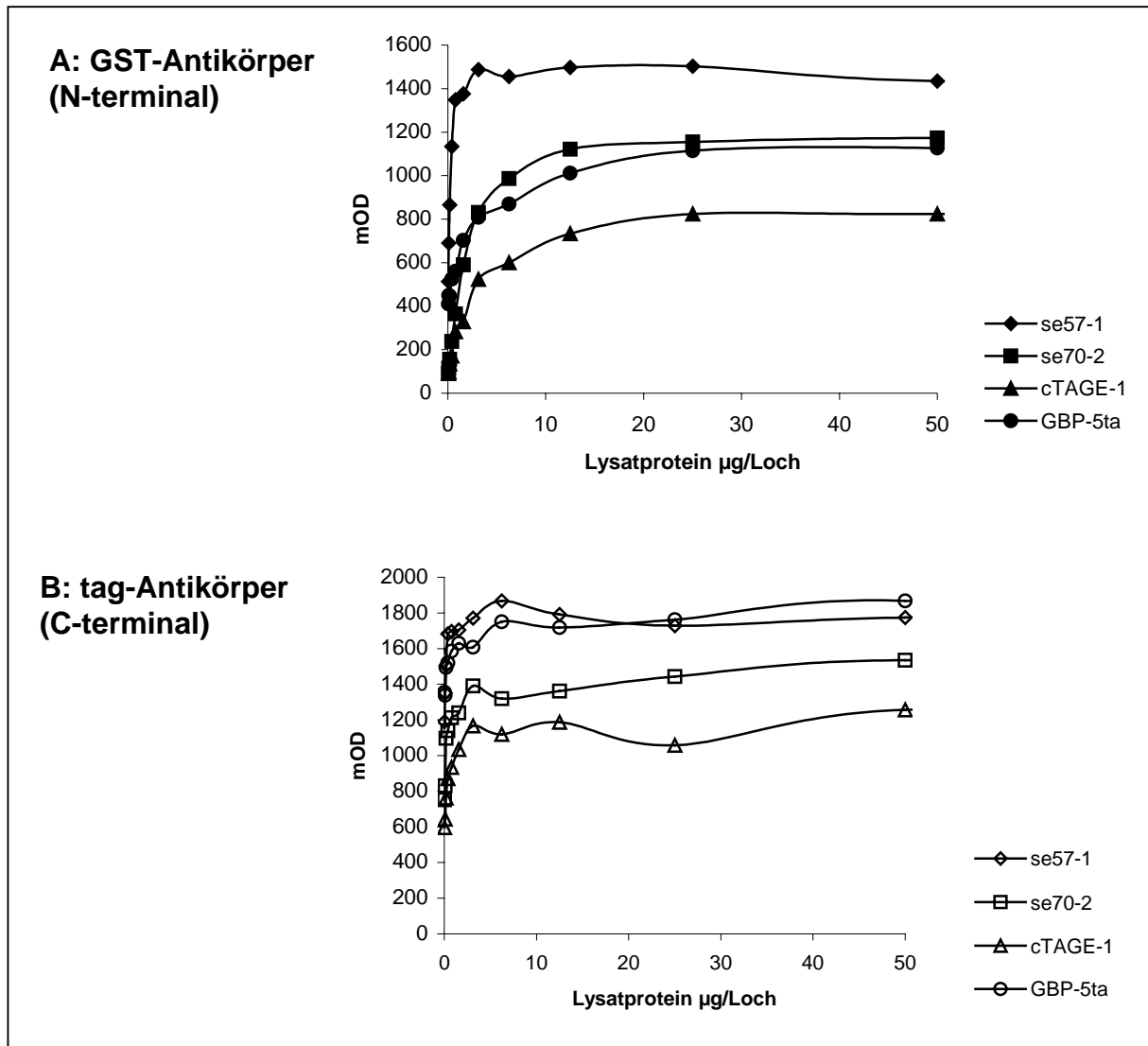


Abbildung 3-2: Titration der Antigene für den GST-Xtag ELISA

Glutathion-Casein beschichtete ELISA Platten wurden mit den zwischen 0,2 und 50 µg Lysatprotein/Loch verdünnten geklärten Lysaten der GST-Xtag überexprimierten E.coli BL21-Bakterien inkubiert. In A und B sind Mittelwerte der Doppelbestimmungen linear aufgetragen. Die gebundenen Antigene wurden mittels monoklonalem Anti-tag Antikörper (A) und dem polyklonalen Anti-GST Antikörper (B) quantifiziert.

Cut-off Wert Bestimmung und Statistik

Der Cut-off Wert für alle ELISA-Messungen wurde aus den Reaktivitäten der Kontrollgruppe als Mittelwert plus 3x Standardabweichung unter Wegfall der außerhalb dieser Grenze

liegenden Reaktivitäten berechnet. Daraus ergaben sich die Cut-off Werte 31, 115, 15 und 26 für se57-1, se70-2, cTAGE-1 und GBP-5ta.

Für die statistische Auswertung der ELISA Ergebnisse wurden die in Abbildung 3-3 für jedes Antigen aufgeführten Serengruppen mit dem Kruskal-Wallis Test verglichen. Ergab sich für die drei Serengruppen ein signifikanter Unterschied, wurde die Signifikanz der einzelnen Gruppen jeweils zu der Kontrollgruppe mit dem Mann-Whitney U-Test errechnet. Waren nach diesem Test die Patientenserum zu den Kontrollserum signifikant verschieden, so wurde der tatsächliche Größenunterschied dieser Signifikanz nach Hodges-Lehmann Schaezter berechnet. Der Hodges-Lehmann Schaezter Test berechnet den Median der Differenzen zwischen den Werten beider Gruppen.

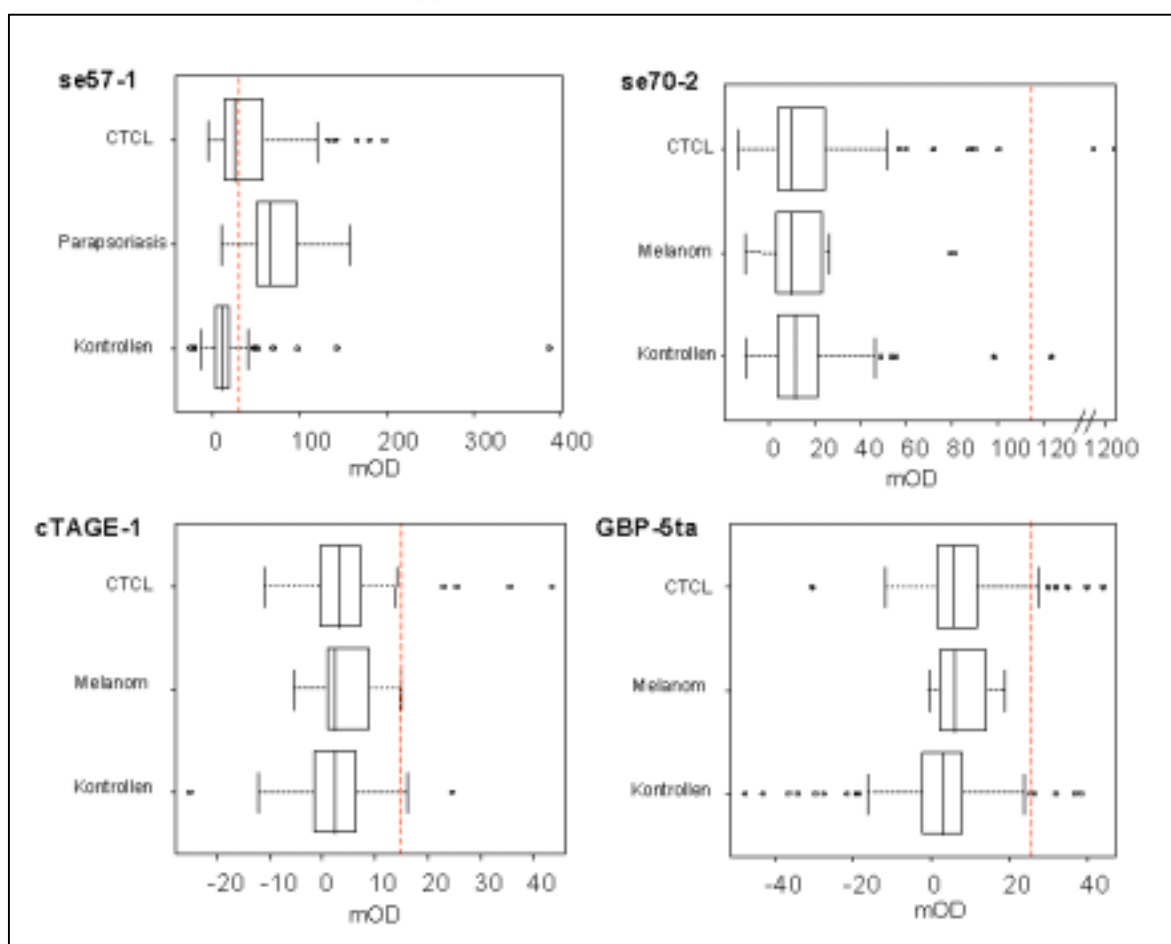


Abbildung 3-3: Reaktivitäten im ELISA gegen se57-1, se70-2, cTAGE-1 und GBP-5ta

Verteilung der Antikörperreaktivitäten von Kontroll-, CTCL-, Melanom- oder Parapsoriasis-Seren gegen die Antigene se57-1, se70-2, cTAGE-1 und GBP-5ta mittels Tukey-Boxplots. Die gestrichelte Linie zeigt den Cut-Off-Wert an. Die Antikörperreaktivitäten gegen se70-2 und cTAGE-1 waren zwischen Kontrollen und Tumorseren nach dem U-Test von Mann-Whitney nicht signifikant verschieden. Die Kontrollgruppe und die CTCL-Seren von GBP-5ta zeigten einen signifikanten Unterschied, der allerdings unter dem Cut-off Wert lag. Die Reaktivitäten der Parapsoriasis- und CTCL-Seren waren bei se57-1 signifikant höher gegenüber den Kontrollseren.

GST-se57-1tag ELISA

Im GST-se57-1tag ELISA reagierten 45% (27/60) der CTCL-Seren, aber nur 10,7% (16/149) der Kontrollseren (Tabelle 3-2). 18/43 MF und 6/10 SS Seren sowie 1/3 CBCL waren für se57-1 positiv. Auffallend bei se57-1 ist die hohe Reaktivität der Parapsoriasis-Seren mit 18/20. Die drei Serengruppen Kontrollen, CTCL und Parapsoriasis sind nach dem Kruskal-Wallis Test statistisch signifikant unterschiedlich ($p < 0,0001$) (Tabelle 3-2). Die einzelnen Gruppen wurden im Mann-Whitney U-Test gegeneinander verglichen und waren für Kontrollen versus CTCL ($p < 0,0001$) mit einem tatsächlichen Größenunterschied von 17 nach Hodges-Lehmann Schaetzer statistisch signifikant. Ebenfalls signifikant zueinander im Mann-Whitney U-Test sind die Gruppen Kontrollen versus Parapsoriasis ($p < 0,0001$) mit einem Größenunterschied von 58,5 nach Hodges-Lehmann Schaetzer (Tabelle 3-2). Die Vermutung, dass die CTCL- und Parapsoriasis-Seren häufiger reagierten als die Kontrollseren, konnte statistisch belegt werden.

Tabelle 3-2: Antikörperreaktivitäten im GST-se57-1tag ELISA

Se57-1	Cut-off Wert	Kontrollseren		Patientenseren		Mann-Whitney U-Test*	Hodges-Lehmann Schaetzer
		% Positive (n)	Median (min/max) in mOD	% Positive (n)	Median (min/max) in mOD		
31		Kontrollen: 10,7% (149)	12 (-12/388)	CTCL: 45% (60)	28 (-4,5/198)	P<0,0001	17
				Parapsoriasis: 90,0% (20)	65 (10/158)	P<0,0001	58,5

ELISA-Ergebnisse in Prozent Positive über dem Cut-off Wert und statistische Auswertung.
*Signifikanzgrenze des Mann-Whitney U-Tests: $p = 0,05$

GST-se70-2tag ELISA

Im GST-se70-2tag ELISA reagierten CTCL-Seren mit zum Teil sehr hohen Werten bis 1252 mOD (Tabelle 3-3). Die maximale Reaktivität der Kontrollseren war 189 mOD von allerdings nur drei positiven Seren (n=93). 5,4% (6/112) CTCL-Seren waren positiv, davon 0/9 der SS Seren und 6/98 der MF Seren. Die Parapsoriasis- (n=19), CBCL- (n=3) und Melanomseren (n=18) waren alle negativ. Mit dem Kruskal-Wallis Test waren die drei Serengruppen Kontrollen, CTCL und Melanom statistisch nicht signifikant unterschiedlich ($p = 0,95$) (Tabelle 3-3).

Tabelle 3-3: Antikörperreaktivitäten im GST-se70-2tag ELISA

	<i>Cut-off Wert</i>	<i>Kontrollseren</i>		<i>Patientenseren</i>		<i>Mann-Whitney U-Test*</i>	<i>Hodges-Lehmann Schaetzer</i>
		% Positive (n)	Median (min/max) in mOD	% Positive (n)	Median (min/max) in mOD		
<i>Se70-2</i>	115	Kontrollen: 3,2% (93)	12 (-12/388)	CTCL: 5,4% (112)	9 (-14/1252)	nicht signifikant ^o	-
				Melanom: 0,0 % (18)	9 (-11/81)	nicht signifikant ^o	-

ELISA-Ergebnisse in Prozent Positive über dem Cut-off Wert und statistische Auswertung
 *Signifikanzgrenze des Mann-Whitney U-Tests: p=0,05^o p-Wert wurde nicht mehr berechnet, da die Ergebnisse mit dem Kruskal-Wallis Test bereits nicht signifikant waren.

GST-cTAGE-1tag ELISA

cTAGE-1, als kleinstes Protein, zeigte die geringsten mOD Werte mit 44 mOD als Spitzenwert. Es reagierten 4/93 der Kontroll- und 4/112 CTCL-Seren, davon 4/98 MF und 0/9 SS-Seren (Tabelle 3-4). Keines der Parapsoriasis-, CBCL- und Melanomseren war positiv für cTAGE-1. Statistisch waren die drei Gruppen Kontrollen, CTCL und Melanome nach dem Kruskal-Wallis Test nicht signifikant unterschiedlich (p=0,38).

Tabelle 3-4: Antikörperreaktivitäten im GST-cTAGE-1tag ELISA

	<i>Cut-off Wert</i>	<i>Kontrollseren</i>		<i>Patientenseren</i>		<i>Mann-Whitney U-Test*</i>	<i>Hodges-Lehmann Schaetzer</i>
		% Positive (n)	Median (min/max) in mOD	% Positive (n)	Median (min/max) in mOD		
<i>cTAGE-1</i>	15	Kontrollen: 4,3% (93)	3 (-25/25)	CTCL: 3,6% (112)	3 (-11/44)	nicht signifikant ^o	-
				Melanom: 0,0 % (18)	3 (-6/15)	nicht signifikant ^o	-

ELISA-Ergebnisse in Prozent Positive über dem Cut-off Wert und statistische Auswertung.
 *Signifikanzgrenze des Mann-Whitney U-Tests: p=0,05^o p-Wert wurde nicht mehr berechnet, da die Ergebnisse mit dem Kruskal-Wallis Test bereits nicht signifikant waren.

GST-GBP-5ta tag ELISA

Im GBP-5ta ELISA lagen 3,2% (6/93) Kontroll- und 9,8% (11/93) CTCL-Seren über dem Cut-off Wert (Tabelle 3-5). 6/96 MF und 2/10 SS-Seren waren positiv sowie 2/20 der Parapsoriasis Erkrankungen und 1/3 der CBCL. Alle getesteten Melanomseren (n=18) waren negativ gegen rekombinantes GBP-5ta. Die statistischen Auswertungen ergaben eine Signifikanz nach Kruskal-Wallis für die Gruppen Kontrollen, CTCL und Melanome (p=0,005) wobei sich allerdings nur die Kontrollen und CTCL im Mann-Whitney U-Test statistisch signifikant unterschieden (p=0,002) nicht aber die Kontrollen von den Melanomen (p=0,09). Der Größenunterschied zwischen den Kontrollen und CTCL beträgt nach Hodges-Lehmann Schaetzer 3,54. Der statistisch signifikante Bereich liegt allerdings unter dem Cut-off Wert von 26 (Abbildung 3-3).

Tabelle 3-5: Antikörperreaktivitäten im GST-GBP-5ta ELISA

	Cut-off Wert	Kontrollseren		Patientenseren		Mann-Whitney U-Test*	Hodges-Lehmann Schaetzer
		% Positive (n)	Median (min/max) in mOD	% Positive (n)	Median (min/max) in mOD		
GBP-5ta	26	Kontrollen: 3,2% (93)	4 (-107/77)	CTCL: 9,8% (112)	7 (-31/170)	P=0,002	3,54
				Melanom: 0,0 % (18)	6 (-11/19)	nicht signifikant (p=0,09)	-

ELISA-Ergebnisse in Prozent Positive über dem Cut-off Wert und statistische Auswertung .
*Signifikanzgrenze des Mann-Whitney U-Tests: p=0,05

Follow up von immunbehandelten CTCL-Patienten

Bei kutanen T-Zell-Lymphomen werden immunmodulierende Behandlungen als vielversprechende Therapien diskutiert (Muche & Sterry 2002). Um mögliche Effekte auf die humorale Antwort gegen CTCL assoziierte Antigene zu untersuchen, wurden Seren von immunbehandelten Patienten im ELISA getestet. Dabei handelte es sich um 18 verschiedene Seren von 8 Patienten, die mit einem rekombinanten Adenovirus als Träger von IFN-γ behandelt und 45 verschiedenen Seren von 5 Patienten, die mit dem handelsüblichen

Masernimpfstoff immunisiert wurden. Von den Patienten standen jeweils Seren vor, während und nach den jeweiligen Immunisierungen zur Verfügung.

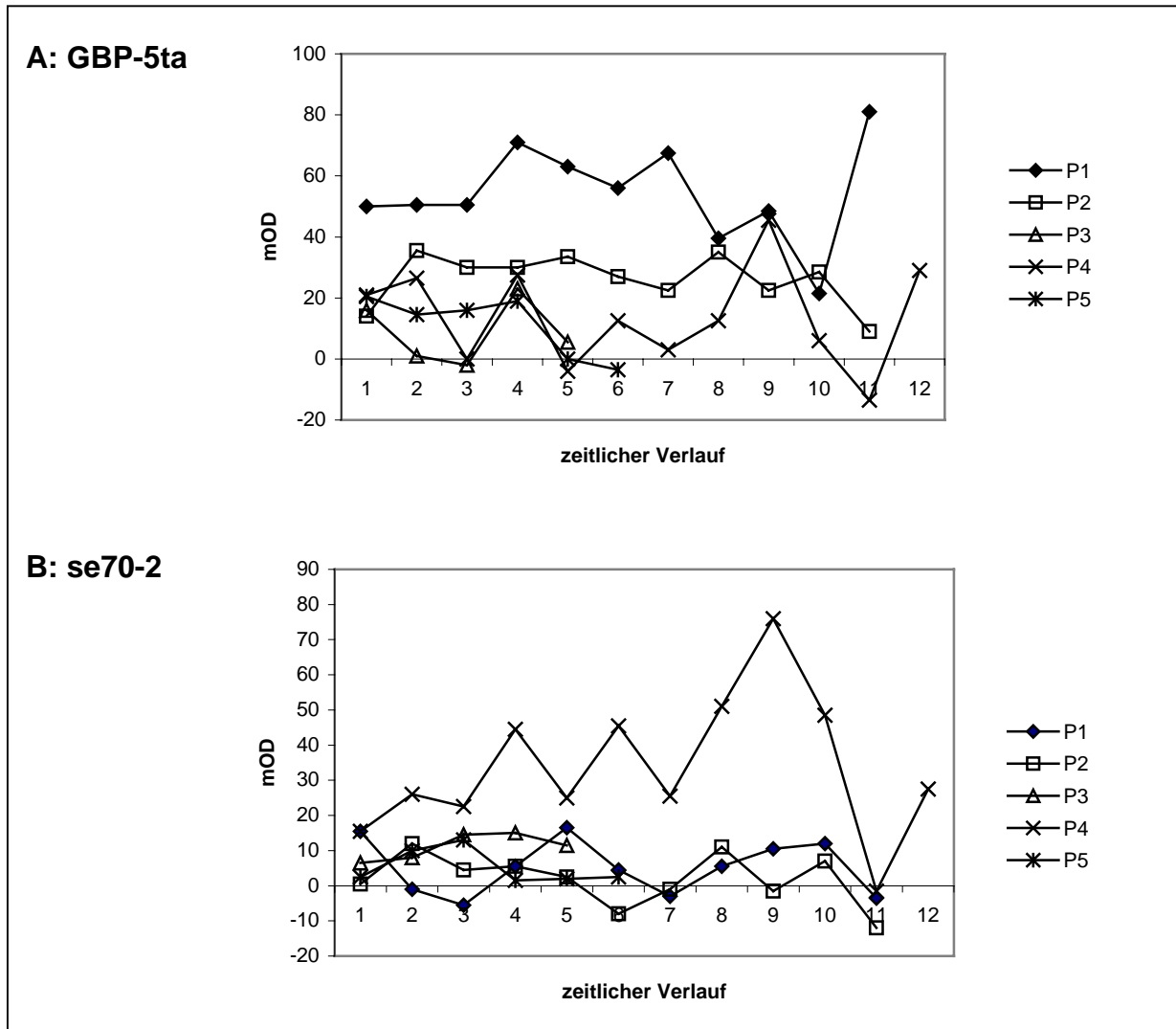


Abbildung 3-4: GST-Xtag ELISA mit Seren von immunbehandelten Patienten

GST-XtagELISA mit Seren von fünf verschiedenen immunbehandelten CTCL Patienten (P1-P5). Die Patienten wurden bis zu 11x mit einem handelsüblichen Masernimpfstoff immunisiert. Gezeigt wird die Reaktivität gegen (A) GBP-5ta und (B) se70-2 im Verlauf der Behandlung. Auf der Y-Achse sind die mOD Werte aufgetragen. Die X-Achse stellt den zeitlichen Verlauf der wiederholten Immunisierungen (2-11) dar. Nummer 1 ist das Serum vor der Immunisierung. Patient 4 zeigte die höchste Reaktivität gegen GBP-5ta (A) und einen Anstieg der Antikörper im zeitlichen Verlauf.

Alle mit dem Adenovirus-Impfstoff behandelten Patienten zeigten keine Veränderung. Weder eine ansteigende noch eine abfallende Antikörperantwort nach der Immunisierung konnte gegen die getesteten Antigene se70-2 und GBP-5ta beobachtet werden. Generell war nur eine schwache Reaktivität aller immunisierten Patienten aus beiden Impfstudien zu finden. Zwei Ausnahmen sind die Antworten der Patienten 3 und 4 (Abbildung 3-4), die mit dem Masernimpfstoff immunisiert wurden, gegen das Antigen GBP-5ta. Wie in Abbildung 3-4

anhand des Kurvenverlaufs zu erkennen ist, zeigt sich hier für Patient 3 ein leichter und für Patient 4 ein etwas deutlicherer Anstieg. Bei Patient 4 liegen alle Werte über dem ermittelten Cut-off Wert, ausgenommen dem Serum vor der Immunisierung, und dem vorletzten Wert. Für eine statistische Auswertung war die Anzahl der getesteten Seren zu gering, um verlässliche Aussagen machen zu können.

3.2 Tumorantigen se2-2

3.2.1 Identifikation und Homologie

Im SEREX Screen von ca $1,9 \times 10^6$ rekombinanten Klonen der Testis cDNA Bank mit 17 verschiedenen CTCL Seren wurde Klon se2-2 gefunden (Eichmüller et al 2001). Es konnten 2 Homologe zu Klon se2-2 in den Datenbanken identifiziert werden. Eines dieser Gene war eine Patentsequenz (Acc. Nr.: AX053701, Patent Nr.: WO0073801), die mittels SEREX an Prostatakarzinomen gefunden wurde. Das zweite Gen ist das publizierte KIAA-Gen KIAA0373 (Nagase et al 2000). Eine japanische Arbeitsgruppe von Nagase hat Voll-Längen cDNA Banken aus Gehirn und der Myloid Zelllinie KG1 hergestellt. Gemein ist diesen Genen ihre Größe (>5 kb). Anhand von Datenbanksuchen, Homologievergleichen der Peptidsequenzen und Suchen nach bekannten Domänen konnten die ersten KIAA-Gene funktionell zugeordnet werden (Nagase et al 1997; Nagase et al 1996). Klon se2-2 und die Ansequenzierung der SEREX Patent mRNA ergaben fast identische 3' Enden (120 Nukleotide versetzt), während das KIAA0373 (Acc Nr.: HSAB2371) am 5' Ende um 3203 Nukleotide verlängert ist (Abbildung 3-5). KIAA0373 und se2-2 sind auf dem Chromosom 12 lokalisiert.

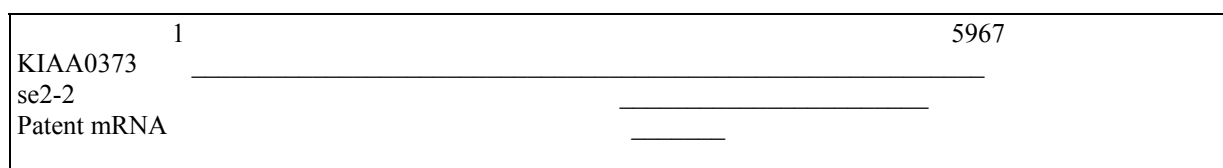


Abbildung 3-5: mRNA Alignment, Klon se2-2

Die Abbildung zeigt ein mRNA Alignment von Klon se2-2 zu verwandten cDNAs aus Datenbanken.

3.2.2 Serologie

Trotz seines ubiquitären Expressionsmusters zeigte se2-2 im SEREX serologische Spezifität: 30% (n=10) der CTCL Patienten besaßen reaktive Antikörper aber 0% (n=5) der Kontrollpersonen (Eichmüller et al 2001).

3.2.3 Proteinmotive

Das kodierende se2-2 Protein (761 AS, 88,4 kDa) ist nukleär lokalisiert (Husar Programm „2Dsweep“). Die Proteinhomologie von KIAA0373 und se2-2 beträgt 99,7% bei 761 AS. KIAA0373 ist N-Terminal um 685 AS und C-terminal um 93 AS länger. Nach der Peptidsequenz werden 24 α -Helices und große Bereiche superspiralisierte α -Helices vorhergesagt. Nach Analysen mit den HUSAR Programmen „Prosite“ und „Motifs“ besitzen die Proteine se2-2 und KIAA0373 ein *ATP/GTP Bindungsmotiv* (GSGRSGKT) bei den Aminosäuren 494 bzw. 1179.

3.2.4 Expressionsanalyse der se2-2 mRNA

Die RT-PCR von Klon se2-2 an Kontroll- und Tumorgeweben zeigte, dass se2-2 in den Kontrollen differentiell exprimiert ist (Tabelle 3-6). Anhand Tabelle 3-6 ist weiter erkennbar, dass se2-2 in fast allen CTCL und in 80% der Melanome nachweisbar ist. Se2-2 wurde außerdem in allen CTCL Zelllinien und Leukämie-Zelllinien exprimiert.

3.2.5 Expressionsanalyse von se2-2 Protein

Herstellung der se2-2 spezifischen Antikörper

Der ORF (3-2315 bp) wurde mittels PCR amplifiziert und in den pTrcHisTOPO Vektor kloniert. Aus 6 l Expressionskultur wurden 2 mg Protein gewonnen. Das rekombinante se2-2HisProtein wurde mit der FPLC nativ über Ni^{2+} -Agarose aufgereinigt und zur Antikörperherstellung eingesetzt. Die Antikörper K43 und K44 erkannten bei einer Verdünnung von 1:5000 spezifisch das 94 kDa große se2-2 Protein im Western Blot (Abbildung 3-6).

Auf Proteinebene ergab sich im Western Blot ein differentielles Expressionsmuster für se2-2 Protein (Tabelle 3-6). In Kontrollgeweben war se2-2 in 57% (n=14) exprimiert gegenüber der mRNA Expression von 76% (n=17). Entgegen der fast 100%ig positiven RT-PCR Analyse war se2-2 Protein nur noch in 29% (n=7) der Melanome und in 33% (n=3) der CTCL-Tumorgewebe zu detektieren.

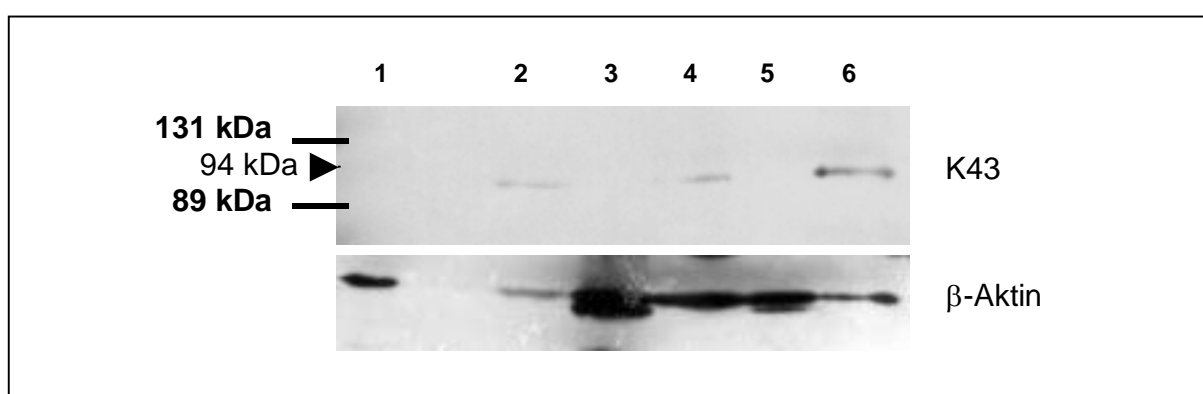


Abbildung 3-6: se2-2 Proteinexpression

Representativer Western Blot der Expressionsanalyse von se2-2 Protein. Se2-2 Protein war in mehreren Kontrollgeweben (2: Skelettmuskel, 4: Placenta, 6: Brust) nachweisbar. Die CTCL-Zelllinie SeAx (1) und die Kontrollgewebe Dünndarm (3), Magen (5) waren negativ.

Tabelle 3-6: RT-PCR und Western Blot Analyse von se2-2

		<i>se2-2 mRNA</i>	<i>se2-2 Protein</i>
Kontrollen	Kontrollgewebe (n)	76% (17)	57% (14)
	Fetale Gewebe (n)	100% (8)	0% (1)
Tumor-Gewebe	CTCL (n)	90% (10)	33% (3)
	CBCL (n)	100% (2)	n.t.
	Melanom (n)	80% (5)	29% (7)
Zelllinien	CTCL (n)	100% (4)	25% (4)
	Leukämie (n)	83% (6)	n.t.

Zusammenfassung der Expressionanalyse von se2-2 auf mRNA- und Proteinebene. Es wurden Kontrollgewebe, Tumorgewebe und Zelllinien auf die Expression von se2-2 untersucht.

3.3 Guanylat Bindendes Protein-5 (GBP-5)

3.3.1 Identifikation und Homologie

Bei der Suche nach Tumorantigenen in 7×10^6 rekombinanten Klonen einer cDNA Phagen Bank bestehend aus verschiedenen CTCL-Geweben, CTCL-Zelllinien und einem CBCL Gewebe wurde HD-CL-05 mit einem MF Serum detektiert (Hartmann et al. 2003, eingereicht). Auf Grund seiner hohen Homologie zur Familie der Guanylat-bindenden Proteine (GBPs) wurde HD-CL-05 in GBP-5ta (GBP-5, Acc. Nr.: AF 328727) umbenannt.

Die Sequenzierung ergab ein Insert von 1968 bp dessen ORF bei 514 bp beginnt und für ein 489 AS Protein kodiert. Während GBP-1 (Acc. Nr.: M55542 (Strehlow et al 1994)) und GBP-2 (Acc. Nr.: M55543 (Cheng et al 1991)) zu 80% (1462 bp) und zu 77% (1462 bp) homolog zu GBP-5ta waren, war GBP-5 (Acc. Nr.: AR035948, unveröffentlicht) im überlappenden Bereich 100% identisch.

Um weitere Spleißvarianten von GBP-5ta zu finden, wurden 3×10^5 Plaques einer cDNA Bank mit dem Digoxigenin gelabelten PCR-Produkt aus Primer Paar I (Abbildung 3-7) gescreent und zwei weitere Varianten gefunden: GBP-5a und GBP-5b. Beide haben am 3' Ende im Vergleich zu GBP-5ta zwei Exons mehr, und besitzen damit ein vollständiges ORF das mit einem Stopcodon endet (Fellenberg et al 2003).

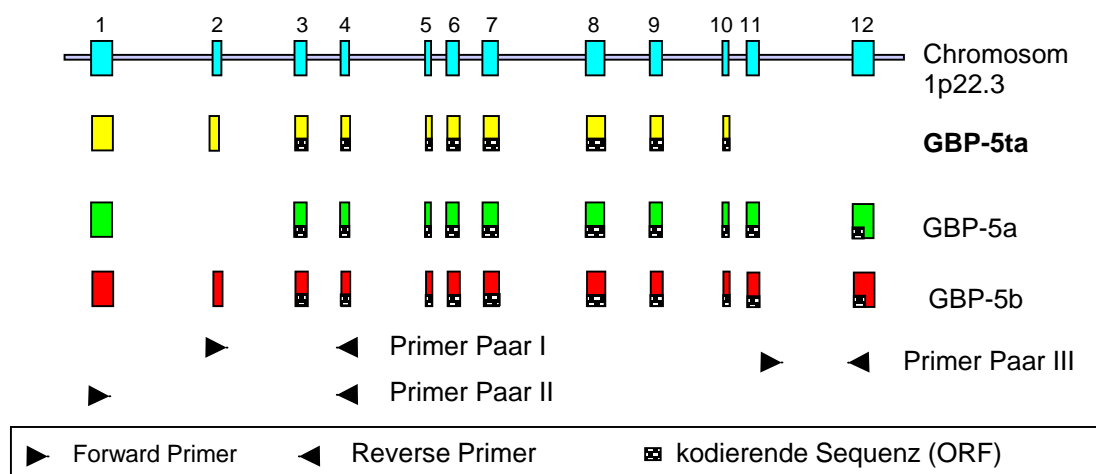


Abbildung 3-7: Chromosomales Alignment von GBP-5ta und GBP-5 mit Chromosom 1

Chromosomales Alignment von GBP-5ta, GBP-5a und GBP-5b sowie die Primerlokalisationen für die Expressionsanalyse in der RT-PCR. Alle Spleißvarianten sind 100% homolog zu Chromosom 1p22.3. Primer Paar I ist spezifisch für GBP-5ta und GBP-5b während Primer Paar II alle drei Varianten erkennt (PCR Produkte in zwei verschiedenen Größen: GBP-5ta/-b: 515 bp, GBP-5a: 408 bp). Primer Paar III liegt in den Exons 12 und 13, die nur GBP-5a und GBP-5b besitzen.

GBP-5 besteht aus 12 Exons, die auf dem Chromosom 1p22.3 lokalisiert sind. Das zweite Exon ist spezifisch für GBP-5ta und GBP-5b. GBP-5a und GBP-5b kodieren dasselbe Protein, GBP-5a/b. GBP-5ta ist C-terminal um 97 AS verkürzt (Abbildung 3-7) und bricht ohne ein Stopcodon ab. Die in den Datenbanken erhältliche Sequenz von GBP-5 ist zu 100% identisch zum ORF von GBP-5a/b.

GBP-5a/b ist zu 67% (591 AS), 64% (591 AS) und 68% (581 AS) homolog zu den humanen GBP-1, GBP-2 und GBP-3 (Tabelle 3-7). Die humanen GBP-4 und GBP-5 sind nicht publizierte Sequenzen, die in Genbank als ORF hinterlegt sind.

Tabelle 3-7: Protein und DNA Homologie der verschiedenen Mitglieder der humanen GBPs

	<i>GBP-5ta</i> 1968bp	<i>GBP-5b</i> 2428bp	<i>GBP-5a</i> 2301bp	<i>GBP-5</i> 1761bp	<i>GBP-1</i> 2881bp	<i>GBP-2</i> 2107bp	<i>GBP-3</i> 2952bp	<i>GBP-4</i> 1923bp
<i>GBP-5ta</i> 489 AS		99,7% 1965 bp	99,7% 1965 bp	99,7% 1466 bp	79,8% 1484 bp	77,4% 1462 bp	80,5% 1461 bp	65,1% 1433 bp
<i>GBP-5b</i> 586 AS	99,7% 489 AS		99,7% 2405 bp	99,9% 1761 bp	77,0% 1768 bp	73,2% 1884 bp	76,1% 1897 bp	64,2% 1688 bp
<i>GBP-5a</i> 586 AS	99,7% 489 AS	100,0%		99,9% 1761 bp	76,9% 1767 bp	75,9% 1673 bp	76,1% 1898 bp	64,2% 1688 bp
<i>GBP-5</i> 586 AS	99,7% 489 AS	100,0% 586 AS	100,0% 586 AS		76,9% 1474 bp	75,9% 1666 bp	77,0% 1748 bp	64,3% 1688 bp
<i>GBP-1</i> 592 AS	73,8% 488 AS	67,3% 591 AS	67,3% 591 AS	67,3% 591 AS		81,5% 1897 bp	88,5% 2913 bp	66,8% 1776 bp
<i>GBP-2</i> 591 AS	71,1% 485 AS	64,3% 591 AS	64,4% 586 AS	64,3% 591 AS	76,6% 584 AS		82,6% 1885 bp	82,6% 1885 bp
<i>GBP-3</i> 563 AS	74,4% 486 AS	68,0% 581 AS	68,0% 581 AS	68,0% 581 AS	87,3% 586 AS	76,3% 582 AS		64,9% 1736 bp
<i>GBP-4</i> 641 AS	57,2% 480 AS	52,0% 578 AS	52,0% 578 AS	52,0% 578 AS	55,7% 586 AS	55,5% 575 AS	55,0% 590 AS	

In der Tabelle werden die Nukleotid-Sequenzen (hellgrauer Bereich) und die daraus abgeleiteten Protein-Sequenzen (dunkelgrauer Bereich) der GBP-5 Spleißvarianten und der humanen GBPs im überlappenden Bereich verglichen. Das Protein von GBP-5a, GBP-5b und humanem GBP-5 ist identisch. GBP-5ta ist um 97 AS C-terminal verkürzt. Alle Homologie-Angaben wurden mit dem HUSAR Programm "bestfit" ermittelt.

Um zu bestätigen, dass die verkürzte Form GBP-5ta ohne Exon 11 und 12 wirklich existiert und nicht durch ein Klonierungsartefakt entstanden ist, wurde eine 3'RACE-PCR an CTCL RACE cDNA durchgeführt. Die PCR ergab zwei Banden. Nach Klonierung und Sequenzierung konnten die Banden GBP-5ta und GBP-5a/b zugeordnet werden.

3.3.2 Serologie

Für die serologische Untersuchung von GBP-5ta und GBP-5a/b im SEREX wurden die Phagen GBP-5ta und GBP-5a verwendet. Beide Phagen zeigten hohe serologische Spezifität. Alle Kontrollseren waren negativ (n=14). Das verkürzte Protein von GBP-5ta war mit 60% (n=15) positiver CTCL Seren immunogener als GBP-5a mit 45% (n=11). Im GST-Xtag ELISA mit GBP-5ta konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Kontrollen und CTCL-Seren errechnet werden (Tabelle 3-5).

3.3.3 Proteinmotive

GBP-5ta (489 AS, vorhergesagte Proteingröße nach „pepstats“: 60 kDa) und GBP-5a/b (586 AS, vorhergesagte Proteingröße: 67 kDa) sind mit einer Wahrscheinlichkeit von 34,8% und 73,9% nukleär lokalisiert (HUSAR Programm „2DSweep“). Die Ergebnisse der Proteinanalyse mit dem HUSAR Programm „Prosite“ und „Motifs“ sind in Tabelle 3-8 zusammengestellt. GBP-5ta und GBP-5a/b besitzen N-terminal bei Aminosäure 44 ein *ATP/GTP-bindendes Motiv (GSGRSGKT)*. Das Arg48 ist nur bei den GBPs konserviert und bei keinem anderen GTP bindenden Protein vorhanden. Sequenzvergleiche und Kristallographie ergaben, dass dieser Glycin-reiche konservierte Bereich im Protein ATP oder GTP bindet und sich zu einer flexiblen Schleife zwischen einem β -Strang und einer α -Helix formt (Dever et al 1987; Fry et al 1986; Moller & Amons 1985). Die Schleife, auch als P-loop bezeichnet, interagiert mit einer Phosphatgruppe des Nukleotids.

GBP-1 ist das am Besten untersuchte Mitglied der GBPs. Von ihm wurden zwei Kristallisationen, eine mit gebundenem Nukleotid (Praefcke et al 1999) und eine ohne (Prakash et al 2000) angefertigt und die Sequenzen, die für den katalytischen Mechanismus zuständig sind, erforscht. Acht Aminosäuren, die das aktive Zentrum flankieren (P-loop) sind vermutlich für die katalytische Maschinerie wichtig (Prakash et al 2000). In der Proteinsequenz von GBP-5a/b und GBP-5ta lassen sich sieben dieser Aminosäuren (Glu72, His 74, Lys76, Gly100, Lys106, Asp108, Asn109) in Form des P-loops, zwei GTP bindenden Motiven und dem sogenannten „Phosphate Cap“ (PC) wiederfinden (Tabelle 3-8). Das PC

schützt das aktive Zentrum, was bei Ras von dem GAP (GTPase aktivierendes Protein) übernommen wird (Rittinger et al 1998; Rittinger et al 1997), so dass nur Wassermoleküle Zugang zum γ -Phosphat haben (Prakash et al 2000).

Tabelle 3-8: Proteinmotive von GBP-1, GBP-5a/b und GBP-5ta im Vergleich *

	<i>Motiv</i>	GBP-1	GBP-5a/b	GBP-5ta
GTP bindende Motive	P-loop	GxxxxGK(S/T)	Arg48(R)	Arg48(R)
	Motiv I	DxxG	⁹⁷ DTQG ¹⁰⁰	⁹⁷ DTEG ¹⁰⁰
	Motiv II	DxEKGD	¹⁰³ DVEKGD ¹⁰⁸	¹⁰³ DVEKAD ¹⁰⁸
		Asn109(N)	Asn109(N)	Asn109(N)
	PC	Phosphate cap	Glu72(Q) His74(H) Lys76(K)	Glu72(Q) His74(H) Lys76(K)
	IP	CaaX	CTIS	CVLL
				fehlt

* siehe dazu das Alignment der humanen GBPs im Anhang. Die Tabelle vergleicht die in der Literatur beschriebenen essentiellen AS für die GTPase Aktivität von GBP-1 mit GBP-5a/b. Unterschiede sind dabei nur in der AS⁹⁹ und AS¹⁰⁷ zu finden (Prakash et al 2000). Die Isoprenylierungsstelle (CaaX-Motiv) liegt bei GBP-1 als CTIS und bei GBP-5a/b als CVLL vor, während sie bei GBP-5ta fehlt. IP=Isoprenylierung, PC=Phosphate cap

Die einzige ausgetauschte Aminosäure stellt das neutrale Ala¹⁰⁷ bei GBP-5a/b gegen das neutrale Gly¹⁰⁷ bei GBP-1 dar, allerdings liegt der Unterschied nur in einer angehängten Methylgruppe beim Alanin. C-terminal besitzt GBP-5a/b eine *Isoprenylierungsstelle (IP)*, konserviert als CaaX Motiv (C=Cystein, a=Leucin, Isoleucin, Valin, X=Methionin, Serin, Leucin, Glutamin), während sie bei GBP-5ta fehlt. Im Anhang ist das Alignment der Proteinsequenzen der GBPs und ihrer Motive dargestellt.

3.3.4 Expressionsanalyse von GBP-5 mRNAs

Drei verschiedene Primer Paare wurden für die Expressionsanalyse generiert, um die drei Spleißvarianten zu unterscheiden (Abbildung 3-7). Die Einzelergebnisse der RT-PCR sind im Anhang 3 aufgeführt. Der Forward Primer I liegt im Exon 2 (GBP-5ta und GBP-5b spezifisch). Der Forward Primer II bindet im Exon 1 und amplifiziert alle drei Varianten. Der gemeinsame Reverse Primer liegt im Exon 4. Primer Paar II ergibt zwei Banden: eine große (515 bp) entspricht GBP-5ta und GBP-5b und eine kleine Bande (408 bp) für GBP-5a. Die Abbildung 3-8 zeigt das Agarosegel der RT-PCR mit den Zelllinien Myla und HuT-78 jeweils mit Primer Paar I und II. Zu erkennen ist, dass in den Zelllinien alle Varianten vorhanden sind: eine Doppelbande bei Primer Paar II und eine Bande bei Primer Paar I.

Ein drittes Primer Paar (Primer Paar III) wurde in die Exons 11 und 12 gelegt, um das Vorhandensein der verkürzten Form GBP-5ta zu untersuchen. Das sich ergebende PCR Produkt ist 267 bp lang.

Die Expression der drei Spleißvarianten von GBP-5 wurde an cDNA aus CTCL Geweben von MF und SS Patienten, CBCL, sowie an CTCL-Zelllinien, Leukämien und Kontrollgeweben durchgeführt. Die RT-PCR mit Primer Paar I resultierte in einer Bande, die in 29% der Normalgewebe zu finden war. Die Tumorgewebe waren mit 32% der CTCL-Gewebe, 67% der CBCL-Gewebe und 45% der Melanomgewebe positiv.

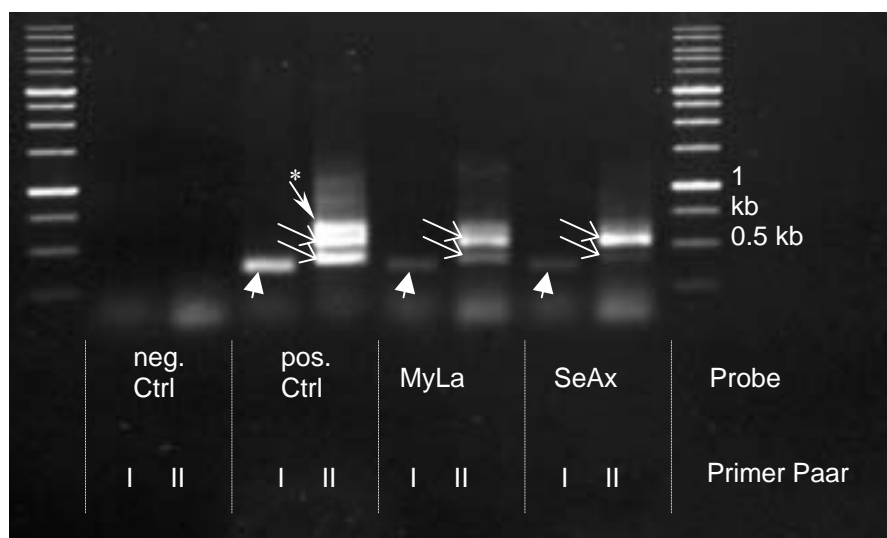


Abbildung 3-8: RT-PCR mit Primer Paar I und II

Die RT-PCR Produktgröße mit Primer Paar I ist 364 bp (GBP-5ta; Pfeil), während die Produkte mit Primer Paar II 408 bp (GBP-5) und/oder 515 bp (GBP-5ta) (zwei Pfeile) groß sind. Ein Gemisch aus allen Plasmiden der Tumorbank diente als Positivkontrolle und führt mit Primer Paar II zu einer dritten Bande (Pfeil mit Sternchen).

Primer Paar II zeigte Doppelbanden in 32-67% der Tumorgewebe und in 29-50% der Kontrollgewebe (Tabelle 3-9). Ein Gemisch aus allen Plasmiden der Tumorbank diente als Positivkontrolle und führte mit Primer Paar II zu einer dritten Bande (Abbildung 3-8; Pfeil mit Sternchen). Primer Paar III war in 100% aller Kontrollgewebe (n=20) und CTCL-Zelllinien (n=4) positiv. In den Tumorgeweben war in 83% der CTCL (n=12) und in 32% der Melanome (n=19) die lange Spleißvariante mit Exon 11 und 12 vorhanden. Das Magengewebe war mit Primer II für GBP-5a negativ, während GBP-5ta und/oder GBP-5b nach der Primer I Analyse positiv war. Da auch Primer Paar III ein positives Ergebnis lieferte (siehe Anhang 3), liegt im Magengewebe eindeutig GBP-5b mRNA vor.

Alle GBP-5 Varianten werden in Normalgeweben differentiell und im Tumorgewebe werden GBP-5ta, GBP-5a und GBP-5b zwischen 32% und 67% exprimiert.

Tabelle 3-9: RT-PCR Analyse von GBP-5 Spleißvarianten mit Antigen-spezifischen Primern

		<i>Primer I</i>	<i>Primer II</i>		<i>Primer III</i>
		<i>GBP-5ta/ GBP-5b</i>	<i>GBP-5ta/ GBP-5b</i>	<i>GBP-5a</i>	<i>GBP-5</i>
<i>Kontrollen</i> n=Gewebe	<i>Normalgewebe</i>	6/21	7/21	6/21	20/20
	<i>fetale Gewebe</i>	0/8	4/8	4/8	n.t.
<i>Tumor- Gewebe</i> n=Patienten	<i>CTCL (n=19)</i>	32%	58%	37%	83% (n=12)
	<i>CBCL (n=3)</i>	67%	67%	67%	n.t.
	<i>Melanom (n=19)</i>	42%	42%	32%	32%
<i>Zelllinien</i> n=Linien	<i>CTCL (n=4)</i>	100%	50%	50%	100%
	<i>Leukämie (n=5)</i>	20%	20%	0%	n.t.

In der Tabelle sind die positiven Gewebe und Zelllinien in Prozenten aufgeführt. RT-PCR wurde mit Primer Paar I und II durchgeführt und die Gesamtzahl der getesteten Proben ist in Klammern angeben (n). Primer Paar I ergibt eine Bande, während Primer Paar II eine große Bande spezifisch für GBP-5ta und GBP-5b und eine kleine Bande für GBP-5a amplifiziert. Das Auftreten der großen Bande bei Primer Paar II korreliert nicht immer mit den Ergebnissen von Primer Paar I. Primer Paar III resultiert in einer Bande. Die Einzelergebnisse der RT-PCR sind im Anhang 3 aufgeführt.

3.3.5 Expressionsanalyse der Proteine GBP-5a/b und GBP-5ta

GBP-5a und GBP-5b kodieren für das Protein GBP-5a/b, während GBP-5ta für ein kleineres Protein mit gleichem Namen kodiert. Um die Expression dieser beiden Proteine genauer zu untersuchen, wurden vier Antikörper hergestellt, die im Western Blot, Epitopmapping und der Immunhistologie eingesetzt wurden.

3.3.5.1 Herstellung der spezifischen Antikörper

GBP-5ta wurde in den pTrcHisTOPO Vektor kloniert und rekombinant exprimiert. Aus 6 l Expressionskultur wurden 1 mg Protein, welches nativ im Batchverfahren über Ni²⁺-Agarose aufgereinigt wurde, gewonnen. Da die Imidazol-Eluate noch Verunreinigungen von vermutlich Histidinreichen *E. coli* Proteinen enthielten, wurde GBP-5ta in denaturierter Form

aus dem Coomassie Gel (Abbildung 3-8) ausgeschnitten. Zuvor wurde die Bande des rekombinanten Proteins mittels MALDI-TOF ansequenziert. Die Sequenzierung ergab folgende AS-Sequenz „GGSHHHHHGMA“, die übereinstimmend mit dem Beginn des rekombinanten GBP-5ta einschließlich der N-terminalen 6x Histidin war. Abbildung 3-9 zeigt fünf zeitlich aufeinander folgende Eluate, der Aufreinigung über Ni²⁺ Agarose (Elutionspuffer: 500 mM Imidazol). GBP-5ta war als Bande von 60 kDa mit dem Anti-Xpress-Antikörper in ausreichender Menge detektierbar (Abbildung 3-9).

Mit diesem Protein wurden zwei Kaninchen immunisiert und die Antikörper K25 und K26 hergestellt. Da sich die Antikörper für die Erkennung von nativem Protein nur schlecht eigneten, wurde eine weitere 6 l Expression von rekombinanten His-tag GBP-5ta hergestellt. Diesmal wurde das Protein nativ in der FPLC über Ni²⁺-Agarose aufgereinigt und das Eluat gegen 1x PBS dialysiert, um das Imidazol aus dem Elutionspuffer zu entfernen. Die Eluate enthielten noch leichte Verunreinigungen durch *E. coli* Proteine. Mit 1 mg nativem GBP-5ta wurden abermals zwei Kaninchen immunisiert und die Antikörper K41 und K42 hergestellt.

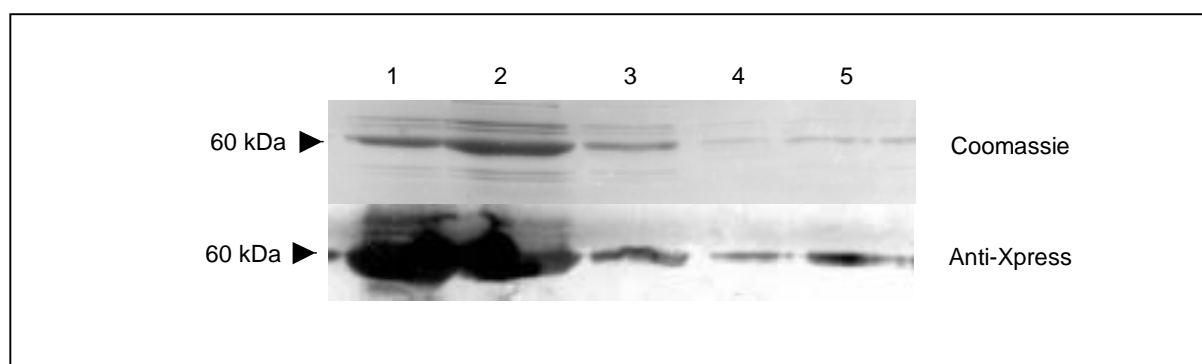


Abbildung 3-9 : SDS-PAGE und Western Blot mit GBP-5ta His-tag Eluaten

A: Coomassie gefärbte SDS-PAGE und **B:** Western Blot (Anti-Xpress Antikörper 1:5000) mit fünf zeitlich aufeinander folgenden Proben (Spur 1-5), die mit dem 500 mM Imidazol Puffer eluiert wurden.

3.3.5.2 *Evaluierung der gegen GBP-5ta generierten Antikörper*

Die vier gegen GBP-5ta generierten Antikörper (K25, K26, K41, K42) wurden auf ihre Verwendbarkeit im Western Blot, GST-Xtag ELISA, SEREX und in der Immunhistologie evaluiert.

Im **Western Blot** wurden die Antikörper an rekombinanten His-getaggen GBP-5ta, *E.coli* Lysaten vom Leervektor und an Protein von CTCL-Zelllinien Lysaten getestet. K25 (1:1000)

und K26 (1:1000), die beide gegen denaturiertes Protein hergestellt worden sind, erkannten das rekombinante GBP-5ta.

Jedoch reagierten beide Antikörper auch gegen *E. coli* Lysate. Diese unspezifische Erkennung von *E. coli* Proteinen lässt sich dadurch erklären, dass beim Ausschneiden der Bande aus dem Gel vermutlich auch *E. coli* Proteine ober- und unterhalb dieser Bande mit ausgeschnitten wurden. Da diese *E. coli* Proteine im Kaninchen immunogener sind als GBP-5ta, wurde ein Teil der polyklonalen Antikörper gegen *E. coli* Proteine generiert, weswegen K25 und K26 auch Proteine in den *E. coli* Proben detektieren. Da in Zelllinien nur eukaryontische Proteine vorliegen, können diese *E. coli* Antikörper nicht binden oder höchstens kreuzreagieren, was aber mit dem unten beschriebenen Experiment widerlegt werden konnte.

In *CTCL Zelllinien* erkannte K25 bei einer Verdünnung von 1:1000 in 1x PBS mit 0,5% Milch ein Protein von 60 kDa, welches der Größe des verkürzten Proteins GBP-5ta entspricht (Abbildung 3-10; A; Lane 2-5). K26 zeigte ein Bandenmuster der Größen 60 und 72 kDa. Anscheinend erkennt K26 sowohl GBP-5ta als auch das größere Protein GBP-5a/b (Abbildung 3-10; B; Lane 1-4). K25 ist somit ein monospezifischer Antikörper, während K26 als bispezifischer Antikörper eingesetzt werden konnte.

Um eine Kreuzreaktivität der beobachteten Banden in den Zelllinien auf Grund der vorhandenen *E. coli* Antikörper auszuschließen, wurden Präabsorptionsversuche mit K25 und K26 durchgeführt. Dazu wurden die Antikörper mit 0,12–5 µg/µl *E. coli* Proteine für 0,5 h bei R.T. inkubiert und dann an *E. coli* Lysaten und den *CTCL Zelllinien* gegen die nicht präabsorbierten Antikörper im Western Blot getestet. Die Blots zeigten, dass sich ab einer Präabsorption mit 0,25 µg/µl *E. coli* Protein die Banden in den *E. coli* Proben entfernen ließen, während das Bandenmuster in den Zelllinien, d.h. für K25 eine Bande bei 60 kDa und für K26 zwei Banden bei 60 und 72 kDa, erhalten blieben. Das spricht dafür, dass es sich bei den Banden in den eukaryontischen Proteinlysaten nicht um Kreuzreaktivität unspezifischer Antikörper handeln kann, sondern die generierten Antikörper GBP-5 Protein erkennen.

In der **Immunhistologie** wurden die Antikörper an Zytospins von *CTCL Zelllinien* getestet. K25 färbte die Präparate nicht, während K26, K41 und K42 in der immunhistologischen Färbung reagierten.

Die gegen natives Protein hergestellten Antikörper K41 und K42 binden nicht an das denaturierte Protein im Western Blot. Sie zeigten beide ein unspezifisches Bandenmuster in

den *E. coli* Lysaten, da auch bei diesen beiden Antikörpern *E. coli* Proteine mit immunisiert wurden. Aber auch bei den Antikörpern K41 und K42 lassen sich die unspezifischen *E. coli* Antikörper, wie der ELISA, zeigte entfernen.

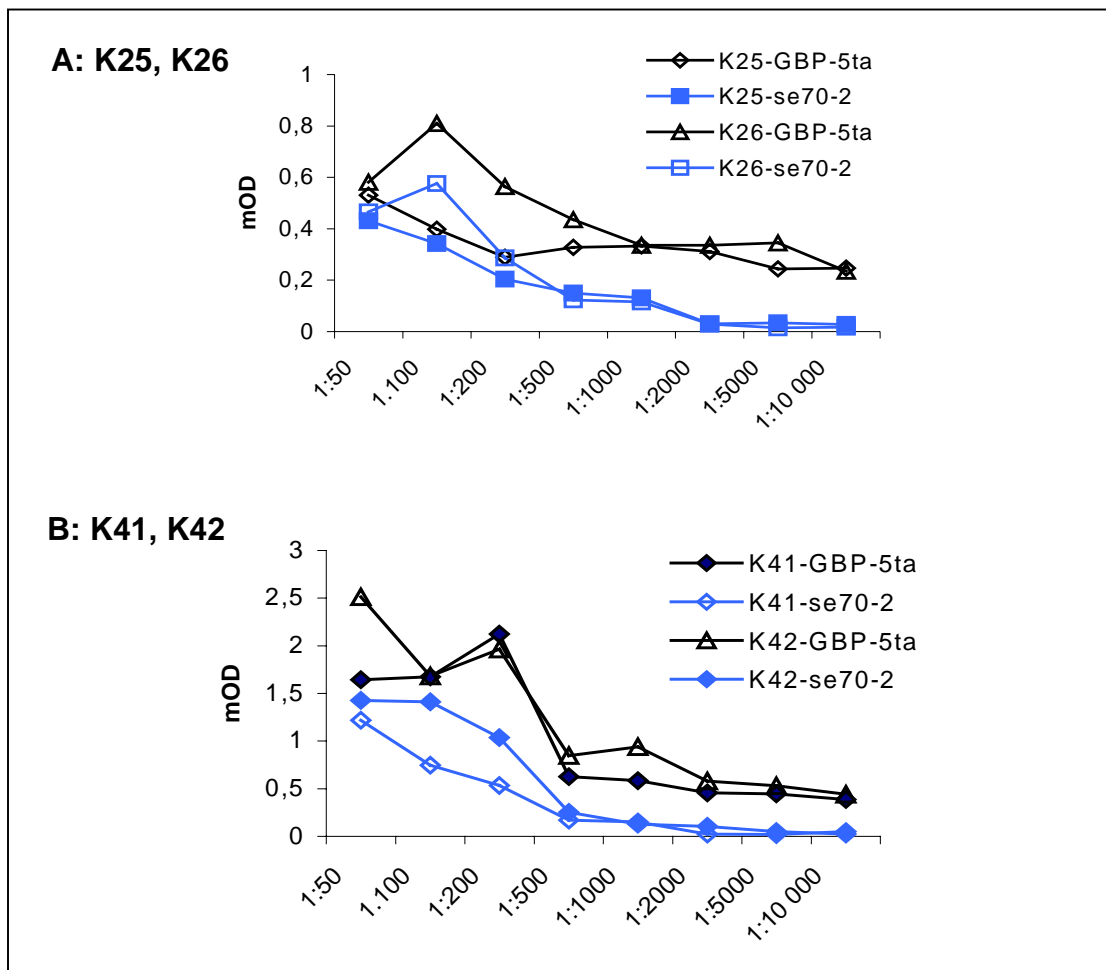


Abbildung 3-10: Titration der präabsorbierten GBP-5ta Antikörper

K25, K26, K41 und K42 sind ab einer Verdünnung von 1:1000 und Präabsorption mit 0,25 µg/µl *E.coli* Proteinen spezifisch für GBP-5ta. K41 und K42 reagierten im ELISA stärker gegen GBP-5ta als K25 und K26.

Im **GST-Xtag ELISA** wurden die GBP-5ta Antikörper mit 0,25 µg/µl *E. coli* Protein präabsorbiert und anschließend in einer Verdünnungsreihe von 1:50-1:10 000 gegen GST-GBP-5ta und GST-se70-2 getestet. Die polyklonalen Antikörper K25, K26, K41 und K42 zeigten spezifische Reaktivität gegen natives GBP-5ta Protein bei einer Verdünnung von 1:1000 - 1:10.000 (Abbildung 3-10). Durch die Präabsorption wurden die Antikörper gegen *E. coli*, die eventuell Kreuzreaktivität hervorrufen könnten, weggefangen. Bei einer Verdünnung von 1:50-1:700 waren alle vier GBP-5ta-Antikörper unspezifisch. Die präabsorbierten Antikörper K25 und K26 zeigten eine schwächere Bindung an natives

rekombinantes GST-GBP-5ta als K41 und K42 (Tabelle 3-10). Als Kontrolle wurde GST-se70-2 aufgetragen, wobei die vier Antikörper ab der Verdünnung 1:1000 nicht gebunden haben und somit spezifisch reagierten.

Tabelle 3-10: Zusammenfassung der generierten anti-GBP-5 Antikörper und ihrer Verwendung

<i>Antikörper</i>		<i>K25</i>	<i>K26</i>	<i>K41</i>	<i>K42</i>
<i>GBP-5ta zur Immunisierung</i>		denaturiert	denaturiert	nativ	nativ
<i>Western Blot</i>	<i>Verdünnung</i>	1:1000	1:1000	unspezifisch	unspezifisch
	<i>Spezifität</i>	GBP-5ta	GBP-5ta/ GBP-5a/b		
<i>GST-Xtag ELISA</i>		1:1000-1: 10.000	1:1000-1: 10.000	1:1000-1: 10.000	1:1000-1:10.000
<i>Immunhistologie</i>		keine Färbung	1:7500	1:500	1:4000
<i>FACS</i>		1:50	1:50	1:50	1:50

Alle vier GBP-5ta Antikörper wurden im Western Blot, GST-XtagELISA, Immunhistologie, und FACS eingesetzt. K25 und K26 eigneten sich am besten für die Western Blot Analysen, während K41 und K42 bevorzugt in der Immunhistologie eingesetzt wurden.

3.3.5.3 Expression in Kontrollgeweben

Mit dem monospezifischen K25 und dem bispezifischen K26 wurden Kontrollgewebe und CTCL Zelllinien untersucht. Alle Kontrollgewebe, die in der RT-PCR mit Primer Paar I und/oder II positiv waren, wurden auf Proteinebene analysiert. K25 detektierte eine 60 kDa Bande (GBP-5ta) in allen vier CTCL Zelllinien (Abbildung 3-11). Dagegen detektierte der Antikörper K26 zwei Banden (60 kDa, GBP-5ta und 72 kDa, GBP-5a/b). Alle Kontrollgewebe mit Ausnahme der peripheren Blut-Monocyten (PBMC) waren GBP-5ta und GBP-5a/b negativ, trotz positiver Expression in der RT-PCR (Tabelle 3-11). In PBMC zeigte GBP-5a/b eine starke und GBP-5ta eine schwache Expression.

Welche Zellen der PBMC für GBP-5ta und/oder GBP-5a/b positiv waren, wurde an aktivierten und unaktivierten CD4+ Zellen, CD8+ Zellen und den restlichen Zellen der PBMC ohne CD4+ und CD8+ untersucht (Abbildung 3-12).

Tabelle 3-11: Vergleichende Analyse der RT-PCR für GBP-5ta/GBP-5b (Primer Paar I) und GBP-5a (Primer Paar II) und Western Blot mit dem bispezifischen K26

		<i>RT-PCR</i>			<i>Western Blot</i> <i>GBP-5ta/GBP-5a/b</i>
		<i>Primer I</i> <i>GBP-5ta/-5b</i>	<i>Primer II</i>		
			<i>GBP-5ta/ GBP-5b</i>	<i>GBP-5a</i>	
	<i>HH</i>	+	+	+	+
<i>CTCL</i>	<i>HuT-78</i>	+	+	+	+
<i>Zelllinien</i>	<i>MyLa</i>	+	+	+	+
	<i>SeAx</i>	+	+	+	+
	<i>Testis</i>	-	-	-	-
	<i>Uterus</i>	-	+	+	-
	<i>Dünndarm</i>	+	+	+	-
	<i>Milz</i>	+	+	+	-
	<i>Magen</i>	+	+	-	-
	<i>Placenta</i>	+	+	+	-
<i>Kontroll- gewebe</i>	<i>Fetale Leber</i>	-	-	-	-
	<i>Brustdrüse</i>	-	-	-	-
	<i>Knochenmark</i>	+	+	+	-
	<i>Dickdarm</i>	-	-	-	-
	<i>Prostata</i>	-	-	-	-
	<i>Skelettmuskel</i>	-	-	-	-
	<i>Gehirn</i>	-	-	-	-
	<i>Luftröhre</i>	-	-	-	-
	<i>PBMC</i>	+	+	+	+

Expressionsanalyse der GBP-5 Spleißvarianten mittels RT-PCR und Western Blot in Kontrollgeweben und CTCL-Zelllinien.

Der K26 Antikörper detektierte in den PBMC (Abbildung 3-12, Spur: 1, vgl. Abbildung 3-11, Spur: 8B) eine Bande für GBP-5a/b und eine schwache Bande für GBP-5ta. Sowohl die inaktivierten als auch die aktivierten CD4+ Zellen waren für beide Proteine positiv. GBP-5ta ist in den nicht aktivierten CD4+ Zellen schwächer exprimiert als in den aktivierten. In den CD8+ Zellen konnte eine starke GBP-5a/b Expression und eine schwache GBP-5ta Expression nachgewiesen werden. In allen restlichen Zellen der PBMC war nur GBP-5a/b exprimiert (Abbildung 3-12, Spur: 7). Die erythromyelozytäre Zelllinie K562 und die embryonale Nierenzelllinie T239 waren für beide Proteine positiv.

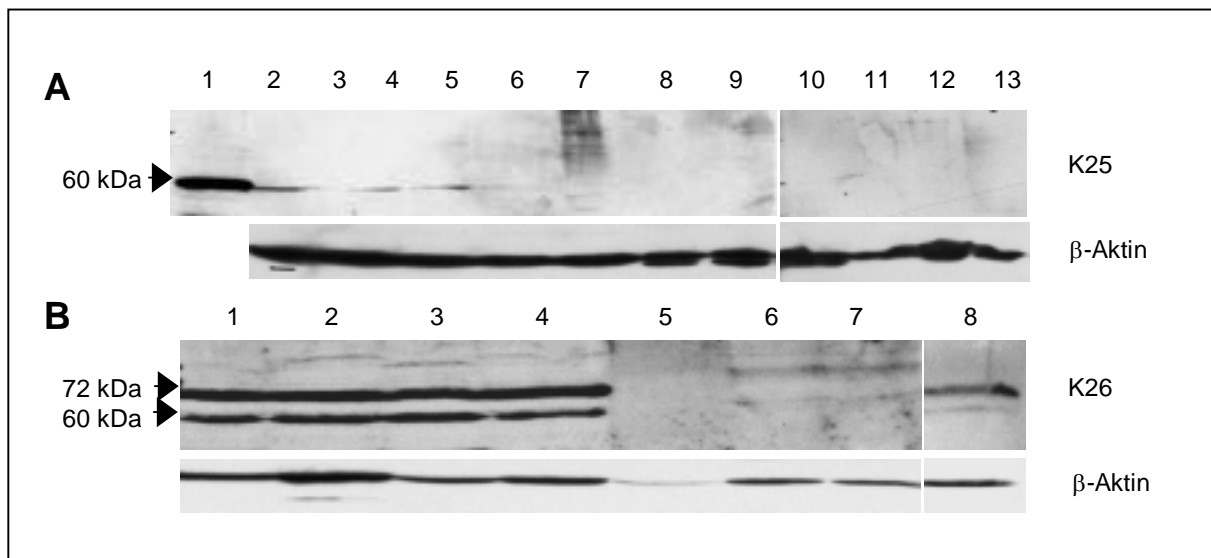


Abbildung 3-11: Western Blot der CTCL Zelllinien und Kontrollgewebe mit K25 (monospezifisch) und K26 (bispezifisch)

A Rekombinantes GBP-5ta (Spur 1), CTCL Zelllinien (2: MyLa, 3: HuT-78, 4: HH, 5: SeAx) und Kontrollgewebe (6: Testis, 7: Uterus, 8: Dünndarm, 9: Milz, 10: Magen, 11: Placenta, 12: Fetale Leber, 13: Brustdrüse). GBP-5ta war als eine Bande von 60 kDa in den vier CTCL Zelllinien zu erkennen, aber in keiner der Kontrollgewebe. **B** GBP-5ta und GBP-5 sind als Banden von 60 und 72 kDa in den CTCL Zelllinien sichtbar (1: MyLa, 2: HuT-78, 3: SeAx, 4: HH). Alle Kontrollgewebe (5: Knochenmark, 6: Testis, 7: Magen, 8: PBMC) außer PBMC waren GBP-5ta und GBP-5a/b negativ.

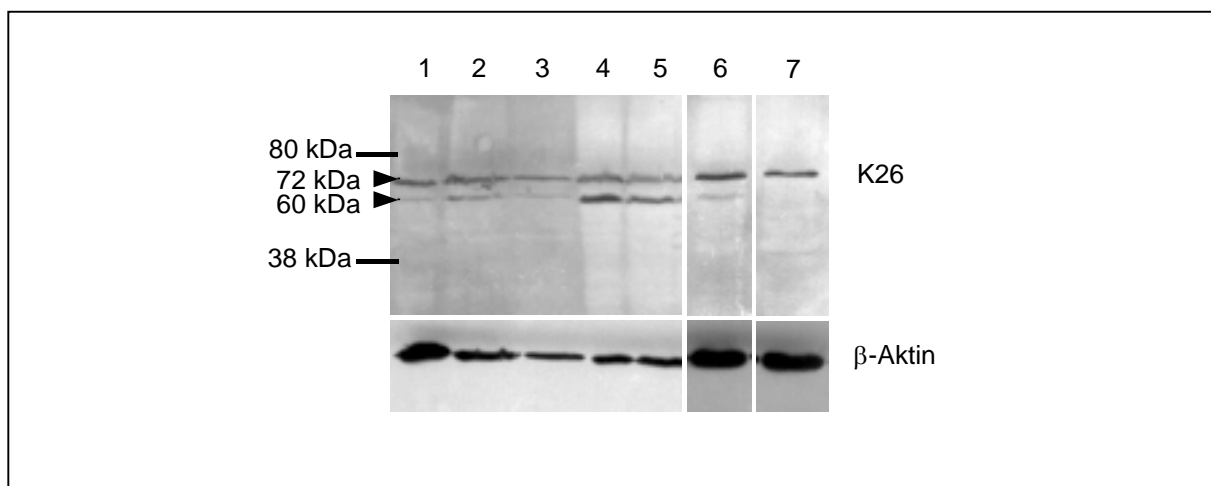


Abbildung 3-12: Analyse der PBMC mit bispezifischen K26

1: PBMC, 2: aktivierte CD4+ Zellen, 3: nicht aktivierte CD4+ Zellen, 4: T293, 5: K562, 6: CD8+Zellen, 7: restliche Zellen der PBMC ohne CD4+ und CD8+. GBP-5ta wird in CD4+ und CD8+ Zellen schwach exprimiert. GBP-5a/b wird in CD4+ und CD8+ Zellen stark exprimiert und ausschließlich in den restlichen PBMCs ohne CD4+ und CD8+.

3.3.5.4 Expression in Tumorgewebe

Im Proteinextrakt von 7/7 CTCL Patienten (2 SS-Patienten, 4 MF-Patienten, 1 CTCL Patient mit unklarer Diagnose) war GBP-5ta als Bande von 60 kDa mit dem bispezifischen K26 nachweisbar (Abbildung 3-13). GBP-5a/b war in keinem der getesteten CTCL Tumorgewebe in nachweisbaren Mengen vorhanden. Von einem Sézary-Patienten (Abbildung 3-13: SS und SS LN) wurde das Tumorgewebe und der Lymphknoten untersucht, wobei im Tumorgewebe wesentlich mehr GBP-5ta nachzuweisen war als im Lymphknoten. MF Patient 1 zeigt die stärkste Expression an GBP-5ta im Tumorgewebe.

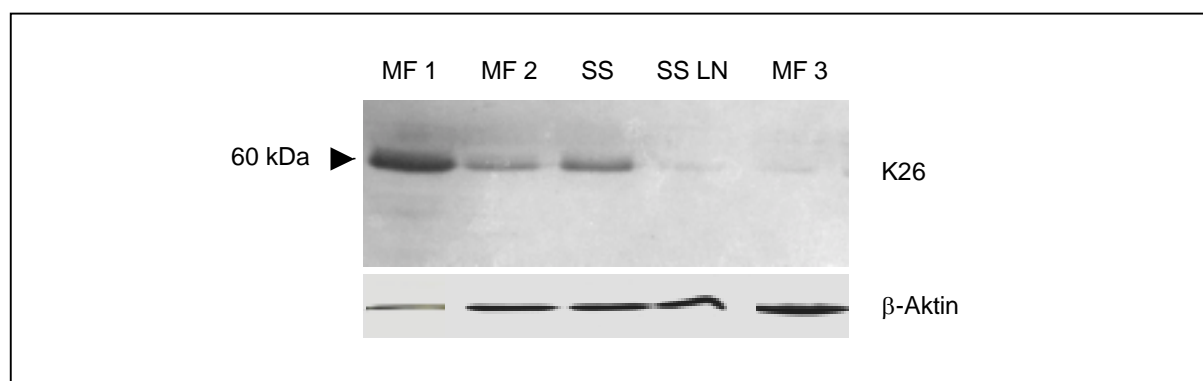


Abbildung 3-13: Western Blot mit CTCL Tumorgewebe mit dem bispezifischen K26

Der Western Blot wurde mit CTCL Tumorgewebe von vier verschiedenen Patienten (MF 1, MF 2, SS, MF 3) und von einem SS Patienten auch mit Lymphknotengewebe (SS LN) mit dem bispezifischen K26 durchgeführt. GBP-5ta konnte als Bande von 60 kDa in verschiedenen Konzentrationen detektiert werden.

6/7 getesteten Melanomzelllinien waren GBP-5a/b (72 kDa) positiv. Ma-Mel 34a war GBP-5ta und GBP-5a/b negativ (Abbildung 3-14; Spur 7). Von einem Patient wurde GBP-5a/b in den PBMC (Abbildung 3-14; Spur 3) nachgewiesen. In den untersuchten Melanomlinien war GBP-5ta gar nicht (Ma-Mel 42, Ma-Mel 12, Ma-Mel 34a, Ma-Mel 05) oder nur als schwache Bande (Ma-Mel 17, Ma-Mel 37a und Ma-Mel 04) zu detektieren.

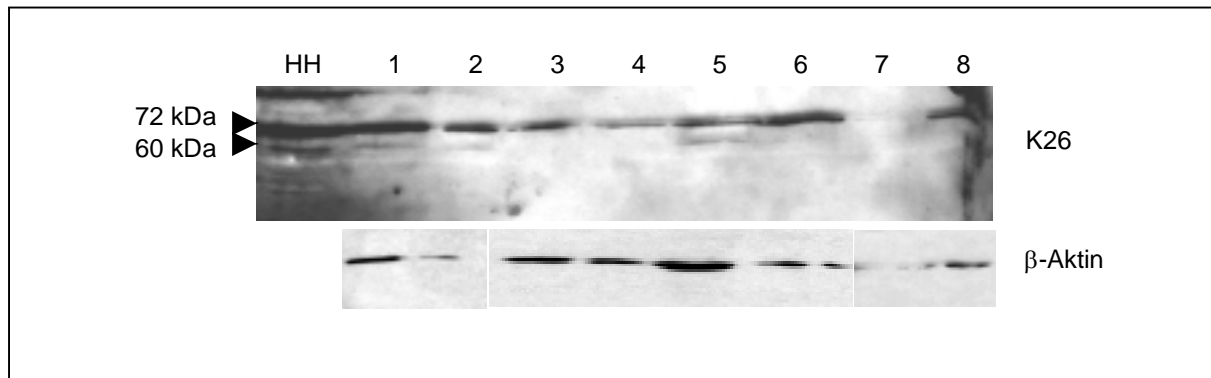


Abbildung 3-14: Western Blot mit Melanom Zelllinien mit dem bispezifischen K26

Western Blot mit sieben verschiedenen Melanom Zelllinien (1: Ma-Mel 17; 2: Ma-Mel 37a; 3: PBMC, 4: Ma-Mel 42; 5: Ma-Mel 04; 6: Ma-Mel 12; 7: Ma-Mel 34a; 8: Ma-Mel 05) und der CTCL-Linie HH als Positivkontrolle. GBP-5a/b ist als Bande von 72 kDa in 6/7 getesteten Zelllinien sichtbar. Ma-Mel 34a (lane 7) ist GBP-5ta und GBP-5a/b negativ. GBP-5ta konnte in HH, sowie als schwache Bande in Ma-Mel 17, Ma-Mel 37a und Ma-Mel 04 detektiert werden.

3.3.5.5 Zelluläre Lokalisation der GBP-5 Varianten

Der Antikörper K41 zeigte 1:500 verdünnt eine intensive perinukleäre Färbung aller vier CTCL Zelllinien wie auch der Melanom-Zelllinie Ma-Mel 33 (Abbildung 3-15). Bei SeAx waren alle Zellen perinukleär gefärbt. Auffällig waren einzelne sehr große gefärbte Zellen (Abbildung 3-15, A). Das Präimmenserum zu K41 zeigte ebenfalls eine Färbung der CTCL-Zelllinien.

K26 färbte alle vier CTCL-Zelllinien ebenfalls intrazellulär (Abbildung 3-15, C), wobei eine Melanomlinie (UKRV-Mel-11a) negativ war. Das Präimmenserum von K26 färbte die Zellen nicht. Für GBP-5ta konnte eine perinukleäre Lokalisation bestimmt werden, was sich mit den Vorhersagen der Computeranalyse deckt.

In einer FACS Analyse wurde die Lokalisation von GBP-5 mit den vier neu generierten Antikörpern K25, K26, K41 und K42 untersucht (Tabelle 3-12). Es wurde zwischen extra- und intrazellulär unterschieden. Alle vier Antikörper zeigten eine stärkere intra- als extrazelluläre Färbung. Entsprechend den Beobachtungen in der Immunhistologie und im ELISA binden K41 und K42 natives Protein besser als K25 und K26. MyLa Zellen wurden mit K41 und K42 zu 73% und 86% gefärbt, während K25 und K26 nur 14% und 19% der Zellen intrazellulär färbten. Die meisten Zellen (bis zu 98%) wurden bei SeAx gefärbt.

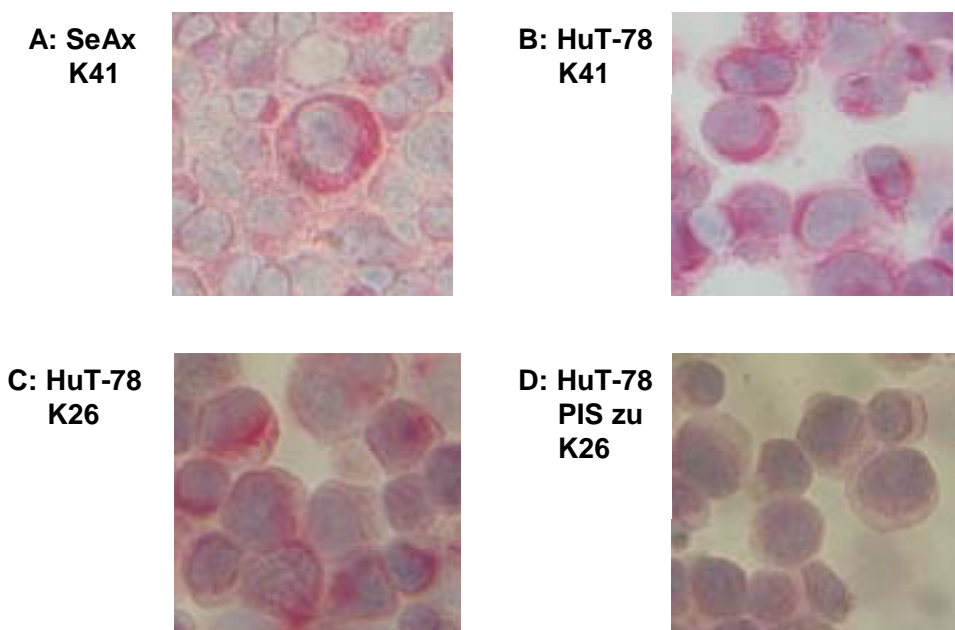


Abbildung 3-15: Zelluläre Lokalisation von GBP-5ta und GBP-5a/b

Repräsentative immunhistologische Färbung mit K41 1:500 verdünnt an der CTCL-Zelllinie SeAx (A) und HuT-78 (B). Immunhistologische Färbung mit K26 1:7500 verdünnt an HuT-78 (C) und dem zugehörigen Präimmunserum (PIS) in gleicher Verdünnung an HuT-78 (D). Zellen in A, B und C zeigten perinukleäre Färbung. Vergrößerung: 300x

	<i>Primärantikörper</i>	<i>SeAx</i>	<i>MyLa</i>	<i>HH</i>	<i>HuT-78</i>
<i>extrazellulär</i>	ohne	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
	K25	6,5%	6,8%	7,3%	3,4%
	K26	4,2%	2,9%	4,9%	2,3%
	K41	3,8%	3,2%	6,0%	1,8%
	K42	7,1%	7,6%	13,0%	2,8%
<i>intrazellulär</i>	ohne	7,0%	1,7%	0,7%	0,4%
	K25	70,0%	14,0%	13,0%	7,5%
	K26	45,0%	19,0%	13,0%	22,0%
	K41	98,0%	73,0%	27,0%	47,0%
	K42	92,0%	87,0%	33,0%	55,0%

Tabelle 3-12: FACS Analyse der GBP-5ta Antikörper

Die Tabelle zeigt die Prozent an positiven Zellen einer intra- und extrazellulären FACS Färbung der CTCL Zelllinien SeAx, MyLa, HH und HuT-78.

3.3.5.6 Epitopmapping

Um das immunogene Epitop von GBP-5ta zu identifizieren, wurde Epitopmapping mit Seren von CTCL Patienten durchgeführt. Es konnte kein eindeutiges Epitop, das einen Großteil der

Seren erkennen würde, gefunden werden. Wahrscheinlich erkennen die gegen GBP-5ta gerichteten Antikörper in den Patientenseren nur gefaltete Epitope.

3.4 Interferon-gamma (IFN- γ) Induktions Assay

Die Familie der GBPs ist, wie vielfach beschrieben wurde, durch IFN- γ induzierbar (Decker et al 1991; Nicolet & Paulnock 1994). Die größte Menge GBPs wird bei der Behandlung mit IFN γ exprimiert. IFN- α und - β induzieren geringere Mengen GBPs (Cheng et al 1986; Vestal et al 2000). Im folgenden Experiment wurde die IFN- γ Induzierbarkeit von GBP-5ta und GBP-5a/b untersucht. Die CTCL Zelllinien HH, HuT-78, MyLa und SeAx wurden für 12 und 36 Stunden mit 10 und 100 Einheiten/ml humanen IFN- γ behandelt. Im Northern und Western Blot wurde die Induktion der GBP mRNA und des Proteins untersucht.

Die Northern Blot Analyse zeigte bei allen vier CTCL-Zelllinien (HH, HuT-78, MyLa, SeAx) und bei der Melanomzelllinie MeWo keine Induktion einer spezifischen hybridisierenden mRNA aber ein gleichmäßiges Muster aus drei Banden mit den Größen 6,8 kb, 4,4 kb und 2,8 kb in jeder Spur. Auf Grund der hohen Homologie der GBP-5 mRNAs zu anderen GBPs konnte nicht ausgeschlossen werden, dass die eingesetzte Sonde auch andere GBPs erkennt, was sich in dem Bandenmuster resultiert.

Proteinextrakt der induzierten Zelllinien nach 12 h wurde mit dem bispezifischen K26 Antikörper im Western Blot untersucht. Es zeigte sich in allen Zelllinien ein immer gleich starkes Doppelbandenmuster (Abbildung 3-16). Die beiden Banden besaßen die Größen 60 kDa (GBP-5ta) und 72 kDa, (GBP-5a/b). Es konnte keine Induktion der Proteine GBP-5ta und GBP-5a/b festgestellt werden, was das Ergebnis des Northern Blots bestätigt.

Der Anti-GBP-1 zeigte in allen vier induzierten Zelllinien im Western Blot keine Induktion des 67 kDa Protein GBP-1. Eine Induktion ICAM-1 (90 kDa; Abbildung 3-17) fand bei HH ab 10 U/ml IFN- γ statt. HLA Klasse I (55 kDa; Abbildung 3-17) war in HuT-78 hochreguliert.

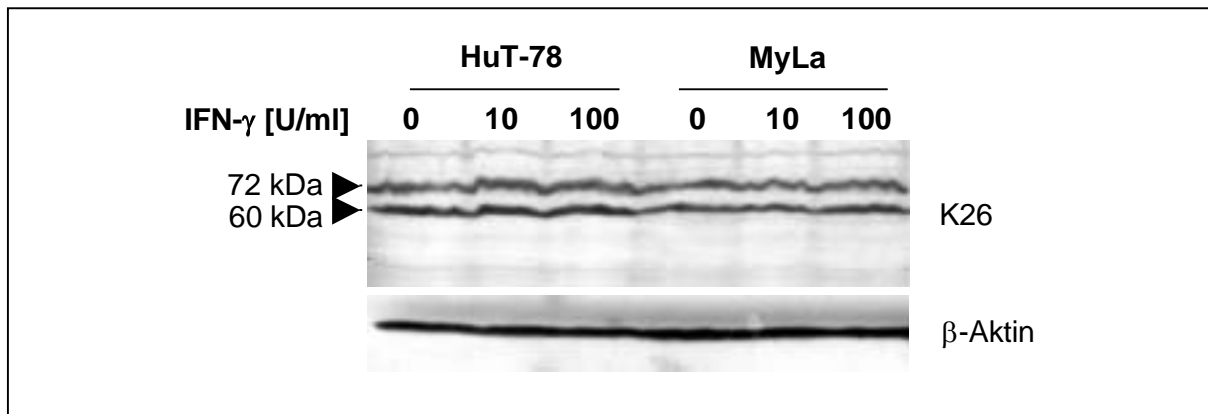


Abbildung 3-16: Western Blot der IFN-γ induzierten CTCL Zelllinien

CTCL Zelllinien (HuT-78, MyLa) mit 0, 10 und 100 U/ml IFN-γ (12 h). K26 erkennt GBP-5ta als Bande von 60 kDa und GBP-5a/b als Bande von 72 kDa. Die Zelllinien HH und SeAx zeigten ebenfalls keine Induktion.

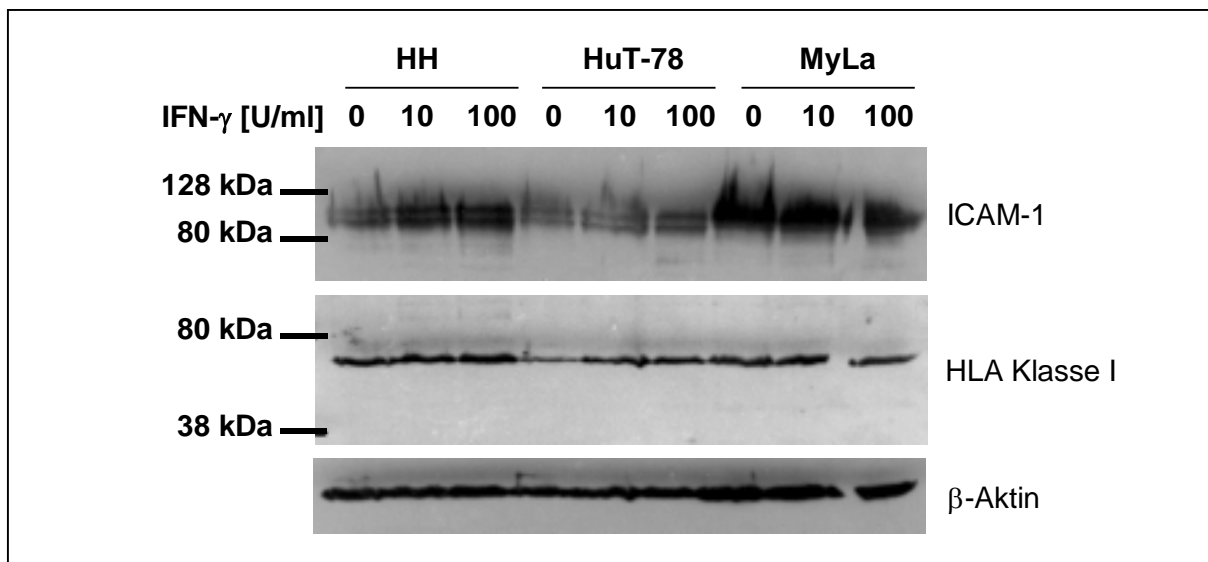


Abbildung 3-17: Western Blot Induktionskontrolle

CTCL Zelllinien (HH, HuT-78, MyLa) mit 0, 10 und 100 U/ml IFN-γ (12 h) induziert. Als Kontrollmarker für die IFN-γ Induktion wurde Anti-ICAM-1 und Anti-HLA Klasse I verwendet. Es wurden die gleichen Proteinproben wie in Abbildung 3-16 aufgetragen. Es ist keine Induktion von ICAM-1 und HLC Klasse I zu erkennen.

3.4.1 Zelluläre Lokalisation von GBP-5 nach IFN-γ Induktion

GBP-1 wird durch IFN-γ induziert und verstärkt prenyliert (Nantais et al 1996). Um eine mögliche induzierte Prenylierung und damit zusammenhängende Membranständigkeit von GBP-5a/b nach Induktion mit IFN-γ zu untersuchen, wurden FACS und immunhistologische Analysen an den vier behandelten CTCL Zelllinien durchgeführt.

Im FACS wurden alle vier Antikörper K25, K26, K41 und K42 an jeweils der uninduzierten Zelllinie und der mit 10 U/ml oder 100 U/ml IFN- γ induzierten Zelllinie getestet. Dabei wurde zwischen intrazellulärer und extrazellulärer Färbung unterschieden. Alle Antikörper wurden vorher an einer CTCL-Zelllinie austitriert und zeigten nur bei 1:50 Reaktivität. In den vier CTCL Zelllinien war ein extremer Anstieg sowohl intrazellulär als auch extrazellulär der detektierten Proteine zu beobachten. Allerdings kann bei der FACS-Analyse nicht sichergestellt werden, um welche induzierten Proteine es sich genau handelt, da die Antikörper nur sehr konzentriert (Verdünnung: 1:50) eingesetzt werden konnten. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Antikörper auch unspezifische Proteine binden. Aufschluss darüber, welche Proteine in den untersuchten Zelllinien vorliegen, lieferten die Western Blot Ergebnisse.

In der immunhistologischen Analyse von Zytospins der uninduzierten und induzierten Zelllinien mit K41 zeigte sich eine deutliche perinukleäre Färbung, die keine Veränderung, d.h. keine Verschiebung der Lokalisation oder Zu- oder Abnahme der Proteinmenge bei Induktion mit IFN- γ aufwies.

4. Diskussion

4.1. Verwendung von Tumorantigenen

Die Identifizierung und molekulare Charakterisierung von Tumorantigenen, die eine spezifische Immunantwort in Tumorpatienten hervorrufen, sind die Basis für eine erfolgreiche Immuntherapie.

Ziel dieser Arbeit war es, bereits identifizierte Tumorantigene des kutanen T-Zell Lymphoms (CTCL) serologisch und expressionsanalytisch zu charakterisieren. Alle untersuchten Tumorantigene hatten positive Ergebnisse im SEREX erbracht und gaben damit Hinweise darauf, dass Tumorpatienten, nicht aber die gesunden Kontrollpersonen, eine humorale Immunantwort entwickelt hatten. Je höher die serologische Reaktivität ist, umso besser sind die Antigene als Marker geeignet. Auch die Kombination von verschiedenen Antigenen als serologisches Markerset, sollte für die Verwendung in Diagnostik, Monitoring und Prognose untersucht werden.

Dazu wurden vier CTCL assoziierte Antigene in einem ELISA Verfahren durch Testen einer großen Anzahl an Seren für die Diagnose und Prognose des CTCL neu evaluiert. Genauer sollten die ATP/GTP bindenden Antigene se2-2 und GBP-5ta sowohl auf DNA- als auch auf Proteinebene charakterisiert werden, um so ihren Wert für die Immuntherapie besser bestimmen zu können.

4.1.1 Prognostik und Diagnostik

Das CTCL ist besonders in den Anfangsstadien nur schwer von chronischen Dermatosen zu unterscheiden (Meissner et al 1991). Durch die Verwendung von Tumorantigenen als spezifische Marker verspricht man sich eine frühere Diagnose und eine bessere Unterscheidung von Patienten mit aggressiven Formen von anderen Erscheinungsbildern. Der T-Zell-Rezeptor wird in der Diagnose eingesetzt, indem über Southern-Hybridisierung (Kern et al 1998) oder über neuere PCR-Ansätze (Assaf et al 2000; Dippel et al 1999) das β -Ketten-Rearrangement des T-Zell-Rezeptors in Lymphknoten analysiert wird. Wenn eine monoklonale T-Zell-Population vorliegt, bedeutet dies für den Patienten eine schlechte Prognose und damit eine Verminderung der Überlebenschance (Munn et al 1996).

Auch die Konzentration der löslichen α -Kette des Interleukin-2 Rezeptors im Serum wurde als Marker beschrieben (Meissner et al 1991; Wasik et al 1996). Für den diagnostischen Nachweis von Tumorzellen mittels RT-PCR oder Northern Blot-Analyse kommen nur tumorspezifisch exprimierte Antigene in Frage.

Zur Zeit werden monoklonale Antikörper, die gegen die differenzierungs- und proliferationsassoziierten Antigene Ki1/CD30, Ki67 und IL2R/CD25 gerichtet sind, zur Diagnose verwendet. Nur die kombinierte Auswertung der Expression dieser Antigene im Patienten liefert eine korrekte Klassifizierung der Erkrankung. Wenn bei SEREX-Analysen Antikörper gegen ein Antigen nur im Patientenserum gefunden werden, so weist dies darauf hin, dass die Antikörperproduktion tumorabhängig ist (Sahin et al 1995). Für die diagnostische Tumorerologie (Old & Chen 1998), zur Beurteilung der Erkrankung oder zur Früherkennung von Rezidiven (Sahin et al 1999) müssen die Antigene im Gegensatz zur Immuntherapie nicht tumorspezifisch exprimiert sein. Die Anzahl an getesteten Tumor- und Kontrollseren muss hoch sein, um eine gesicherte und statistisch relevante Aussage treffen zu können. Die Analyse durch die ELISA Methode eignet sich, um mit einem einfachen Verfahren eine größere Anzahl an Seren als im SEREX testen zu können. Beide Methoden haben ihre Vor- und Nachteile und lassen sich nur bedingt miteinander vergleichen (Lagarkova et al 2003; Stone et al 2003).

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Antigene waren alle im SEREX-Test serologisch spezifisch für das CTCL und damit vielversprechende Kandidaten für Diagnose und Prognose des CTCL (Eichmüller et al 2001; Hartmann et al 2003).

4.1.1.1 Der ELISA in der Krebsdiagnostik

Der Enzym-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) wurde entwickelt, um viele Seren in kurzer Zeit testen zu können. Seine einfache Handhabung eignet sich darüber hinaus für einen routinemäßigen Einsatz. Für die Diagnostik und das Monitoring von Tumorerkrankungen wurden mittlerweile eine Reihe von ELISA etabliert. Ein Beispiel ist der p53-ELISA:

Das Tumorsuppressorprotein p53 stellt einen der wichtigsten Kontrollfaktoren der Zelle dar und reguliert eine Vielzahl von Abläufen (Soussi 2000). In über 50% aller Krebsformen liegt eine Mutation im p53 Gen vor. Aufgrund der Mutation kommt es zur Verlängerung der Lebensdauer von p53 und damit zur Akkumulierung von p53 in der Zelle. Diese Akkumulierung kann dazu führen, dass der Körper gegen p53 Antikörper bildet (Lubin et al

1995a; Zalcman et al 1998). Im Durchschnitt können in 25% der Krebsfälle p53-Autoantikörper nachgewiesen werden. Allerdings bedeutet ein nicht Vorliegen von p53 Antikörpern nicht, dass keine Mutation vorhanden ist. Dafür ist aber der Nachweis von p53 Autoantikörpern eine fast 100%ige Prognose für das Vorhandensein eines Tumors (Lubin et al 1995b).

4.1.2 Immuntherapie

Für eine erfolgreiche Immuntherapie benötigt man gut charakterisierte, tumorassoziierte Antigene. Tumorantigene, die spezifisch auf der Zelloberfläche exprimiert werden, eignen sich als Zielstruktur für Antikörpertherapien. Monoklonale Antikörper können mit zytotoxischen Agenzien wie Radionukliden, Enzymen, Medikamenten oder Toxinen gekoppelt werden (Colcher et al 1999; Meredith et al 1997). Für solche Zwecke ist der murine monoklonale Antikörper CC49 in Kolonkarzinomen in Mäusen erfolgreich angewendet worden (Buchsbaum et al 1999; Safavy et al 1999). Goel und Mitarbeiter entwickelten aus dem CC49 einen tetravalenten Single-chain-Antikörper, um dessen Stabilität, Halbwertszeit im Blut und funktionelle Affinität zu verbessern (Goel et al 2000).

Für das B-Zell-Lymphom wird der monoklonale Antikörper Rituximab eingesetzt, ein chimärer monoklonaler Antikörper, der an CD20, einen spezifischen Rezeptor für B-Lymphozyten, bindet. Erste klinische Untersuchungen zeigten vielversprechende Ergebnisse (Maloney et al 1997; Onrust 1999; Schmitz 1999). Auch die Verwendung von Antikörpern gegen die extrazelluläre Domäne von Her2/neu und den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) erzielten eine adaptive Immunantwort gegen diese tumorassoziierten Antigene mit Tumorregression (Weiner & Adams 2000).

Liegen die Antigene nicht auf der Zelloberfläche, kann man die zytotoxische T-Zell (CTL)-Antwort für eine Immuntherapie nutzen. CTL können abhängig vom HLA-Typ autologe Tumorzellen töten (Berger et al 1996). Dafür müssen HLA-präsentierte Peptide der Tumorantigene von Vorläufer-T-Lymphozyten erkannt werden. So verlaufen zurzeit viele Vakzinierungsstudien HLA-abhängig. Dafür muss das immunogene HLA-abhängige Epitop bekannt sein sowie der HLA-Typ des Patienten. Außerdem muss das Antigen nur im Tumor und nicht in gesundem Gewebe oder zumindest nur in immunprivilegierten Geweben exprimiert sein (Peiper et al 1997). Unter diesen Voraussetzungen kann das Immunsystem so stimuliert werden, dass in vivo eine effektive Immunantwort erzielt werden kann (Peiper et al 1997). Neuere Ansätze versuchen die HLA Restriktion durch Transfektion von Antigen

präsentierenden Zellen (APC) mittels Bakterien oder Viren zu umgehen (Paschen et al 2000; Paschen et al 1999).

Es werden derzeit viele Studien zur Vakzinierungen durchgeführt, wobei die meisten zur Behandlung des malignen Melanoms durchgeführt werden. Man kann Lymphozyten eines Patienten *in vitro* mit Tumorantigenen stimulieren, so dass spezifische CTL gegen diese Antigene entstehen und diese spezifischen CTL dem Patienten wieder übertragen. Der Patient kann aber auch direkt mit einem Tumorantigen bzw. dessen immunogenen Epitop immunisiert und somit die Immunantwort induziert werden. Das therapeutische Potential von Tumorantigenen wurde schon von Jäger et al. (Jäger 1996) mit MAGE-3 und von Yee et al. (Yee et al 1996) mit MelanA/Mart1 und Tyrosinase gezeigt. Es konnten Remissionen in einigen Patienten beobachtet werden. Nestle et al. (Nestle et al 1998) konnten bei Vakzinierung mit dendritischen Zellen, die mit Peptiden oder Tumorlysat beladen wurden, bei fünf von sechzehn Melanom Patienten eine Regression von Metastasen in mehreren Organen beobachten. So wurde eine antigenspezifische Immunität induziert. Marchand und Mitarbeiter konnten bei Vakzinierung mit MAGE-3 Peptiden bei zwei von sechs Patienten eine komplette Remission beobachten (Marchand et al 1995).

In dieser Arbeit wurden das Tumorantigen se2-2 und die GBP-5 Spleißvarianten im Hinblick auf ihre Verwendbarkeit für eine Immuntherapie charakterisiert. Die GTP bindenden Proteine GBP-5a/b und GBP-5ta konnten funktionell und expressionsanalytisch beschrieben werden. GBP-5ta ist auf Proteinebene PBMC und tumorspezifisch exprimiert und könnte daher in der Tumorthherapie des CTCL Verwendung finden.

4.2 GST-Xtag ELISA

Zum ersten Mal wurde in der vorliegenden Arbeit ein ELISA für CTCL assoziierte Tumorantigene entwickelt, um die humorale Immunantwort bei Tumorpatienten in statistisch relevanten Zahlen zu untersuchen.

Um einen ELISA mit aufgereinigtem Protein aufzubauen, wurden die Antigene se57-1, se89-1, se2-2 und GBP-5ta zuerst als Fusionsproteine mit 6x Histidin exprimiert. Von allen Antigenen konnte allerdings mit den beschriebenen Methoden kein aufgereinigtes Protein in ausreichender Menge für den ELISA hergestellt werden. Daher wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt. Gegen aufgereinigtes se2-2 His-tag und GBP-5ta His-tag Protein wurden Antikörper generiert.

Als Vereinfachung des gebräuchlichen ELISA mit aufgereinigtem Protein und auf die CTCL assoziierten Antigene anwendbar, stellte sich der GST-Xtag ELISA dar. Die Antigene se57-1, se70-2, cTAGE-1, se89-1 und GBP-5ta wurden in den pGEX4T3tag Vektor umkloniert. Se89-1 konnte nicht exprimiert werden.

Alle vier GST-Xtag Antigene (se57-1, se70-2, cTAGE-1, GBP-5ta) und GST-tag waren in voller Länge in den bakteriellen Lysaten als prominente Bande im Western Blot identifizierbar und blieben nach einer 30 min Zentrifugation in Lösung. Durch Affinität der Gluthation S-Transferase zu Gluthation war eine einfache Aufreinigung aus den geklärten Lysaten möglich. Über das in jedem Antigen vorhandene C-terminale Markerepitop konnte die Menge von Protein in voller Länge für jedes Antigen mit demselben System ermittelt werden. Das erlaubte die Verwendung vergleichbarer Antigenmengen im ELISA. Ungeachtet ihrer unterschiedlichen Größe und Struktur banden alle Fusionsproteine und GST-tag als Kontrollprotein mit ähnlichen Maximalmengen auf der ELISA Platte (Abbildung 3-2). Die Antigene waren auch bei gesättigten Proteinmengen pro Loch nicht zu dicht auf der Platte gepackt, sondern ließen noch die Bindung an ihren an die Plastikoberfläche gebundenen GST-Teil und an ihren tag-Teil durch Immunglobuline zu.

4.2.1 Reaktivitäten im se57-1, se70-2, cTAGE-1 und GBP-5ta ELISA

Se70-2 zeigte einzelne sehr hohe Antikörperreaktivitäten, trotzdem reagierten die CTCL- und Melanomseren zu den Kontrollseren nicht signifikant häufiger. Für cTAGE-1 konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied der CTCL- und Melanomseren gegenüber der Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Dies resultiert vermutlich aus der geringen Größe von GST-cTAGE-1 mit 37 kDa insgesamt, von denen 26 kDa allein auf das GST-Fusionsprotein entfielen. Daher war die Bindung spezifischer Antikörper wahrscheinlich durch das große GST sterisch behindert.

Die Reaktivitäten der CTCL-Seren im Vergleich zu den Kontrollseren waren bei GBP-5ta signifikant verschieden ($p=0,002$). Die mOD Werte lagen unter dem Cut-off Wert von 26. Die Melanom- und Kontrollseren waren nicht signifikant unterschiedlich.

Im se57-1 ELISA waren die Parapsoriasis-Seren signifikant ($p<0,0001$) reaktiver als die Kontrollgruppe. Die Reaktivitäten der CTCL-Seren gegen se57-1 waren ebenfalls signifikant ($p<0,0001$) erhöht gegenüber den Kontrollseren.

Die Reaktivitäten im se57-1, se70-2, cTAGE-1 und GBP-5ta ELISA waren nur halb so hoch verglichen mit den ELISA Ergebnissen von E6 und E7 Antigenen des human Papilloma Virus (HPV) aus der Literatur (Meschede et al 1998). Grund dafür könnte die wesentlich höhere Immunogenität von Virusantigenen im Vergleich zu den CTCL assoziierten *Autoantigenen* sein. Autoantigene sind körpereigene Proteine, die vom Immunsystem als „fremd“ angesehen werden. In normalen Individuen werden autoreaktive T-Zellen nach der Präsentation des erkannten Selbst-Peptids durch APC entweder im Thymus eliminiert oder in der Peripherie inaktiviert. Bei einer Fehlfunktion dieser Mechanismen, wie sie im Tumor vorliegen können, kann es zu Antikörper und T-Zell vermittelten Immunreaktionen gegen die körpereigenen Antigene kommen (Abu-Shakra et al 2001; Janeway & Travers 1997). Daher ist der Nachweis einer Immunantwort gegen diese Selbst-Peptide eher ungewöhnlich und daher schwächer als gegen Fremd-Peptide von Bakterien oder Viren.

4.2.2 se57-1

Der se57-1 ELISA fällt durch die hohe Signifikanz der Patientenserum und besonders der Gruppe der Parapsoriasis-Seren auf. Ihr tatsächlicher Unterschied zu den Kontrollen betrug 58,5 nach dem Lehmann Schaezter Test. Im Gegensatz zum GBP-5ta ELISA liegen die signifikant höheren Mediane der Parapsoriasis- und CTCL-Seren gegen se57-1 über dem Cut-off Wert (Abbildung 3-3).

Parapsoriasis beschreibt eine heterogene Gruppe von Hautkrankheiten, die durch schuppige Flecken oder Plaques beschrieben werden und i.d.R. mit Entzündungen einhergehen (Emmerich 2000). 17 der getesteten Parapsoriasispatienten wurden mit der großfleckigen Parapsoriasis (large plaque parapsoriasis = LPP) und drei Patienten mit der Lymphomatoiden Papulose diagnostiziert. Die großfleckige Parapsoriasis kann in ein kutanes T-Zelllymphom übergehen und wird als mögliche Vorstufe der MF diskutiert (Burg et al 2001; Jung 1995). Die Lymphomatoide Papulose ist in den meisten Fällen eine monoklonale Proliferation von CD4+ Zellen in der Haut (Emmerich 2000). Klinisch charakteristisch sind in Gruppen auftretende rötliche Papeln, die sich spontan wieder zurückbilden und narbig verheilen (Emmerich 2000).

Burg und Mitarbeiter diskutieren die Entstehung einer Neoplasie aus einer Entzündung. Bei der MF ist bekannt, dass sie aus einer chronischen Entzündung hervorgehen kann (Burg et al 2001). Wie die serologischen Ergebnisse im ELISA zeigten, reagierten sowohl CTCL-Seren als auch die Parapsoriasis-Seren gegen se57-1. Damit ist se57-1 kein serologisch spezifisches

Antigen für das CTCL, aber ein Marker für CTCL und Parapsoriasis. Das Bindeglied zwischen der Parapsoriasis und dem CTCL stellt die Entzündung dar. Zu se57-1 wurde des Weiteren ein homologes EST gefunden, dass durch den respiratorischen Syncytialvirus (RSV) induziert wird. Die Erkrankung mit dem RS-Virus ruft grippale Infekte hervor, die mit Entzündungen der Rachen- und Luftröhrenschleimhäute sowie der Bronchien einher gehen (Martinez 2003). Auch hier liegt somit eine Verbindung zur Entzündung vor und damit ist dies ein weiterer Hinweis, dass es sich bei se57-1 um einen Entzündungsmarker handeln könnte.

Die se57-1 mRNA wurde nur in 21% (n=28) Kontrollgeweben gefunden und auch im CTCL Tumorgewebe war se57-1 mRNA nur in 6% (n=17) exprimiert (Eichmüller et al 2001).

Um se57-1 als möglichen Entzündungsmarker zu bestätigen, sollte eine Analyse von Seren weiterer entzündlicher Erkrankungen durchgeführt werden.

4.2.3 Follow-up von immunbehandelten Patienten

Mit den Antigenen se70-2 und GBP-5ta wurden im GST-Xtag ELISA Seren von immunbehandelten Patienten getestet. Pro Patient wurden mehrere Seren nach wiederholten Immunisierungen und ein Serum vor der Immunisierung untersucht.

Fünf CTCL Patienten wurden mit dem handelsüblichen Masernimpfstoff behandelt. Das Masernvirus gehört zu den Paramyxoviridae und besitzt einzelsträngige RNA in Negativorientierung. Es befällt Makrophagen, Endothelzellen, Mono- und Lymphozyten. Im Verlauf der akuten Erkrankung sorgen vor allem CTL für die Eliminierung virusinfizierter Zellen. Des Weiteren werden virusspezifische CD4⁺ T-Zellen vom T_H2 Typ aktiviert. Sie sezernieren Cytokine, die Makrophagen und weitere T-Zellen aktivieren und die Proliferation von B-Zellen induzieren. Beim Masernimpfstoff handelt es sich um einen attenuierten Lebendimpfstoff, der vor allem CD4⁺ Zellen vom Typ T_H2 aktiviert (Bedford 2003; Gerike & Tischer 1993). Da das CTCL vorwiegend aus T_H2-Zellen besteht, versprechen sich Dummer und Mitarbeiter durch diese Immunisierungsstrategie eine immunstimulatorische Wirkung.

In der zweiten Impfstudie wurden neun CTCL Patienten mit einem rekombinanten Adenovirus immunisiert. Die Adenoviridae haben ein doppelsträngiges, lineares Genom. Sie infizieren bevorzugt Epithelzellen des Pharynx, des Dünndarmes sowie die Konjunktivalzellen. Der in der klinischen Studie unter der Leitung von Prof. Dummer verwendete rekombinante Adenovirus trägt ein Gen für das humane IFN- γ . Dieses Gen ist in

die E1 Region des Adenovirus 5 integriert was dazu führt, dass E1 und E3 deletiert sind und der Adenovirusvektor sich nicht unabhängig vermehren kann. Das vom CMV Promoter gesteuerte IFN- γ -Gen wird über das Adenovirus in die humanen Zellen transfiziert, wo es zu lokaler IFN- γ Expression kommt.

Die Ergebnisse des GST-Xtag ELISA dieser immunisierten Patienten geben wenig Aufschluss über systemische Effekte der Immunisierungen durch steigende Antikörpermengen gegen se70-2 und GBP-5ta. Es wurden von jedem Patienten mehrere Serumproben im Verlauf der Therapie untersucht. Die mOD Werte sind sehr gestreut, besonders bei den Patienten, die mit dem Adenovirus immunisiert wurden. Bei den Patienten, die mit dem Masernimpfstoff behandelt wurden, lagen fast alle Reaktivitäten unter dem Cut-off von se70-2 und GBP-5ta. Patient 4 (Abbildung 3-4; P4) zeigte für GBP-5ta die höchsten mOD Werte, die bis auf die letzten beiden Werte über dem Cut-off Wert lagen. Um aber auf einen statistisch relevanten Anstieg der Antikörper in Patient 4 nach Immunisierung schließen zu können, müssten mehr Seren getestet werden.

Für ein zuverlässiges und statistisch relevantes Monitoring der Antikörperantworten, müsste eine größere Anzahl von Seren und Antigenen getestet werden. Möglich ist allerdings auch, dass sich über die Antikörperantwort keine Aussage über den immunmodulierenden Effekt machen lässt, sondern die Immunantwort nur auf Ebene der CD8+ und/oder CD4+ T-Zellen nachzuweisen ist.

4.2.4 Validierung des GST-Xtag ELISA für CTCL assoziierte Antigene

Vergleicht man die Ergebnisse der vier GST-Xtag ELISA mit den SEREX Ergebnissen (Tabelle 4-1) der entsprechenden Phagen, zeigen sich bei allen Antigenen Abweichungen der Seroreaktivitäten.

Während im GST-Xtag ELISA 3,2-10,7% der Kontrollseren positiv waren, reagierte im SEREX kein Kontrollserum. Die CTCL-Seren waren für se57-1 im SEREX zu 30% (n=15) positiv und lagen im Test mit der GST-Xtag ELISA Methode bei 45% (n=60). Die Antigene cTAGE-1 und GBP-5ta zeigten gravierende Abweichungen der Reaktivitäten bei CTCL-Seren.

Während für GBP-5ta im SEREX 60% (n=16) der CTCL-Seren positiv waren, sind im GST-Xtag ELISA nur noch 10% (n=112) der Seren positiv. Ähnlich war das Bild bei cTAGE-1. Waren in den SEREX Analysen noch 33% (n=30) der CTCLs für cTAGE-1 positiv, waren im

ELISA dagegen 3,6% (n=112) positiv. Se70-2 zeigte im SEREX 10% positive CTCL Seren, im ELISA waren 5,4% (n=112) reaktiv.

Tabelle 4-1: Vergleich der Seroreaktivität der CTCL und Kontrollseren im SEREX und im ELISA (Eichmüller et al 2001; Fellenberg et al 2003)

<i>Tumorantigen</i>		<i>se57-1</i>		<i>se70-2</i>		<i>cTAGE-1</i>		<i>GBP-5ta</i>	
<i>Methode</i>		<i>SEREX</i>	<i>ELISA</i>	<i>SEREX</i>	<i>ELISA</i>	<i>SEREX</i>	<i>ELISA</i>	<i>SEREX</i>	<i>ELISA</i>
<i>Kontrollseren</i>	<i>%Positive (n)</i>	0% (9)	10,7% (149)	0% (6)	3,2% (93)	0% (17)	4,3% (93)	0% (9)	3,2% (93)
<i>CTCL-Seren</i>	<i>%Positive (n)</i>	33% (15)	45% (60)	10% (10)	5,4% (112)	33% (30)	3,6% (112)	60% (16)	9,8% (112)

Die Tabelle zeigt die serologischen Ergebnisse des sekundären SEREX mit den Antigenen se57-1, se70-2, cTAGE-1 und GBP-5ta. Untersucht wurden CTCL-Seren und Kontrollen.

Um die Unterschiede zwischen den ELISA und SEREX Ergebnissen erklären zu können, werden im folgenden die einzelnen Komponenten „Protein“, „Serum“ und „Auswertung“ der beiden Methoden miteinander verglichen:

Protein: Im SEREX liegt die cDNA mit „Untranslated Region“ (UTR) des Antigens im pBluescript-Vektor vor. Welches Protein bzw. welche Proteine genau translatiert werden, ist unbekannt. Es ist also möglich, dass neben dem ORF auch kleine Proteinfragmente der UTR translatiert werden, die immunogen sind. Im ELISA wurde die kodierende Sequenz im Leseraster in den Expressionsvektor pGEX4T3tag kloniert und damit, wie der Western Blot bestätigt, nur ein definiertes Protein exprimiert. An diesem Protein hängt N-terminal das 26 kDa große GST. Eventuell können immunogene Epitope durch das GST-Fusionsprotein sterisch behindert werden, wie es für cTAGE-1 vermutet werden kann. Ein weiterer möglicher Grund für die höheren Reaktivitäten im SEREX als im ELISA, könnte auch in der Nativität des Proteins liegen. Während das Antigen im SEREX nativ vorliegt, ist das Antigen im ELISA durch den Bakterienaufschluß in der French Press und die Behandlung durch Detergenzien wie Sarkosyl und DTT (siehe Material und Methoden) verändert. Dadurch befindet sich das Antigen im ELISA sicherlich in einem veränderten Zustand gegenüber dem Antigen der SEREX-Analyse.

Serum: Im SEREX sind die Seren 1:100 verdünnt und aufwendig gegen *E. coli*- und Phagenproteine präabsorbiert. Im ELISA werden die Seren in der Verdünnung 1:50 eingesetzt und 0,5 h mit 0,25 µg/µl *E. coli* Lysat bei R.T. sehr einfach präabsorbiert.

Im SEREX werden meist Seren aus späteren Krankheitsstadien verwendet, die einen höheren Antikörpertiter besitzen (Stone et al 2003; Talpur et al 2002). Im ELISA wurde dagegen eine wesentlich größere Anzahl an zufällig zusammengestellten Seren aus allen Krankheitsstadien und Altersgruppen getestet (Abendstein et al 2000), was die geringere Anzahl positiver Seren erklären könnte.

Auswertung: Die Ergebnisse im ELISA wurden objektiv mittels des ELISA-Readers gemessen. Ob ein Serum positiv war oder nicht, wurde mit dem Antigen-spezifischen Cut-off Wert bestimmt (siehe Material und Methoden). Die SEREX Analyse erfolgt visuell durch den Vergleich positiver und negativer Plaques auf einem Membranabschnitt. Diese Form der Auswertung birgt mehr Fehlerquellen in sich (Verhältnis der positiven zu den negativen Plaques, ungleiche Entwicklung etc.) als die Cut-off Bewertung im ELISA. Andererseits ist aber auch der Cut-off für die untersuchten Autoantigene diskussionswürdig. Da die Reaktivitäten gegen Autoantigene sehr niedrig sind, verglichen mit z.B. Virusantigenen, ist es fraglich, ob der berechnete Cut-off Wert nicht zu hoch liegt und damit positive Seren verloren gehen. Dies könnte für GBP-5ta der Fall sein: die Unterschiede zwischen CTCL- und Kontrollseren sind zwar statistisch signifikant, ein großer Teil der Werte liegen aber unter dem ermittelten Cut-off Wert.

Zusammenfassend ist der in dieser Arbeit entwickelte ELISA mit den vier getesteten Autoantigenen nur bedingt für die Diagnostik oder Prognose des CTCL geeignet. Eventuell würde sich die Zusammenstellung von weiteren CTCL assoziierten Antigenen mit GBP-5ta, bei dem sich die CTCL-Gruppe von der Kontrollgruppe signifikant unterschied, als besser erweisen. Jedoch konnte der Beweis erbracht werden, dass die ELISA Methode grundsätzlich für Autoantigene geeignet ist. Das Beispiel GBP-5ta zeigt, dass die Reaktivitäten gegenüber starken immunogenen Antigenen schwächer sind, jedoch eine statistische Signifikanz erreichen können. Die sinnvolle Festlegung der Cut-off Werte muß für Autoantigene neu ermittelt werden.

Die bislang entwickelten ELISA mit Tumorantigenen zeigten alle ebenfalls keine hohen Reaktivitäten. Stockert et al. untersuchten 234 Seren von Krebspatienten und 70 von Kontrollpersonen an den Tumorantigenen NY-ESO-1, MAGE-1, MAGE-3, MelanA, Tyrosinase und SSX (Stockert et al 1998). NY-ESO-1 zeigte die höchste Reaktivität mit 9,4% (12/127) der Melanomseren, 12,5% (4/32) der Ovarialkarzinomseren, 4,2% (1/24) der Lungenkrebsseren und 7,7% (2/26) der Seren von Brustkrebspatienten (Stockert et al 1998). Gegen MelanA und Tyrosinase reagierte keines der 234 Patientenseren. Drei Patientenseren

besaßen Antikörper gegen MAGE-1, zwei Seren gegen MAGE-3 und ein Serum gegen SSX2 (Stockert et al 1998). Vergleichbar mit dem ELISA dieser Arbeit liegen gegen die Tumorantigene nur schwache und niedrig frequente humorale Antworten vor. Lagarkova und Mitarbeiter diskutieren den Unterschied zwischen ELISA und SEREX damit, dass der ELISA zwar einfacher und robuster ist, aber weniger sensitiv als die SEREX Methode (Lagarkova et al 2003). Somit ist der ELISA vermutlich die geeignete Methode für sehr immunogene Antigene wie Entzündungsmarker oder Virusantigene, und weniger für schwach immunogene Autoantigene wie es bei se70-2, cTAGE-1 und GBP-5ta der Fall ist. Hier scheint die SEREX Methode der sensitivere Nachweis für die vorhandenen Antikörper zu sein.

4.3 Tumorantigene mit bekannter Funktion

Für die erfolgreiche Entwicklung von Antigen-spezifischen Tumorthérapien ist eine genaue Charakterisierung der Antigene und ihrer Funktion erforderlich. Nur von wenigen Tumorantigenen, wie z.B. SCP-1 (Meuwissen et al 1997), OY-TES-1 (Baba et al 1994) und CT-15/Fertilin- β (Primakoff & Myles 2000; Vidaeus et al 1997) sind Funktionen bekannt. Da zu den Tumorantigenen se2-2 und GBP-5 ein Hinweis zu ihrer Funktion in Form einer ATP/GTP bindenden Stelle gefunden wurde, war ihre Charakterisierung besonders interessant.

Se2-2 ist sowohl auf DNA-Ebene als auch auf Protein-Ebene differentiell exprimiert (Tabelle 3-4) und im SEREX serologisch spezifisch für das CTCL. 30% (n=10) der getesteten CTCL-Seren waren positiv jedoch kein Kontrollserum (n=5) (Tabelle 4-1). Dieses Tumorantigen besitzt, wie auch das homologe KIAA0373, eine ATP/GTP bindende Stelle. Genauere Funktionen konnten se2-2 bislang nicht zugeordnet werden. Se2-2 ist gegenüber KIAA0373 N-terminal um 685 AS verkürzt, was eventuell mit einem Funktionsverlust verbunden sein könnte.

4.3.1 Familie der Guanylat-bindenden Proteine

In den folgenden Abschnitten wird die Analyse der GBP-5 Antigene und ihre Verwendbarkeit in der Diagnostik und Immuntherapie diskutiert.

Guanin Nukleotid bindende Proteine spielen eine wichtige Rolle in verschiedenen zellulären Prozessen wie der Proteinsynthese, Signaltransduktion, intrazellulärem Proteintransport, Zellproliferation, Differenzierung und Regulation des Zytoskeletts (Bourne et al 1990; Bourne

et al 1991). Die Familie der Guanylat-bindenden Proteine (GBP) gehört zu den großen GTPasen (67-73 kDa). Sie unterscheiden sich durch ihre unterschiedliche Affinität zu GTP, GDP und GMP. Sie können nicht nur GTP zu GDP hydrolysieren, wie die gewöhnlichen GTPasen, sondern auch zu GMP (Bourne et al 1991). Bisher wurden GBPs vom Menschen (Cheng et al 1991), von der Maus (Boehm et al 1998; Vestal et al 2000; Wynn et al 1991; Anderson et al 1999], der Ratte (Asundi et al 1994) und dem Huhn (Schwemmle et al 1996) kloniert.

Humanem GBP-1 und GBP-2 wurden ein antiviraler Effekt gegen den „Vesicular Stomatitis Virus“ (VSV) und das Encephalomyocarditis Virus (EMCV) nachgewiesen (Anderson et al 1999). Transfiziert man HeLa Zellen mit humanem GBP-1 oder GBP-2, werden die Zellen resistent gegen den VSV und EMCV und produzieren wesentlich weniger virale Nachkommen als Kontrollzellen (Anderson et al 1999).

Alle murinen GBPs sowie das humane GBP-1 sind durch Interferon induzierbar (Anderson et al 1999; Gorbacheva et al 2002; Nantais et al 1996; Nguyen et al 2002). Interferone gehören zu einer Familie von regulatorischen Molekülen, die an Oberflächenrezeptoren binden und auf diesem Wege einen antiviralen, antiproliferierenden Effekt und verschiedene andere Immunantworten auslösen (Lengyel 1982; Pestka 1987). Die zelluläre Antwort auf Interferone beinhaltet die transkriptionelle Induktion von hunderten von Genen (Stark et al 1998; Sen & Ransohoff 1993). IFN- γ ruft eine stärkere Induktion der GBPs hervor als IFN- α und - β . Andere Moleküle wie EGF, Insulin und Serum induzieren kein GBP-1 Protein (Cheng et al 1983). IFN- γ behandelte HeLa Zellen produzieren weniger virale Nachkommen als IFN- γ behandelte HeLa Zellen, deren HuGBP-1 RNA mit antisense GBP-1 RNA ausgeschaltet wurde (Anderson et al 1999). Zellen, die murines GBP-2 exprimieren, wachsen schneller und dichter, was darauf schließen lässt, dass mGBP-2 bei der Wachstumskontrolle der Zelle eine Rolle spielt (Gorbacheva et al 2002). Die bisher am besten untersuchten GBPs sind die humanen GBP-1 und GBP-2. Entsprechend der Kristallstruktur von humanem GBP-1 befindet sich N-terminal eine nukleotidbindende Stelle mit Sequenzmotiven, die sich von der bekannten Ras Struktur unterscheiden (Prakash et al 2000a; Prakash et al 2000b). Die GBPs besitzen nicht das dritte GTP bindende Motiv (N/TxPG), welches viele andere GTP bindende Proteine wie auch Ras aufweisen (Cheng et al 1991). Darüber hinaus besitzen alle humanen GBPs, außer GBP-3 und GBP-4, ein CaaX Isoprenylierungsmotiv am C-Terminus und werden *in vivo* isoprenyliert (Nantais et al 1996).

4.3.2 Tumorantigene GBP-5ta und GBP-5a/b

GBP-5 repräsentiert ein neues Gen der GBP-Familie, dessen drei Spleißvarianten in zwei Proteine (GBP-5a/b und GBP-5ta) translatiert werden. GBP-5ta ist C-terminal um 97 AS gegenüber GBP-5a/b verkürzt. Über 50% der CTCL-Seren aber keines der Kontrollseren haben mit GBP-5ta in SEREX Untersuchungen reagiert, was auf eine hohe Immunogenität von GBP-5ta hindeutet. Interessanterweise ist das verkürzte Protein (GBP-5ta) im SEREX immunogener als das Voll-Längen-Protein GBP-5a/b. Das immunogene Epitop von GBP-5ta konnte mittels Epitopmapping (siehe Material und Methoden) mit CTCL-Seren nicht eindeutig bestimmt werden. Das deutet darauf hin, dass GBP-5ta nur in seiner gefalteten Form von Antikörpern erkannt wird.

Expression

Um die Expression der GBP-5 Proteine zu untersuchen, wurden Antikörper gegen rekombinantes GBP-5ta hergestellt. Die Antikörper K25 und K26 wurden für die Western Blot Analysen verwendet. Folgende Argumente sprechen für die GBP-5ta Spezifität der Antikörper K25 und K26:

Damit die Antikörper nur gegen das definierte rekombinante GBP-5ta Protein generiert wurden, wurde eine ständige *Qualitätskontrolle* durchgeführt. Die Bande des His-tag GBP-5ta wurde ansequenziert und ergab das richtige Protein. Das Ausschneiden der Bande wurde durch paralleles Blotten eines Gelstreifens aus demselben Gel und Nachweis des rekombinanten Proteins mit dem Anti-Xpress Antikörper überprüft. Eventuelle *E. coli* Antikörper lassen sich, wie das Präabsorptionsexperiment zeigte, im Western Blot und im ELISA entfernen.

Des Weiteren waren die präabsorbierten GBP-5ta Antikörper K25, K26, K41 und K42 im *GST-Xtag ELISA* ab einer Verdünnung von 1:1000 spezifisch.

Es zeigte sich, dass die detektierten Banden von K25 und K26 in den Zelllinien bei *Präabsorption* mit 1 µg/µl *E. coli* Protein erhalten blieben, während sich die unspezifischen *E. coli* Banden wegpräabsorbieren ließen. Trotz der vorhandenen Anti-*E. coli* Antikörper sind die polyklonalen Antikörper K25 und K26 mono- bzw. bispezifisch für GBP-5ta und GBP-5a/b (Abbildung 3-11, A: Spur 2-5 und B: Spur 1-4).

Mit Hilfe von drei Primer Paaren, wurde die Expression der Spleißvarianten untersucht. GBP-5ta, GBP-5a und GBP-5b RNA waren in Normalgeweben differentiell exprimiert. Die RT-PCR detektierte GBP-5ta/-5b in 26-58% der CTCL Tumorgewebe und in 45% der Melanome (Tabelle 3-9). Primer Paar III, das die letzten beiden Exons amplifiziert, die bei GBP-5ta fehlen, war in 100% der Normalgewebe positiv. Vermutlich liegen alle drei Spleißvarianten in der Zelle gleichzeitig vor, so dass es schwer ist, spezifisch GBP-5ta in der RT-PCR zu detektieren.

Die Expression der GBP-5 Proteine wurde im Western Blot analysiert. Alle getesteten Kontrollgewebe außer den PBMCs waren negativ für GBP-5ta und GBP-5a/b (Abbildung 3-11). Die PBMCs waren für GBP-5a/b positiv und GBP-5ta war schwach exprimiert. Die genauere Analyse der PBMC zeigte, dass GBP-5ta und GBP-5a/b in CD8+ Zellen exprimiert sind, aber nur schwach in CD4+ Zellen. GBP-5ta wird in nicht aktivierten CD4+Zellen schwächer exprimiert als in aktivierten (Abbildung 3-12). In den übrigen Zellen der PBMC ohne die CD4+ und CD8+ Zellen wird GBP-5a/b und schwach GBP-5ta exprimiert. GBP-5ta ist damit nahezu tumorspezifisch, da es in PBMC nur sehr schwach exprimiert wird. Auch der ErbB2(Her2) Rezeptor, gegen den der monoklonale Antikörper Herceptin eingesetzt wird, ist nicht tumorspezifisch. ErbB2(Her2) wird in Brusttumoren überexprimiert und ist auch zusammen mit dem Corezeptor ErbB4 für die Entwicklung von Herz Ventrikeln essentiell (Özcelik et al 2002). Daher kommt es bei der kombinierten Therapie mit Herceptin und Chemotherapeutika in 27% der behandelten Patienten zur Kardiomyopathie (Tham et al 2002).

In CTCL Tumorgewebe wurde GBP-5ta in verschieden starken Mengen exprimiert aber kein GBP-5a/b nachgewiesen (Abbildung 3-13), während im Melanom vorwiegend GBP-5a/b detektiert wurde (Abbildung 3-14). Drei Melanomlinien zeigten auch eine schwache Bande für GBP-5ta (Abbildung 3-14; Lane 1, 2, 5). Die CTCL Zelllinien HuT-78, HH, SeAx und MyLa waren für GBP-5ta und GBP-5a/b positiv.

Diese Abweichung zwischen der RNA Expression und der Proteinexpression wurde auch bei anderen Genen beobachtet: SART-1 und SART-3 fanden sich im Northern Blot in fast allen Normalgeweben, während die Proteine für SART-3 tumorspezifisch und SART-1 nur in Tumorgewebe, Fetaler Leber und der Testis detektiert wurden (Kikuchi et al 1999; Shichijo et al 1998).

Da sich die drei GBP-5 Varianten in der RT-PCR nicht eindeutig spezifizieren ließen, konnte nur die Analyse der Proteine GBP-5ta und GBP-5a/b eindeutigen Aufschluß über ihre Expression liefern. GBP-5ta konnte als PBMC spezifisches Tumorantigen charakterisiert werden.

4.3.2.1 Zelluläre Lokalisation

Murines GBP-1 und GBP-2 wurden in IFN- γ behandelten Makrophagen und Fibroblasten auf ihre subzelluläre Lokalisation untersucht. MuGBP-2 trat granulär im Zytoplasma verteilt auf und war außerdem in vesikelartigen Strukturen verschiedener Größe und Verteilung zu finden (Vestal et al 2000). Dabei war die Lokalisation in den Vesikeln von der Isoprenylierung abhängig. Humanes GBP-1 wurde in Blase, Lunge, Magen, Kolon, Leber besonders aber in Endothelzellen und entzündeter Haut nicht aber in gesunder Haut immunhistochemisch nachgewiesen (Lubeseder-Martellato et al 2002).

Die GBP-5 Proteine konnten in immunhistologischen Färbungen mit dem Antikörper K26 in den vier CTCL Zelllinien HuT-78, HH, SeAx, MyLa und perinukleär lokalisiert werden, während die Melanomzelllinie UKRV-Mel-11a negativ war. Die Färbungen zeigten ein granuläres Erscheinungsbild. Das Präimmenserum von K26 färbte HuT-78 nicht (Abbildung 3-15). Auch mit dem Antikörper K41 konnten die vier CTCL-Zelllinien cytoplasmatisch gefärbt werden, allerdings zeigte das zugehörige Präimmenserum ebenfalls eine Färbung der Zellen.

In IFN- γ behandelten CTCL-Zelllinien konnte keine veränderte Lokalisation von GBP-5 beobachtet werden. Dies könnte eventuell an einer Interferon-Resistenz der CTCL Zelllinien liegen, zumal dies für das CTCL bereits gezeigt wurde (Dummer et al 2001).

Die FACS Analyse der vier GBP-5ta Antikörper bestätigt die beobachtete intrazelluläre Lokalisation von GBP-5. Während die Antikörper die CTCL-Zelllinien extrazellulär zwischen 1,8 bis 7,6% markierten, wurden die Zellen intrazellulär zwischen 7,5 bis 98% gefärbt (Tabelle 3-12).

4.3.2.2 Induktion der GBPs durch IFN- γ

IFN- γ Applikation induziert die Expression der GBPs (Decker et al 1991; Nicolet & Paulnock 1994). Daher wurde die Induzierbarkeit von GBP-5ta und GBP-5a/b in CTCL-Zelllinien untersucht. Bei keiner der vier CTCL-Zelllinien war nach IFN- γ Behandlung eine Induktion

der GBP mRNA zu sehen. Im Western Blot zeigten GBP-5a und GBP-5a/b keine Induktion (Abbildung 3-16).

Dies lässt sich vermutlich durch die IFN- γ Resistenz der CTCL-Zelllinien erklären (Dummer et al 2001; Willers et al 2001). Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um einen Tumor-Escape-Mechanismus der T_{H2} Tumorzellen, um der Inaktivierung durch T_{H1} Zellen zu entgehen (Dummer et al 2001). Auch ein Drittel der humanen Melanome und nicht-Adenokarzinoma-Lungentumoren zeigen eine quantitative Reduktion der IFN- γ T_{H2} Sensitivität. 24% der Lungen Adenokarzinoma Linien sind vollständig IFN- γ T_{H2} resistent (Kaplan et al 1998).

Um die Induktion mit bekannten Markern zu überprüfen, wurden die ICAM-1, HLA Klasse I und die GBP-1 Expression untersucht. IFN- γ und TNF- α induzieren HLA Klasse I und ICAM-1 in Tumoren und in nicht-malignen Zellen (Carrel et al 1985). ICAM-1 wird in Ovartumoren unter Behandlung mit IFN- γ und TNF- α hochreguliert (Santin et al 1996).

In den induzierten CTCL-Zelllinien konnte im Western Blot eine Induktion von ICAM-1 bei HH und von HLA Klasse I bei HuT-78 gezeigt werden (Abbildung 3-17). GBP-1 wurde nicht durch IFN- γ induziert, was in der Tat auf eine veränderte Interferon Antwort hindeutet. Möglicherweise handelt es sich um eine Interferon-Resistenz der CTCL Zelllinien.

4.3.2.3 Zytogenetik

Zytogenetische Untersuchungen von Knochenmark, PBMCs und Hauttumoren von MF Patienten in frühen Stadien zeigten chromosomale Abnormalitäten in 100% der Tumorzellen, während die Knochenmark- und Blutzellen karyotypisch normal waren (Burg et al 2001). Die Region zwischen 1p22 und 1p36 ist eine potente Region zur Identifizierung von Genen, die in den Prozess der malignen Transformation oder Progression des MF beteiligt sind (Burg et al 2001). GBP-5a und GBP-5b sowie die verkürzte Variante GBP-5ta sind auf Chromosom 1p22 lokalisiert. Dieser Bereich wurde in der Literatur vielfach auf Grund seiner chromosomalen Abnormalitäten in Tumoren beschrieben (Cigudosa et al 1999; Dave et al 2002; Parada et al 1998).

4.3.3 GBP-5ta: ein potentiell Onkogen

Das bekannteste Mitglied der GTPasen im Zusammenhang mit Krebs ist das Ras Protein. Seine bedeutende Rolle in der Regulation von Zellwachstum und Differenzierung bestätigt

sich dadurch, dass in 70% der Neoplasien mutierte Varianten auftraten. Die häufigsten Mutationen findet man in der 12. und 13. AS. Weitere Mutationen wurden in AS 59 und 61 gefunden. Diese Mutationen im *ras* Gen erzeugen aktives Ras, das dauerhaft die Proliferation stimuliert (Abbildung 1-2). Die Mutation des Cysteins der CaaX-Box verhindert die Farnesylierung und damit die Ras Funktion. Nicht farnesyliertes Ras wirkt nicht onkogen. Die verlorene GTPase Aktivität durch eine Therapie wiederherzustellen ist äußerst schwierig. Einfacher zu therapieren ist die Überreaktivität mutierter Ras-Proteine. Das Enzym Farnesyltransferase (FTase) überträgt einen Isoprenylrest von Farnesyldiphosphat auf die Seitenkette des Cysteins. Neue Therapieansätze zielen darauf ab, diese FTase zu inhibieren. FTase-Inhibitoren befinden sich mittlerweile in ersten klinischen Erprobungen (Cox & Der 2002).

Sequenzvergleiche von GBP-5 mit dem humanen GBP-1 deuten auf ähnliche GTPase und Isoprenylierungseigenschaften hin. An dem C-terminalen Isoprenylierungsmotiv (CaaX-Box) können an den Cysteinrest des Proteins posttranslational Farnesyl oder Geranyl-Geranyl Gruppen angehängt werden, wodurch das Protein hydrophober wird und in der Membran verankert werden kann (Clarke 1992; Glomset et al 1990; Lowy & Willumsen 1989; Zhang & Casey 1996). Viele Mitglieder der Ras-Familie sowie die humanen GBP-1 und GBP-2 werden prenyliert (Newman & Magee 1993). Für GBP-5 ist das Prenylierungsmotiv die Sequenz „CVLL“. Alle GBPs, die die CaaX Box tragen, außer MuGBP-5 und HuGBP-1, enden C-terminal mit einem Leucin. Die bevorzugte Isoprenylierung des Leucins ist das Geranyl-Geranyl, was für die GBPs der Ratte und MuGBP-2 bestätigt wurde (Asundi et al 1994; Vestal et al 1998). Dass die CaaX Sequenz in der Familie der GBPs stark konserviert ist, lässt vermuten, dass die Isoprenylierung eine wichtige Funktion hat. Da GBP-5ta C-terminal verkürzt ist, fehlt ihm dieses Motiv, weshalb GBP-5ta vermutlich nicht in der Membran verankert werden kann und/oder seine Funktion verliert.

Durch Kristallisation von humanem GBP-1 mit und ohne gebundenem Nukleotid konnten Acht AS definiert werden, die für die katalytische GTPase Aktivität essentiell sind. Sieben dieser AS sind in GBP-5 ebenfalls vorhanden. Die einzige ausgetauschte Aminosäure stellt das neutrale Ala¹⁰⁷ bei GBP-5a/b gegen das neutrale Gly¹⁰⁷ bei GBP-1 dar, wobei sich die beiden AS nur in einer angehängten Methylgruppe beim Alanin unterscheiden. Am N-Terminus der GBPs finden sich zwei der drei GTP bindenden Motive GxxxxGK(S/T), DxxG und (N/T)KxD (Dever et al 1987). Das dritte Motiv ((N/T)KxD), welches in den meisten GTPasen konserviert und verantwortlich für die Erkennung von Guanidin Basen ist, fehlt

(Cheng et al 1991). Trotzdem binden die GBPs Guanidin Nukleotide nicht aber Adenin, Cytosin oder Thymin (Praefcke et al 1999). Homolog zum humanen GBP-1 besitzt GBP-5 das „Phosphate Cap“, welches dafür sorgt, dass nur Wasser Zugang zum γ -Phosphat hat (Tabelle 3-6).

Murines GBP-5 ist zu dem humanen GBP-5 homologer als zu den anderen vier murinen GBPs. Auch beim murinen GBP-5 wurden zwei verschiedene Varianten gefunden. MuGBP-5 besitzt die zwei GTP bindenden Motive GxxxxGK(S/T) und DxxG und eine C-terminale Isoprenylierungsstelle. N-terminal ist MuGBP-5a um 112 AS verkürzt und C-terminal verlängert. Dadurch fehlt die Isoprenylierungsstelle (Nguyen et al 2002). Damit haben das humane und das murine GBP-5 verschiedene Spleißvarianten, von denen jeweils bei einer das Isoprenylierungsmotiv verloren gegangen ist.

Für GBP-1 wurde ein antiproliferierender Effekt auf Endothelzellen unabhängig von seiner GTPase Aktivität und der Isoprenylierung nachgewiesen. Guenzi et al. (Guenzi et al 2001) klonierten den N-terminalen und den C-terminalen Teil, um die funktionelle Domäne zu identifizieren. Sie zeigten, dass der N-terminale Bereich fast keinen antiproliferierenden Effekt hat, während der C-terminale Teil zur Inhibierung der Endothelzellproliferation essentiell ist. Bei GBP-5ta fehlt dieser C-terminale Teil, was einen wichtigen Einfluß auf die mögliche anti-proliferierende Funktion von GBP-5 haben könnte. GBP-5ta könnte somit mitverantwortlich oder Auslöser einer unkontrollierten Proliferation im Tumor sein.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Immuntherapien auf der Basis gut charakterisierter, tumorspezifischer Antigene stellen ein vielversprechendes Konzept der Tumorthherapie dar. Ein potentielles Antigen für immuntherapeutische Strategien sollte möglichst tumorspezifisch exprimiert sein und es sollte einen Hinweis auf bereits erfolgte Immunantworten im Patienten geben, wie z.B. die Existenz spezifischer Antikörper oder zytotoxischer T-Zellen (CTL). Eine membranständige Lokalisation ist für die Verwendung von Tumorantigenen in Antikörpertherapien notwendig. Während für viele Neoplasien Tumorantigene bekannt sind, wurden für das kutane T-Zell Lymphom (CTCL) bislang nur sehr wenige tumorassoziierte Antigene identifiziert.

Die Antigene se57-1, se70-2, cTAGE-1 und GBP-5ta wurden durch serologisches Durchsuchen einer Phagenbank aus Testis- bzw. Tumorgewebe (SEREX-Methode) identifiziert. In der vorliegenden Arbeit wurde die Immunogenität dieser vier Tumorantigene in einem neu entwickelten ELISA mit CTCL-, Parapsoriasis-, Melanom- und Kontrollseren untersucht. se70-2 und cTAGE-1 Protein erkannten nur wenige Patientenseren. Für GBP-5ta konnte dagegen eine signifikant höhere Reaktivität der CTCL-Seren im Vergleich zu den Kontrollseren ermittelt werden. Bei se57-1 waren die CTCL- und die Parapsoriasisseren hoch signifikant verschieden zu den Kontrollseren. Dieses putativ virusinduzierte Antigen sollte in zukünftigen Arbeiten auf seine mögliche Funktion als Entzündungsmarker weiter untersucht werden. Für das CTCL sollten weitere Kombinationen von Tumorantigenen auf ihren diagnostischen Wert in der Serologie getestet werden.

Des Weiteren konnten in dieser Arbeit die CTCL assoziierten Antigene se2-2 und die GBP-5 Familie genauer charakterisiert werden: Die Expressionsanalyse von se2-2 Protein und mRNA in verschiedenen Normalgeweben zeigte ein differentielles Expressionsmuster. Im SEREX wurde se2-2 serologisch spezifisch nur von CTCL-Seren erkannt. Möglicherweise wäre se2-2 eine geeignete Zielstruktur für die serologische Diagnostik des CTCL. Aufgrund seiner fehlenden Tumorspezifität ist se2-2 für die Immuntherapie jedoch wenig geeignet.

Die neu identifizierte GBP-5 Familie besteht aus mindestens drei Spleißvarianten (GBP-5ta, GBP-5a und GBP-5b), die zwei Proteine, GBP-5ta und GBP-5a/b, kodieren. GBP-5ta ist gegenüber GBP-5a/b C-terminal um 97 AS verkürzt. GBP-5ta mRNA wird differentiell exprimiert, während GBP-5ta Protein PBMC-spezifisch exprimiert wird. In CTCL-Tumorgewebe konnte GBP-5ta nachgewiesen werden, wogegen in Melanomzelllinien fast

ausschließlich GBP-5a/b vorliegt. Gegen GBP-5ta konnte eine humorale Immunantwort bei CTCL-Patienten nachgewiesen werden: Im SEREX wurde GBP-5ta nur von CTCL-Patientenseren erkannt. Auch in der ELISA-Methode reagierten signifikant mehr Patientenseren als Kontrollseren mit GBP-5ta. Die höhere Immunogenität von GBP-5ta gegenüber GBP-5a/b im SEREX unterstreicht die Bedeutung der verkürzten Variante. Ob CTL gegen GBP-5ta präsentierende Zellen existieren, wird momentan untersucht.

Die GBP-5 Spleißvarianten sind hoch homolog zur Familie der GTPasen, zu denen auch das Onkogen Ras gehört. Das verkürzte Protein von GBP-5ta könnte durch den Verlust der C-terminalen Domäne seine eventuelle anti-proliferierende Funktion verlieren. Ein Knock-out Versuch von GBP-5 könnte die Bedeutung von GBP-5 in der Tumorzelle untersuchen. Darüber hinaus wäre es vielversprechend, die GTPase Aktivität der GBP-5 Varianten in einem GTP-Bindungs-Assay zu überprüfen. GBP-5ta könnte eine mögliche Ursache des unkontrollierten Wachstums der Tumorzelle und somit eine vielversprechende potentielle Zielstruktur für therapeutische Ansätze für das CTCL sein.

6 Summary and perspectives

Immunotherapies represent a promising concept of tumor-therapies on the basis of well characterized, tumor-specific antigens. A potential antigen for immunotherapeutic strategies should be preferably tumor-specific expressed and should give a reference to immune responses in the patient, already taken place, as by antibodies or cytotoxic T-cells (CTL). A localization in the membrane is necessarily for antibody therapies. While for many neoplasia tumor antigens are known, the cutaneous t-cell lymphoma (CTCL) so far only very few tumor-associated antigens were identified.

The tumor antigens, se57-1, se70-2, cTAGE-1 and GBP-5ta were identified by screening a testis and tumor tissue phage library (SEREX approach). In this work the immunogenicity of this four antigens was investigated in a newly developed ELISA using sera from CTCL, Parapsoriasis and melanoma patients as well as healthy controls.

The ELISA results showed that only few patient sera reacted against se70-2 and cTAGE-1. CTCL sera reacted significantly more frequent against GBP-5ta than control sera. se57-1 protein was detected by sera from CTCL and Parapsoriasis patients, but hardly by any control sera. This putativ virus-induced antigen should be further examined for its possible function as inflammation marker. For the CTCL further combinations of tumor antigens should be tested to their diagnostic value.

The CTCL associated antigens se2-2 and antigens of the GBP-5 family could be characterized in this work. The expression analysis of se2-2 protein and mRNA in different control tissues showed a differential expression. Secondary screening by SEREX indicated a serological specificity for se2-2. se2-2 could be a suitable target for serological diagnostic of the CTCL but due to its missing expression specificity se2-2 is little suitable for immunotherapy.

The newly identified GBP-5 family consists of at least three splicing variants (GBP-5ta, GBP-5a and GBP-5b), coding for two proteins, GBP-5ta and GBP-5a/b. GBP-5ta is C-terminally truncated by 97 aa in comparison to GBP-5a/b. GBP-5ta mRNA is differentially expressed, while GBP-5ta protein is PBMC-specific. GBP-5ta is expressed in CTCL tumor tissue, while in melanoma cell lines almost exclusively GBP-5a/b was found. A humoral immune response in CTCL patients against GBP-5ta could be: SEREX indicated a serological specificity. Accordingly to the ELISA method significantly more patients' sera than control sera reacted against GBP-5ta. The higher immunogenicity of GBP-5ta in comparison to GBP-5a/b

underlines the importance of the shortened variant. Whether CTL exist against GBP-5ta epitopes presently examined. The GBP-5 splicing variants are highly homologous to the GTPase superfamily including the ras oncogen. The loss of the C-terminal domain might be one reason why the truncated protein GBP-5ta loses its possible anti-proliferating function. GBP-5 knock-out experiments could examine the meaning of GBP-5 in the tumor cell. Beyond that, it would be promising to examine the GTPase activity of the GBP-5 variants in a GTP-binding-assay. GBP-5ta could be a possible cause of the uncontrolled growth of the tumor cell and thus a promising potential target for therapy for the CTCL.

7 Literatur

- Abendstein, B., Marth, C., Muller-Holzner, E., Widschwendter, M., Daxenbichler, G., Zeimet, A. G. 2000. Clinical significance of serum and ascitic p53 autoantibodies in epithelial ovarian carcinoma. *Cancer* 88:1432-7.
- Abrams, J. T., Vonderheid, E. C., Kolbe, S., Appelt, D. M., Arking, E. J., Balin, B. J. 1999. Sezary T-cell activating factor is a Chlamydia pneumoniae-associated protein. *Clin Diagn Lab Immunol* 6:895-905
- Abu-Shakra, M., Buskila, D., Ehrenfeld, M., Conrad, K., Shoenfeld, Y. 2001. Cancer and autoimmunity: autoimmune and rheumatic features in patients with malignancies. *Ann Rheum Dis* 60:433-41.
- Akritis, M. G., LaValley, M. P. 1996. Nonparametric inference in factorial designs with censored data. *Biometrics* 52:913-24.
- Anderson, S. L., Carton, J. M., Zhang, X., Rubin, B. Y. 1999. Genomic organization and chromosomal localization of a new member of the murine interferon-induced guanylate-binding protein family. *J Interferon Cytokine Res* 19:487-94.
- Anderson, S. L., Carton, J. M., Lou, J., Xing, L., Rubin, B. Y. 1999. Interferon-induced guanylate binding protein-1 (GBP-1) mediates an antiviral effect against vesicular stomatitis virus and encephalomyocarditis virus. *Virology* 256:8-14.
- Angelopoulou, K., Yu, H., Bharaj, B., Gjai, M., Diamandis, E. P. 2000. p53 gene mutation, tumor p53 protein overexpression, and serum p53 autoantibody generation in patients with breast cancer. *Clin Biochem* 33:53-62.
- Assaf, C., Hummel, M., Dippel, E., Goerdts, S., Muller, H. H., et al. 2000. High detection rate of T-cell receptor beta chain rearrangements in T-cell lymphoproliferations by family specific polymerase chain reaction in combination with the GeneScan technique and DNA sequencing. *Blood* 96:640-6
- Asundi, V. K., Stahl, R. C., Showalter, L., Conner, K. J., Carey, D. J. 1994. Molecular cloning and characterization of an isoprenylated 67 kDa protein. *Biochim Biophys Acta* 1217:257-65.

- Atalay, A., Crook, T., Ozturk, M., Yulug, I. G. 2002. Identification of genes induced by BRCA1 in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 299:839-46.
- Baba, T., Niida, Y., Michikawa, Y., Kashiwabara, S., Kodaira, K., et al. 1994. An acrosomal protein, sp32, in mammalian sperm is a binding protein specific for two proacrosins and an acrosin intermediate. *J Biol Chem* 269:10133-40.
- Baccard, M., Marolleau, J. P., Rybojad, M. 1997. Middle-term evolution of patients with advanced cutaneous T-cell lymphoma treated with high-dose recombinant interleukin-2. *Arch Dermatol* 133:656.
- Bagot, M., Echchakir, H., Mami-Chouaib, F., Delfau-Larue, M., Charue, D., et al. 1998. Isolation of tumor-specific cytotoxic CD4⁺ and CD4⁺ CD8dim⁺ T-cell clones infiltrating a cutaneous T-cell lymphoma. *Blood* 91:4331-4341
- Bagot, M., Moretta, A., Sivori, S., Biassoni, R., Cantoni, C., et al. 2001a. CD4(+) cutaneous T-cell lymphoma cells express the p140-killer cell immunoglobulin-like receptor. *Blood* 97:1388-91.
- Bagot, M., Nikolova, M., Schirm-Chabanette, F., Wechsler, J., Boumsell, L., Bensussan, A. 2001b. Crosstalk between tumor T lymphocytes and reactive T lymphocytes in cutaneous T cell lymphomas. *Ann N Y Acad Sci* 941:31-8.
- Bakker, A., Schreurs, M., de Boer, A., Kawakami, Y., Rosenberg, S., et al. 1994. Melanocyte lineage-specific antigen gp100 is recognized by melanoma-derived tumor-infiltrating lymphocytes. *J Exp Med* 179:1008-1009
- Ballare, C., Barrio, M., Portela, P., Mordoh, J. 1995. Functional properties of FC-2.15, a monoclonal antibody that mediates human complement cytotoxicity against breast cancer cells. *Cancer Immunol Immunother* 41:15-22.
- Baselga, J., Mendelsohn, J. 1994. Receptor blockade with monoclonal antibodies as anti-cancer therapy. *Pharmacol Ther* 64:127-54.
- Baselga, J., Tripathy, D., Mendelsohn, J., Baughman, S., Benz, S. S., et al. 1999. Phase II study of weekly intravenous trastuzumab (Herceptin) in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. *Semin Oncol* 26:78-83
- Bedford, H. 2003. Measles: the disease and its prevention. *Nurs Stand* 17:46-52; quiz 54-5.

- Berd, D., Maguire, H. C., Jr., McCue, P., Mastrangelo, M. J. 1990. Treatment of metastatic melanoma with an autologous tumor-cell vaccine: clinical and immunologic results in 64 patients. *J Clin Oncol* 8:1858-67.
- Berger, C., Longley, B., Imaeda, S., Christensen, I., Heald, P., Edelson, R. 1998. Tumor-specific peptides in cutaneous T-cell lymphoma: association with class I major histocompatibility complex and possible derivation from the clonotypic T-cell receptor. *Int J Cancer* 76:304-311
- Berger, C., Wang, N., Christensen, I., Longley, J., Heald, P., Edelson, R. 1996. The immune response to class I-associated tumor-specific cutaneous T-cell lymphoma antigens. *J Invest Dermatol* 107:392-397
- Berger, C. L., Hanlon, D., Kanada, D., Dhodapkar, M., Lombillo, V., et al. 2002. The growth of cutaneous T-cell lymphoma is stimulated by immature dendritic cells. *Blood* 99:2929-39.
- Berger, C. L., Longley, J., Hanlon, D., Girardi, M., Edelson, R. 2001. The clonotypic T cell receptor is a source of tumor-associated antigens in cutaneous T cell lymphoma. *Ann N Y Acad Sci* 941:106-22.
- Berke, Z., Andersen, M. H., Pedersen, M., Fugger, L., Zeuthen, J., Haurum, J. S. 2000. Peptides spanning the junctional region of both the abl/bcr and the bcr/abl fusion proteins bind common HLA class I molecules. *Leukemia* 14:419-26.
- Bilbe, G., Delabie, J., Brügggen, J., Richener, H., Asselbergs, FAM., et al. 1992. Restin: a novel intermediate filament-associated protein highly expressed in the Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *EMBO J* 11: 2103-2113
- Bhattacharya-Chatterjee, M., Chatterjee, S. K., Foon, K. A. 2000. Anti-idiotypic vaccine against cancer. *Immunol Lett* 74:51-8.
- Bocchia, M., Korontsvit, T., Xu, Q., Mackinnon, S., Yang, S. Y., et al. 1996. Specific human cellular immunity to bcr-abl oncogene-derived peptides. *Blood* 87:3587-92.
- Boehm, U., Guethlein, L., Klamp, T., Ozbek, K., Schaub, A., et al. 1998. Two families of GTPases dominate the complex cellular response to IFN-gamma. *J Immunol* 161:6715-23.

-
- Boller, K., Janssen, O., Schuldes, H., Tonjes, R. R., Kurth, R. 1997. Characterization of the antibody response specific for the human endogenous retrovirus HTDV/HERV-K. *J Virol* 71:4581-8.
- Boon, T. 1993. Tumor antigens recognized by cytolytic T lymphocytes: present perspectives for specific immunotherapy. *Int J Cancer* 54:177-80.
- Bourne, H. R., Sanders, D. A., McCormick, F. 1990. The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* 348:125-32.
- Bourne, H. R., Sanders, D. A., McCormick, F. 1991. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* 349:117-27.
- Brass, N., Heckel, D., Sahin, U., Pfreundschuh, M., Sybrecht, G., 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* 6:33-39
- Brichard, V., Herman, J., VanPel, A., Wildmann, C., Gaugler, B., et al. 1996. A tyrosinase nonapeptide presented by HLA-B44 is recognized on a human melanoma by autologous cytolytic T lymphocytes. *Eur J Immunol* 26:224-230
- Brichard, V., Van Pel, A., Wolfel, T., Wolfel, C., De Plaen, E., et al. 1993. The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J Exp med* 178:489-495
- Buchsbaum, D. J., Khazaeli, M. B., Mayo, M. S., Roberson, P. L. 1999. Comparison of multiple bolus and continuous injections of 131I-labeled CC49 for therapy in a colon cancer xenograft model. *Clin Cancer Res* 5:3153s-3159s
- Bunn, P. A., Jr., Ihde, D. C., Foon, K. A. 1986. The role of recombinant interferon alfa-2a in the therapy of cutaneous T-cell lymphomas. *Cancer* 57:1689-95.
- Burg, G., Dummer, R., Haeffner, A., Kempf, W., Kadin, M. 2001. From inflammation to neoplasia: mycosis fungoides evolves from reactive inflammatory conditions (lymphoid infiltrates) transforming into neoplastic plaques and tumors. *Arch Dermatol* 137:949-52.

-
- Burg, G., Dummer, R., Kerl, H. 1994. Classification of cutaneous lymphomas. *Dermatol-Clin.* 12:213-7
- Burg, G., Kempf, W., Haeffner, A., Nestle, F., Hess-Schmid, M., et al. 1997. Cutaneous lymphomas. *Curr Probl Dermatol* 9:137-204
- Burg, G., Kerl, H., Przybilla, B., Braun-Falco, O. 1984. Some statistical data, diagnosis, and staging of cutaneous B-cell lymphoma. *J Dermatol Surg Oncol* 10:256-262
- Carrel, S., Schmidt-Kessen, A., Giuffre, L. 1985. Recombinant interferon-gamma can induce the expression of HLA-DR and -DC on DR-negative melanoma cells and enhance the expression of HLA-ABC and tumor-associated antigens. *Eur J Immunol* 15:118-23.
- Carter, P. 2001. Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nat Rev Cancer* 1:118-29.
- Chan, Y., Walmsley, R. P. 1997. Learning and understanding the Kruskal-Wallis one-way analysis-of-variance-by-ranks test for differences among three or more independent groups. *Phys Ther* 77:1755-62.
- Chen, Y., Scanlan, M., Sahin, U., Türeci, Ö., Güre, A., et al. 1997. A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:1914-1918
- Chen, Y. T. 2000. Cancer vaccine: identification of human tumor antigens by SEREX. *Cancer J Sci Am* 6:S208-17.
- Cheng, Y. S., Becker-Manley, M. F., Nguyen, T. D., DeGrado, W. F., Jonak, G. J. 1986. Nonidentical induction of the guanylate binding protein and the 56K protein by type I and type II interferons. *J Interferon Res* 6:417-27.
- Cheng, Y. S., Colonno, R. J., Yin, F. H. 1983. Interferon induction of fibroblast proteins with guanylate binding activity. *J Biol Chem* 258:7746-50.
- Cheng, Y. S., Patterson, C. E., Staeheli, P. 1991. Interferon-induced guanylate-binding proteins lack an N(T)KXD consensus motif and bind GMP in addition to GDP and GTP. *Mol Cell Biol* 11:4717-25.

-
- Choi, Y., Chae, C. 1991. DNA hypomethylation and germ cell-specific expression of testis-specific H2B histone gene. *J Biol Chem* 266:20504-20511
- Choi, Y., Chae, C. 1993. Demethylation of somatic and testis-specific histone H2A and H2B genes in F9 embryonal carcinoma cells. *Mol Cell Biol* 13:5538-5548
- Cigudosa, J. C., Parsa, N. Z., Louie, D. C., Filippa, D. A., Jhanwar, S. C., et al. 1999. Cytogenetic analysis of 363 consecutively ascertained diffuse large B-cell lymphomas. *Genes Chromosomes Cancer* 25:123-33.
- Clarke, S. 1992. Protein isoprenylation and methylation at carboxyl-terminal cysteine residues. *Annu Rev Biochem* 61:355-86.
- Clynes, R. A., Towers, T. L., Presta, L. G., Ravetch, J. V. 2000. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med* 6:443-6.
- Colcher, D., Goel, A., Pavlinkova, G., Beresford, G., Booth, B., Batra, S. K. 1999. Effects of genetic engineering on the pharmacokinetics of antibodies. *Q J Nucl Med* 43:132-9
- Connors, J. M., Hsi, E. D., Foss, F. M. 2002. Lymphoma of the skin. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*:263-82.
- Coulie, P., Brichard, V., Van Pel, A., Wolfel, T., Schneider, J., et al. 1994. A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J Exp Med* 180:35-42
- Cox, A., Skipper, J., Chen, Y., Henderson, R., Darrow, T., et al. 1994. Identification of a peptide recognized by five melanoma-specific human cytotoxic T cell lines. *Science* 264:716-719
- Cox, A. D., Der, C. J. 2002. Ras family signaling: therapeutic targeting. *Cancer Biol Ther* 1:599-606.
- Crovetti, G., Carabelli, A., Berti, E., Guizzardi, M., Fossati, S., et al. 2000. Photopheresis in cutaneous T-cell lymphoma: five-year experience. *Int J Artif Organs* 23:55-62.

- Dave, B. J., Nelson, M., Pickering, D. L., Chan, W. C., Greiner, T. C., et al. 2002. Cytogenetic characterization of diffuse large cell lymphoma using multi-color fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 132:125-32.
- De Plaen, E., Arden, K., Traversari, C., Gaforio, J. J., Szikora, J. P., et al. 1994. Structure, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the MAGE family. *Immunogenetics* 40:360-9
- De Plaen, E., Lurquin, C., Van Pel, A., Mariame, B., Szikora, J. P., et al. 1988. Immunogenic (tum-) variants of mouse tumor P815: cloning of the gene of tum-antigen P91A and identification of the tum- mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:2274-8.
- De Smet, C., De Backer, O., Faraoni, I., Lurquin, C., Brasseur, F., Boon, T. 1996. The activation of human gene MAGE-1 in tumor cells is correlated with genome-wide demethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:7149-7153
- de Vos, A. M., Tong, L., Milburn, M. V., Matias, P. M., Jancarik, J., et al. 1988. Three-dimensional structure of an oncogene protein: catalytic domain of human c-H-ras p21. *Science* 239:888-93.
- Decker, T., Lew, D. J., Darnell, J. E., Jr. 1991. Two distinct alpha-interferon-dependent signal transduction pathways may contribute to activation of transcription of the guanylate-binding protein gene. *Mol Cell Biol* 11:5147-53.
- Dever, T. E., Glynias, M. J., Merrick, W. C. 1987. GTP-binding domain: three consensus sequence elements with distinct spacing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:1814-8.
- Diamandidou, E., Cohen, P. R., Kurzrock, R. 1996. Mycosis fungoides and Sezary syndrome. *Blood* 88:2385-409.
- Dippel, E., Assaf, C., Hummel, M., Schrag, H. J., Stein, H., et al. 1999. Clonal T-cell receptor gamma-chain gene rearrangement by PCR-based GeneScan analysis in advanced cutaneous T-cell lymphoma: a critical evaluation. *J Pathol* 188:146-54
- Dummer, R. 1998. [Cutaneous lymphomas. Quality Assurance Committee of the German Society of. *Hautarzt* 48 Suppl 1:S49-55

- Dummer, R., Dobbeling, U., Geertsen, R., Willers, J., Burg, G., Pavlovic, J. 2001. Interferon resistance of cutaneous T-cell lymphoma-derived clonal T-helper 2 cells allows selective viral replication. *Blood* 15:523-527
- Dummer, R., Heald, P. W., Nestle, F. O., Ludwig, E., Laine, E., et al. 1996. Sezary syndrome T-cell clones display T-helper 2 cytokines and express the accessory factor-1 (interferon-gamma receptor beta-chain). *Blood* 88:1383-9.
- Duncan, K. O., Heald, P. W. 1998. T-cell technology in the diagnosis & management of cutaneous T-cell lymphoma. *Compr Ther* 24:117-22.
- Edelson, R. L. 2001. Cutaneous T cell lymphoma: the helping hand of dendritic cells. *Ann N Y Acad Sci* 941:1-11.
- Eichmüller, S. 2002. Towards defining specific antigens for cutaneous lymphomas. *Onkologie* 25:448-54.
- Eichmüller, S., Usener, D., Dummer, R., Stein, A., Thiel, D., Schadendorf, D. 2001. Serological detection of cutaneous T-cell lymphoma-associated antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:629-34.
- Emmerich, B. 2000. Maligne Lymphome. *Zuckschwerdt Verlag München* 6. Auflage
- Engvall, E., Perlman, P. 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8:871-4.
- Fellenberg, F., Hartmann, T., Dummer, R., Usener, D., Schadendorf, D., Eichmüller, S. 2003. GBP-5 splicing variants: New guanylate-binding proteins with tumor-specific expression and antigenicity. *in prep.*
- Feurerer, M., Beckhove, P., Bai, L., Solomayer, E. F., Bastert, G., et al. 2001. Therapy of human tumors in NOD/SCID mice with patient-derived reactivated memory T cells from bone marrow. *Nat Med* 7:452-8.
- Fischer, D., Kurpisz, M. 1998. Major histocompatibility complex expression on human, male germ cells: a review. *Am J Reprod Immunol* 40:172-6.

- Flieger, D., Renoth, S., Beier, I., Sauerbruch, T., Schmidt-Wolf, I. 2000. Mechanism of cytotoxicity induced by chimeric mouse human monoclonal antibody IDEC-C2B8 in CD20-expressing lymphoma cell lines. *Cell Immunol* 204:55-63.
- Foon, K. A., Roth, M. S., Bunn, P. A., Jr. 1987. Interferon therapy of non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer* 59:601-4.
- Fraser-Andrews, E. A., Russell-Jones, R., Woolford, A. J., Wolstencroft, R. A., Dean, A. J., Whittaker, S. J. 2001. Diagnostic and prognostic importance of T-cell receptor gene analysis in patients with Sezary syndrome. *Cancer* 92:1745-52.
- Frodin, J. E., Fagerberg, J., Hjelm Skog, A. L., Liljefors, M., Ragnhammar, P., Mellstedt, H. 2002. MAb17-1A and cytokines for the treatment of patients with colorectal carcinoma. *Hybrid Hybridomics* 21:99-101.
- Fry, D. C., Kuby, S. A., Mildvan, A. S. 1986. ATP-binding site of adenylate kinase: mechanistic implications of its homology with ras-encoded p21, F1-ATPase, and other nucleotide-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:907-11.
- Gaugler, B., Brouwenstijn, N., Vantomme, V., Szikora, J., Van der Speck, C., et al. 1996. A new gene coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human renal carcinoma. *Immunogenetics* 44:323-330
- Gazdar, A. F., Carney, D. N., Bunn, P. A., Russell, E. K., Jaffe, E. S., et al. 1980. Mitogen requirements for the in vitro propagation of cutaneous T-cell lymphomas. *Blood* 55:409-17
- Geertsen, R., Hofbauer, G., Kamarashev, J., Yue, F. Y., Dummer, R. 1999. Immune escape mechanisms in malignant melanoma. *Int J Mol Med* 3:49-57.
- Gentilini, P., Laffi, G., La Villa, G., Romanelli, R. G., Buzzelli, G., et al. 1997. Long course and prognostic factors of virus-induced cirrhosis of the liver. *Am J Gastroenterol* 92:66-72.
- Gerike, E., Tischer, A. 1993. [Experience with preventive measles, mumps and rubella vaccination in unified Germany]. *Gesundheitswesen* 55:38-9.

-
- Gisselbrecht, C., Maraninchi, D., Pico, J. L., Milpied, N., Coiffier, B., et al. 1994. Interleukin-2 treatment in lymphoma: a phase II multicenter study. *Blood* 83:2081-5.
- Glass, L. F., Keller, K. L., Messina, J. L., Dalton, J., Yag Howard, C., Fenske, N. A. 1998. Cutaneous T-cell Lymphoma. *Cancer Control* 5:11-18
- Glomset, J. A., Gelb, M. H., Farnsworth, C. C. 1990. Prenyl proteins in eukaryotic cells: a new type of membrane anchor. *Trends Biochem Sci* 15:139-42.
- Goel, A., Colcher, D., Baranowska Kortylewicz, J., Augustine, S., Booth, B. J., et al. 2000. Genetically engineered tetravalent single-chain Fv of the pancarcinoma monoclonal antibody CC49: improved biodistribution and potential for therapeutic application.[In Process Citation]. *Cancer Res* 60:6964-71
- Goldstein, N. I., Prewett, M., Zuklys, K., Rockwell, P., Mendelsohn, J. 1995. Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model. *Clin Cancer Res* 1:1311-8.
- Goodison, S., Urquidi, V., Tarin, D. 1999. CD44 cell adhesion molecules. *Mol Pathol* 52:189-96.
- Goodison, S., Yoshida, K., Churchman, M., Tarin, D. 1998. Multiple intron retention occurs in tumor cell CD44 mRNA processing. *Am J Pathol* 153:1221-8.
- Goodman, G. E., Hellstrom, I., Yelton, D. E., Murray, J. L., O'Hara, S., et al. 1993. Phase I trial of chimeric (human-mouse) monoclonal antibody L6 in patients with non-small-cell lung, colon, and breast cancer. *Cancer Immunol Immunother* 36:267-73.
- Gorbacheva, V. Y., Lindner, D., Sen, G. C., Vestal, D. J. 2002. The interferon (IFN)-induced GTPase, mGBP-2. Role in IFN-gamma-induced murine fibroblast proliferation. *J Biol Chem* 277:6080-7.
- Gromet, M. A., Epstein, W. L., Blois, M. S. 1978. The regressing thin malignant melanoma: a distinctive lesion with metastatic potential. *Cancer* 42:2282-92.
- Guenzi, E., Topolt, K., Cornali, E., Lubeseder-Martellato, C., Jorg, A., et al. 2001. The helical domain of GBP-1 mediates the inhibition of endothelial cell proliferation by inflammatory cytokines. *Embo J* 20:5568-77.

- Guitart, J., Kaul, K. 1999. A new polymerase chain reaction-based method for the detection of T-cell clonality in patients with possible cutaneous T-cell lymphoma. *Arch Dermatol* 135:158-62.
- Güre, A., Altorki, N., Stockert, E., Scanlan, M., Old, L., Chen, Y. 1998. Human lung cancer antigens recognized by autologous antibodies: Definition of a novel cDNA derived from the tumor suppressor gene locus on chromosome 3p21.3. *Cancer Res.* 58:1034-1041
- Güre, A., Türeci, O., Sahin, U., Tsang, S., Scanlan, M., et al. 1997. SSX: a multigene family with several members transcribed in normal testis and human cancer. *Int J Cancer* 72:965-971
- Gure, A. O., Stockert, E., Arden, K. C., Boyer, A. D., Viars, C. S., et al. 2000a. CT10: a new cancer-testis (CT) antigen homologous to CT7 and the MAGE family, identified by representational-difference analysis. *Int J Cancer* 85:726-32.
- Gure, A. O., Stockert, E., Scanlan, M. J., Keresztes, R. S., Jager, D., et al. 2000b. Serological identification of embryonic neural proteins as highly immunogenic tumor antigens in small cell lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:4198-203
- Hall, W. 1994. Human T cell lymphotropic virus type I and cutaneous T cell leukemia/lymphoma. *J Exp Med* 180:1581-1585
- Hartmann, T. B., Thiel, D., Dummer, R., Schadendorf, D., Eichmüller, S. 2003. New tumor-associated antigens for cutaneous T-cell lymphoma. *Br J Dermatol submitted*
- Hellstrom, I., Beaumier, P. L., Hellstrom, K. E. 1986. Antitumor effects of L6, an IgG2a antibody that reacts with most human carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:7059-63.
- Herbst, H., Sauter, M., Kuhler-Obbarius, C., Loning, T., Mueller-Lantzsch, N. 1998. Human endogenous retrovirus (HERV)-K transcripts in germ cell and trophoblastic tumours. *Apmis* 106:216-20.
- Herrmann, J. J., Roenigk, H. H., Jr., Hurria, A., Kuzel, T. M., Samuelson, E., et al. 1995. Treatment of mycosis fungoides with photochemotherapy (PUVA): long-term follow-up. *J Am Acad Dermatol* 33:234-42.

- Hogdall, E. V., Hogdall, C. K., Blaakaer, J., Heegaard, N. H., Glud, E., et al. 2002. P53 autoantibodies in sera from Danish ovarian cancer patients and their correlation with clinical data and prognosis. *Apmis* 110:545-53.
- Holloway, K. B., Flowers, F. P., Ramos-Caro, F. A. 1992. Therapeutic alternatives in cutaneous T-cell lymphoma. *J Am Acad Dermatol* 27:367-78.
- Hoppe, R. T., Medeiros, L. J., Warnke, R. A., Wood, G. S. 1995. CD8-positive tumor-infiltrating lymphocytes influence the long-term survival of patients with mycosis fungoides. *J Am Acad Dermatol* 32:448-53.
- Hsu, F., Caspar, C., Czerwinski, D., Kwak, L., Liles, T., et al. 1997. Tumor-specific idiotype vaccines in the treatment of patients with B-cell lymphoma long-term results of a clinical trial. *Blood* 89:3129-3135
- Hsu, F. J., Benike, C., Fagnoni, F., Liles, T. M., Czerwinski, D., et al. 1996. Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 2:52-8.
- Hynes, N. E., Stern, D. F. 1994. The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer. *Biochim Biophys Acta* 1198:165-84.
- Ioannides, C., Fisk, B., Fan, D., Biddison, W., Wharton, J., O'Brian, C. 1993. Cytotoxic T cells isolated from ovarian malignant ascites recognize a peptide derived from the HER-2/neu proto-oncogene. *Cell Immunol* 151:225-234
- Jackow, C. M., Cather, J. C., Hearne, V., Asano, A. T., Musser, J. M., Duvic, M. 1997. Association of erythrodermic cutaneous T-cell lymphoma, superantigen-positive *Staphylococcus aureus*, and oligoclonal T-cell receptor V beta gene expansion. *Blood* 89:32-40.
- Jäger, E., Bernhard, H., Romero, P., Ringhoffer, M., Arand, M., Karbach, J., Ilsemann, C., Hagedorn, M., Knuth, A. 1996. Generation of cytotoxic T-cell responses with synthetic melanoma-associated peptides in vivo: implications for tumor vaccines with melanoma-associated antigens. *Int J Cancer* 66:162-169
- Jahn, S., Asadullah, K., Walden, P., Sterry, W. 1998a. Cutaneous malignant lymphomas. *Immunol Today* 19:100-3.

-
- Jahn, S., Asadullah, K., Walden, P., Sterry, W. 1998b. Cutaneous malignant lymphomas. *Immunol Today* 19:100-3
- Janeway, C. A., Travers, P. 1997. Immunologie. *Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg* 2. auflage
- Jung, E. G. 1995. Dermatologie. *Hippokrates Verlag* 3. Auflage
- Kaltoft, K., Bisballe, S., Dyrberg, T., Boel, E., Rasmussen, P. B., Thestrup Pedersen, K. 1992. Establishment of two continuous T-cell strains from a single plaque of a patient with mycosis fungoides. *In Vitro Cell Dev Biol* 28a:161-7
- Kaltoft, K., Bisballe, S., Rasmussen, H. F., Thestrup-Pedersen, K., Thomsen, K., Sterry, W. 1987. A continuous T-cell line from a patient with Sezary syndrome. *Arch Dermatol Res* 279:293-8.
- Kaplan, D. H., Shankaran, V., Dighe, A. S., Stockert, E., Aguet, M., et al. 1998. Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:7556-61.
- Kapur, S., Menke, M. A., Tiemann, M., Schubert, C., Parwaresch, R. 2001. Early mycosis fungoides: molecular analysis for its diagnosis and the absence of p53 gene mutations in cases with progression. *J Dermatol Sci* 26:36-45.
- Kawakami, Y., Eliyahu, S., Jennings, C., Sakaguchi, K., Kang, X., et al. 1995. Recognition of multiple epitopes in the human melanoma antigen gp100 by tumor-infiltrating T lymphocytes associated with in vivo tumor regression. *J Immunol* 154:3961-8
- Kawakami, Y., Eliyahu, S., Sakaguchi, K., Robbins, P., Rivoltini, L., et al. 1994. Identification of the immunodominant peptides of the MART-1 human melanoma antigen recognized by the majority of HLA-A2-restricted tumor infiltrating lymphocytes. *J Exp Med* 180:347-352
- Kempf, W., Dummer, R., Burg, G. 2001. Klinische Besonderheiten und therapeutische Besonderheiten kutaner Lymphome. *Dt. Ärzteblatt* 98:697-703
- Kern, D. E., Kidd, P. G., Moe, R., Hanke, D., Olerud, J. E. 1998. Analysis of T-cell receptor gene rearrangement in lymph nodes of patients with mycosis fungoides. Prognostic implications [see comments]. *Arch Dermatol* 134:158-64

- Kern, M.A., Helmbach, H., Artuc, M., Karmann, D., Jurgovsky, K., Schadendorf, D. 1997. Human melanoma cell lines selected in vitro displaying various levels of drug resistance against cisplatin, fotemustine, vindesine or etoposide: modulation of proto-oncogene expression. *Anticancer Res* 17(6D): 4359-70.
- Kessler, J. F., Jones, S. E., Levine, N., Lynch, P. J., Booth, A. R., Meyskens, F. L., Jr. 1987. Isotretinoin and cutaneous helper T-cell lymphoma (mycosis fungoides). *Arch Dermatol* 123:201-4.
- Kikuchi, A., Nishikawa, T., Ikeda, Y., Yamaguchi, K. 1997. Absence of human T-lymphotropic virus type I in Japanese patients with cutaneous T-cell lymphoma. *Blood* 89:1529-32.
- Kikuchi, M., Nakao, M., Inoue, Y., Matsunaga, K., Shichijo, S., et al. 1999. Identification of a SART-1-derived peptide capable of inducing HLA-A24-restricted and tumor-specific cytotoxic T lymphocytes. *Int J Cancer* 81:459-66.
- Kondoh, N., Nishina, Y., Tsuchida, J., Koga, M., Tanaka, H., et al. 1997. Assignment of synaptonemal complex protein 1 (SCP1) to human chromosome 1p13 by fluorescence in situ hybridization and its expression in the testis. *Cytogenet Cell Genet* 78:103-104
- Kroes, R. A., Jastrow, A., McLone, M. G., Yamamoto, H., Colley, P., et al. 2000. The identification of novel therapeutic targets for the treatment of malignant brain tumors. *Cancer Lett* 156:191-8.
- Kuzel, T. M., Roenigk, H. H., Jr., Rosen, S. T. 1991. Mycosis fungoides and the Sezary syndrome: a review of pathogenesis, diagnosis, and therapy. *J Clin Oncol* 9:1298-313.
- Lagarkova, M. A., Koroleva, E. P., Kuprash, D. V., Boitchenko, V. E., Kashkarova, U. A., et al. 2003. Evaluation of humoral response to tumor antigens using recombinant expression-based serological mini-arrays (SMARTA). *Immunol Lett* 85:71-4.
- Lauritzen, A. F., Vejlsgaard, G. L., Hou-Jensen, K., Ralfkiaer, E. 1995. p53 protein expression in cutaneous T-cell lymphomas. *Br J Dermatol* 133:32-6.

-
- Lee, L., Wang, R. F., Wang, X., Mixon, A., Johnson, B. E., et al. 1999. NY-ESO-1 may be a potential target for lung cancer immunotherapy. *Cancer J Sci Am* 5:20-5
- Lennette, E. T., Winberg, G., Yadav, M., Enblad, G., Klein, G. 1995. Antibodies to LMP2A/2B in EBV-carrying malignancies. *Eur J Cancer* 31A:1875-8.
- Lengyel, P. 1982. Biochemistry of interferons and their actions. *Annu Rev Biochem* 51:251-82.
- Lethe, B., Lucas, S., Michaux, L., De Smet, C., Godelaine, D., et al. 1998. Lage-1, a new gene with tumor specificity. *Int J Cancer* 76:903-908
- Linnemann, T., Tumenjargal, S., Gellrich, S., Wiesmuller, K., Kaltoft, K., et al. 2001. Mimotopes for tumor-specific T lymphocytes in human cancer determined with combinatorial peptide libraries. *Eur J Immunol* 31:156-65.
- Linnemann, T., Wiesmuller, K., Gellrich, S., Kaltoft, K., Sterry, W., Walden, P. 2000. A T-cell epitope determined with random peptide libraries and combinatorial peptide chemistry stimulates T cells specific for cutaneous T-cell lymphoma. *Ann Oncol* 11:95-9
- Livingston, P. O., Kaelin, K., Pinsky, C. M., Oettgen, H. F., Old, L. J. 1985. The serologic response of patients with stage II melanoma to allogeneic melanoma cell vaccines. *Cancer* 56:2194-200.
- Löffler, G., Petrides. 1998. Biochemie und Pathobiochemie. *Springer Verlag* Kap. 38.3
- Lowy, D. R., Willumsen, B. M. 1989. Protein modification: new clue to Ras lipid glue. *Nature* 341:384-5.
- Lubeseder-Martellato, C., Guenzi, E., Jorg, A., Topolt, K., Naschberger, E., et al. 2002. Guanylate-binding protein-1 expression is selectively induced by inflammatory cytokines and is an activation marker of endothelial cells during inflammatory diseases. *Am J Pathol* 161:1749-59.
- Lubin, R., Schlichtholz, B., Teillaud, J. L., Garay, E., Bussel, A., Wild, C. P. 1995a. p53 antibodies in patients with various types of cancer: assay, identification, and characterization. *Clin Cancer Res* 1:1463-9.

-
- Lubin, R., Zalcmán, G., Bouchet, L., Tredanel, J., Legros, Y., et al. 1995b. Serum p53 antibodies as early markers of lung cancer. *Nat Med* 1:701-2.
- Lutz, W., Nowakowska-Swirta, E. 2002. Gene p53 mutations, protein p53, and anti-p53 antibodies as biomarkers of cancer process. *Int J Occup Med Environ Health* 15:209-18.
- Macaluso, M., Russo, G., Cinti, C., Bazan, V., Gebbia, N., Russo, A. 2002. Ras family genes: an interesting link between cell cycle and cancer. *J Cell Physiol* 192:125-30.
- Maier, T., Tun-Kyi, A., Tassis, A., Jungius, K.-P., Burg, G., et al. 2003. Vaccination of cutaneous T-cell lymphoma patients using intranodal injection of autologous tumor lysate pulsed dendritic cells. *Blood First Edition Paper, prepublished online* 10:2002-08-2455
- Maloney, D. G., Grillo Lopez, A. J., White, C. A., Bodkin, D., Schilder, R. J., et al. 1997. IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 90:2188-95
- Marchand, M., Weynants, P., Rankin, E., Arienti, F., Belli, F., et al. 1995. Tumor regression responses in melanoma patients treated with a peptide encoded by gene MAGE-3. *Int J Cancer* 63:883-885
- Marincola, F. M., Hijazi, Y. M., Fetsch, P., Salgaller, M. L., Rivoltini, L., et al. 1996. Analysis of expression of the melanoma-associated antigens MART-1 and gp100 in metastatic melanoma cell lines and in in situ lesions. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* 19:192-205.
- Marolleau, J. P., Baccard, M., Flageul, B., Rybojad, M., Laroche, L., et al. 1995. High-dose recombinant interleukin-2 in advanced cutaneous T-cell lymphoma. *Arch Dermatol* 131:574-9.
- Martinez, F. D. 2003. Respiratory syncytial virus bronchiolitis and the pathogenesis of childhood asthma. *Pediatr Infect Dis J* 22:S76-82.
- Meese, E., Comtesse, N. 2002. Cancer genetics and tumor antigens: time for a combined view? *Genes Chromosomes Cancer* 33:107-13.

- Meissner, K., Loning, T., Rehpennig, W. 1991. [Mycosis fungoides and Sezary syndrome: diagnostic and prognostic relevance of cellular antigen expression]. *Hautarzt* 42:84-91
- Meissner, K., Michaelis, K., Rehpennig, W., Loning, T. 1990. Epidermal Langerhans' cell densities influence survival in mycosis fungoides and Sezary syndrome. *Cancer* 65:2069-73.
- Meredith, R. F., LoBuglio, A. F., Spencer, E. B. 1997. Recent progress in radioimmunotherapy for cancer. *Oncology (Huntingt)* 11:979-84, 987; discussion 987-8
- Meschede, W., Zumbach, K., Braspenning, J., Scheffner, M., Benitez-Bribiesca, L., et al. 1998. Antibodies against early proteins of human papillomaviruses as diagnostic markers for invasive cervical cancer. *J Clin Microbiol* 36:475-80.
- Meuwissen, R., Meerts, I., Hoovers, J., Leschot, N., Heyting, C. 1997. Human synaptonemal complex protein 1 (SCP1): isolation and characterization of the cDNA and chromosomal localization of the gene. *Genomics* 1997 Feb 1;39(3):377-84 39:377-384
- Mintz, A., Debinski, W. 2000. Cancer genetics/epigenetics and the X chromosome: possible new links for malignant glioma pathogenesis and immune-based therapies. *Crit Rev Oncog* 11:77-95
- Miracco, C., Rubegni, P., De Aloe, G., D'Ascenzo, G., Mazzatenta, C., et al. 1997. Extracorporeal photochemotherapy induces apoptosis of infiltrating lymphoid cells in patients with mycosis fungoides in early stages. A quantitative histological study. *Br J Dermatol* 137:549-57.
- Moller, W., Amons, R. 1985. Phosphate-binding sequences in nucleotide-binding proteins. *FEBS Lett* 186:1-7.
- Muche, J. M., Lukowsky, A., Asadullah, K., Gellrich, S., Sterry, W. 1997. Demonstration of frequent occurrence of clonal T cells in the peripheral blood of patients with primary cutaneous T-cell lymphoma. *Blood* 90:1636-42.

-
- Muche, J. M., Lukowsky, A., Heim, J., Friedrich, M., Audring, H., Sterry, W. 1999. Demonstration of frequent occurrence of clonal T cells in the peripheral but not in the skin of patients with small plaque parapsoriasis. *Blood* 94:1409-17
- Muche, J. M., Sterry, W. 2002. Vaccination therapy for cutaneous T-cell lymphoma. *Clin Exp Dermatol* 27:602-7.
- Munger, K., Scheffner, M., Huibregtse, J. M., Howley, P. M. 1992. Interactions of HPV E6 and E7 oncoproteins with tumour suppressor gene products. *Cancer Surv* 12:197-217.
- Munn, S. E., McGregor, J. M., Jones, A., Amlot, P., Rustin, M. H., et al. 1996. Clinical and pathological heterogeneity in cutaneous gamma-delta T-cell lymphoma: a report of three cases and a review of the literature. *Br J Dermatol* 135:976-81
- Nagase, T., Ishikawa, K., Nakajima, D., Ohira, M., Seki, N., et al. 1997. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. VII. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which can code for large proteins in vitro. *DNA Res* 28:141-150
- Nagase, T., Kikuno, R., Ishikawa, K., Hirosawa, M., Ohara, O. 2000. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XVII. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro. *DNA Res* 7:143-50.
- Nagase, T., Seki, N., Ishikawa, K., Ohira, M., Kawarabayasi, Y., et al. 1996. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. VI. The coding sequences of 80 new genes (KIAA0201-KIAA0280) deduced by analysis of cDNA clones from cell line KG-1 and brain. *DNA Res* 3:321-329, 341-354
- Naitoh, J., Belldegrun, A. 1998. Gene therapy for prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 1:189-196.
- Nantais, D. E., Schwemmler, M., Stickney, J. T., Vestal, D. J., Buss, J. E. 1996. Prenylation of an interferon-gamma-induced GTP-binding protein: the human guanylate binding protein, huGBP1. *J Leukoc Biol* 60:423-31.

-
- Nau, M. M., Brooks, B. J., Battey, J., Sausville, E., Gazdar, A. F., et al. 1985. L-myc, a new myc-related gene amplified and expressed in human small cell lung cancer. *Nature* 318:69-73.
- Neri, A., Fracchiolla, N., Roscetti, E., Garatti, S., Trecca, D., et al. 1995. Molecular analysis of cutaneous B- and T-cell lymphomas. *Blood* 86:3160-3172
- Nestle, F., Alijagic, S., Gilliet, M., Sun, Y., Grabbe, S., et al. 1998. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 4:328-332
- Newman, C. M., Magee, A. I. 1993. Posttranslational processing of the ras superfamily of small GTP-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1155:79-96.
- Nguyen, T. T., Hu, Y., Widney, D. P., Mar, R. A., Smith, J. B. 2002. Murine GBP-5, a new member of the murine guanylate-binding protein family, is coordinately regulated with other GBPs in vivo and in vitro. *J Interferon Cytokine Res* 22:899-909.
- Ni, X., Hazarika, P., Zhang, C., Talpur, R., Duvic, M. 2001. Fas ligand expression by neoplastic t lymphocytes mediates elimination of cd8+ cytotoxic t lymphocytes in mycosis fungoides: a potential mechanism of tumor immune escape? *Clin Cancer Res* 7:2682-92.
- Nichols, J., Foss, F., Kuzel, T. M., LeMaistre, C. F., Plataniias, L., et al. 1997. Interleukin-2 fusion protein: an investigational therapy for interleukin-2 receptor expressing malignancies. *Eur J Cancer* 33:S34-6.
- Nicolet, C. M., Paulnock, D. M. 1994. Promoter analysis of an interferon-inducible gene associated with macrophage activation. *J Immunol* 152:153-62.
- Nikolova, M., Bagot, M., Boumsell, L., Bensussan, A. 2002. Identification of cell surface molecules characterizing human cutaneous T-cell lymphomas. *Leuk Lymphoma* 43:741-6.
- Old, L. J. 2001. Cancer/Testis (CT) antigens - a new link between gametogenesis and cancer. *Cancer Immunity* 1:1
- Old, L. J., Chen, Y. T. 1998. New paths in human cancer serology [comment]. *J Exp Med* 187:1163-7

- Ono, T., Kurashige, T., Harada, N., Noguchi, Y., Saika, T., et al. 2001. Identification of proacrosin binding protein sp32 precursor as a human cancer/testis antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:3282-7.
- Onrust, S., Lamb, H.M., Balfour, J.A. 1999. Rituximab. *Drugs* 58:79-90
- Osterroth, F., Garbe, A., Fisch, P., Veelken, H. 2000. Stimulation of cytotoxic T cells against idiotype immunoglobulin of malignant lymphoma with protein-pulsed or idiotype-transduced dendritic cells. *Blood* 95:1342-1349
- Overwijk, W. W., Lee, D. S., Surman, D. R., Irvine, K. R., Touloukian, C. E., et al. 1999. Vaccination with a recombinant vaccinia virus encoding a "self" antigen induces autoimmune vitiligo and tumor cell destruction in mice: requirement for CD4(+) T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:2982-7.
- Overwijk, W. W., Restifo, N. P. 2000. Autoimmunity and the immunotherapy of cancer: targeting the "self" to destroy the "other". *Crit Rev Immunol* 20:433-50.
- Özcelik, C., Erdmann, B., Pilz, B., Wettschureck, N., Britsch, S., et al. 2002. Conditional mutation of the ErbB2 (HER2) receptor in cardiomyocytes leads to dilated cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:8880-5.
- Pancake, B., Zucker-Franklin, D., Coutavas, E. 1995. The cutaneous T cell lymphoma, mycosis fungoides, is a human T cell lymphotropic virus-associated disease. A study of 50 patients. *J Clin Invest* 1995 Feb;95(2):547-54 95:547-554
- Parada, L. A., Hallen, M., Tranberg, K. G., Hagerstrand, I., Bondeson, L., et al. 1998. Frequent rearrangements of chromosomes 1, 7, and 8 in primary liver cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 23:26-35.
- Paschen, A., Dittmar, K. E. J., Grenningloh, R., Rohde, M., Schadendorf, D., et al. 2000. Human dendritic cells infected by *Listeria monocytogenes*: induction of maturation, requirements for phagolysosomal escape and antigen presentation capacity. *Eur J Immunol* 30:3447-3456
- Paschen, A., Domann, E., Chakraborty, T., Sucker, A., Schadendorf, D. 1999. Einsatz bakterieller Vehikel zur Immuntherapie des malignen Melanoms. *Zeitschrift für Hautkrankheiten H+G* 74:608

-
- Pawson, R., Catovsky, D., Schulz, T. F. 1996. Lack of evidence of HHV-8 in mature T-cell lymphoproliferative disorders. *Lancet* 348:1450-1.
- Peiper, M., Goedegebuure, P. S., Eberlein, T. J., Zornig, C. 1997. [Cytotoxic T-lymphocytes and the recognition of tumor antigens-an approach to "preventive tumor vaccination?"]. *Zentralbl Chir* 122:141-8
- Pestka, S. 1987. Advances in cancer: interferon--achievements and potential. *N J Med* 84:51-6.
- Pfreundschuh, M. 2000. Exploitation of the B cell repertoire for the identification of human tumor antigens. *Cancer Chemother Pharmacol* 46:S3-7
- Pfreundschuh, M., Shiku, H., Takahashi, T., Ueda, R., Ransohoff, J., et al. 1978. Serological analysis of cell surface antigens of malignant human brain tumor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75:5122-5126
- Poiesz, B. J., Ruscetti, F. W., Gazdar, A. F., Bunn, P. A., Minna, J. D., Gallo, R. C. 1980. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77:7415-9.
- Ponta, H., Sleeman, J., Dall, P., Moll, J., Sherman, L., Herrlich, P. 1994. CD44 isoforms in metastatic cancer. *Invasion Metastasis* 14:82-6.
- Praefcke, G. J., Geyer, M., Schwemmle, M., Robert Kalbitzer, H., Herrmann, C. 1999. Nucleotide-binding characteristics of human guanylate-binding protein 1 (hGBP1) and identification of the third GTP-binding motif. *J Mol Biol* 292:321-32.
- Prakash, B., Praefcke, G. J., Renault, L., Wittinghofer, A., Herrmann, C. 2000a. Structure of human guanylate-binding protein 1 representing a unique class of GTP-binding proteins. *Nature* 403:567-71.
- Prakash, B., Renault, L., Praefcke, G., Herrmann, C., Wittinghofer, A. 2000b. Triphosphate structure of guanylate-binding protein 1 and implications for nucleotide binding and GTPase mechanism. *EMBO J* 19:4555-4564

-
- Preuss, K. D., Zwick, C., Bormann, C., Neumann, F., Pfreundschuh, M. 2002. Analysis of the B-cell repertoire against antigens expressed by human neoplasms. *Immunol Rev* 188:43-50.
- Primakoff, P., Myles, D. G. 2000. The ADAM gene family: surface proteins with adhesion and protease activity. *Trends Genet* 16:83-7.
- Qin, J. Z., Zhang, C. L., Kamarashev, J., Dummer, R., Burg, G., Dobbeling, U. 2001. Interleukin-7 and interleukin-15 regulate the expression of the bcl-2 and c-myc genes in cutaneous T-cell lymphoma cells. *Blood* 98:2778-83.
- Ramsay, D. L., Lish, K. M., Yalowitz, C. B., Soter, N. A. 1992. Ultraviolet-B phototherapy for early-stage cutaneous T-cell lymphoma. *Arch Dermatol* 128:931-3.
- Ramsay, D. L., Meller, J. A., Zackheim, H. S. 1995. Topical treatment of early cutaneous T-cell lymphoma. *Hematol Oncol Clin North Am* 9:1031-56.
- Real, F. X., Furukawa, K., Mattes, M., Gusik, S., Cordon-Cardo, C., et al. 1988. Class 1 (unique) tumor antigens of human melanoma: identification of unique and common epitopes on a 90-kDa glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:3965-9
- Reddy, S. A., Okada, C., Wong, C., Bahler, D., Levy, R. 2001. T cell antigen receptor vaccines for active therapy of T cell malignancies. *Ann N Y Acad Sci* 941:97-105.
- Rich, B. E., Campos-Torres, J., Tepper, R. I., Moreadith, R. W., Leder, P. 1993. Cutaneous lymphoproliferation and lymphomas in interleukin 7 transgenic mice. *J Exp Med* 177:305-16.
- Rittinger, K., Taylor, W. R., Smerdon, S. J., Gamblin, S. J. 1998. Support for shared ancestry of GAPs. *Nature* 392:448-9.
- Rittinger, K., Walker, P. A., Eccleston, J. F., Nurmahomed, K., Owen, D., et al. 1997. Crystal structure of a small G protein in complex with the GTPase-activating protein rhoGAP. *Nature* 388:693-7.
- Rochlitz, C. F. 2001. Gene therapy of cancer. *Swiss Med Wkly* 131:4-9.
- Rook, A. H., Heald, P. 1995. The immunopathogenesis of cutaneous T-cell lymphoma. *Hematol Oncol Clin North Am* 9:997-1010.

-
- Rook, A. H., Zaki, M. H., Wysocka, M., Wood, G. S., Duvic, M., et al. 2001. The role for interleukin-12 therapy of cutaneous T cell lymphoma. *Ann N Y Acad Sci* 941:177-84.
- Rosen, S. T., Foss, F. M. 1995. Chemotherapy for mycosis fungoides and the Sezary syndrome. *Hematol Oncol Clin North Am* 9:1109-16
- Rosenberg, S. A. 1996. Development of cancer immunotherapies based on identification of the genes encoding cancer regression antigens. *J Natl Cancer Inst* 88:1635-44.
- Rosenberg, S. A. 1999. A new era of cancer immunotherapy: converting theory to performance. *CA Cancer J Clin* 49:70-3, 65.
- Rubinfeld, B., Albert, I., Porfiri, E., Munemitsu, S., Polakis, P. 1997. Loss of beta-catenin regulation by the APC tumor suppressor protein correlates with loss of structure due to common somatic mutations of the gene. *Cancer Res* 57:4624-30.
- Safavy, A., Khazaeli, M. B., Safavy, K., Mayo, M. S., Buchsbaum, D. J. 1999. Biodistribution study of 188Re-labeled trisuccin-HuCC49 and trisuccin-HuCC49deltaCh2 conjugates in athymic nude mice bearing intraperitoneal colon cancer xenografts. *Clin Cancer Res* 5:2994s-3000s
- Sahin, U., Türeci, Ö., Pfreundschuh, M. 1999. Vom Immunsystem erkennbare Antigene auf menschlichen Malignomen. *Onkologe* 5:659-667
- Sahin, U., Türeci, O., Schmitt, H., Cochlovius, B., Johannes, T., et al. 1995. Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:11810-11813
- Saleh, M. N., LeMaistre, C. F., Kuzel, T. M., Foss, F., Plataniias, L. C., et al. 1998. Antitumor activity of DAB389IL-2 fusion toxin in mycosis fungoides. *J Am Acad Dermatol* 39:63-73.
- Sander, C. A., Simon, M., Puchta, U., Raffeld, M., Kind, P. 1996. HHV-8 in lymphoproliferative lesions in skin. *Lancet* 348:475-6.
- Santin, A. D., Rose, G. S., Hiserodt, J. C., Fruehauf, J., Eck, L. M., et al. 1996. Effects of cytokines combined with high-dose gamma irradiation on the expression of major

-
- histocompatibility complex molecules and intercellular adhesion molecule-1 in human ovarian cancers. *Int J Cancer* 65:688-94.
- Sarris, A., Esgleyes-Ribot, T., Crow, M., Broxmeyer, H., Karasavvas, N., et al. 1995. Cytokine loops involving interferon-gamma and IP-10, a cytokine chemotactic for CD4+ lymphocytes: an explanation for the epidermotropism of cutaneous T-cell lymphoma? *Blood* 86:651-658
- Scanlan, M., Chen, Y., Williamson, B., Güre, A., Stockert, E., et al. 1998. Characterization of human colon cancer antigens recognized by autologous antibodies. *Int. J. Cancer* 76:652-658
- Scanlan, M. J., Altorki, N. K., Gure, A. O., Williamson, B., Jungbluth, A., et al. 2000. Expression of cancer-testis antigens in lung cancer: definition of bromodomain testis-specific gene (BRDT) as a new CT gene, CT9. *Cancer Lett* 150:155-64.
- Scanlan, M. J., Gure, A. O., Jungbluth, A. A., Old, L. J., Chen, Y. T. 2002. Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy. *Immunol Rev* 188:22-32.
- Scanlan, M. J., Williamson, B., Jungbluth, A., Stockert, E., Arden, K. C., et al. 1999. Isoforms of the human PDZ-73 protein exhibit differential tissue expression. *Biochim Biophys Acta* 1445:39-52.
- Schmekel, K., Meuwissen, R., Dietrich, A., Vink, A., van Marle, J., et al. 1996. Organization of SCP1 protein molecules within synaptonemal complexes of the rat. *Exp Cell Res* 226:20-30
- Schmitz, K., Brugger, W., Weiss, B., Kaiserling, E., Kanz, L. 1999. Clonal selection of CD20-negative non-Hodgkin's lymphoma cells after treatment with anti-CD20 antibody rituximab. *Br J Haematol* 106:571-572
- Schwab, M. 1999. Oncogene amplification in solid tumors. *Semin Cancer Biol* 9:319-25.
- Schwemmle, M., Kaspers, B., Irion, A., Staeheli, P., Schultz, U. 1996. Chicken guanylate-binding protein. Conservation of GTPase activity and induction by cytokines. *J Biol Chem* 271:10304-8.

-
- Sehr, P., Zumbach, K., Pawlita, M. 2001. A generic capture ELISA for recombinant proteins fused to glutathione S-transferase: validation for HPV serology. *J Immunol Methods* 253:153-62.
- Seiter, S., Schadendorf, D., Tilgen, W., Zoller, M. 1998. CD44 variant isoform expression in a variety of skin-associated autoimmune diseases. *Clin Immunol Immunopathol* 89:79-93.
- Sen, G. C., Ransohoff, R. M. 1993. Interferon-induced antiviral actions and their regulation. *Adv Virus Res* 42:57-102.
- Shichijo, S., Nakao, M., Imai, Y., Takasu, H., Kawamoto, M., et al. 1998. A gene encoding antigenic peptides of human squamous cell carcinoma recognized by cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 187:277-88.
- Shimakage, M., Sasagawa, T., Kawahara, K., Yutsudo, M., Kusuoka, H., Kozuka, T. 2001. Expression of Epstein-Barr virus in cutaneous T-cell lymphoma including mycosis fungoides. *Int J Cancer* 92:226-31.
- Siegel, R. S., Pandolfino, T., Guitart, J., Rosen, S., Kuzel, T. 2000. Primary cutaneous T-cell lymphoma: review and current concepts. *J Clin Oncol* 18:2908-25
- Slamon, D. J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., et al. 2001. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 344:783-92.
- Slater, D. 1991. Cutaneous lymphoproliferate disorders: an assessment of recent investigative techniques. *Br J Dermatol* 124:309-323
- Soussi, T. 2000. p53 Antibodies in the sera of patients with various types of cancer: a review. *Cancer Res* 60:1777-88.
- Stadler, R., Otte, H. G., Luger, T., Henz, B. M., Kuhl, P., et al. 1998. Prospective randomized multicenter clinical trial on the use of interferon -2a plus acitretin versus interferon -2a plus PUVA in patients with cutaneous T-cell lymphoma stages I and II. *Blood* 92:3578-81.
- Stark, G. R., Kerr, I. M., Williams, B. R., Silverman, R. H., Schreiber, R. D. 1998. How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* 67:227-64.

-
- Starkebaum, G., Loughran, T. P., Jr., Waters, C. A., Ruscetti, F. W. 1991. Establishment of an IL-2 independent, human T-cell line possessing only the p70 IL-2 receptor. *Int J Cancer* 49:246-53
- Steinwaerder, D. S., Carlson, C. A., Lieber, A. 2001. Human papilloma virus E6 and E7 proteins support DNA replication of adenoviruses deleted for the E1A and E1B genes. *Mol Ther* 4:211-6.
- Steplewski, Z., Lubeck, M. D., Koprowski, H. 1983. Human macrophages armed with murine immunoglobulin G2a antibodies to tumors destroy human cancer cells. *Science* 221:865-7.
- Sterry, W., Gellrich, S., Audring, H., Schulze, P., Jahn, S. 1997. Diagnostik und Klassifikation kutaner Lymphome. In *Dermatologische Onkologie*, ed. C. Garbe, Dummer, R., Kaufmann, R., Tilgen, W. pp. 427-435. Berlin, Heidelberg, New-York: Springer Verlag
- Stockert, E., Jäger, E., Chen, Y., Scanlan, M., Gout, I., et al. 1998. A survey of the humoral immune response of cancer patients to a panel of human tumor antigens. *J Exp Med* 187:1349-54
- Stone, B., Schummer, M., Paley, P. J., Thompson, L., Stewart, J., et al. 2003. Serologic analysis of ovarian tumor antigens reveals a bias toward antigens encoded on 17q. *Int J Cancer* 104:73-84.
- Strehlow, I., Lohmann Matthes, M. L., Decker, T. 1994. The interferon-inducible GBP1 gene: structure and mapping to human chromosome 1. *Gene* 144:295-9
- Stuhler, G., Walden, P. 1994. Recruitment of helper T cells for induction of tumour rejection by cytolytic T lymphocytes. *Cancer Immunol Immunother* 39:342-5.
- Talpur, R., Lifshitz, O., Breuer-Mcham, J., Duvic, M. 2002. Increased serum immunoglobulin levels are common in mycosis fungoides and Sezary syndrome. *J Am Acad Dermatol* 47:685-91.
- Tensen, C. P., Vermeer, M. H., van der Stoop, P. M., van Beek, P., Scheper, R. J., et al. 1998. Epidermal interferon-gamma inducible protein-10 (IP-10) and monokine

- induced by gamma-interferon (Mig) but not IL-8 mRNA expression is associated with epidermotropism in cutaneous T cell lymphomas. *J Invest Dermatol* 111:222-6.
- Tham, Y. L., Verani, M. S., Chang, J. 2002. Reversible and irreversible cardiac dysfunction associated with trastuzumab in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 74:131-4.
- Thangavelu, M., Finn, W. G., Yelavarthi, K. K., Roenigk, H. H., Jr., Samuelson, E., et al. 1997. Recurring structural chromosome abnormalities in peripheral blood lymphocytes of patients with mycosis fungoides/Sezary syndrome. *Blood* 89:3371-7.
- Thomsen, K., Hammar, H., Molin, L., Volden, G. 1989. Retinoids plus PUVA (RePUVA) and PUVA in mycosis fungoides, plaque stage. A report from the Scandinavian Mycosis Fungoides Group. *Acta Derm Venereol* 69:536-8.
- Trauth, B. C., Klas, C., Peters, A. M., Matzku, S., Moller, P., et al. 1989. Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* 245:301-5.
- Trefzer, U., Weingart, G., Chen, Y., Herberth, G., Adrian, K., et al. 2000. Hybrid cell vaccination for cancer immune therapy: first clinical trial with metastatic melanoma. *Int J Cancer* 85:618-26.
- Tukey, J. W. 1977. Exploratory Data Analysis. *Behavioral Science: Quantitative Methods (F. Mosteller, Ed.) Addison-Wesley Publishing Co., Reading, Massachusetts*
- Türeci, O., Sahin, U., Pfreundschuh, M. 1997. Serological analysis of human tumor antigens: molecular definition and implications. *Mol Med Today* 3:342-9.
- Türeci, O., Sahin, U., Schobert, I., Koslowski, M., Schmitt, H., et al. 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* 56:4766-4772
- Türeci, Ö., Sahin, U., Vollmar, E., Siemer, S., Göttert, E., et al. 1998a. Human carbonic anhydrase XII: cDNA cloning, expression, and chromosomal localization of a carbonic anhydrase gene that is overexpressed in some renal cell cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:7608-7613

-
- Türeci, O., Sahin, U., Zwick, C., Koslowski, M., Seitz, G., Pfreundschuh, M. 1998b. Identification of a meiosis-specific protein as a member of the class of cancer testis antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:5211-5216
- Usener, D., Schadendorf, D., Koch, J., Dübel, S., Eichmüller, S. 2002. cTAGE: A cutaneous T-cell lymphoma associated antigen family with tumor-specific splicing. *JID* submitted
- Van den Eynde, B., O., P., De Backer, O., B., G., Lucas, S., 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* 182:689-698
- van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., et al. 1991. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254:1643-7.
- Vestal, D. J., Buss, J. E., McKercher, S. R., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., et al. 1998. Murine GBP-2: a new IFN-gamma-induced member of the GBP family of GTPases isolated from macrophages. *J Interferon Cytokine Res* 18:977-85.
- Vestal, D. J., Gorbacheva, V. Y., Sen, G. C. 2000. Different subcellular localizations for the related interferon-induced GTPases, MuGBP-1 and MuGBP-2: implications for different functions? *J Interferon Cytokine Res* 20:991-1000.
- Vidaeus, C. M., von Kapp-Herr, C., Golden, W. L., Eddy, R. L., Shows, T. B., Herr, J. C. 1997. Human fertilin beta: identification, characterization, and chromosomal mapping of an ADAM gene family member. *Mol Reprod Dev* 46:363-9.
- Vonderheid, E. C., Ekbote, S. K., Kerrigan, K., Kalmanson, J. D., Van Scott, E. J., et al. 1998. The prognostic significance of delayed hypersensitivity to dinitrochlorobenzene and mechlorethamine hydrochloride in cutaneous T cell lymphoma. *J Invest Dermatol* 110:946-50.
- Wang, F., Bade, E., Kuniyoshi, C., Spears, L., Jeffery, G., et al. 1999. Phase I trial of a MART-1 peptide vaccine with incomplete Freund's adjuvant for resected high-risk melanoma. *Clin Cancer Res* 5:2756-65.

-
- Wang, R., Appella, E., Kawakami, Y., Kang, X., Rosenberg, S. 1996. Identification of TRP-2 as a human tumor antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 184:2207-2216
- Wang, R., Robbins, P., Kawakami, Y., Kang, X., Rosenberg, S. 1995. Identification of a gene encoding a melanoma tumor antigen recognized by HLA-A31-restricted tumor-infiltrating lymphocytes. *J Exp Med* 171:799-804
- Wasik, M. A., Vonderheid, E. C., Bigler, R. D., Marti, R., Lessin, S. R., et al. 1996. Increased serum concentration of the soluble interleukin-2 receptor in cutaneous T-cell lymphoma. Clinical and prognostic implications. *Arch Dermatol* 132:42-7
- Weiner, L. M., Adams, G. P. 2000. New approaches to antibody therapy.[In Process Citation]. *Oncogene* 19:6144-51
- Weinstock, M. A., Horm, J. W. 1988. Mycosis fungoides in the United States. Increasing incidence and descriptive epidemiology. *Jama* 260:42-6.
- Whittaker, S. 1996. T-cell receptor gene analysis in cutaneous t-cell Lymphoma. *Clin Exp Derm* 21:81-87
- Whittemore, A. S., Holly, E. A., Lee, I. M., Abel, E. A., Adams, R. M., et al. 1989. Mycosis fungoides in relation to environmental exposures and immune response: a case-control study. *J Natl Cancer Inst* 81:1560-7.
- Willemze, R., Kerl, H., Sterry, W., Berti, E., Cerroni, L., et al. 1997. EORTC classification for primary cutaneous lymphomas: a proposal from the Cutaneous Lymphoma Study Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer. *Blood* 90:354-371
- Willers, J., Haffner, A., Zepter, K., Storz, M., Urosevic, M., et al. 2001. The interferon inhibiting cytokine IK is overexpressed in cutaneous T cell lymphoma derived tumor cells that fail to upregulate major histocompatibility complex class II upon interferon-gamma stimulation. *J Invest Dermatol* 116:874-9.
- Wölfel, T., Hauer, M., Schneider, J., Serrano, M., Wolfel, C., et al. 1995. A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science* 269:1281-1284

- Wood, G., Schaffer, JM., Boni, R., Dummer, R., Burg, G., Takeshita, M., Kikuchi, M. 1997. No evidence of HTLV-I proviral integration in lymphoproliferative disorders associated with cutaneous T-cell lymphoma. *Am J Pathol* 150:667-683
- Wood, G. S., Haeffner, A., Dummer, R., Crooks, C. F. 1994. Molecular biology techniques for the diagnosis of cutaneous T-cell lymphoma. *Dermatol Clin* 12:231-41.
- Wood, G. S., Hardman, D. L., Boni, R., Dummer, R., Kim, Y. H., et al. 1996. Lack of the t(2;5) or other mutations resulting in expression of anaplastic lymphoma kinase catalytic domain in CD30+ primary cutaneous lymphoproliferative disorders and Hodgkin's disease. *Blood* 88:1765-70.
- Wynn, T. A., Nicolet, C. M., Paulnock, D. M. 1991. Identification and characterization of a new gene family induced during macrophage activation. *J Immunol* 147:4384-92.
- Xiang, Z., Yang, Y., Wilson, J., Ertl, H. 1996. A replication-defective human adenovirus recombinant serves as a highly efficacious vaccine carrier. *Virology* 219:220-227
- Yamamoto, A., Shimizu, E., Sumitomo, K., Shinohara, A., Namikawa, O., et al. 1997. L-Myc overexpression and detection of auto-antibodies against L-Myc in both the serum and pleural effusion from a patient with non-small cell lung cancer. *Intern Med* 36:724-7.
- Yee, C., Gilbert, M. J., Riddell, S. R., Brichard, V. G., Fefer, A., et al. 1996. Isolation of tyrosinase-specific CD8+ and CD4+ T cell clones from the peripheral blood of melanoma patients following in vitro stimulation with recombinant vaccinia virus. *J Immunol* 157:4079-86
- Zackheim, H. S. 1994. Topical carmustine (BCNU) for patch/plaque mycosis fungoides. *Semin Dermatol* 13:202-6.
- Zalcman, G., Schlichtholz, B., Tredaniel, J., Urban, T., Lubin, R., et al. 1998. Monitoring of p53 autoantibodies in lung cancer during therapy: relationship to response to treatment. *Clin Cancer Res* 4:1359-66.
- Zhang, F. L., Casey, P. J. 1996. Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences. *Annu Rev Biochem* 65:241-69.

Zucker-Franklin, D., Pancake, B. A. 1994. The role of human T-cell lymphotropic viruses (HTLV-I and II) in cutaneous T-cell lymphomas. *Semin Dermatol* 13:160-5.

Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich recht herzlich bei all denen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn Professor Schadendorf danke ich sehr für die Überlassung des interessanten Themas, die optimalen Arbeitsbedingungen und die hilfreichen Diskussionen.

Herrn Prof. Manfred Scharthl danke ich ganz herzlich für die Betreuung meiner Doktorarbeit von Seiten der Universität Würzburg.

Mein Dank gilt Herrn Dr. Stefan Eichmüller für die großartige Betreuung und seinen Einsatz während der gesamten Arbeit. Ich schätze seine Offenheit für neue Methoden und Ideen und möchte mich an dieser Stelle auch dafür bedanken, dass ich die Möglichkeit hatte an Fortbildungen teilzunehmen und auf einer Reihe von interessanten Tagungen meine Arbeit präsentieren zu können.

Michael Pawlita und Christof Gänzler danke ich für das Erlernen der Methode des GST-ELISAs und darüber hinaus für viele gute Tipps und Ratschläge.

Dem gesamten Dermato-Onkologie-Team danke für eine gute und hilfsbereite Atmosphäre. Mit den „Tumorantigenen“ habe ich drei abwechslungsreiche und schöne Jahre mit vielen leckeren Kuchen verbringen dürfen. Anita Dahlke und Judith Bartels möchte ich für die tatkräftige Unterstützung im Labor und viele amüsante Kaffeepausen danken. Nicole Gottstein und Mieun Lee danke ich ganz herzlich für ihre detaillierte und sehr hilfreiche Korrektur meiner Arbeit und für eine schöne Zeit. Brigitte Gschwendt danke ich für ihr unendliches methodisches Wissen an dem ich Teil haben durfte. Ganz besonders herzlich danke ich Tanja Hartmann für Motivation, Einfühlungsvermögen und Humor.

Meinen Eltern möchte ich für ihre Unterstützung einschließlich der Korrektur meiner Arbeit und ihren Glauben an mich danken. Danke für ein stets offenes und verständnisvolles Ohr für die kleinen und grösseren Schwierigkeiten.

Ein ganz besonderer Dank gilt Bernhard Häfner, der immer für mich da war mit einer übermenschlichen Geduld, Liebe und viel Humor. Danke, dass du mich er-bzw. getragen hast.

Lebenslauf

Persönliche Daten

- Name: Friederike Fellenberg
- Geburtsdatum: 7.10.1975 in Kassel
- Familienstand: Ledig
- Nationalität: Deutsch

Schulbildung

- 09/1982 - 07/1986 Grundschule Königshof in Hann Münden
- 09/1986 - 07/1988 Orientierungsstufe I Münden
- 09/1988 - 1995 Grotefend Gymnasium Münden
- 06/1995 Allgemeine Hochschulreife (Note: 1,7) Abiturfächer: Mathematik, Biologie, Sozialkunde, Kunst

Studium

- Seit 11/1995 Julius - Maximilians - Universität Würzburg, Studium der Biologie
- 27.10.1997 Diplom-Vorprüfung im Studiengang Biologie mit Gesamtnote: „gut“
- 10/1998 - 06/1999 Studium und externe Diplomarbeit an der Universität Leeds in GB (Socrates – Programm der Europäischen Union)
Thema: Expression of Stalk subunits of the V-ATPase
- 29/03/2000 Diplom der Biologie mit Gesamtnote: „gut“ an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Promotion

- 07/2000 – 10/2003 betreut durch Prof. Dr. Scharl, Lehrstuhl Physiologische Chemie I des Theodor-Boveri-Instituts für Biowissenschaften in Würzburg
- externe Dissertation am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) in Heidelberg (Abtl. Klinische Kooperationsseinheit Dermato-Onkologie), Prof. Dr. Schadendorf
Thema: Charakterisierung von Tumorantigenen des kutanen T-Zell Lymphoms

Würzburg, den 15.09.2003

Friederike Fellenberg

8 Anhang

8.1 Anhang 1: Eigene Veröffentlichungen

8.1.1 Artikel

Fellenberg, F., Hartmann, T., Dummer, R., Schadendorf, D. and Eichmüller, S., *GBP-5 splicing variants: New guanylate-binding proteins with tumor-specific expression and antigenicity*. J Invest Dermatol, eingereicht, 2003.

Usener, D., **Fellenberg, F.**, Pawlita, M., Schadendorf, D. and Eichmüller, S., *Se70-2 autoantigen-family: differentially spliced and recognized by sera-antibodies*. In Vorbereitung

Dummer, R., Hassel, J.C., Maier, T., Slos P., **Fellenberg, F.**, Eichmüller, S., Acres, B., Bataille V., Squiban, P., Burg, G., Urosevic, M., *Adenovirus-mediate intralesional inteferon- γ gene transfer induces tumor regressions in cutaneous lymphomas*. In Vorbereitung

8.1.2 Tagungsbeiträge

Fellenberg, F., Hartmann, T., Schadendorf, D. and Eichmüller, S., *GBP-TA: A new guanylate-binding protein as tumorspecific target for cutaneous T-cell lymphoma*, in Immunology Letters, 15th European Immunology Congress, 2003 87, 1-3, p224. Rhodos 2003

Fellenberg, F., Hartmann, T., Schadendorf, D. and Eichmüller, S., *Tumor antigen GBP-5ta: a member of the newly identified GBP-5 family and a specific target for cutaneous T-cell lymphoma*, in Abstract book, Gemomics and Cancer, German Cancer Research Center (DKFZ), Heidelberg. 2003

Fellenberg, F., Hartmann, T., Schadendorf, D. and Eichmüller, S., *Protein expression and serological reactivity of GBP-TA, a new tumor-specific antigen for CTCL*, in Abstract Book, International Symposium on the Biology and Immunology of Cutaneous Lymphoma, Berlin. 2002.

Schadendorf, D., Usener, D., **Fellenberg, F.** and Eichmüller, S., *Tumor-associated antigens - perspectives for immune monitoring and vaccination*, in Abstract Book, International Symposium on the Biology and Immunology of Cutaneous Lymphoma, Berlin. 2002.

Fellenberg, F., Hartmann, T., Schadendorf, D. and Eichmüller, S., *GBP-TA, a cutaneous T-cell lymphoma associated antigen, and its serological reactivity in patients' sera*, in Abstract Book, Strategies for Immune Therapy, Würzburg. 2002

Fellenberg, F., Usener, D., Bartels, J., Hartmann, T., Schadendorf, D. and Eichmüller, S., *Identification of a new cutaneous T-cell lymphoma specific tumor antigen, GBP-TA, and frequent detection of serological reactivity in patients sera*. Zeitschrift für Hautkrankheiten H+G, 2001. **76**: p. 518. Wien 2001

Fellenberg, F., Usener, D., Schadendorf, D. and Eichmüller, S., *Recombinant expression of tumor antigens and their recognition by sera from cutaneous T-cell lymphoma patients*. Scand J Immunol, 2001. **54**(Suppl. 1): p. 108. Stockholm 2001

Usener, D., Koch, J., Dübel, S., **Fellenberg, F.**, Schadendorf, D. and Eichmüller, S., *Serological recognition of the cutaneous T-cell lymphoma associated antigen cTAGE-1 and its family members*, Scand J Immunol, 2001. **54**(Suppl. 1): p. 108. Stockholm 2001

8.2 Anhang 2: Protein Alignment der humanen GBPs

GBP-5ta	MALEIHMSDPMCLIEFNQELKVNQEALEILSAITQPVVVVAIVG	45
GBP-5a/b	MALEIHMSDPMCLIEFNQELKVNQEALEILSAITQPVVVVAIVG	45
GBP-4	MGERTLHAAVPTPGYPESESIMMAPICLVENQEEQLTVNSKALEILDKISQPVVVVAIVG	60
GBP-3	MAPEIHMTGPMCLIENTNGELVANPEALKILSAITQPVVVVAIVG	45
GBP-2	MAPEINLPGPMSLIDNTKQQLVVNPEALKILSAITQPVVVVAIVG	45
GBP-1	MASEIHMTGPMCLIENTNGRLMANPEALKILSAITQPMVVVAIVG	45
	P-loop PC I II	
GBP-5-ta	LYRTGKSYLMNKLAKGNKGFVASTVQSHTKGIWIWCVPHPNWPNHTLVLLDTEGLGDVE	105
GBP-5a/b	LYRTGKSYLMNKLAKGNKGFVASTVQSHTKGIWIWCVPHPNWPNHTLVLLDTEGLGDVE	105
GBP-4	LYRTGKSYLMNRLAKGRNGFPLGSTVQSETKGIWMMWCVPHLSKPNHTLVLLDTEGLGDVE	120
GBP-3	LYRTGKSYLMNKLAKGNKGFSLGSTVKSHTKGIWMMWCVPHPKKPEHTLVLLDTEGLGDVK	105
GBP-2	LYRTGKSYLMNKLAKGNKGFSLGSTVKSHTKGIWMMWCVPHPKKPEHTLVLLDTEGLGDIE	105
GBP-1	LYRTGKSYLMNKLAKKKKGFSLGSTVQSHTKGIWMMWCVPHPKKPGHILVLLDTEGLGDVE	105
GBP-5ta	KADNKNDIQIFALALLSSTFVYNTVKNIDQGAIDLLHNVTETDILLKARNSPDLDR--V	163
GBP-5a/b	KADNKNDIQIFALALLSSTFVYNTVKNIDQGAIDLLHNVTETDILLKARNSPDLDR--V	163
GBP-4	KSNPKNDSWIFALAVLLSSSFVYNSVSTINHQALEQLHYVTELAELIRAKSCPRPDE--A	178
GBP-3	KGDNQNDSWIFTLAVLLSSTLVYNSMGTIQQAMDQLYYVTELTTHRIRSKSSPDENEN--	163
GBP-2	KGDNENDSWIFALAILLSSSTFVYNSMGTIQQAMDQLHYVTELTDRIRKANSSPGNNS--V	163
GBP-1	KGDNQNDSWIFALAVLLSSTFVYNSIGTIQQAMDQLYYVTELTTHRIRSKSSPDENENEV	165
GBP-5ta	EDPADSASFFPDLVWTLRDFCLGLEIDGQLVTPDEYLENSLRPKQGSQQRVQNFNLPRLC	223
GBP-5a/b	EDPADSASFFPDLVWTLRDFCLGLEIDGQLVTPDEYLENSLRPKQGSQQRVQNFNLPRLC	223
GBP-4	EDSSEFASFFPDFIWTVRDFTLELKLKLDGNPITEDEYLENALKLIPGKNPKIQNSNMPREC	238
GBP-3	EDSADFVSFFPDFVWTLRDFSLDLEADGQPLTPDEYLEYSLKLTQGN-----	210
GBP-2	DDSADFVSFFPAFVWTLRDFLTLELEVDGEPITADDYLELSLKLKRGTDKKSFSFNDPRLC	223
GBP-1	EDSADFVSFFPDFVWTLRDFSLDLEADGQPLTPDEYLYSLKLLKKGTSQKDETFNLPRLC	225
GBP-5ta	IQKFFPKKKCFIFDLPAHQKK-LAQLETLPDDELEPEFVQQVTEFCFSYIFSHSMTKTLPG	282
GBP-5a/b	IQKFFPKKKCFIFDLPAHQKK-LAQLETLPDDELEPEFVQQVTEFCFSYIFSHSMTKTLPG	282
GBP-4	IRHFFRKRKCFVDRPTNDKQYLNHMDEVPEENLERHFLMQSDNFCSYIFTHAKTKTLRE	298
GBP-3	-----RK-LAQLEKLQDEELDPEFVQQVADFCSYIFSNKTKTLTG	250
GBP-2	IRKFFPKRKCFFVDFWPAPKKY-LAHLEQLKEEELNPDFIEQVAEFCSYILSHSNVKTLSG	282
GBP-1	IRKFFPKKKCFVDRPVHRRK-LAQLEKLQDEELDPEFVQQVADFCSYIFSNKTKTLTG	284
GBP-5ta	GIMVNGSRLKNLVLTYVNAISSGDLPCIEAVLALAQRENSAAVQKAI AHYDQQMGQKVQ	342
GBP-5a/b	GIMVNGSRLKNLVLTYVNAISSGDLPCIEAVLALAQRENSAAVQKAI AHYDQQMGQKVQ	342
GBP-4	GIIVTGKRLGTLVVVYVDAINS GAVPCLENAVTALAQLENPAAVQRAADHYSQQMAQQLR	358
GBP-3	GIKVNGPCLESVLVLYINAI SRGDLPCMENAVLALAQIENSAAVQKAI AHYDQQMGQKVQ	310
GBP-2	GIAVNGPRLESVLVLYVNAISSGDLPCMENAVLALAQIENSAAVEKAI AHYEQQMGQKVQ	342
GBP-1	GIQVNGPRLESVLVLYVNAISSGDLPCMENAVLALAQIENSAAVQKAI AHYEQQMGQKVQ	344
GBP-5ta	LPMETLQELLDLHRTS EREAIEVFMKNSFKDVDQSFQKELETLLDAKQNDICKRNLEASS	402
GBP-5a/b	LPMETLQELLDLHRTS EREAIEVFMKNSFKDVDQSFQKELETLLDAKQNDICKRNLEASS	402
GBP-4	LPTDTLQELLDVHAACEREAIAVFMHESFKDENHEFQKKLVDTIEKKKGDFVLQNEEASA	418
GBP-3	LPAETLQELLDLHRV S EREATEVYMKNSFKDVDHFLFQKKLAAQLDKKRDDFCQKQNEASS	370
GBP-2	LPTETLQELLDLHRD S EREAIEVFMKNSFKDVDQMFQRKLGAEARRDDFCQKQNSKASS	402
GBP-1	LPTESLQELLDLHRD S EREAIEV FIRSSFQKDVDHFLFQKELAAQLEKKRDDFCQKQNEASS	404
GBP-5ta	DYCSALLKDI FGPLEEAVKQGIYSKPGGHNLF IQKTEELKAKYYREPRKGIQAEFVLQKY	462
GBP-5a/b	DYCSALLKDI FGPLEEAVKQGIYSKPGGHNLF IQKTEELKAKYYREPRKGIQAEFVLQKY	462
GBP-4	KYCQAEKRLSEHLTESILRGIFSVPGGHNLYLEEKQVEWDYKLVPRKGVKANEVQLQNF	478
GBP-3	DRCSALLQVIFSPLEEEVKAGIYSKPGGYCLFIQKLDLEKKYYEPRKGIQAEFVILQTY	430
GBP-2	DCCMALLQDIFGPLEEDVKQGTFSKPGGYRLFTQKLDLEKKNYYQVPRKGIQAKEVLLKKY	462
GBP-1	DRCSGLLQVIFSPLEEEVKAGIYSKPGGYRLFVQKLDLKKKYYEPRKGIQAEFVILQTY	464

GBP-5-ta	LKSKESVSHAILQTDQALTETEKKKKK-----	489
GBP-5a/b	LKSKESVSHAILQTDQALTETEKKKKEAQVKAEEAEKAEQRLAAIQRQNEQMMQERERLH	522
GBP-4	LQSQVVVEESILQSDKALTAGEKAIAAERAMKEAAEKEQELLREKQKEQQMMEAQERSF	538
GBP-3	LKSKESVTDAILQTDQILTEKEKEIEVECVKAESAQASAKMVEEMQIKYQQMEEKEKSY	490
GBP-2	LESKEDVADALLQTDQSLSEKEKAIEVERIKAESAEEAAKKMLEEIQKKNEEMMEQKEKSY	522
GBP-1	LKSKESMTDAILQTDQTLTEKEKEIEVERVKAESAQASAKMLQEMQRKNEQMMEQKERSY	524
GBP-5ta	-----	
GBP-5a/b	QEQVRQ----MEIAKQNWLAEEQKKMQEQMQEQAAQLSTTFQAQNRSLLSSELQHAQRTVN	578
GBP-4	QENIAQLKKKMERERENLLREHERLLKHKLKVQEEMLKKEEFQKKSEQLNKEINQLKEKIE	598
GBP-3	QEHVKQLTEKMERERAQLLEEQEKTLTSLKQEQARVLKERCQGESTQLQNEIQKLQKTLK	550
GBP-2	QEHVKQLTEKMERDRAQLMAEQEKTLALKLQEQERLLKEGFENESKRLQKDIWDIQMRSK	582
GBP-1	QEHLKQLTEKMENDRVQLLKEQERTLALKLQEQEQLLKEGFQKESRIMKNEIQDLQTKMR	584
	IP	
GBP-5ta	-----	
GBP-5a/b	NDDP-CVLL	586
GBP-4	STKNE-QLRLLKILDMAASNIMIVTLPGASKLLGVGTKYLGSRI*	641
GBP-3	KKTKRYMSHKLKI	563
GBP-2	SLEPICNIL	591
GBP-1	RRKA-CTIS	592

PC= Phosphate Cap

I,II=GTP bindendes Motiv I und II

IP= Isoprenylierungsstelle

P-loop

8.3 Anhang 3: RT-PCR Expressionanalyse GBP-5

Kontrollgewebe	Primer I		Primer II		Primer III
	GBP-5ta/ GBP-5b	GBP-5ta/ GBP-5b	GBP-5a	GBP-5a/b	GBP-5a/b
Knochenmark	+	+	+	+	
Gehirn	-	-	-	+	
Darm	-	-	-	+	
Herz	-	-	-	+	
Niere	-	-	-	+	
Leber	-	-	-	+	
Lunge	-	-	-	+	
Brustdrüse	-	-	-	+	
Ovar	-	-	-	+	
Placenta	+	+	+	+	
PBMC	+	+	+	+	
Prostata	-	-	-	+	
Skelettmuskel	-	-	-	+	
Haut	-	-	-	+	
Dünndarm	+	+	+	+	
Milz	+	+	+	+	
Magen	+	+	-	+	
Testis	-	-	-	+	
Thymus	-	-	-	+	
Trachea	-	-	-	+	
Uterus	-	+	+	+	
	6/21	7/21	6/21	21/21	
	29%	33%	29%	100%	

CTCL Tumorgewebe	Diagnose	Primer I		Primer II		Primer III	
		GBP-5ta/ GBP-5b	GBP-5ta/ GBP-5b	GBP-5a	GBP-5a/b		
B.B.	MF	+	+	-	n.t.		
D.B.	MF	-	-	-	n.t.		
M.F.	MF	-	+	+	+		
E.G.	MF	-	+	+	+		
A.L.	MF	-	+	-	+		
A.M.	MF	+	+	-	+		
L.M.	MF	+	+	+	+		
B.P.	MF	-	-	-	+		
A.S.	MF	-	+	+	-		
H.S.	CTCL	-	+	+	+		
R.T.	MF	+	+	+	-		
B.W.	MF	-	-	-	+		
J.W.	MF	-	-	-	+		
W.W.	MF	-	+	+	+		
E.S.	SS	+	+	-	n.t.		
A.F.	SS	-	-	-	n.t.		
H.J.	SS	+	+	+	n.t.		
H.R.	SS	-	-	-	n.t.		
		6/18 32%	11/18 58%	7/18 37%	10/12 83%		

CBCL Tumorgewebe	Primer I		Primer II		Primer III	
	GBP-5ta/ GBP-5b	GBP-5ta/ GBP-5b	GBP-5a	GBP-5a/b		
W.G.	+	+	+	n.t.		
A.N.	+	+	+	n.t.		
W.R.	-	-	-	n.t.		
	2/3 67%	2/3 67%	2/3 67%			

Melanomzelllinien	Primer I	Primer II		Primer III
	GBP-5ta/ GBP-5b	GBP-5ta/ GBP-5b	GBP-5a	GBP-5a/b
Ma-Mel-18a	-	-	-	+
Ma-Mel-19	-	-	-	-
UKRV-Mel-15	-	-	+	-
Ma-Mel-13	-	-	-	-
UKRV-Mel-31	-	-	+	-
Ma-Mel-11	-	-	-	-
UKRV-Mel-02	+	+	+	-
UKRV-Mel-07	-	-	-	-
Ma-Mel-33	+	+	-	-
Ma-Mel-37a	+	+	-	+
Ma-Mel-17	-	-	-	+
SK-Mel 023	+	+	-	-
UKRV-Mel-11a	-	-	-	-
Ma-Mel-5	+	+	+	+
Ma-Mel-12	+	+	+	+
Ma-Mel-42a	+	+	+	-
UKRV-Mel-10	+	+	-	-
PBMC (MM)	-	-	-	+
Ma-Mel-4	-	-	-	-
	8/19	8/19	6/19	6/19
	42%	42%	32%	32%

CTCL- Zelllinien	Primer I	Primer II		Primer III
	GBP-5ta/ GBP-5b	GBP-5ta/ GBP-5b	GBP-5a	GBP-5a/b
HuT-78	+	+	+	n.t.
HH	+	+	+	n.t.
SeAx	-	-	+	n.t.
MyLA	-	-	+	n.t.

Leukämie- Zelllinien	Primer I	Primer II		Primer III
	GBP-5ta/ GBP-5b	GBP-5ta/ GBP-5b	GBP-5a	GBP-5a/b
ARA-10	-	-	-	n.t.
Jurkat	-	-	-	n.t.
K562	-	-	-	n.t.
KG1	+	-	+	n.t.