

Charakterisierung von Tumorantigenen des kutanen T-Zell Lymphoms

Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der
Naturwissenschaften“
am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Dirk Usener
geb. am 12.12.1972 in Mainz

Mainz, 2003

Tag der mündlichen Prüfung: 24.06.2003

Die vorliegende Arbeit wurde am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) Heidelberg in der Arbeitsgruppe Tumorantigene (Dr. Eichmüller) der Abteilung Klinische Kooperationsseinheit Dermato-Onkologie (Prof. Schadendorf) durchgeführt.

Meinem Vater

Inhaltsverzeichnis

1	<u>EINLEITUNG</u>	1
1.1	VAKZINATIONSTHERAPIEN	3
1.1.1	ANTIKÖRPERTHERAPIEN	3
1.1.2	IMMUNISIERUNGSTHERAPIEN	3
1.2	ANTIGENE	4
1.2.1	ANTIGENKLASSEN	5
1.2.2	IDENTIFIKATION VON ANTIGENEN	10
1.2.3	ANTIGENE ALS IMMUNOGENE STRUKTUR	12
1.3	DAS KUTANE T-ZELL LYMPHOM UND SEINE ANTIGENEN STRUKTUREN	14
1.3.1	THERAPIE	14
1.3.2	MÖGLICHE URSACHEN DER CD4+ PROLIFERATION	14
1.3.3	IMMUNTHERAPIE DES CTCL	15
1.3.4	ANTIGENE BEIM KUTANEN T-ZELL LYMPHOM	16
1.4	ZIEL DER ARBEIT / AUFGABENSTELLUNG	17
2	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	18
2.1	IDENTIFIZIERUNG VERWANDTER GENE / GENFAMILIEN	18
2.1.1	HYREX (= DNA HYBRIDIZATION ANALYSIS OF RECOMBINANTLY EXPRESSED CDNA LIBRARIES)	18
2.1.2	IN-VIVO-EXCISION	20
2.1.3	SEQUENZIERUNG	20
2.1.4	RACE (RAPID AMPLIFICATION OF CDNA ENDS)	21
2.1.5	COMPUTER-PROGRAMME	23
2.2	SEROLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN	24
2.2.1	SEREX	24
2.2.2	EPITOPE MAPPING	26
2.3	EXPRESSIONSANALYSEN DER ANTIGENE	27
2.3.1	RNA GEWINNUNG	27
2.3.2	HERSTELLUNG VON CDNA	28
2.3.3	RT-PCR	29
2.3.4	PCR-SOUTHERN BLOT	34
2.3.5	NORTHERN BLOT	35
2.3.6	SOUTHERN BLOT	35
2.3.7	ANTIKÖRPER HERSTELLUNG	36
2.3.8	PROTEIN-ISOLATION	36
2.3.9	WESTERN-BLOT	37
2.4	IMMUNHISTOLOGIE	38
2.4.1	CYTOSPINS	38
2.4.2	PARAFFINSCHNITTE	38
2.5	FACS	39
2.6	COMPUTERPROGRAMME	39

2.7	LÖSUNGEN	40
2.7.1	MEDIEN UND AGAR	40
2.7.2	HYREX / SEREX	40
2.7.3	LÖSUNGEN FÜR CDNA / DNA ARBEITEN	41
2.7.4	LÖSUNGEN FÜR RNA ARBEITEN	42
2.7.5	LÖSUNGEN FÜR PROTEIN ARBEITEN	43
2.8	GERÄTE / REAGENZIEN	44
2.8.1	ANTIKÖRPER	44
2.8.2	CHEMIKALIEN	44
2.8.3	VERBRAUCHSMATERIAL	46
2.8.4	FERTIGE KITS	46
2.8.5	GERÄTE	46
3	ERGEBNISSE	48
3.1	BEKANNTE ANTIGENE ALS TUMORMARKER	48
3.1.1	CT-ANTIGENE BEIM CTCL	48
3.1.2	EXPRESSION BEKANNTER LYMPHOZYTEN-ASSOZIIERTER ANTIGENE IN KUTANEN T-ZELL LYMPHOMEN	51
3.2	cTAGE: CTCL ASSOZIIERTE ANTIGENFAMILIE MIT TUMORSPEZIFISCHEM SPLICING	53
3.2.1	cTAGE-1 / cTAGE-2 SPLICING AUS CHROMOSOM 18p11.2	53
3.2.2	IDENTIFIKATION DER cTAGE-FAMILIE	55
3.2.3	CHROMOSOMALE LOKALISATION	58
3.2.4	IMMUNOGENITÄT DER cTAGE-FAMILIE	64
3.2.5	EXPRESSIONSANALYSE DER cTAGE-GENFAMILIE	66
3.2.6	ZELLULÄRE LOKALISATION DER cTAGE-FAMILIE	73
3.3	IDENTIFIKATION, EVALUIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG NEUER CTCL ASSOZIIERTER TUMORANTIGENE	76
3.3.1	PAR-3 / SE2-5 ANTIGENFAMILIE	76
3.3.2	LYMPHOMASSOZIIERTES ANTIGEN SE20-10	80
3.3.3	KLON SE57-1	86
3.3.4	KLON SE70-2	87
4	DISKUSSION	93
4.1	CT-ANTIGENE	93
4.1.1	SEROLOGISCHE IMMUNOGENITÄT VON CT-ANTIGENEN	96
4.1.2	BEWERTUNG CT-ANTIGEN BEIM CTCL	98
4.2	LYMPHOM-ASSOZIIERTE ANTIGENE	99
4.2.1	BEKANNTE LYMPHOZYTEN ASSOZIIERTE ANTIGENE	100
4.2.2	AUTOANTIGENE	100
4.2.3	VIRUS INDUZIERTER ANTIGENE	101
4.2.4	AUTOANTIGENE MIT TUMORSPEZIFISCHER IMMUNOGENITÄT	103
4.2.5	ÜBEREXPRIMIERTER ANTIGENE	103
4.2.6	SPLICING-ANTIGENE	105
4.2.7	ONKOGENE	106
4.2.8	NEUE LYMPHOM SPEZIFISCHE-ANTIGENE	108
4.3	cTAGE-FAMILIE	109

4.3.1	TUMORSPEZIFISCHES SPLICING	110
4.3.2	PSEUDOGENE	111
4.3.3	TUMORANTIGENE UND PSEUDOGENE	114
4.3.4	EXPRESSIONSANALYSE UND IMMUNOGENITÄT	114
4.4	ABSCHLIEBENDE BEWERTUNG DER TUMORTARGETS FÜR DAS CTCL	117
4.5	CTCL: PROLIFERATION EINER CD4 T-ZELLE	118
4.6	INTEGRIERTE IMMUNANTWORT	119
4.7	ZUSAMMENFASSUNG	122
5	<u>LITERATUR</u>	123
6	<u>ANLAGEN</u>	A

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1-1: SCHEMATISCHE ÜBERSICHT VON ANTIGENKLASSEN	6
TABELLE 2-1: SEQUENZIER PRIMER.....	20
TABELLE 2-2: RACE PRIMER.....	23
TABELLE 2-3: <i>E. COLI</i> LYSIS ANSATZ.....	25
TABELLE 2-4: SERUMENDVERDÜNNUNG	26
TABELLE 2-5: CDNA-HERSTELLUNG	28
TABELLE 2-6: PRIMER	30
TABELLE 2-7: RT-PCR PROBEN.....	34
TABELLE 2-8: BOOST SCHEMA ZUR CTAGE-1 UND CTAGE-5A ANTIKÖRPER HERSTELLUNG	36
TABELLE 2-9: WESTERN-BLOT REAGENZIEN.....	37
TABELLE 3-1: CT-ANTIGENE IN CTCL TUMOREN.....	49
TABELLE 3-2: SEREX ANALYSE VON CT-ANTIGENEN MIT CTCL SEREN	50
TABELLE 3-3: MUC-1, WT-1 UND PRAME RT-PCR EXPRESSION	51
TABELLE 3-4: HOMOLOGIE DER CTAGE-FAMILIE	57
TABELLE 3-5: CHROMOSOMALE LOKALISATION DER CTAGE MRNAS.....	60
TABELLE 3-6: SEREX ANALYSE DER CTAGE-FAMILIE	66
TABELLE 3-7: RT-PCR ANALYSE DER CTAGE-GENE AN NORMAL-GEWEBE.....	67
TABELLE 3-8: MRNA EXPRESSIONSMUSTER IN CTCL GEWEBEN	69
TABELLE 3-9: RT-PCR ANALYSE AN TUMOR CDNA	70
TABELLE 3-10: RT-PCR ANALYSE DER PAR-3 / SE2-5 GENFAMILIE	78
TABELLE 3-11: SEREX-ANALYSE DER PAR-3 / SE2-5 FAMILIE.....	80
TABELLE 3-12: RT-PCR AN SE20-10 VERWANDTEN MRNAS	82
TABELLE 3-13: SEREX ANALYSE DER LAA PHAGEN-KLONE.....	84
TABELLE 3-14: SEREX ERGEBNISSE DER SE70-2 FAMILIE.....	89
TABELLE 3-15: SE70-2 RT-PCR	90

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1-1: SCHEMA EINER IMMUNABWEHR GEGEN EINEN ANTIGEN-TRAGENDEN TUMOR	2
ABBILDUNG 1-2: SEREX METHODE	11
ABBILDUNG 1-3: IMMUNANTWORT GEGEN EINE CTAGE-1 KODIERENDE MALIGNEN CD4 T-ZELLE	13
ABBILDUNG 2-1: SEQUENZIER PCR	21
ABBILDUNG 2-2: RACE-PCR	23
ABBILDUNG 2-3: GAPDH PCR	29
ABBILDUNG 2-4: PCR-MATERIALIEN	29
ABBILDUNG 2-5: PCR-PROGRAMM	30
ABBILDUNG 3-1: ORGANISATION AUF CHROMOSOM 18P11-2.....	54
ABBILDUNG 3-2: GENOMISCHER SOUTHERN-BLOT MIT CTAGE-1 UND CTAGE-2 ALS SONDE....	56
ABBILDUNG 3-3: EXON / INTRON STRUKTUR EINES ABSCHNITTES AUS CHROMOSOM 14.....	61
ABBILDUNG 3-4: CHROMOSOMALE LOKALISATION VON CTAGE-4.....	62
ABBILDUNG 3-5: EPITOPE MAPPING VON CTAGE-1	65
ABBILDUNG 3-6: HYREX UND SEREX ANALYSE VON CTAGE-KLONEN	65
ABBILDUNG 3-7: CTAGE FAMILIEN NORTHERN-BLOT ANALYSE	71
ABBILDUNG 3-8: CTAGE-5 WESTERN-BLOT ANALYSE.....	72
ABBILDUNG 3-9: ZELLULÄRE CTAGE-5 LOKALISATION	73
ABBILDUNG 3-10: FACS ANALYSE MIT CTAGE-5 SPEZIFISCHEN ANTIKÖRPERN.....	75
ABBILDUNG 3-11: MRNA ALIGNMENT DER PAR-3 / SE2-5 GENFAMILIE	77
ABBILDUNG 3-12: CHROMOSOMALE STRUKTUR DER PAR-3 / SE2-5 FAMILIE	78
ABBILDUNG 3-13: ALIGNMENT DER SE20-10 FAMILIE.....	81
ABBILDUNG 3-14: EXON / INTRON STRUKTUR DER LAA FAMILIE	82
ABBILDUNG 3-15: NORTHERN-BLOT ANALYSE LAA-FAMILIE.....	83
ABBILDUNG 3-16: SE57-1 MRNA ALIGNMENT.....	86
ABBILDUNG 3-17: SE70-2 NORTHERN-BLOT ANALYSE.....	87
ABBILDUNG 3-18: EXON / INTRON STRUKTUR AUF CHROMOSOM 13 DER SE70-2 GENFAMILIE ..	88
ABBILDUNG 3-19: MRNAVERGLEICH DER SE70-2 FAMILIE.....	90

Anlagenverzeichnis

ANLAGE 1: AUS DER DISSERTATION ENTSTANDENE VERÖFFENTLICHUNGEN	A
ANLAGE 2: SONSTIGE VERÖFFENTLICHUNGEN	A
ANLAGE 3: PATENTE	A
ANLAGE 4: KONGREßBEITRÄGE.....	B
ANLAGE 5: PEPTID ALIGNMENT DER CTAGE-FAMILIE	E

Abkürzungsverzeichnis

Acc. Nr.	Accession Nummer
AML	Akute myeloische Leukämie
CBCL	kutanes B-Zell Lymphom (cutaneous B-cell Lymphoma)
CD	Oberflächen Protein (cluster of differentiation)
CDS	Kodierende Sequenz (coding sequence)
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-Lymphozyten (cytotoxic T-cells)
CL	kutane Lymphome (cutaneous lymphomas)
GAGE	Tumorspezifisches Antigen, analog zu MAGE benannt
HeLa	Zelllinie eines Gebärmutterhalskarzinomes
HH	Zelllinie einer Lymphomatoiden Papulosis (CTCL)
HYREX	DNA Hybridisierung Analyse an rekombinant exprimierten cDNA Banken (DNA hybridization analysis of recombinantly expressed cDNA phage libraries)
HLA	Human Leukozyten Antigen
HNSCC	Head and Neck squamous cell carcinoma
HuT 78	Zelllinie eines SS
KG-1	Zelllinie einer AML
LAA	Lymphom assoziierte Antigene
MAGE	Melanom-assoziertes Antigen

MF	Mycosis fungoides
MHC	Major Histocompatibility complex
MyLa	Zelllinie einer MF
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
RAGE	Nieren Zell Karzinom assoziiertes Antigen (Renal-cell carcinoma associated antigen)
SeAx	Zelllinie eines SS
SEREX	Serologische Analyse von Tumorantigenen an rekombinant exprimierten cDNA Banken (serological identification of recombinantly expressed cDNA phage libraries)
SS	Sézary Syndrom
TAA	tumorassoziierte Antigene
TCR	T-Zell Rezeptor (T-cell receptor)

1 Einleitung

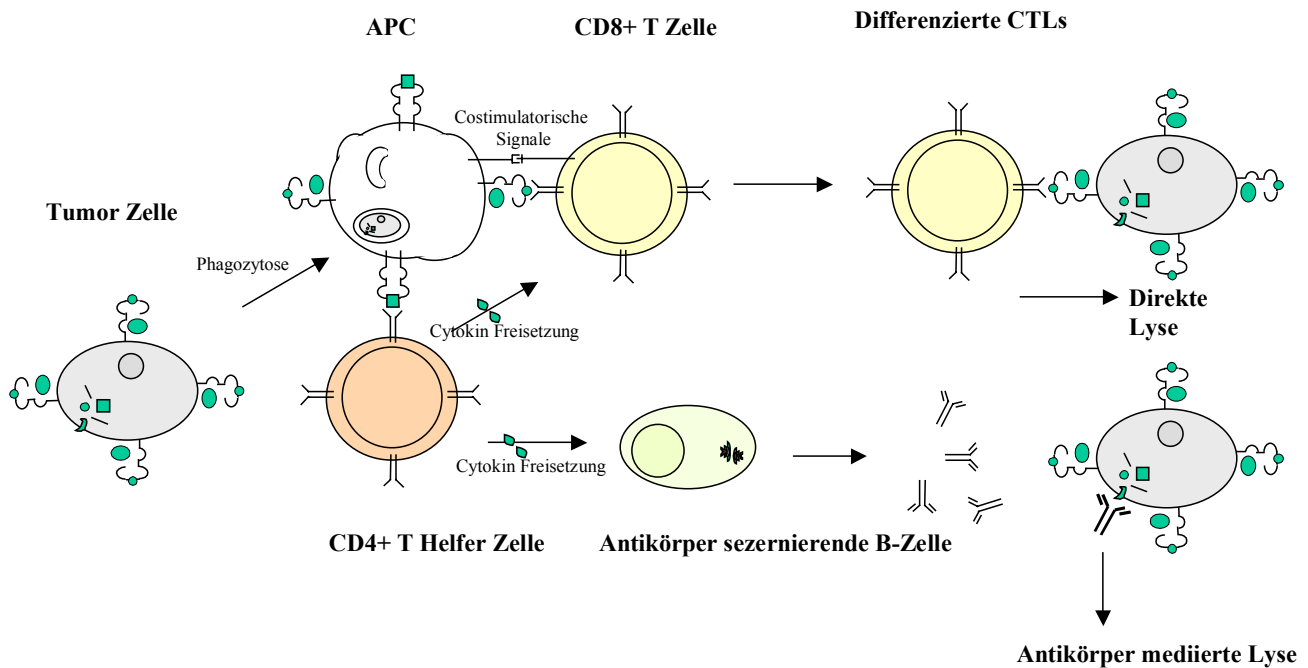
Die meisten systemischen Therapien bei fortgeschrittenen Krebserkrankungen gehen zur Zeit nicht über palliative Maßnahmen hinaus. Eine gezielte und sichere Vernichtung aller Krebszellen in einem Patienten scheinen mit den herkömmlichen Therapie-Ansätzen nur schwer möglich zu sein. Dies ist aber eine für die erfolgreiche Bekämpfung der Krebserkrankung zwingende Voraussetzung.

Das Potenzial des körpereigenen Immunsystems wird deutlich in der spontanen Regression von Tumoren, was bei Melanomen und bei Nierenzell-Karzinomen [1] schon vor langer Zeit beobachtet werden konnte. Neuere Therapie-Ansätze machen sich das körpereigene Immunsystem zunutze um Mikro-Metastasen aufzuspüren und zu vernichten, indem das Immunsystem zur effektiven Bekämpfung maligner Erkrankungen gezielt aktiviert wird. Immunmodulatorische Reagenzien (z.B. Interferone oder Zytokine), die das Immunsystem unspezifisch stimulieren, zeigen keine befriedigenden Erfolge. Dagegen zeigen Immunisierungsstrategien mit spezifischen Erkennungsstrukturen in experimentellen Therapieansätzen die ersten Erfolge, z.B. beim Melanom durch die Präsentation von tumorspezifischen Antigenen in einem definierten HLA-Kontext [2]. Spezifische Immuntherapien basieren darauf, dass Krebszellen Antigene exprimieren.

Damit Antigene als immunogen vom Immunsystem erkannt werden, müssen spezifische Tumorproteine von einer Antigenpräsentierenden Zelle (APC) aufgenommen werden (siehe Abbildung 1-1). Die Tumor-Proteine werden MHC I und MHC II präsentiert und so von CD8⁺ und von CD4⁺ T-Zellen erkannt. Die CD8⁺ Zelle differenziert sich zu einer zytotoxischen T-Zelle (CTL), die Tumorzellen über MHC I präsentiertem Antigen erkennt und damit lysieren kann. Die CD4⁺ Zelle induziert naive B-Zellen zur antigenspezifischen Differenzierung, sodass reife Plasma-B-Zellen spezifische Antikörper sezernieren.

Immuntherapien versuchen eine CTL Antwort zu stimulieren oder zu induzieren, indem eine Antigen-präsentierende Zelle (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.

Abbildung 1-1: Schema einer Immunabwehr gegen einen Antigen-tragenden Tumor



Die Schemazeichnung stellt eine mögliche Immunabwehr gegen eine Tumorzelle dar. Ein spezifisches Antigen wird in der Tumorzelle degradiert und MHC I präsentiert. Eine Antigenpräsentierende Zelle (APC) kann eine Tumorzelle phagozytieren und die spezifischen Antigene über MHC I und MHC II präsentieren. Über MHC I werden naive CD8+ T-Zellen zur Proliferation und Differenzierung zu Zytotoxischen T-Zellen (CTL) initiiert. MHC II präsentiertes Antigen wird von CD4+ T-Helfer Zellen erkannt. B-Zellen werden über Cytokine zur Antikörper Freisetzung angeregt. Die Tumorzelle kann über zwei Mechanismen lysiert werden. Entweder lysiert die CTL direkt über ein MHC I präsentiertes Antigen die Tumorzelle, oder ein spezifisches membranständiges Protein der Tumorzelle wird über einen Antikörper mediierten Mechanismus lysiert.

Vakzinierungen in der Tumorthherapie dienen dazu, die Immunabwehr des Patienten auf spezifische Zielstrukturen, d.h. spezifische Antigene des eigenen Tumors zu lenken. Bei einer Reihe von verschiedenen Neoplasien, wie dem Mammakarzinom [3], dem Zervixkarzinom oder dem Melanom [4], wird eine Immunisierungstherapie angestrebt, da dort spezifische Antigene bereits bekannt sind. Auch beim kutanen T-Zell Lymphom (CTCL) werden solche Strategien diskutiert [5]. Um Tumorantigene für Therapien einsetzen zu können, dürfen die Antigene nicht in gesundem Gewebe exprimiert werden oder zumindest dort nicht vom Immunsystem erkannt werden. Eine erfolgreiche Immuntherapie setzt spezifische Antigene

voraus, die in dieser Arbeit vor allem für das CTCL identifiziert, charakterisiert und damit evaluiert werden sollen.

1.1 Vakzinationstherapien

1.1.1 Antikörpertherapien

Tumorzellen, die durch monoklonale Antikörper spezifisch erkannt werden, können über folgende Effektorfunktionen lysiert werden:

- lokale Initiierung der Komplementkaskade
- Rekrutierung von Effektorzellen oder
- Antikörper gekoppelte Toxine bzw. spezifische Sekundär-Antikörper mit gekoppelten Toxinen [6, 7]

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 AML, akuter myeloischer Leukämie) zugelassen [8].

Mit Herceptin gegen Mamma-Karzinome konnte in Kombination zu herkömmlichen Chemotherapien eine signifikante Steigerung des progressionsfreien Intervalls erreicht werden [9]. Auch mit Rituximab konnten vielversprechende Ergebnisse in ersten klinischen Untersuchungen beobachtet werden [10].

1.1.2 Immunisierungstherapien

Im Gegensatz zu den Antikörpertherapien bezweckt eine Impfstrategie generell die aktive Beteiligung und Unterstützung des Immunsystems, um eine gezielte Immunantwort gegen Tumorzellen zu entwickeln. Es gibt verschiedene Ansätze dieser Vakzinationstherapien.

- Peptid-Vakzinierungen zeigen, dass eine immunologische Antwort induzierbar ist, jedoch konnten keine klinischen Regressionen beobachtet werden (Beispiel: Melanom mit Melan-A/Mart1 Vakzine [11]).

- Antigenpräsentierende Zellen (APC) werden mit spezifischen Antigenen oder Tumorlysaten von außen beladen (Melanom: [2], Prostata-Karzinom: [12]), um CD8 Zellen zu induzieren und dadurch eine starke Immunstimulanz zu erwirken. Da die Beladung von Peptiden HLA-abhängig erfolgen muss, können nur spezifische und vorher definierte Z-Zell Epitope werden. Andere Ansätze versuchen die APC mittels Viren oder Bakterien zu infizieren, um so das spezifische Epitop des Antigens durch die APC selbst MHC I oder MHC II exprimieren zu lassen [13-16]. Für beide Ansätze müssen spezifische Antigene für einen Tumor bekannt sein, da kein autologes Tumormaterial verwendet werden kann.
- Durch eine Fusion von autologen Tumorzellen und APCs [17] sollen autologe Antigene an der Oberfläche der APC präsentiert werden, sodass die vorherige molekulare Identifikation von Tumorantigenen entfällt. Erste Studien sind beim Melanom durchgeführt worden [18].
- Auch der Transfer von autologen Gedächtniszellen [19] wird diskutiert.

1.2 Antigene

Tumorantigene sind i.d.R. physiologisch vorkommende, auch auf normalen Zellen exprimierte Antigene [20], die sich über verschiedene Wege zu Tumorantigenen, gegen die eine Immunantwort stattfindet, entwickeln. Eine Veränderung der molekularen Struktur durch Mutationen, chromosomale Translokationen, verändertes Splicing, Translation alternativer Leserahmen oder auch durch posttranslationale Modifikationen können immunogene Proteine generieren (siehe [21]). Auch Veränderungen der regulatorischen Elemente können das Expressionsverhalten, wie eine selektive oder differentielle Expression, Genamplifikation, oder eine Expression in einem anderen Zellkompartiment bewirken.

Demgegenüber existieren Neo-Antigene, die nicht in "normalen" Zellen exprimiert sind. Diese Neo-Antigene sind nicht-körpereigene "Fremd"-Antigene nach einer bakteriellen oder viralen Infektion, die ebenfalls als antigene Strukturen bei malignen Erkrankungen beschrieben wurden [22]. Gegen diese findet i.d.R. immer eine starke Immunantwort statt, die nicht induziert werden muss.

Eine Immuntherapie versucht das Immunsystem zur effektiven Bekämpfung maligner Erkrankungen gezielt zu aktivieren. Im Gegensatz zu pathogenen Antigenen induzieren

körpereigene Antigene i.d.R. nur eine schwache Immunabwehr, da Tumorantigene Selbst-Antigene sind, gegen die eine immunologische Toleranz durch klonale Deletion oder Anergie induziert wurde. Oftmals besteht bereits eine ineffiziente Immunantwort des Körpers gegen den Tumor, die durch spezifische CTLs oder reaktive Antikörper nachgewiesen werden kann [23, 24]. Gegen solche Antigene muss die immunologische Toleranzschwelle durchbrochen werden, um eine suffiziente Immunantwort auszubilden.

1.2.1 Antigenklassen

Antigene lassen sich aufgrund ihrer Eigenschaften, ihrer Expression und molekularen Alterationen in fünf verschiedene Untergruppen einteilen (siehe Tabelle 1-1).

Antigene durch molekulare Alterationen

Mutation oder andere strukturelle Veränderungen (posttranslationale Modifikationen, Defekte in der Antigen-Prozessierung) können zur immunogenen Erkennung und zur Immunantwort führen. Dies wurde in vielen Arbeiten für das Tumorsuppressorgen p53 beschrieben [25-28].

Durch **Mutationen** in der Gensequenz kann es zu Veränderungen im Protein kommen, wodurch neue Epitope entstehen können, für die keine Immuntoleranz besteht [29, 30]. Da diese Mutationen meistens aber einzigartig oder zumindest sehr selten sind, eignen sie sich nicht für eine Immuntherapie verschiedener Patienten. Beispielsweise konnten durch CTLs

- eine CDK4 Mutation [31],
- eine Punktmutation in einem unbekanntem Gen [32] und
- eine β -Catenin Mutation [33]

bei je einem Melanom-Patienten nachgewiesen werden. Weitere Antigene, die durch Punktmutationen entstanden sind: MUM-1, MUM-2 und MUM-3 (Melanoma ubiquitously mutated) [34].

Bei Nierenzell-Karzinomen konnten CTL gegen ein mutiertes HLA-A2 generiert werden [35], bei HNSCC (=Head and Neck squamous cell carcinoma) Patienten fungiert ein mutiertes CASPASE-8 Protein als Antigen [36] und bei Harnblasen Karzinomen wurden gegen ein unbekanntes, mutiertes KIAA0205 CTLs nachgewiesen [37].

Tabelle 1-1: schematische Übersicht von Antigenklassen

	Beispiele	Referenzen
Gen-Produkte verändert durch		
Punkt-Mutation	p53 p16INK4a	[28] [31]
Translokation	BCR / ABL ALK Kinase	[38] [39]
Splice Varianten	cTAGE NY-Col-38 p53	[40] [28] [41]
Posttranslationale Modifikation		[42]
Veränderte Antigen-Prozessierung		[43]
amplifizierte Antigene	Her-2/neu MYCL Carbonic Anhydrase XII	[44] [45] [46]
Virale Antigene	Hom-RCC-1.14 / HERV- K10	[47]
Differenzierungs-Antigene	Tyrosinase TRP1 und TRP2	[48] [49]
Cancer Testis Antigene	MAGE-A SSX-2 NY-ESO-1	[23] [50] [51]
Autoantigene	NY-ESO-2 / U1-snRNP	[51]
mit tumorspezifischer Immunogenität	Hom-Mel-2.4 / CEBP	[52]

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 (untere Hälfte der Tabelle) beschrieben werden [53].

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 der Translokation entsteht ein neues Fusionsprotein, das BCR / ABL Fusionsprotein. Die BCR / ABL mRNA konnte in 80% der Ph positiven CML Patienten gefunden werden [38]. Dieses Onkogen ist

stark immunogen. HLA-spezifische Epitope aus BCR/ABL konnten identifiziert und CTLs generiert werden [38, 54]. Daneben konnte die BCR / ABL Immunogenität durch reaktive Antikörper in Seren von Ph⁺ - und Ph⁻ CML Patienten und allerdings auch in Kontrollpersonen bestätigt werden [55]. Ebenfalls durch eine Translokation t(2,5)(p23,q35) entsteht eine veränderte anaplastische Lymphom Kinase (ALK), die im Zellkern akkumuliert. Immunhistochemische Untersuchungen konnten die ALK bei 53% (n=72) der CD30⁺ anaplastisch-großzelligen Lymphome (=ALCL) nachweisen, bei anderen Tumoren des CTCL (n=77) dagegen nicht [39]

NY-LU-12 ist ein SEREX definiertes Antigen, das durch **alternatives Splicing** des Tumorsuppressorgens g16 entsteht. Durch das alternative Splicing entsteht ein Frameshift, wodurch NY-LU-12 ein längeres Protein kodiert, gegen das Tumorkranken reaktive Antikörper besitzen [56]. Gegen das Tumorantigen NY-Col-38 / PDZ73 reagieren Nierenzell- und Kolon-Karzinom Patienten. Zu diesem Tumorantigen sind 4 weitere Isoformen bekannt, die durch alternatives Splicing entstehen [57]. Reaktive Antikörper gegen das Splicing Produkt des Restins sind in Kontrollseren und Krebspatienten-Seren zu finden [24, 58]. Das Oberflächenantigen CD-44 wird alternativ zu verschiedenen mRNAs gespliced, die als prognostischer und metastatischer Faktor diskutiert werden [59-61].

Virale Antigene

Virus assoziierte Antigene sind im Zusammenhang der Tumorentstehung bislang wenig bekannt. Diese wären perfekte Zielstrukturen für eine präventive Vakzine. Bekannt ist bislang beispielsweise das HERV-K10 Antigen im Rahmen von Nierenzell-Karzinomen [52]. Gegen die EBV Membranprotein LMP2A und LMP2B konnten reaktive Antikörper in Krebspatienten gefunden werden [62].

Überexprimierte, ubiquitäre Antigene

Genamplifikation, verstärkte Induktionen oder eine größere Stabilität des Proteins können zu einer Überschreitung der Toleranzschwelle führen und somit eine Immunantwort auslösen. Überexprimierte Tumorantigene sind zum Beispiel die Aldolase A [56] bei Lungen-Karzinomen, eIF-4 γ [63] bei kleinzelligen Lungen-Karzinomen und die Carbon-Anhydrase XII [46] bei Nierenzell-Karzinomen. Bekanntester Vertreter dieser ubiquitär exprimierten Antigene ist das Her-2/neu Gen [64, 65], welches als membranständiges Antigen sich sehr gut für eine Therapie mit monoklonalen Antikörpern eignet, was bereits in klinischer Erprobung

ist (Herceptin) [66]. Die Immunität von Her-2/neu konnte durch CTLs und Antikörper bestätigt werden [67]. Es konnten Her-2/neu spezifische CTLs bei Mammakarzinom-Patienten [68] und Antikörper in 14/71 Krebspatienten gegen Her-2/neu gefunden werden. MYCL konnte mit einer 10-20 fachen Expression in SCCL (=Small cell carcinoma of the lung, kleinzelliges Lungen-Karzinom) beobachtet werden [45]. Anti-MYCL Antikörper konnten in Lungenkrebs Patienten mit der Überexpression des Proteins korreliert werden [69].

Differenzierungsantigene

Differenzierungsantigene kennzeichnen Gene, die im Rahmen der Differenzierung von gesunden Zellen exprimiert werden. Melanome entstehen durch Entartung und Proliferation von Melanozyten in der Haut. Es konnten gegen Proteine, die in der Melanin-Synthese eine katalytische Rolle spielen, zytotoxische T-Zellen (CTL) generiert werden, die Melanomzellen *in vitro* und *in vivo* lysieren konnten. Beim Melanom sind als autoimmunogene Differenzierungsantigene beispielsweise die Tyrosinase [48, 70], Melan-A/Mart-1 [71, 72], gp100 [73], das Tyrosinase related protein 1 und 2 (TRP 1 oder gp75, TRP 2) [49, 74] oder alternative Splicing Produkte von pMel17 oder gp100 [75, 76] beschrieben. Die Tyrosinase katalysiert den Schritt des Tyrosins zum DOPA (Dihydroxyphenylalanin), einem Vorläufer des Melanins. CTL gegen Differenzierungsantigene bedeuten einen Bruch der Toleranz gegen Selbst-Antigene, was in einem autoimmunem Phänomen, der Vitiligo, sichtbar werden [77-79].

Differenzierungsantigene konnten auch im Rahmen von Leberzellkarzinomen und Hodgkin-Lymphomen (SOX [80], rab38 aus der rab-Familie [81] und andere), sowie beim Kolon-Karzinom Galektin 4 [28] und beim Nieren-Zell Karzinom RAGE [82] gefunden werden. Auch onkofetale Antigene werden bereits in der Therapie eingesetzt [83]. Ferner können CD Antigene als Differenzierungsantigene gelten. Das CD20 wird beispielsweise bei der Therapie des B-Zell Lymphoms als Erkennungsstruktur benutzt [7]. Auch der T-Zell Rezeptor (TCR) einer klonalen malignen T-Zelle des CTCLs ist differenzierungs-abhängig exprimiert.

Cancer Testis Antigene

Ebenfalls differentiell verteilt sind die sogenannten Cancer Testis Antigene (CT-Antigene, oder auch als Cancer germline genes bezeichnet) [84, 85], die ihre Bezeichnung auf Grund ihres Expressionsmusters besitzen. CT-Antigene sind außer in Tumoren unterschiedlicher

Herkunft nur in den Spermatogonien der Testis zu finden. Immunhistochemische Untersuchungen konnten MAGE-A [86], NY-ESO-1 [87, 88] und CT-7 [89] in jungen Spermatogonien der Testis finden.

Der Grund für dieses charakteristische Expressionprofil wird in den Regulationsmechanismen vermutet. Eine maligne Transformation ist häufig assoziiert mit einer genomweiten Demethylierung der CpG Inseln, die eine Aktivierung von normalen „ruhigen“ Genen bewirkt. Bei zumindest einigen Mitgliedern der CT-Antigene steht die Aktivierung in Tumorzellen direkt im Zusammenhang mit der CpG-Demethylierung in Tumoren [90]. Genauso ist eine genomweite Demethylierung in Testis zu erkennen [91, 92]. Eine MAGE-A1, -A2 und -A3 Expression ist häufiger in Metastasen als im primären Tumor zu finden [93]. Als Grund diskutiert man drei regulatorische Promoter-Elemente: Sp-1 Faktor und zwei Transkriptionsproteine (Ets-Faktoren) [94].

Die meisten CT-Antigene sind auf dem X-Chromosom lokalisiert (Ausnahmen: SCP-1 [95] und OY-TES-1 [96] und cTAGE-1 [97, 98]). CT-Antigene sind in ihrer Expression nicht auf einen bestimmten Tumor beschränkt, sondern zeigen ein breites Expressionsmuster. Beispielsweise sind die MAGE-A Gene in vielen verschiedenen Neoplasien zu finden [99, 100]. Das CT-Antigen NY-ESO-1 wurde mittels der SEREX Methode an einer Ösophagus-Karzinom Bank gefunden, konnte aber in der Expression vor allem in Lungenkarzinomen bestätigt werden [51, 101].

CT-Antigene sind vielversprechende Kandidaten für eine Immuntherapie, da Testisgewebe wegen seiner reduzierten bis fehlenden HLA-Expression als immunprivilegiertes Gewebe gilt [102, 103].

Es handelt sich bei den CT-Antigenen meist um Multigen-Familien. So besteht die MAGE-A [104] und die GAGE-Familie [105] aus 15 bzw. 9 Familien Mitgliedern. Zu MAGE-A gibt es viele weitere nah verwandte Genfamilien, wie MAGE-B (17 Mitglieder) [106], MAGE-C (7 Mitglieder) [107, 108], MAGE-D (4 Mitglieder) [109], MAGE-E (3 Mitglieder), MAGE-F bis L (Review in [110]). Zu den humanen MAGE-Genen konnten mittlerweile eine Reihe von Maus-Homologen identifiziert werden, was auf eine konservierte Funktion hindeutet [110].

Den meisten CT-Antigenen konnte bislang keine Funktion zugeordnet werden. Neueste Analysen zeigen, dass die MAGE-A verwandten Proteine anti- und pro- apoptotische Wirkungen besitzen [111]. SCP-1 ist ein Protein, dass bei der korrekten Paarung der

homologen Chromosomen während der Meiose eine Rolle spielt [112, 113]. OY-*TES-1* ist lokalisiert in den Spermien-Akrosomen und hat eine Funktion als Bindungs-Protein zu Proacrosin zum Packen und Kondensieren der Acrosin-Zymogene in der acrosomalen Matrix [96]. CT9 (bromodomain testis specific gene product) ist ebenfalls ein Testis spezifischer transkriptionaler Regulator [114].

CT-Antigene sind eine heterogene Gruppe, denen das Expressionmuster gemein ist, welches durch die Funktion (*SCP-1*, CT9 und OY-*TES-1*) oder einen Testis-spezifischen Regulationsmechanismus begründet ist.

Autoantigene

Es sind eine Vielzahl von Autoantigenen bei Transplantatabstoßungen oder bei allergischen Erkrankungen bekannt (Review: [115]). Desweiteren konnte in vielen SEREX Untersuchungen Antigene identifiziert werden, die ein ubiquitäres Expressionsmuster besitzen, jedoch serologisch tumorspezifisch sind [52, 97, 98]. Dies sind Autoantigene mit einer tumorspezifischen Immunogenität.

1.2.2 Identifikation von Antigenen

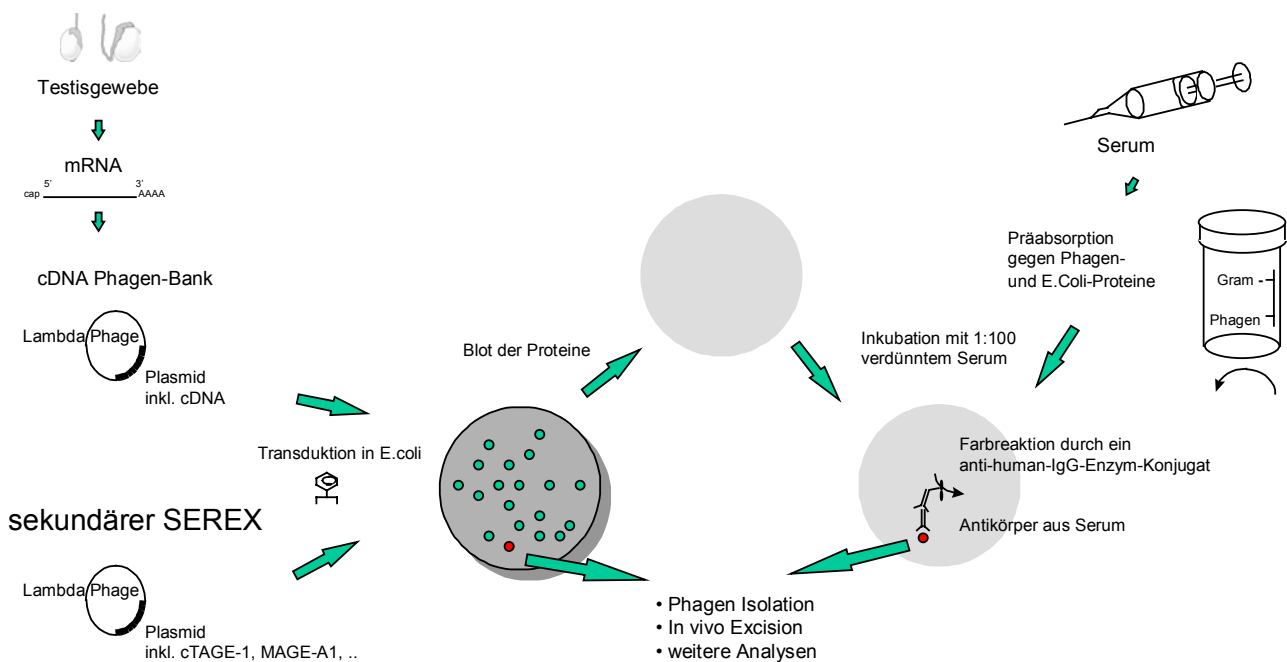
Mittels tumorspezifischen CTLs (CD8+ T-Zellen) sind die ersten tumorassoziierten Antigene identifiziert worden [116, 117]. Durch Co-Kultivierung von autologen Lymphozyten und zerkleinerten Tumor-Material ist es möglich, CTLs heranzuziehen. Das kodierende Gen, dessen Epitope durch CTLs erkannt wird, wird durch Transfektion rekombinanter cDNA Banken mit anschließender Isolation des immunogenen Klonen identifiziert. Auf diese Weise sind eine Reihe von Antigenen, wie *MAGE-A1*, *GAGE*, oder viele der Melanom-Differenzierungs-Antigene identifiziert worden.

Eine andere Methode, die eine humorale Immunantwort gegen den Tumor in Form von Antikörpern voraussetzt, ist die SEREX-Methode (**SEREX** = serological identification of antigens by recombinant expression cloning) [24]. Normalerweise werden im Rahmen der humoralen Immunantwort Antikörper von B-Zellen in das Blut sezerniert, um eindringende Mikroorganismen zu neutralisieren. Auch bei Krebserkrankungen konnten spezifische Antikörper gegen körpereigene-Antigene beschrieben werden [118-120]. Außerdem beweisen viele SEREX-Publikationen die erfolgte humorale Immunantwort gegen tumorassoziierte Antigene.

In Abbildung 1-2 ist die SEREX Methodik schematisiert. 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 und exprimieren das cDNA Insert, welche als Plaques erkennbar sind. Nach Blot der Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran erfolgt die Detektion durch Antikörper aus einem Serum. Dieses ist durch eine Präabsorption gegen *E. coli* und Phagenelemente gereinigt und final 1:100 verdünnt. Sichtbar wird die Bindung durch einen zweiten humanen IgG spezifischen Antikörper, der mit einer alkalischen Phosphatase gebunden ist. Ein positiver Phage kann dann aus der Agar-Platte isoliert und das Plasmid durch eine In Vivo Excision gewonnen werden.

Abbildung 1-2: SEREX Methode

klassischer SEREX



Die Abbildung zeigt das Schema der SEREX Methode. Zur Identifikation von neuen Tumorantigenen wurde Phagen cDNA Banken aus Testis- oder CTCL-Gewebe verwendet. Für einen sekundären SEREX, bzw. zur Überprüfung der Immunogenität mit Seren gesunder Spender und weiterer Krebspatienten können Phagen mit bekannten cDNAs eingesetzt werden, so z.B. cTAGE-1, MAGE-A1.

Alle in Absatz 1.2.1 (Antigenklassen) vorgestellten Antigene konnten mittels der SEREX Methode identifiziert oder bestätigt werden [121]. Zudem sind etliche der durch zytotoxische T-Zellen (CTLs) gefundenen Antigene, wie z.B. einige MAGE-A Proteine ebenfalls durch die SEREX-Methode gefunden worden. Die Tatsache, dass Antigene, die durch CTLs gefunden wurden, durch SEREX bestätigt werden, zeigt, dass häufig eine humorale und eine zelluläre Immunantwort parallel induziert wird. Dies ist auch für das mittels SEREX gefundene Antigen NY-ESO-1 [122] beschrieben worden. Diese Resultate machen die SEREX Methode zu einer einfachen Methode zur Identifikation und zur Evaluierung von Tumorantigenen.

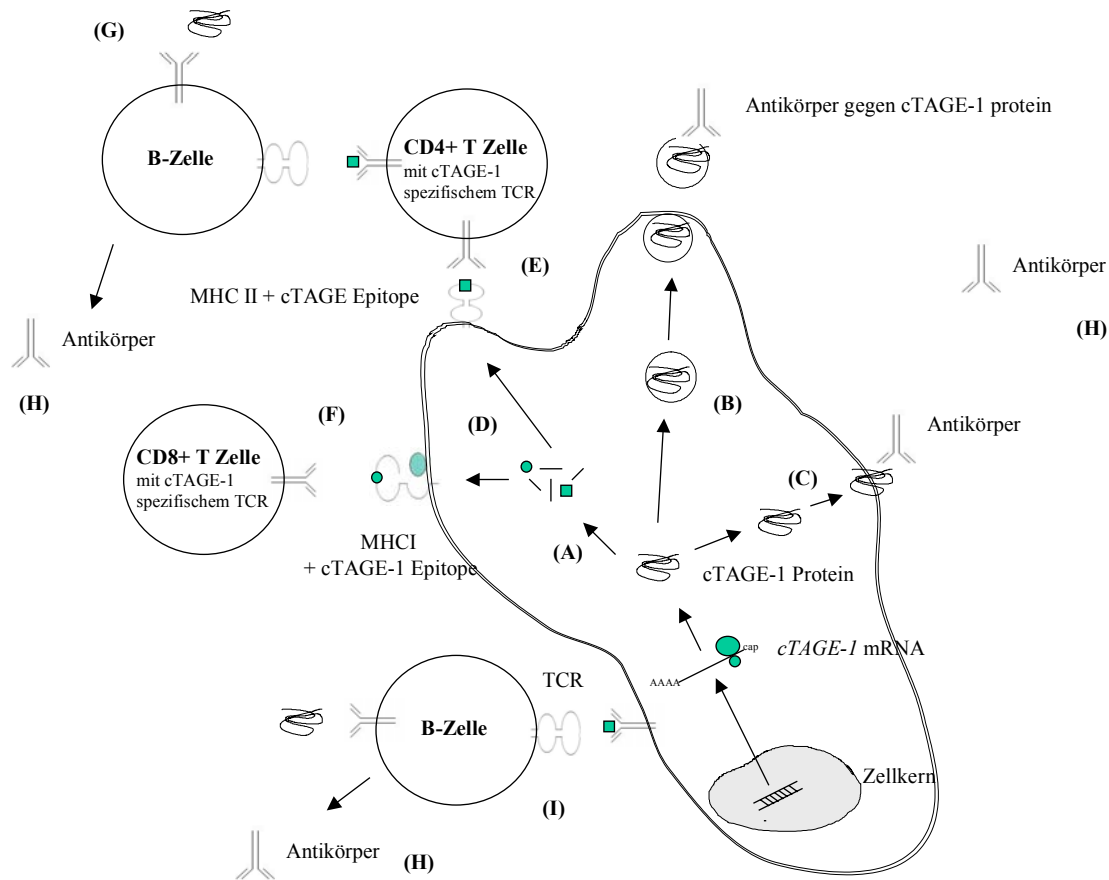
1.2.3 Antigene als immunogene Struktur

In der folgenden Abbildung 1-3 ist eine mögliche Immunantwort gegen eine cTAGE-1 als Antigen kodierende maligne CD4+ T-Zelle beschrieben.

Das besondere an einer malignen CD4+ T-Zelle ist, dass die proliferierende T-Zelle selbst eine immunrelevante T-Zelle ist (siehe Abbildung 1-3). So wird diskutiert, dass das Antigen gegen das die CD4 T-Zelle gerichtet ist aus der malignen Zelle selber stammt [124, 125].

Für eine spezifische Immuntherapie ist die spezifische Erkennung des Tumors über Antigene notwendig. Für das CTCL sind bisher nur wenige Tumorantigene (siehe Abschnitt 1.3.4, Antigene beim kutanen T-Zell Lymphom) identifiziert worden, so dass eine weitere Identifizierung und Evaluierung notwendig ist. Im Gegensatz dazu ist für andere Neoplasien (wie bei HNO-Tumoren, Melanomen, Mamma-, ovariellen- oder Kolon-Karzinomen) bereits eine Vielzahl an verschiedenen Tumorantigenen identifiziert worden. Jedoch ist die Erkennung dieser Antigene durch das Immunsystem bei Krebspatienten nicht ausreichend, um klinische Remissionen zu beobachten. Dies kann an Immune-Escape Mechanismen liegen [126] oder daran, dass die Krebszellen bei Tumorprogression diese Antigene verlieren, wie es für das Melanom beschrieben wurde [81, 85, 127].

Es ist notwendig, in einer Immuntherapie viele verschiedene Tumorantigene einzusetzen, um eine maximale Erkennung aller Tumorzellen bei möglichst allen Patienten zu gewährleisten und möglichen Escape-Mechanismen entgegenzuwirken.

Abbildung 1-3: Immunantwort gegen eine cTAGE-1 kodierende maligne CD4 T-Zelle


Schemazeichnung einer möglichen Immunantwort gegen eine cTAGE-1 exprimierende maligne CD4+ T-Zelle (verändert nach [123]).

Nach Synthese des Antigens, z.B. des cTAGE Proteins wird es (A) prozessiert, (B) freigesetzt oder (C) bei Vorhandensein eines Membranankers in diese eingebaut. Die im Proteasom prozessierten cTAGE-1 Epitope werden mit MHC I oder MHC II Proteinen assoziiert und kreuzpräsentiert (D). Während MHC II präsentiertes cTAGE-1 Epitope über CD4+ T-Zellen (E) und B-Zellen die cTAGE-1 spezifische Antikörper-Produktion initiieren (H), führt MHC I präsentiertes cTAGE-1 Peptid zur Induktion von zytotoxischen CD8+ T-Zellen, die in der Lage sind direkt die maligne Zelle zu lysieren (F). Die löslichen Antikörper (H) wurden bei der Identifikation von cTAGE-1 genutzt (SEREX), wobei die Antikörper des Serums auch das freigesetzte (B) oder membranständige (C) cTAGE-1 erkennen könnten. Plasma B-Zellen können auch über lösliches cTAGE-Protein (G) zur spezifischen Antikörper Produktion angeregt werden. Unklar ist, ob maligne CD4+ T-Zelle selber als regulatorische T-Zelle B-Zellen zur Antikörper-Produktion anregen können (I).

1.3 Das kutane T-Zell Lymphom und seine antigenen Strukturen

Die primären kutanen Lymphome werden durch eine große Zahl an verschiedenen Untergruppen repräsentiert, die eine Vielzahl an Unterschieden in klinischen Verläufen, Histologie, Immunphänotyp und der Prognose zeigen. Kutane T-Zell-Lymphome (CTCL) sind meist Proliferationen von CD4 positiven Lymphozyten mit einer Primärmanifestation in der Haut und sind mit 65% [128, 129], neben den kutanen B-Zell Lymphomen (CBCL) mit 25%, die am häufigsten vertretenen kutanen Lymphome. Die Inzidenz beträgt jährlich 0,3-1/100.000 in den USA [130, 131]. Klinisch ist das CTCL durch eine Reihe von Krankheitsbildern gekennzeichnet, wie der Mycosis fungoides, dem Sézary Syndrom oder dem pleomorphen großzelligen CTCL [132-134].

Eine schlechte Prognose korreliert mit dem histologischen Typ der CTCL, so haben das Sézary Syndrom und das großzellige, CD30-negative CTCL, welches sich aus einer fortgeschrittenen Mycosis fungoides entwickeln kann, eine schlechte 3-Jahresüberlebensprognose von 20% [135, 136].

1.3.1 Therapie

Die derzeitigen Therapieformen, wie die Psoralen-UVA-Behandlung, Interferon- und Retinoidgaben zeigen in frühen Stadien zufriedenstellende Therapieerfolge. In fortgeschrittenen Tumor-Stadien ist aber nur eine Palliation möglich [5, 125, 133, 136, 137].

1.3.2 Mögliche Ursachen der CD4+ Proliferation

Das CTCL ist zumeist eine Proliferation einer malignen CD4+ TH₂-Zelle [138, 139]. Verschiedene voneinander unabhängige Faktoren werden als Ursache für das CTCL diskutiert. Chromosomale Abnormalitäten, wie die Translokation t(2;5) bewirkte eine Differenzierung zu (primären und sekundären) anaplastischen großzelligen CTCLs [140]. Abnormalitäten der Region zwischen 1p22 und 1p36 konnten mit der malignen Transformation des CTCLs und der damit verbundenen Progression korreliert [141] werden. Chronische Antigenstimulation [142], Chemikalien [143], virale oder bakterielle Infektionen [144, 145] werden als Ursache diskutiert.

Edelson und Berger diskutieren seit längerem, dass das Wachstum einer malignen CD4+ CTCL Zelle an der Stimulanz von unreifen DC's liegt. Als präsentierte Antigene, die die CTCL-Zellen zum Wachstum anregen, fungieren Proteine aus der malignen Zelle selbst [124, 125].

Das humane HTLV-1 (humanes T-Zell lymphotropes Virus Typ 1) [145-147], welches ursächlich an der Entstehung der adulten T-Zell Leukämie beteiligt ist, das humane Herpesvirus-8 (HHV-8) [148, 149], und das EBV [150] sind Faktoren, die teilweise in malignen CTCL Geweben nachgewiesen werden konnten [151]. IL-7 wird als Induktor des SS und anderen CTCLs [152] diskutiert. Moleküle wie der Chlamydia pneumoniae-assoziierte Sézary T-cell activating factor (SAF) [153] und p53 in einigen MF-Proben [154] sind nachgewiesen [155]. Inwieweit diese Moleküle ätiopathologisch von Bedeutung sind oder nur Epiphänomene, ist bislang nicht geklärt.

1.3.3 Immuntherapie des CTCL

Das CTCL ist in verschiedenen Arbeiten als klonale Proliferation von CD4+ T-Zellen nachgewiesen worden [155-157]. Die Prognose der Patienten verbessert sich, je mehr CD8⁺ T-Zellen im Tumor (Tumor-infiltrierende T-Zellen) nachweisbar sind [158].

Zwei Arbeitsgruppen konnten inzwischen beweisen, dass auch beim CTCL eine körpereigene Immunantwort gegen den Tumor stattfindet, indem autologe zytotoxische CD8-Lymphozyten, HLA-abhängig spezifisch autologe Tumorzellen töten konnten [159]. Diese CTL waren spezifisch gegen Peptide aus dem konservierten Anteil des T-Zell Rezeptors (TCR) [160]. Bagot und Kollegen isolierten aus einem CTCL-Tumor tumorinfiltrierende T-Lymphozyten, die zytotoxisch auf frisch isolierte Tumorzellen wirken [161].

So werden mittlerweile auch für das CTCL Immuntherapien wie für das Melanom angestrebt [125, 135]. In einer Pilotstudie wurden Infusionen mit Tumorantigenen-beladene dendritischen Zellen bei Patienten mit folliculären Lymphomen durchgeführt, die in 3 von 4 Fällen therapeutisch von Nutzen waren [162, 163]. 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 (dendritische Zellen) beobachten [164].

1.3.4 Antigene beim kutanen T-Zell Lymphom

Beim CTCL sind bislang nur wenige immunogene Antigene bekannt [165]. Da das CTCL eine klonale Proliferation von Lymphozyten ist, stellt der T-Zell Rezeptor (TCR) eine ideale spezifische Antigen-Struktur dar [166]. So sind einige TCR-abhängige spezifische Antigene bekannt, die für eine individuelle Vakzinierung in Frage kämen [160]. Kürzlich konnten CTL gegen die hypervariable Region CDR3 des TCR generiert werden [167]. Immunogene Peptidfragmente aus Teilen des TCR müssten allerdings für jeden Patienten neu analysiert werden [168], was in der Routinediagnostik zur Zeit etabliert wird [169]. Mit TCR-unabhängigen, spezifischen Antigenen würde dieses Problem entfallen. In der Tat existieren CTCL-spezifische Antigene, die nicht zum T-Zell Rezeptor selbst gehören. Linnemann und Mitarbeiter identifizierten an einer synthetischen Peptidbank mit einer CTCL spezifischen CTL-Linie HLA restringierte Epitope [170, 171]. So konnte diese Arbeitsgruppe erstmals eine zelluläre Immunantwort gegen ein definiertes Epitop nachweisen, welches 80% der HLA passenden Patienten besitzen. Die identifizierten Epitope werden „Mimotope“ genannt, da sie synthetische und keinem Gen zuzuordnen sind.

Bislang konnten von Bagot und Mitarbeitern zwei weitere TCR unabhängige Proteine identifiziert werden. Das p140-KIR Protein, einem „killer immunoglobulin-like receptor“ (KIR) [172], ist ein Oberflächenmarker auf malignen CD4+ Lymphozyten, NK-Zellen und einigen CD8+ Zellen. Das Transmembranprotein SC5 [173] wird vor allem bei T-Zell Aktivierung exprimiert.

Immunologisch relevante CTCL-assoziierte Tumorantigene konnten in eigenen Vorarbeiten mittels der SEREX Methode identifiziert werden [97, 98]. Mit einer serologischen Detektion von Tumorantigenen gelang es 14 verschiedene CTCL assoziierte Testis Antigene zu bestimmen. Eine erste RT-PCR Analyse ergab bei 8 Tumorantigenen ein ubiquitäres, bei vier ein differentielles und bei zwei weiteren ein Tumor / Testis spezifisches Expressionsmuster.

Die tumorspezifischen Antigene

- SCP-1, synaptenomales Protein-1 [112], welches bereits in anderen SEREX Untersuchungen mit Nierenzellkarzinom-Patienten detektiert werden konnte [174], und
- ein neues Gen, cTAGE-1 (cutaneous T-cell Lymphoma associated antigen-1) [97, 98]

kommen für eine Immuntherapie in Frage.

Viele der detektierten Antigene waren serologisch spezifisch, d.h. nur Tumor-Patienten besaßen reaktive Antikörper gegen die abgeleiteten Proteine im Gegensatz zu Kontroll-Seren gesunder Personen.

1.4 Ziel der Arbeit / Aufgabenstellung

Ein großer Teil der in eigenen Vorarbeiten detektierten Proteine sind im Normal- und im Tumorgewebe exprimiert. Diese Antigene eignen sich nur bedingt für mögliche Immuntherapien, da eventuell eine Immunantwort gegen gesundes Gewebe generiert würde.

Auffällig ist die serologische Spezifität der detektierten Antigene. Diese Autoantigene mit tumorspezifischer Immunogenität deuten darauf hin, dass die Antigene im gesunden Zustand keine immunogene Struktur darstellen. Das Beispiel des Her2/neu [175] zeigt, dass Antigene in malignen Geweben überexprimiert sein können, um als Zielstruktur für ein Immunantwort in Frage zu kommen.

Ferner konnte Labreque für das Tumorsuppressorgen p53 zeigen, dass Antikörper, die gegen eine mutierte Form gerichtet waren, auch gegen die nicht mutierte Formen kreuzreagierten [25]. Es ist also denkbar, dass die bisherigen Analysen an einer Testis-Bank eines gesunden Spenders nur eine „Wildtyp“ Variante eines immunogenen Klonen betrafen.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die CTCL assoziierten / spezifischen Antigene [97, 98] genauer zu charakterisieren und damit zu evaluieren, ob diese für Diagnose, Monitoring oder als Zielstruktur für Vakzinierungs- oder Antikörpertherapien von Krebserkrankungen insbesondere des kutanen T-Zell Lymphoms in Frage kommen. Daneben sollen weitere Antigene gefunden werden, die für obige Ziele in Betracht kommen.

Besonders soll der Wert von cTAGE-1 als Zielstruktur für Immuntherapien evaluiert werden. Die im Northern-Blot gefundenen Banden [97, 98] deuten auf mindestens zwei weitere Varianten hin. Diese oder eine mögliche Genfamilie, analog zu anderen CT-Antigenen, soll identifiziert werden. Deren Expression und Immunität sollen untersucht werden, um deren mögliche Nutzung und Anwendung für Diagnose oder für eine Immuntherapie des CTCLs und anderer Neoplasien zu bewerten.

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 letzten Kapitel angefügt.

2.1 Identifizierung verwandter Gene / Genfamilien

Um eine mögliche Genfamilie genauer zu untersuchen, wurde während dieser Arbeit eine neue Methode entwickelt. Diese Methode dient zur Identifizierung und Isolierung homologer cDNAs in einer Phagen-Plasmid Bank. Die homologen Klone können anschließend im Rahmen einer SEREX-Untersuchung auf ihre immunogene Kapazität, d.h. auf Antikörper in Seren von Tumor-Patienten überprüft werden.

2.1.1 HYREX (= DNA hybridization analysis of recombinantly expressed cDNA libraries)

Herstellung der Phagenbanken

Zur Identifizierung von verwandten Genen wurden drei verschiedene Phagenbanken benutzt. Es wurden die Testis Phagenbank [97, 98] und zwei neu hergestellte Phagenbanken aus CTCL Tumormaterial, sowie aus einer CTCL-Zelllinie (SeAx) benutzt. Dazu wurden 1300/1100 µg RNA isoliert (siehe Abschnitt RNA Gewinnung, RNA CLEAN) und anschließend die mRNA mittels des QIAOLIGOTEX mRNA MIDI KIT (Fa. Qiagen) gewonnen. Dieser Kit nutzt eine Poly-T Selektion zur Trennung der mRNA von der Gesamt-RNA. Für die Phagenbank wird das Uni ZAP XR Phage System verwendet. In diesem Konstrukt ist in einem Lambda Genom ein komplettes Plasmid pBluescript enthalten und vereint somit die Eigenschaften eines Phagen und eines Plasmiden.

Dazu schnitt man das Plasmid pBluescriptII mit EcoRI und XhoI auf. An die Xho Schnittstelle wurde über eine GAGA Schutzsequenz ein Poly-T Arm ligiert. Die EcoRI Schnittstelle wurde ebenfalls durch eine Adaptorsequenz aufgefüllt. Die mRNA sollte sich so unidirektional an das Poly-T mit ihrer Poly A Sequenz ligieren. Eine Reverse Transkriptase polymerisierte dann den komplementären Strang. Die GAGA Sequenz wurde sodann wieder herausgeschnitten und die noch vorhandene RNA abverdaut. Das genaue Protokoll ist in der Anleitung des Herstellers zu finden.

Transduktion / Blot der DNA / RNA

Die HYREX Methode ist eine Abwandlung der SEREX Methode, so sind die verwendeten Phagen-Banken, die Schritte der Transduktion und Induktion identisch. Für die Transduktion werden 200µl frisch auf OD von 0,5 gezogene *E. coli* MRF mit austitrierter Phagenlösung aus einer cDNA Bank gemischt. Die Lösung wurde 15 min bei 37°C inkubiert, anschließend werden die cDNAs in den Phagengenomen mit final 10mM IPTG¹ induziert (optional mit

¹ Isopropylthiogalactosid

final 1,5µg/µl X-Gal² zur Überprüfung der Klonierungseffizienz) und mit LB Top Agar und der Lösung auf einer NZY Agar Platte ausplattiert. Die Platten wurden bei 37°C über Nacht inkubiert.

DNA Blot und Hybridisierung

Die rekombinant exprimierten cDNA-Abschnitte sind anhand von Plaques erkennbar. Die DNA wurde durch 10 minütiges Auflegen einer Nitrozellulose Membran gebロットet. Nach 2 mal 15 minütigem schüttelnden Inkubieren mit Denaturierungslösung und anschließendem Neutralisieren (2mal 20 min Neutralsierungslösung) wurden die Nitrozellulose-Blots mit 2xSSC gewaschen und getrocknet. Nach UV Crosslinking (500mV) werden die Membranen mit 2xSSC befeuchtet und 2h bei 45°C mit Hybridisierungslösung (Fa. Roche) prähybridisiert. Über Nacht bei 45°C wurden die Membrane mit einer frisch denaturierten Sonde hybridisiert.

Digoxigenin markieren spezifischer PCR-Produkte

Als Sonde dienen RT-PCR Produkte, die mittels des JETQUICK PURIFICATION KITS (Fa. Jetquick) aufgereinigt wurden bzw. PCR Produkte an Plasmiden. Ca. 3µg der so aufgereinigten, bei 95°C denaturierten DNA wurden für die Digoxigenin Markierung mittels des DIG DNA LABELLING KITS (Fa. Roche) eingesetzt (siehe Herstellerprotokoll). Für ein Screening wurden 5 solcher Ansätze gepoolt, um eine höhere Digoxigenin gelabelte DNA Konzentration zu erhalten.

Die Markierungseffizienz wurde in einem Dot Blot überprüft. Hierbei wird anhand einer Verdünnungsreihe von bekannten Mengen markierter DNA die markierte Sonde verglichen.

Detektion

Die Detektion erfolgte mit einem alkalische Phosphatase gekoppelten ANTI DIG ANTIKÖRPER (Fa. Roche). Die Membranen wurden mit Waschpuffer geschüttelt, 30 min mit Puffer 2 blockiert und 30 min mit dem ANTI DIG AP KONJUGAT-Gemisch in Puffer 2 (1:10.000) inkubiert. Anschließend wurden die Blots mit 2 ml für 15 min in Waschpuffer, 5 min in Puffer 3 geschüttelt. Der Nachweis erfolgte mittels einer Farbumsetzung des NBT³ / BCIP⁴ in der Entwicklerlösung durch die alkalische Phosphatase. So erkennt man einen positiven Klon, an der blau-violetten Anfärbung eines gebლობten Plaques auf der Membran. Der positiv detektierte Klon wurde aus dem Agar ausgeschnitten und in 500µl SM Puffer (1h auf Rüttler) gelöst. Diese Phagenlösung benötigte man, um die Detektion zu bestätigen, monoklonal zu isolieren und um Kreuztests mit der SEREX-Methode (Test von Antikörpern aus Tumorseren und Kontrollseren) durchzuführen. Die Phagenlösung wurde bei 10.000g zentrifugiert und der Überstand aufbewahrt. Längere Aufbewahrung konnte bei -80°C mit 7% DMSO (final) erfolgen.

² 5-Brom-4-chlor-3-indolyl βD-galaktopyranosid

³ Nitrobluetetrazolium

⁴ 5-Brom-4-chlor-3-indolyl Phosphat

2.1.2 In-vivo-excision

Das Plasmid mit dem interessierenden cDNA-Fragment wurde aus dem Phagen durch eine sogenannte „in-vivo-excision“ isoliert. Dazu wurde der Helfer-Phage ExAssist verwendet, welcher für F1 Proteine kodiert. Diese bewirken, dass normalerweise der Lambda Phage aus dem Wirtsgenom am λ Origin ausgeschnitten wird. Da dieses Origin an den pBluescript Vektor grenzt, wird das Plasmid mit dem Insert isoliert. Dazu wurde das Protokoll des Herstellers (Fa. Stratagene) benutzt.

Die Plasmide wurden über Nacht auf LB-Amp Platten selektioniert und anschließend in 3 ml Flüssig-Kulturröhrchen über Nacht in LB-Amp Medium angezogen. Als Langzeitstock wurde das Plasmid in LB-Glycerin (final 15% Glycerin) eingefroren. Aus der Flüssigkultur wurden die Plasmide mit dem Qiagen QIAPREP MINIPREP KIT (Fa. Qiagen) isoliert (siehe Hersteller Protokoll). Durch einen Restriktionsverdau wurde das Insert herausgeschnitten und in einer Agarose Gelelektrophorese (0,7-1,5%) in 1xTAE-Puffer der Größe nach aufgetrennt. Nach Ethidiumbromid Anfärbung konnte die Größe des Inserts durch einen Standard-Größen Marker genau bestimmt werden.

2.1.3 Sequenzierung

Die durch HYREX identifizierten homologen cDNA Abschnitte wurden mit dem ABI PRISM™ 310 GENETIC ANALYSER und dem BIG DYE TERMINATOR CYCLE SEQUENCING READY REACTION KIT (Fa. Applied Biosystems) sequenziert. Dazu wurden in der Regel Standard Primer aus dem Plasmid verwendet, die das Insert flankieren.

Tabelle 2-1: Sequenzier Primer

Primer Name	Sequenz	Plasmid
T3	aat taa ccc tca cta aag gg	pBluescript, pC DNA3.1
T7	gta ata cga ctc act ata ggg c	pBluescript, pC DNA3.1
BSM25	cac aca gga aac agc tat gac cat g	pBluescript
BSCRIP	gta aaa cga cgg cca gtg	pBluescript
pTRC HIS.for	gag gta tat att aat gta tcg	pTRC His

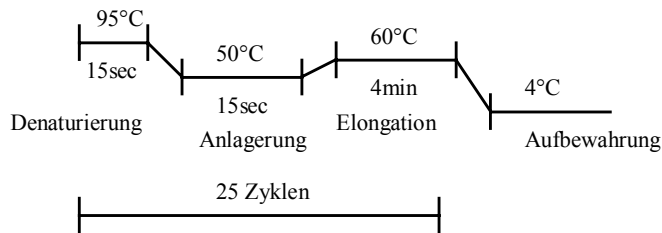
Primer zur Sequenzierung eines Plasmides.

Zur Sequenzierung wurden 400ng Plasmid eingesetzt, mit 1,25 μ M Primer und 2 μ l BigDye Mix im Thermocycler mit folgendem Programm markiert. Um die DNA nach der Sequenzierungs-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 100% EtOH⁵ gegeben. Die DNA wurde 10 min auf Eis gefällt und daraufhin bei

⁵ Ethanol

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

Abbildung 2-1: Sequenzier PCR



Schematische Darstellung einer Sequenzier PCR.

2.1.4 RACE (Rapid Amplification of cDNA ends)

Einige der detektierten Antigene wurden als verkürzte Versionen gefunden. Die verkürzten 3' und 5' Enden wurden mittels einer RACE-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 Reaktion mit einem initialem Oligo-dT-Primer, der am Poly A Ende hybridisiert. Die 5'-cDNA-Synthese wird, wie die 3'-Synthese, durch ein Oligo dT 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 3-5 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, Fa. BD Clontech) binden, da es eine Guanin-reiche Region besitzt. Das SMART II-Oligo dient als Primer für die reverse Transkription in 3' Richtung. Die Polymerase-Ketten-Reaktion wurde in Anwesenheit eines Lese-Prüf-Enzyms durchgeführt. Eine *hot start-PCR* wird durch die Bindung eines monoklonalen Antikörpers am N-Terminus der Taq Polymerase, die diese damit inhibiert, simuliert. Beim initialen Erhitzen auf 95°C wurde der Antikörper denaturiert. Auf Grund der bekannten Sequenz an den Enden der cDNAs war es möglich, diese als Primerbindungsstellen zu benutzen und eine PCR mit einem Genspezifischen zweiten Primer durchzuführen. Aus dem bekannten DNA-Bereich wurde ein Primer mit hoher Hybridisierungstemperatur gewählt und damit eine hohe Spezifität gewährleistet (siehe

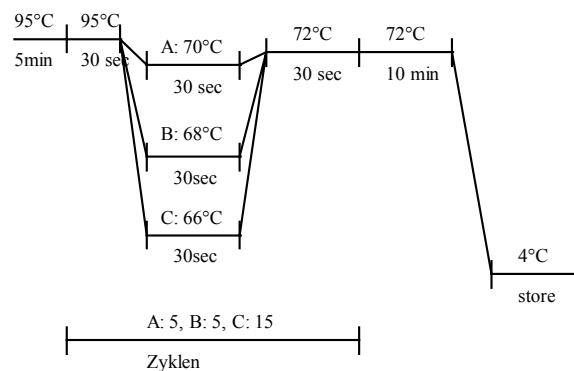
Tabelle 2-2).

Tabelle 2-2: RACE Primer

	5' RACE, forward Primer	GC Gehalt (%)	Annealing Temp. (°C)
14-2	tgg ctt ggt ggc cca gct tgc atg aag gac	60	68
14-2 β	tcc ttc ccc ttg cca cag caa gag aaa agc aga ac	51	66
se2-5	ctg ctc agg cgg gtg gtt cag tcg ggg tgc	70	71
se70-2	gga aga cag cgt cca gga gaa gca gct ttg acc	58	70
	3'RACE, reverse Primer	GC Gehalt (%)	Annealing Temp. (°C)
14-2	tgc aag ctg ggc cac caa gcc att gct tc	59	67
cTAGE-2 rev	ttt ccc ccc acc tcc tcc agg aac ctg g	64	66
se2-5	tca cct ggg agc ccc cct gga cct gag ctg	70	70

RACE Primer in 5' und 3' Richtung für eine Voll-Längen Polymerisierung.

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

Abbildung 2-2: RACE-PCR


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

2.1.5 Computer-Programme

Mit Hilfe von GCG-Programme (Husar, DKFZ) wurden Sequenzanalysen, Primerwahl, die Bestimmung der offenen Leserahmen, Datenbank Suchen, Alignments und Proteinmotiv Suchen durchgeführt.

Ein Programm des National Institute of Health, USA (NIH) verlängert eine Sequenz durch Abgleich mit homologen EST-Sequenzen zu einer Konsensus-Sequenz, einem Unigene Cluster. Dieses Unigene Cluster konnte dann mittels eines elektronischen Suchprogrammes (Virtual-Northern) mit allen sequenzierten Genen und ESTs verglichen und somit eine Expressionanalyse erstellt werden (<http://cgap.nci.nih.gov/Genes/GeneFinder>).

Ferner existiert eine SEREX Datenbank, die alle gefundenen SEREX-Sequenzen enthält. Im Internet unter <http://www2.licr.org.CancerImmunomeDB> sind weiter Daten, wie serologische Erkennung des Proteins, Isolation des Klons und Expression der mRNA zusammengefasst. Leider sind die Daten zur Zeit noch unvollständig.

2.2 Serologische Untersuchungen

Zur Bestimmung der Immunogenität der detektierten Phagen cDNA Konstrukte, wurde die SEREX Methode benutzt. Die zu einer Familie gehörenden Phagen-Klone wurden in einem SEREX-Ansatz gegen Seren von Tumorpatienten und gegen Seren gesunder Spender getestet. Um immunogene Antikörper-Epitope einiger interessanter Antigene zu identifizieren, wurden Epitop-Mapping Experimente für cTAGE-1 durchgeführt.

2.2.1 SEREX

Präabsorption des Patientenserums

Die SEREX-Methode bedient sich der Antikörper aus Seren von Tumorpatienten, um die humorale Immunantwort zum Screening nach Antigenen auszunutzen. Dazu wurde Vollblut in Serum-Monovetten 10 min bei 3000 UPM zentrifugiert und das Serum auf -20°C eingefroren. Blutproben von mehreren CTCL Patienten und gesunden Spendern wurden zur Kontrolle verwendet. Im Rahmen der Präabsorption werden die Seren in mehreren Schritten gegen Fragmente von *E. coli* und lysierte *E. coli* Fragmente, d.h. auch gegen Phagen Elemente, präabsorbiert. Das Serum wurde mit 10x Verdünnungslösung und A. dest 1:10 vorverdünnt, um damit die Präabsorption durchzuführen. Nach der Präabsorption wurde das Serum auf eine finale Konzentration von 1/100 verdünnt.

Isolierung eines blauen Phagen

Das Plasmid pBluescript trägt neben einer Ampicillin Resistenz ein lacZ Gen inklusive eines Polylinkers. Eine Insertion eines Gens führt somit zu einer Inaktivierung des lacZ Gens und kann im lacZ deletierten *E. coli* Stamm MRF für eine Blau-Weiß Selektion verwendet werden. Mehrere blaue Phagen wurden isoliert und in jeweils 500µl SM Puffer gelöst. Nach 1 Stunde Schütteln, in der sich die Phagen aus dem Agar lösten, wurden mittels Zentrifugation die Agarreste pelletiert und der Überstand gesammelt (=Phagenlösung, aufbewahrt bei 4°C). Die Phagenlösung wurde benutzt, um das Serum gegen lysierte *E. coli* Fragmente zu reinigen.

Präabsorption I, mechanisch zerkleinerte *E. coli*

Am Adsorbens der Säulenmatrix binden *E. coli* Fragmente und Proteine, die zur Präabsorption der Seren benutzt werden. Die „mechanische Säule“ wurde hergestellt, indem eine überwachsene 50 ml *E. coli* MRF Kultur (ü.N.) pelletiert (ZF 3500g, 15 min), das Pellet in 5 ml PBS gelöst und die Zellen mittels Sonifikation (5x 20sec, auf Eis) zerstört wurde. Das Lysat wurde in ein 50 ml Falcon mit der Matrix (2g, aktiviert mit Glutar-dialdehyd) 4 h bei

RT⁶ im Überkopffrotor inkubiert. Die Säule wurde anschließend 3 mal mit 30 ml TBS (0.1% Na-Acid) äquilibriert. Das vor-verdünnte Serum wurde mit der beladenen Matrix über Nacht bei 4°C im Überkopffrotor inkubiert (alternativ: mehrere Stunden bei RT). Das präabsorbierte Serum wurde bei 4°C aufbewahrt und die Säule dreimal mit 35 ml Tris pH=3 und dreimal mit 1xTBS (pH=7) + 0,1% Natrium Azid äquilibriert. Die Säule konnte nach Gebrauch bei 4°C aufbewahrt werden und war für maximal 6 ml unverdünntes Serum zu verwenden.

Präabsorption II: lysierte *E. coli*

Die lytische Säule dient dazu, aus dem Serum mittels lysierter *E. coli*-Fragmente und Phagenelemente Antikörper herauszufiltern. *E. coli* MRF wurde in 50 ml LB-Maltose bis zur einer OD₆₀₀=0.5 hochgezogen. Die Kultur wurde pelletiert (ZF 10000, 15 min) und in 2 ml 0.01 M MgSO₄ aufgenommen. Anschließend wurde *E. coli* mit einen blauem Phagen in LB Medium komplett transduziert:

Tabelle 2-3: *E. coli* Lysis Ansatz

LB Medium	5 ml
Maltose, 10mM	100 µl
<i>E. coli</i> XI1 MRF	200 µl
blauer Phagen	500 µl

E. coli Lysis Ansatz zur Herstellung der lytischer Säulen.

Die Inkubationszeit betrug 4 h bei 37°C. Danach wurde der Rest des *E. coli* Stamms in MgSO₄ zugegeben und nochmals 2 h bei 37°C inkubiert. Sodann wurden die lysierten Bakterien zusätzlich mittels Sonifikation 5 x 20 sec. zerkleinert. Die mit 2g Matrix beladene Säule wurde mit der Bakteriensuspension für 4 h bei RT im Überkopffrotor inkubiert (alternativ: über Nacht / 4°C) und wie die mechanische Säule äquilibriert. Das mit der mechanischen Säule präinkubierte Serum wurde auf der so hergestellten lytischen Säule ü.N. auf dem Überkopffrotor inkubiert, anschließend dekantiert und bei 4°C aufbewahrt. Die Säulen wurden anschließend äquilibriert und konnten ebenfalls bis zu 6 ml unverdünntes Serum präabsorbieren.

Präabsorption III: Blot der lysierten *E. coli* Proteine

Die lytische Folie benutzt auch lysierte *E. coli* Fragmente, um Antikörper herauszufiltern. Der Unterschied zur lytischen Säule besteht darin, dass lysierte Bakterienstämme auf Nitrozellulose geblottet werden. Die lytische Folie wurde hergestellt, indem ein gepickter blauer Phage mit 600µl MRF (OD₆₀₀=0.5) gemischt und 15 min inkubiert wurde. Die Suspension wurde mit erhitztem TopAgar (ca. 50°C) auf eine NZY Agar Platte ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert (Konfluenz der Bakterien). Anschließend wurde eine Nitrozellulose Membran aufgelegt und über Nacht bei 37°C geblottet. Mehrfaches Blotten war möglich. Auf die mit 1x TBS angefeuchtete Folie wurde das Serum aus den Präabsorptionsschritten der Mechanischen- und Lytischen Säule gegeben und inkubierte 3-4 Std. bei RT. Pro Serum wurde dieser Schritt 4-mal mit jeweils einer neuen lytischen Folie wiederholt.

⁶ Raumtemperatur

Tabelle 2-4: Serumendverdünnung

Vorverdünntes Serum	X ml	20 ml
10x Verdünnungslösung	x ml	20 ml
A.dest	$x * 100 - (2x)$ ml	160 ml
Endvolumen	$x * 100$ ml	200 ml

Endverdünnung des Patientenserums zum immunologischen Screenen / Bestätigen.

Ein Transduktionsansatz wurde genau nach der HYREX Methode durchgeführt. Tags darauf wurden Nitrozellulose Membrane für 4h bei 37°C aufgelegt. Die Blots wurden anschließend abgezogen und 3-mal 10 min, schüttelnd in 1xTBST Lösung (0,3%iges Tween 20) gewaschen, wobei vorsichtig alle Agarreste entfernt wurden. Anschließend inkubierte man die Membrane 1h schüttelnd bei RT mit der Blockierungslösung und wusch die Membrane sodann 3-mal 10 min mit 1xTBS. Die immunologische Detektion erfolgte mit endverdünntem, präabsorbierten Patientenserum, welches über Nacht auf dem Blot inkubierte. Das gesammelte Serum konnte wiederverwendet werden. Die Blots wurden in 1xTBS (3x) gewaschen und 1h mit einem sekundären Antikörper Mix (siehe Lösungen) inkubiert. Der sekundäre Antikörper ist ein gegen humanes IgG gerichteter spezifischer Antikörper aus der Ziege, an den eine alkalische Phosphatase gekoppelt ist. Nach wiederholtem Waschen in 1xTBS wurde der Blot in frisch angesetzter Entwicklerlösung für 2h bei 37°C schüttelnd entwickelt. Der Nachweis erfolgte durch einen Farbumschlag mit BCIP und NBT, gemäß des HYREX Protokolls.

2.2.2 Epitope Mapping

Um den translatierten Leserahmen von cTAGE-1 zu identifizieren, wurden Antikörper-Epitope-Mapping Experimente durchgeführt. Mittels des Auto-Spot Robot ASP222, Fa. Abimed wurden in 0,1µl Aminosäure 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 Peptid Bindung eingegangen werden kann. Die Aminosäuren sind 1 molar in NMP gelöst. Bei der Bindung einer Aminogruppe an das Fmoc wurde ein Pentafluorphenolrest freigesetzt. Der Spot der Aminosäure wurde dreimal wiederholt. Im anschließendem Waschschriff wurden die freien Aminogruppen basischer Aminosäuren mittels 4% Essigsäure-Anhydrid Lösung in DMF inkubiert und unter Freisetzung von Essigsäure die Aminogruppe acetyliert. Damit ist die Aminogruppe behindert etwaige Peptidbindungen einzugehen. Nach Waschen mit DMF (2x 2min) wird die Membran mit 20% Piperidinlösung (in DMF) 5 min inkubiert. Das Piperidin 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 à 2 min gewegewaschen. Eine Anfärbung der jetzt freien Aminogruppen mit 0,01% Bromphenolblau in DMF diente als Kontrolle, die mit Ethanol 2x 2 min gewegewaschen und etwaiges Wasser verdrängt wird. 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 Waschschriff wurden zuerst die Fmoc Gruppen beseitigt durch 5 minütiges Inkubieren mit 20% Piperidinlösung (danach 10x DMF Waschen) und danach alle (auch die α-Aminogruppen) durch 0,5 und 5 minütiges Inkubieren mit 4 %

Essigsäure-Anhydrid Lösung acetyliert (EtOH, H₂O frei). Durch ein 1-stündiges Inkubieren mit 5 ml Dichlormethan / 5 ml TFA (Abspalten der Schutzgruppen) / 250µl Triisobutylsilan (Fangen der Reaktionsprodukte) werden alle Aminogruppen deacetyliert. Durch 3-maliges waschen mit Dichlormethan und 3 mal DMF wurden die Reaktionsprodukte entfernt. Nach dem Entfernen aller Wasserrückstände durch 2 maliges Ethanol-Waschen, konnten die im kalten Luftstrom getrockneten Membrane für eine Antikörper-Inkubation eingesetzt werden. Diese Experimente wurden für die Tumorantigene cTAGE-1 und se57-1 durchgeführt. Dazu wurden bei cTAGE-1 alle möglichen Peptide aus der mRNA auf einer Membran in einer 1er Raster synthetisiert. Anschließend wurde die Membran dehydriert, indem sukzessive von DMF über Ethanol alle 5 Minuten ein höherer TBS Prozentsatz in Ethanol zum Blot gegeben wurde. Der Block unspezifischer Antikörper Bindungen erfolgte über Nacht bei 4°C mit 10% Milch, 5% Sucrose 1xTBS Lösung mit 1x Kasein Block (=Casein Enzym Hydrolisat, Fa. Genosys). Nach 3-maligem Waschen mit 1xTBST erfolgte die Inkubation mit 1:500 in Inkubationbuffer (TBST mit 0.05% Milch, 5% Sukrose und 1x Kasein-block) verdünntem Patienten Serum für 2 Stunden bei Raumtemperatur. Anschließend wurde wiederum 3 mal für je 10 Minuten mit TBST gewaschen, um mittels einem 1: 10.000 in Inkubationsbuffer verdünntem Ziege-anti Mensch IgG (H+L) HRP gekoppeltem Antikörper (Fa. Dianova) für 1 Stunde inkubiert zu werden. Nach 3-maligem TBST Waschen konnten mittels Chemilumineszenz (ECL stainig Kit, Fa. Amersham Bioscience) positive Antikörper – Peptid Bindungen visualisiert werden. Dieser Versuch wurde mit verschiedenen CTCL-Patienten Seren und Kontroll-Seren durchgeführt.

2.3 Expressionsanalysen der Antigene

Um die Tumorspezifität der gefundenen Antigene zu testen, wurde ein Expressionspektrum mittels RT-PCR (z.T. in Kombination mit einem PCR-Southern-Blot), Northern-Blot, Southern-Blot und Western-Blot Analysen durchgeführt.

2.3.1 RNA Gewinnung

Für die Expressionsanalysen per PCR und Northern-Blot wurde RNA aus verschiedenen Tumorgeweben isoliert. In flüssigem Stickstoff gekühlte Tumor-Proben / Zell-Pellets wurden mit 2 ml pro 100 mg Gewebe in TRIS-STAR Puffer (Fa. Peqlab) überschichtet und mit einem Ultrathurax mechanisch zerkleinert und mittels eines Ultraschall-Sonifikators weiter zerkleinert.

Nach 15 min Inkubation auf Eis und anschließender Zentrifugation (13.000 UPM, 4°C, 15 min) befindet sich die RNA im Überstand, während das Pellet zur Protein-Isolation und DNA-Gewinnung verwendet wurde. Der Überstand wurde anschließend präzipitiert (1 VT RNA Lsg, 3 VT kaltes 96% EtOH, 1/10 VT NaAc, 3M, 30min, 4°C, 13.000 UPM Zentrifugation, Pellet mit 2 Volumen 100% EtOH gewaschen, Zentrifugation 20min, 4°C, 13.0000 UPM).

DNase Behandlung mit anschließender Phenol/Chloroform-Extraktion / Fällung

Dazu wurde die RNA Lösung mit DMPC Wasser zu einem Volumen von 88µl aufgefüllt. Von der 1/10 in DNase Puffer verdünnte DNase wurden 2µl eingesetzt, und mit 10µl 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 schließlich zentrifugiert (13.000 UPM, RT, 5 min) wurde. Die wässrige obere Phase enthielt die RNA und wurde mit 2 × Vol 96% EtOH

und 1/10 Vol NaAc (3M) und 70% EtOH gefällt. Das Pellet wurde in DMPC Wasser aufgenommen und bei -80°C gelagert.

RNA-Gel (MOPS-Gel)

Zur Überprüfung wurde die RNA in einem MOPS Gel überprüft. 1-2 µg RNA wurden mit 2 VT RNA-Puffer gemischt und 10 min auf 65°C erhitzt, damit die RNA einzelsträngig vorliegt. Anschließend wurde das Gemisch mit RNA Lade-Puffer (2µl) in einem 1% Agarose 1xMOPS Gel bei 80V elektrophoretisch aufgespalten.

2.3.2 Herstellung von cDNA

Aus der isolierten Gesamt-RNA wurde eine cDNA hergestellt. Dazu wurde der komplementäre Strang mit Hilfe des FIRST STRAND CDNA SYNTHESIS KIT (Fa. Roche) polymerisiert. Es wurde 1 µg RNA für die cDNA Synthese eingesetzt und nach dem Pipettierschema (siehe Tabelle 2-5) verfolgt.

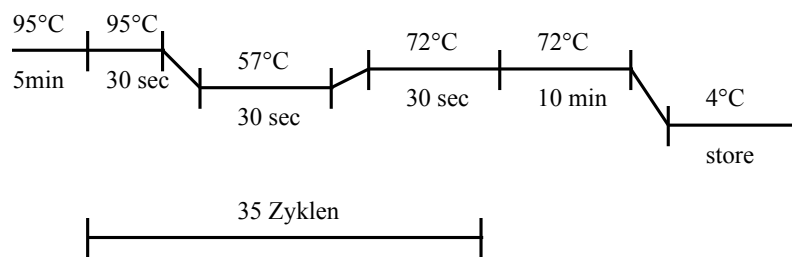
Tabelle 2-5: cDNA-Herstellung

Reagenz	Volumen/ Ansatz	finale Konzentration
10× reaction buffer	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 units
AMV Reverse Transkriptase	0,8 µl	20 units
RNA	*	1 µg
H ₂ O (DMPC)	ad 20 µl	

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

Mit Hilfe der Reversen Transkriptase wurde der komplementäre Strang polymerisiert. Der RNase-Inhibitor sorgt dafür, dass die RNA nicht degradiert. Man nutzt Primer, die sich zufällig nach einer statistischen Häufigkeit an die RNA anlagern. Dazu heizt man den Mix auf 25°C 10 min auf (Anlagerungsschritt der Primer). Während der 60 min 42°C polymerisiert die RT von den Primer in 5' Richtung. Die 5 min 99°C dient dazu die RT zu inaktivieren. Gelagert wurde die cDNA bei -80°C. Die cDNA-Qualität wurde mittels einer RT PCR mit einem Haushalts-Gen, GAPDH⁷, geprüft. Folgendes PCR-Programm wurde gewählt:

⁷ Glycerin-Aldehyd 3-Phosphat-Dehydrogenase

Abbildung 2-3: GAPDH PCR


GAPDH PCR zur Qualitätsbestimmung der cDNA.

2.3.3 RT-PCR

Mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wurde die Expression des gefundenen Antigens in verschiedenen Geweben untersucht. Mit Hilfe der PCR ist man in der Lage, 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 Tumoren, Zelllinien und diversen Kontrollgeweben hergestellt. Ein PCR-Ansatz enthielt folgende Reagenzien:

Abbildung 2-4: 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. Natutec)	– 1U
– Nukleotide (Fa. Promega)	– 200 µM each
– Primer forward	– 400 nM
– Primer reverse	– 400 nM
– DMSO	– 10%
– cDNA	– 0,1-1 ng
– H ₂ O sterile bidest.	– 15,5 µl

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

Für neu identifizierte Gene wurden Primer mittels des GCG Programm Husar *Prime* herausgesucht. Bei bereits beschriebenen Genen wurden z.T. auch publizierte Primer verwendet. In Tabelle 2-6 sind alle verwendeten Primer aufgeführt.

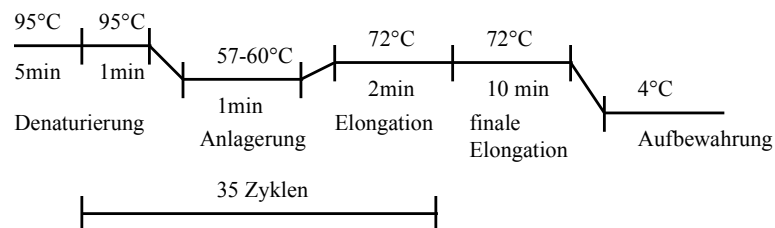
Die Denaturierung von 95°C der doppelsträngigen cDNA, der Syntheseschritt der Polymerase bei 72°C und die Zyklenanzahl blieb i.d.R. unverändert. Auch wurde der Salzgehalt (MgCl₂)

unverändert gelassen. Als Postivkontrollen diente das Plasmid und Testis-cDNA, als Negativkontrolle wurde Wasser verwandt. Die PCR Produkte wurden anschließend in einem Agarose Gel überprüft.

PCR-Programm

Die verwendete Annealing-Temperatur wurde für das einzelne Primer-Paar optimiert (siehe vorletzte Spalte; Tabelle 2-6).

Abbildung 2-5: PCR-Programm



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

Tabelle 2-6: Primer

Primer Name	Forward	Reverse	Produktlänge	Annealing (°C)	Primer Herkunft
GAPDH	gtt tac atg ttc caa tat gat tcc ac	tca tat ttg gca ggt ttt tct gac	638	57°C	Neu
pan-cTAGE ¹	cgg acc atc aga tta caa ag	caa gag gtg gag gaa caa ag	385	53	Neu
I	ctc ctg act tct ttc cca acc ttt acc	tgc aat tcc cac cta act tcc att ctg	714	60	Neu
II	ctc tcc ccg ctg aaa atg aag caa c	gct tag gga aga cga agg gaa gga a	1002	63	Neu
III	tag ggc taa ccc tca gcc ata c	ctc ctt ctg aaa gct ggc att c	346	63	Neu
cTAGE-3	aac aga aag tta atg act gag tta tat c	cac tct atc ttc aga atg tgg ggg tgg g	1195	60	Neu
cTAGE-4	gcc ata aac agc ttt ttc agc aag	ttt taa act tct ggt tct gct ggt c	1270	60	Neu
cTAGE-5A	cca gca ctt ggc act tta ttc g	tat ttc atc ctg aag ttc aga att	578	55	Neu
cTAGE-5B	ctc tcc ctg ctg aaa atg aag cca c	tcg tta gtc tca tcc gcc aat gct tc	308	60	Neu
MGEA-6	gtg tca tca ttt tga gct ttg g	tgc ttc act gcc ttt cct tc	107	50	[176]



Primer Name	Forward	Reverse	Produktlänge	Annealing (°C)	Primer Herkunft
MGEA-11	agc att tgg cag agg ctc ac	tgg aat caa acc tga ggg gaa c	706	60	Neu
CHO8/9 ¹	agt cct cag gga gcc tcc	act cag ctc ctc cca gat tt	486	60	[23]
MAGE-A1ser	gaa gag agc ggt cag tgt tc	aat cca ggt atg cat ata tct tta	398	56	[177]
MAGE-A2pw	aag tag gac ccg agg cac tg	gaa gag gaa gaa gcg gtc tg	247	64	[178]
MAGE-A3pw	tgg agg acc aga ggc ccc c	gga cga tta tca gga ggc ctg c	725	60	[178]
MAGE-A9edp	ccc cag agc agc act gac g	cag ctg agc tgg gtc gac c	391	63	[104]
MAGE-B	gtc aga aga gta agc tcc gtg c	gac ccc aca gga att gat agc	725	60	Neu
RAGE1-3 ^{1,2}	gaa ctg gaa ttg gaa gaa c	ata tta gcc cag aag atc c	891/851	45	Neu
RAGE1n ²	agt tca aac agg atc agg aat acc tc	tgc tca gtt atc ttc cgc ctt tc	440	59	Neu
RAGE2n ²	gct tac ctg att tga aat tgt ctg c	agg aaa atc aaa att cat agc tct cga c	209	54	Neu
RAGE3n ²	tgg tgg cgt ggg aat gaa gaa tgt g	tgc tgc tca gtt atc ttc cgc ctt tc	612	62	Neu
RAGE4	cac acc cgc tca gaa gat c	gga ctc tag ctg cct tgt gg	584	60	Neu
SCP-1	gta cag cag aaa gca agc aac tga atg	gga aat tgg att cta aag cag ttc ctt c	596	59	[174]
GAGE1,2,8 ¹	vde44: ccc cac cgc ttc ccg tg	vde24:cca tca gga cca tct tca	244	56	[105, 179]
GAGE3,4,5,6, 7b ¹	vv-1:gac caa ggc gct atg tac	vde24	244	58	[105, 179]
GAGE1	vde 44	GAGE-1R: gca att gtt cat taa aag cc	352	56	[105, 179]
SSX-2	gtg ctc aaa tac cag aga aga tc	ttt tgg gtc cag atc tct cgt g	435	60	[180]
LAGE-1a/b	BLE 72: gca gga tgg aag gtg ccc	BLE 71: ctg gcc act cgt gct ggg a	1a:328 1b:628	62	[181]



Primer Name	Forward	Reverse	Produktlänge	Annealing (°C)	Primer Herkunft
NY-ESO-1	BLE73: ccc cac cgc ttc ccg tg	BLE 71	274	58	[181]
OPC 183 / 184	gcc tgc tga agg atg agg cc	ggg gct gca gga gac tct gc	1190	63	[182]
OPC 189 / 190	ctg tac tca ttt cca gag cca ga	tat tga gag ggt ttc caa ggg gtt	591	54	[182]
MUC 1	cgt cgt gga cat tga tgg tac a	ggg acc tcc tct cac ctc ctc caa	286	50	[183]
WT-1	atg agg atc cca tgg gcc agc a	cct ggg aca ctg aac ggt ccc cga	852	70	[184]
Primerset A ¹	gct gca cag aaa acc tta ctt gtt tcc acc	ctc cgt aaa tgc aga aat ctc caa tgc cc	585	56	Neu
Primerset B	caa taa aag cag tat gag gat agt agt gga	gcc agt aga tgt aga caa cac ctg a	580	62	Neu
Primerset C	gca gaa gca gaa cac gaa g	gtc tcc tct ata caa aaa ccc	311	50	Neu
Primerset D	agg ata gta gtg gac tca gaa tca a	tct gtg ttt caa tgt gct ttt cta a	742	58	Neu
LAA pan ¹	gta gag atc aga gag ttg tga cat ctg	tat tac ttt tca ctg tta cac tgc tgg	537	59	Neu
LAA3'	atg aaa tgc agt tta acc	caa agt atg aaa aaa caa g	200	54	Neu
LAA 5'	agg cta cga tga gca cac	tca gtt agt aac aaa tgc gga g	406	50	Neu
PAR pan ¹	acc cac gca gat ttg gaa tc	agg ctg atc act ggc tgt g	911	60	Neu
PAR-3ta	cca aaa gaa acg aaa gca gaa g	acc tga ctc acc cat tat cc	534	52	Neu
PAR-3G	gag gcc gcc atg att gta ag	ttc cca gag gcc ctc cat c	553	56	Neu
PAR-3H	cac tga gga tga gga tgg g	cac tgt tca cac tcc tgt tgt c	540	56	Neu
PAR-3I	ata atg ggt gag tca ggt aaa tac cag	tgc ttt ttg att ttc gtg ttt taa cg	346	56	Neu
hASIPla	aca atg ctc gct cgt ctc	ctg ttc aca ctc ctg ttg tc	579	60	Neu



Primer Name	Forward	Reverse	Produktlänge	Annealing (°C)	Primer Herkunft
RSV	tgt tat agg cat atc att ga	tta acc agc aaa gtg tta ga	239	50	[185]
RSV N	ggg aga ggt ggc tcc aga ata cag gc	agc atc act tgc cct gaa cca tag gc	347	68	[186]

Die RT-PCR wurden immer mit Positiv Kontrollen (cDNA aus Testis und 1:100 verdünntem Plasmid), sowie mit Negativ Kontrollen (H₂O) durchgeführt. ¹: Primerpaare, die mehrere Gene amplifizieren. pan-cTAGE amplifiziert cTAGE-2/ -3/ -4/ -5a/ -5b und cTAGE-5C / MGEA-6 und cTAGE-5D / MGEA11, CHO8/9 die mRNAs MAGE-A1, -A2, -A3, -A3b, -A5a, -A6, and -A12, PARpan alle PAR-3 bekannten mRNA und Primerset A alle se70-2 bekannten mRNAs. Die GAGE Primer amplifizieren die im Namensindex gekennzeichneten GAGE mRNAs. ²: RAGE1,2,3 erkennt 3 RAGE-gene, dessen Amplifikate 1/50 verdünnt in einer nested PCR mit RAGE-1, RAGE-2 und RAGE-3 spezifischen Primern eingesetzt wurden. Alle Ergebnisse wurden in mindestens 2 unabhängigen Versuchen bestätigt.

PCR Proben

Zur Überprüfung der Expression in gesunden Normalgeweben wurden selbst isolierte RNA und gekaufte RNA Normalgewebe Panels (Fa. BD Clontech) in cDNAs umgeschrieben. Ferner wurden fertige cDNA Panels: MTC II und fetales Panel als Kontrollen benutzt. Folgende Gewebe waren enthalten:

umgeschriebene selbst isolierte RNA, n=3	Haut PMNC Leukozyten
umgeschriebenes Human Total RNA Panel I, n=6	Gehirn Herz Niere Leber Lunge Trachea
umgeschriebenes Human Total RNA Panel II, n=6	Knochenmark Kolon Dünndarm Milz Magen Thymus

MTC II, n=4	Ovar Testis Leukozyten Prostata
fetales MTC Panel, n=8	fetales Gehirn fetales Herz fetale Niere fetale Leber fetale Lunge fetaler Skelettmuskel fetale Milz fetaler Thymus

cDNA aus folgenden Tumorgeweben (siehe Tabelle 2-7) und Zelllinien wurden hergestellt. Alle cDNAs wurden mittels GAPDH-PCR bezüglich der mRNA Integrität überprüft.

Tabelle 2-7: RT-PCR Proben

Ziele	Gewebe	Zelllinien	Summe
Kontrollen	19		19
Fetale Kontrollen	8		8
T-Zell Kontrollen ¹		4	4
CTCL gesamt ²	17	4	21
CBCL	3		3
Kolon-Karzinome Zelllinien	8	31	29
Melanome	10	22	22
Leukämien – Zelllinien		5	5
HNO-Tumore- Zelllinien	24	6	30
Ovarialkarzinome	63		63
Mamma Karzinome	23		23
Ovarial Karzinome	63		

cDNAs, die als PCR Proben verwendet worden sind; ¹: T-Zelllinien als Kontrolle, bestehend aus 3 aktivierten T-Zellklonen und der Zelllinie Jurkat; ²CTCL, gesamt: Mycosis Fungoides = 13, Sézary-Syndrom = 3, T-Zonen Lymphom = 1 und pleomorphes CD30+ Lymphom = 1.

2.3.4 PCR-Southern Blot

Durch eine Hybridisierung mit spezifischen Sonden wurden die PCR Ergebnisse bestätigt. Eng verwandte Genen ließen nicht immer eine optimale, Primerwahl zu, die aber durch die Erhöhung der Detektion durch eine sekundäre Hybridisierung ausgeglichen wurde.

Blotting

Dazu wurden die PCR-Produkte in einem Agarose Gel aufgespalten, 2-mal 20 min in Denaturierungslösung und 2-mal 30 min in Neutralisierungslösung unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend folgte der Blotaufbau. In Gelgröße wurden 2 Lagen Whatman-Papier und Nylon Membran zugeschnitten. Durch 2 in Transferpuffer getränkte Lagen Whatman hatte das Gel Kontakt zum Transferpuffer (20xSSC). Auf das Whatman-Papier wurde das Gel luftblasenfrei aufgelegt, es folgte luftblasenfrei die vorher mit H₂O und 2xSSC gespülte positiv geladene Nylon-Membran, darauf in Transferpuffer getränkte 2 Lagen Whatmann-Filter. Als oberstes wurde ein Stapel Papierhandtücher aufgelegt. Die Saugspannung zieht die DNA aus dem Gel auf die Membran. Am darauffolgenden Tag wurden die Membrane in 2xSSC gespült und die DNA im Crosslinker bei 500mV an die Membrane fixiert.

Sondenherstellung und Hybridisierung

Das Digoxigenin-Markieren der Sonde erfolgte gemäß des HYREX Protokolls (siehe Abschnitt HYREX) Die Membrane wurden in 2xSSC gewaschen und auf 42°C erwärmt und mit vorgewärmten DIG EASY HYB Lösung (Fa. Roche) prähybridisiert (2 h bei 42C). Die frisch denaturierte Sonde (10 min 100°C, kurz auf Eis) wurde direkt in die Hybridisierungslösung (ca. 3 ml / 100cm² Membran) hineingegeben und über Nacht bei 42°C

hybridisiert. Die Membrane wurden bei 68°C 2-mal 5 min mit 4xSSC + 0,1%SDS; 2-mal 15 min mit 2xSSC + 0,1% SDS und 2-mal 15 min mit 0,2xSSC + 0,1%SDS gewaschen.

Detektion

Der Nachweis erfolgte mit Anti Digoxigenin spezifischen AP konjugierten Antikörpern, gemäß des HYREX Protokolls. Die alkalische Phosphatase spaltet das CSPD unter Freisetzung von Chemilumineszenz. Bei der Chemilumineszenzreaktion entsteht durch die enzymatische Dephosphorylierung des Substrats ein metastabiles Phenolatanion, welches zerfällt und Licht emittiert. Durch Auflegen eines Röntgenfilms kann das nicht-radioaktive Signal bis zu 48 Stunden nach Zugabe von CSPD detektiert werden. So wurden die Membrane abgetropft und mit CSPD READY TO USE (Fa. Roche) 5 min in einer Folie luftblasenfrei inkubiert. Die abgetropften Membrane wurden in Folie eingeschweißt, 15 min bei 37°C inkubiert und mit einem Kodak Xomat XR 30sec-20 min belichtet. Die Entwicklung erfolgte mit der Entwicklermaschine Agfa Curix 60.

2.3.5 Northern Blot

Der Northern Blot diente dazu, die Ergebnisse der RT-PCR zu bestätigen und zu quantifizieren. 10 µg RNA wurde in einem MOPS Gel aufgespalten. Das Gel wurde 2-mal 20 min in 20xSSC getränkt und anschließend der Kapillarblot aufgebaut (siehe PCR-Southern Blot). Auf einem Transilluminator wurden die Lauffronten der 28s rRNA und 18s rRNA als Größenstandarts auf der Membran markiert.

Sondenherstellung

Unter Verwendung des HIGH PRIME LABELING KIT (Fa. Roche) wurden ca. 20ng Sonde eingesetzt. Als Sonde wurde das aufgereinigte PCR Produkt am Plasmid gewählt. Die Polymerisierung wurde ½ Stunde bei 37°C durchgeführt. Die Reaktion wurde mit 1/10 VT 200mM EDTA (pH8) gestoppt.

Hybridisierung

Die Nylonmembran wurde mit 2xSSC gespült und zur vorgewärmten Hybridisierungslösung gegeben. Die Prähybridisierung dauerte 3 Stunden bei 55°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 der Radioaktivität, noch einmal benutzt werden. Die Membran wurde mit 2xSSC + 0,1%SDS 2-mal 30 min bei 50°C gewaschen und anschließend mit verringerter Stringenz mit 0,2xSSC + 0,1%SDS 2-mal 30 min bei 63°C. Die Membrane wurden eingeschweißt und in einer Röntgenfilmkassette fixiert. Der Röntgenfilm lag bis zu 10 Tagen bei -80°C auf. Die Sonde wurde 2h bei 65°C mit Hilfe der Mild Stripping Solution entfernt und anschließend wurde der Blot mittels einer Haushaltsgen Hybridisierung (GAPDH) überprüft.

2.3.6 Southern Blot

Für einen Southern-Blot wurde genomische DNA der Zelllinien HH, HuT-78, MyLa, SeAx und von *E.Coli* (BLOOD AND CELL CULTURE DNA MINI KIT; Fa. Qiagen) isoliert. Die DNA wurde über Nacht *HindIII* (Fa. Amersham) restringiert, in einem 0,5%igem Agarose-Gel separiert und auf eine positiv-geladene Nylon-Membran über Nacht (Kapillar-Blot Aufbau) transferiert. cTAGE-1, cTAGE-2 und als negative Kontrolle puc18 Sonden wurden radioaktiv markiert (siehe Sondenherstellung Northern-Blot). Nach Prähybridisierung (6xSSC and 2xDenhardt; 2 Std. bei 63°C) wurden die Membrane der spezifischen Probe über Nacht (3xSSC, 1x Denhardt, bei 60°C) inkubiert. Nach mehrmaligen Waschen (2xSSX bei 55°C und 0,2xSSC bei 60°C, 2x 30 min jeweils) wurde ein Kodak-Film bis zu 4 Tagen aufgelegt.

2.3.7 Antikörper Herstellung

Um die Expression von cTAGE-1 und cTAGE-5A auf Proteinebene herauszufinden, wurden Epitop spezifische Antikörper hergestellt (Fa. Biogenes). In Tabelle 2-8 ist das Immunisierungsschema der Kaninchen dargestellt.

Tabelle 2-8: Boost Schema zur cTAGE-1 und cTAGE-5A Antikörper Herstellung

	Anti cTAGE-1 AK		Anti cTAGE-5 AK	
	K26	K25	K64	K65
Erst Immunisierung	1x	1x	1x	1x
Boost	2x	2x	2x	2x
Bluten	20ml	20ml	20ml	20ml
Boost	2x	2x	2x	2x
Bluten	1,5ml	1,5ml		
Boost	2x	2x		
Bluten	20ml	20ml		
Boost	1x	1x		
Ausbluten	Ausbluten	Ausbluten	Ausbluten	Ausbluten

Zur Immunisierung bzw. Boosten wurden Protein-Epitope aus den Tumorantigenen an KLH gebunden. Zur Injektion wurden cTAGE-1 und cTAGE-5A an KLH gebundene Epitope eingesetzt.

Zur Herstellung der Antikörper wurde das immunogene Epitope (siehe Ergebnis Epitope Mapping cTAGE-1) aus cTAGE-1 synthetisiert, über Cystein an KLH gekoppelt und damit 2 unterschiedlichen Kaninchen immunisiert. Gegen cTAGE-5A wurde ein Epitop aus dem C-terminalen Bereich des Proteins gewählt, der identisch zu cTAGE-5C / MGEA-6 und cTAGE-5D / MGEA-11, jedoch zu allen anderen cTAGE-Proteinen unterschiedlich ist. Hier wurde auch KLH gebundenes Peptid in Kaninchen injiziert und das Serum gewonnen. Beide polyklonalen Antikörperseren wurden gegen eine cTAGE-1 Peptid bzw. cTAGE-5A Peptid beladenen Sephadex Säule aufgereingt (Fa. Biogenes).

2.3.8 Protein-Isolation

Zur Analyse der Proteinexpression der Tumorantigene wurden die Western-Blot Analysen und Dot-Blot Analysen durchgeführt. Zum einen wurden gekaufte Protein-Panels von Normalgeweben der Firma BD Clontech (Testis, Placenta, Dünndarm, Magen und Brustgewebe) und der Firma BioCat (Knochenmark, Hirn, Dickdarm, Prostata, Skelett Muskulatur und Luftröhre) benutzt, zum anderen wurden Proteine von Tumorzellen mittels des TriStar Kits (Fa. Peqlab) isoliert. Als positiv Kontrollen wurde cTAGE-1 und cTAGE-5A in einen Expressionsvektor pTRC-His kloniert und rekombinant exprimiert. Bakterienlysate, die cTAGE-1 und cTAGE-5A kodierende Plasmide enthielten, wurden 4h mit IPTG bei RT

induziert, anschließend pelletiert und in einem isotonischen Puffer (2ml / 2mg Pellet) aufgenommen, 5x 20 Sekunden sonifiziert und der Überstand als Proben in Western-Blot und Dot-Blot Analysen verwandt. Die Lysate wurden mit Protease Hemmern (DTT 1mM, PMSF 14µg/µl, Aprotinin 8µg/ml und Leupeptin 2µg/ml) versetzt und bei -80°C aufbewahrt. Als Positiv-Kontrolle wurden die zu Immunisierung verwandten Peptide an BSA gekoppelt. Bei dieser Methode werden Peptide über Aminogruppen an das Carrierprotein gekoppelt. 1,125 mg Oligopeptide wurden in 100µl PBS, pH 6,8 gelöst und mit 200µl BSA-Protein Lösung (11,25mg/ml) in PBS, pH 6,8, gemischt. Zu der Mischung werden 0,3ml 0,2% Glutaraldehyd / PBS, pH 6,8 gegeben. Diese Lösung wurde für 1 Stunde bei RT unter Lichtschutz geschüttelt, um anschließend mit 1/10 des Gesamtvolumens an 1M Ethanolamin, pH 8,0 weiter für 1 Stunde unter Lichtschutz geschüttelt zu werden. Die Proteinlösung wurde unter Lichtschutz 4°C über Nacht gegen PBS pH 7,5 mittels einer Dialyse aufgereinigt. Dazu wurde der Dialysierschlauch mit einer Porengröße von 12-14 kDa 2-mal für 10 Minuten mit 2% Na-Bicarbonat und 1mM EDTA (pH 8) in H₂O und mit 1mM EDTA Lösung gekocht. Nach H₂O-Spülen konnte der Dialysierschlauch eingesetzt werden.

Proteinbestimmung nach Bradford

Zur genauen Konzentrationsbestimmung wurden die Extinktion der Proteine mit der Bradford Reagenz gemessen (BioRad Protein Assay Reagenz) und anhand einer Verdünnungsreihe von Rinder-Serum Albumin bestimmt.

2.3.9 Western-Blot

Für alle Polyacrylamidgele wurde das BioRad Protean II und III Gel System verwendet. Die Proteinproben wurden (siehe Tabelle 2-9) in einem Sammelgel gesammelt und in einem Trenngel aufgetrennt.

Tabelle 2-9: Western-Blot Reagenzien

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

Die Tabelle zeigt das Pipetierschema für ein Polyacrylamid Gel zur Auftrennung von Proteinen.

In der Regel wurden 20µg Protein mit Ladepuffer in 1x Laufpuffer bei 150V 1h aufgetrennt. Zur Kontrolle der Protein Lysate konnten die Gele durch Brilliant Blue G blau gefärbt (30 sec in Mikrowelle aufgeköcht) werden. Nach 1h Entfärben (Destaining Lösung) kann ein Protein-Auftrennungsmuster erkannt werden.

Blot der Proteine

Die Proteine wurden mit dem Biorad Blotting Sytem unter elektrischer Spannung 1h bei 100V gemäß der Anleitung des Herstellers in 1x Transferpuffer auf Nitrozellulose transferiert. Der Transfer konnte mit einer Ponceau Rot Anfärbung und PBST Entfärbung überprüft werden.

Detektion von Proteinen

Zur spezifischen Detektion der Proteine durch Antikörper wurden die Membrane 2x10 min in PBST (0,1%) gewaschen und anschließend mit 5% Trockenmilch 1h RT geblockt. Nach 3x 10 min in PBS-Tween (0,1%) bei RT wurde der Antikörper in 0,5% Milch verdünnt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach 3x10 min in PBST bei RT wurde der mit einer Peroxidase gekoppelte Kaninchen IgG-spezifische Zweitantikörper (1:10 verdünnt in PBST / 0,5% Milchpulver) für 1 Stunde bei RT inkubiert. Unspezifische Antikörper Bindungen wurden durch 3-maliges Waschen mit PBST abgewaschen und mittels ECL (Fa. Amersham) und Auflage eines Filmes (Kodak Xomat XR) sichtbar gemacht. Zur Kontrolle wurden alle Blots mit b-Actin spezifischen Antikörper inkubiert, um Proteinmengen abschätzen zu können.

2.4 Immunhistologie

Das immunhistochemische Markieren von Zellen mit cTAGE-5A Antikörpern dient dazu die Proteinlokalisierung in der Zelle zu beobachten. Die Versuche wurden mit Cytospins von Tumorzelllinien (Colo320, HT29, Ma-Mel-33, UKRV-Mel-11a, HH, Hut 78, MyLA und SeAx) und an Paraffinschnitten durchgeführt. Die Paraffinschnitte wurden in Kooperation mit der Dermatologischen Klinik Zürich Prof. Dr. R. Dummer gewonnen.

2.4.1 Cytospins

Die Cytospins wurden 10 min in eiskaltem Aceton fixiert und anschließend 5 Minuten in 10mM Citratpuffer pH=6.0 aufgekocht. Nach Abkühlen und 5 minütigem waschen in 1xPBS wurden unspezifische Avidin oder Biotinbindungen durch je 15 minütiges Inkubieren mit Avidin D- und Biotin Lösungen des AVIDIN / BIOTIN BLOCKING KITS (Fa. Linaris) geblockt. Anschließend wurden die Präparate 3x 5min in 1xPBS gewaschen, um mittels 5% Ziege Serum in 1xPBS für 20 Minuten gegen unspezifische Antikörper Bindungen geblockt zu werden. Sodann wurde der cTAGE-5A Primärantikörper in einer 1: 500 Verdünnung in 1% Ziege-Serum in einer feuchte Kammer über Nacht inkubiert.

Der Sekundär Antikörper des ABC Systems erkennt spezifisch Kaninchen-Antikörper und wurde nach 3x 5minütigem Waschen in 1xPBS in 10% Ziegenserum für 30 min inkubiert. Die ABC Reagenzien des ALKALINE PHOSPHATASE RABBIT IGG ABC KITS (Fa. Linaris) wurden nach Angaben des Hersteller zur Verstärkung des Signals angesetzt und für 30 Minuten in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach Waschen (3x 5min in 1xPBS) wurden die Proben kurz mit Tris-HCl pH=8,5 abgespült und die Färbung erfolgte mittels des AP-Substrat-Kits (Fa. Linaris) nach Herstellerangaben. Die gefärbten Schnitte wurden nach 3x 5minütigem Waschen in MQ-H₂O mit Hämatoxylin für 5-10min gegengefärbt und durch fließendes Wasser gebläut. Zur Konservierung wurden die Schnitte mit Histogel eingedeckt.

2.4.2 Paraffinschnitte

Die immunhistochemische Färbung von Tumor-Paraffinschnitten wurde gemäß des Protokolls der Cytospins durchgeführt. Jedoch mussten vor Markierung die Schnitte entparaffiniert werden, indem die Schnitte in Xylol für 3 x 5min, in 100% EtOH für 2 x 2min, in 96% EtOH für 2 x 2min, in 80% EtOH für 2 x 2min und in für H₂O 2 x 2min gewaschen wurden. Nach der Färbung mussten die Schnitte schrittweise wieder dehydriert werden, indem sie in 80% EtOH für 2 x 2min, in 96% EtOH für 2 x 2min, in 100% EtOH für 2 x 2min und in Xylol für 3 x 5min gewaschen wurden. Zur Konservierung wurde mit Mounting Medium eingedeckt.

2.5 FACS

FACS Färbungen wurden mit cTAGE-5A RT-PCR / Western-Blot positiven Zelllinien durchgeführt. Bei der FACS Färbung werden Zellen gegen einen Antikörper gefärbt und der Größe nach (oder mittels eines zweiten Antikörpers) sortiert. So kann bei dieser Messung an intakten Zellen die FACS Färbung als Nachweis für membranständige Proteine angesehen werden. Die Zellen wurden dazu mit PBS gewaschen und auf eine Konzentration von $2 - 5 \times 10^6$ Zellen / ml eingestellt. 0,1 ml der Zellsuspension wurde pro FACS – Reaktion angesetzt ($2 - 5 \times 10^5$ Zellen / Röhrchen). 2µl des Antikörper (1:50 Verdünnung) wurden direkt zu der Lösung gegeben und 30min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit 1-2ml 2% FCS / PBS Lösungen gewaschen, das Pellet wurde in 100µl 2% FCS / PBS Lösung mit 2µl Fluorescein (FITC) markierten Goat Anti Rabbit IgG (H+L) sekundärem Antikörper (Dianova) versetzt und im Dunkeln 30 min bei 4°C schüttelnd inkubiert. Nach abermaligem Waschen mit 1-2ml 2% FCS / PBS Lösung wurde das Pellet mit 100µl 1% Formalin fixiert. Die Fluoreszenz war bis zu 30 Tagen messbar. Die Messung wurde an einen Becton Dickinson FACS Calibur durchgeführt.

2.6 Computerprogramme

DKFZ: HUSAR / GCG package
Prime, Primer => Primersynthese
Map, translate, 2dsweep, Domaionsweep => Petid-Beschreibung
Gap, Bl2seq => Similaritäts-Vegleiche
Malign, Contig, Malign2MSF, Aline =>Alignment
Genescan, HMM Gene => Exon Intron Strukturen
National Institute of Health NIH, USA:
Unigene Cluster, Virtual Northern-Blot (<http://cgap.nci.nih.gov/Genes/GeneFinder>)
Ludwig Institute for Cancer Research
SEREX Datenbank (<http://www2.licr.org.CancerImmunomeDB>)
Scripps Research Institute, USA
WinMDI2.8



2.7 Lösungen

2.7.1 Medien und Agar

NZY-broth :

Menge:	1l
NaCl	5 g
Bacto Yeast	5 g
MgSO ₄	2 g
NZ a mine	10 g
H ₂ O	Ad

pH = 7.5; autoklavieren

NZY-Agar:

NZY-broth 500 ml

Agar 7,5 g,

autoklavieren

NZY-Top-Agar:

NZY-broth ansetzen 200 ml

Agarose 1,4g,

autoklavieren

LB-Medium

Menge:	1l
Bacto Trypton	10 g
Bacto Yeast	5g
NaCl	10 g

pH = 7.0; autoklavieren

LB-Agar :

LB-Medium 500 ml

Agar 7.5 g, autoklavieren

bei 55°, Antibiotikum dazugeben

2.7.2 HYREX / SEREX

Serum Verdünnungslösung 10x

	100 ml	final
Milchpulver	2 g	0,2%
NaAcid	0,25 g	0,025%
TBS 10x	100 ml	1x

Blockierungslösung:

	500 ml	final
Magermilchpulver	25 g	0,5%
TBS 10x	50 ml	1 x
H ₂ O	ad	

	Stamm-Konz	Final
Tetracyclin	5 mg/ ml	5 µg/ ml
Ampicillin	100 mg/ ml	150 µg/ ml
Kanamycin	50 mg/ ml	50 µg/ ml

LB-komplett

Menge:	10 ml	50 ml	100 ml
LB-Medium	9.3 ml	46,5 ml	93 ml
0.2 M MgSO ₄	0.5 ml	2.5 ml	5 ml
10% Maltose	0.2 ml	1 ml	2 ml
Tetracyclin	25 µl	125 µl	250 µl

Maltose-Stamm (10%)

Maltose: 10 g in 100 ml

sterilfiltrieren

MgSO₄-Stamm (0.2 M)

MgSO₄ x 7 H₂O:

4,92g in 100 ml

autoklavieren

Top-LB-Agar

LB Medium 500 ml

2 g Agar, final M

2g Agarose, final M

Sekundärer Antikörper Mix

	500 ml	final
Magermilchpulver	2,5	0,05%
TBS 10x	50	1x
H ₂ O	Ad 500	
Sekundärer Antikörper	200µl	1:2500

CDS 10x:

0,1 M Tris HCl, pH=9,5

5mM MgCl₂ -6H₂O

0,1M NaCl
pH=9,5

Entwickler (frisch ansetzen):

Grundlösung CDS 10X	50 ml
A. dest.	450 ml
NBT	1000 µl -> mixen
BCIP	500 µl -> mixen

filtrieren und dunkel stellen

NBT-Stamm:

500 mg NBT (4°C) in 10 ml 70% DMF lösen
-> portionieren und bei 4°C aufbewahren

BCIP-Stamm:

250 mg BCIP (-20°C) in 5 ml 100% DMF lösen
-> portionieren und bei -20°C aufbewahren

Na-Acid-Stamm (10%)

0.1 g auf 10 ml H₂O

SM Puffer (Manniat's: A.7)

5,8 g NaCl, final: M
2 g MgSO₄ x 7 H₂O, final M
50 ml Tris HCl 1M, final M
5 ml Gelatine 2%ig
ad 1 l H₂O
autoklavieren

2.7.3 Lösungen für cDNA / DNA Arbeiten

50xTAE

40mM TrisCL
10mM Na Acetat
1mM EDTA (pH7,8)

DNA-Loading buffer

0.1 M EDTA (pH 8)
0.1% Bromphenolblau
1% SDS
50% Glycerin

20 × SSC:

3 M NaCl
0,3 M Na-Citrat-Dihydrat
pH 7,5, autoklavieren

IPTG-Stamm (0.5 M)

0,6 g auf 5 ml H₂O;
sterilfiltrieren
->portionieren (1 ml); aufbewahren bei: -20°C

X-Gal-Stamm (250 mg/ ml)

250mg in 1 ml 100% DMF lösen
->portionieren (50 - 100 µl);dunkel aufbewahren bei: -20°C

TBS 10x (pH 7,5 einstellen)

	final
NaCl	8,78%
Trizma Base	0,0116 M
Tris-HCl	0,038 M

pH auf 7,5 einstellen.

TBST 10x (TBS-Tween)

5 ml Tween in 1l TBS 10x

Tris HCl, pH 7.5, 1M:

	100 ml	final
Trizma Base	2,8 g	0,23 M
Tris-HCl	12 g	0,76 M
H ₂ O	ad	

Tris HCl, pH 3.0

g Tris-Base (0,05 M) auf 1l A.dest;
pH = 3 mit HCl, rauchend

2 × SSC: 450 ml H₂O, 50 ml 20 × SSC

4xSSC, 0,1%SDS: 395 ml H₂O, 100 ml 20x SSC, 5 ml 10% SDS

2 × SSC, 0.1% SDS: 445 ml H₂O, 50 ml 20x SSC, 5 ml 10% SDS

0,2 × SSC, 0.1% SDS:490 ml H₂O, 5 ml 20x SSC, 5 ml 10% SDS

200 mM EDTA

4M LiCl

Dig Easy Hyb Lösung:

Dig Easy Hyb Granules, in 64 ml A.dest lösen und 5 min bei 37°C inkubieren.

Puffer 1:

100mM Maleinsäure
150mM NaCl
pH 7,5, autoklavieren

Puffer 2:

2 ml 10% Blockierungsstammlösung
18 ml Puffer 1

2.7.4 Lösungen für RNA Arbeiten**6 x SSC, 3 x Denhard**

150 ml 20xSSC
20 ml 50 x Denhard
ad 500 ml H₂O

3 x SSC, 2 x Denhard

75 ml 20xSSC
10 ml 50xDenhard
ad 500 ml H₂O
vor Gebrauch Lachssperm DNA (final 10 µg / ml) 10 min kochen und nach kurzem Abkühlen (auf Eis) zu der Hybridisierungslösung geben.

RNA Sample Buffer:

2,5 ml deion. Formamid
1 ml 37% Formaldehyd
0,5 ml 10x MOPS
1 ml DMPC H₂O

RNA-Loading buffer

50% Glycerin
1mM EDTA
0,4% Bromphenolblau
0,0004% Ethidiumbromid

10 x MOPS: (1000 ml)

400 mM MOPS
100 mM Na-Acetat
10mM EDTA (pH=8)
pH Wert: 7,
autoklavieren (gelbliche Verfärbung) und lichtgeschützt aufbewahren.

Puffer 3

100mM Tris Base
100mM NaCl
50mM MgCl
pH=9,5

Waschpuffer:

0,3% Tween 20 in Puffer 1

DMPC Wasser: H₂O mit 0,1% DMPC

Dimethylpyrocarbonat versetzen, ca. 30 min bei RT inkubieren, anschließend DMPC durch Autoklavieren inaktivieren.

DNase-Verdünnungspuffer:

25 mM Tris HCl (pH 7.6)
Glycerin (final 50%)
autoklavieren

DNase 10× Testpuffer:

1M Natriumacetat
50 mM MgSO₄
pH5, autoklavieren:

50x Denhardt's Reagenz:

0,5 g Ficoll Typ 400 (Pharmacia)
0,5 g Polyvinylpyrrolidon (Calbiochem)
0,5 g BSA (Pentax Fraktion V, Sigma)
ad 50 ml H₂O
sterilfiltrieren und bei -20° C lagern

Dextransulfat:

33% Dextransulfat mit DMPC Wasser

Formamid, deionisiert:

500 ml Formamid
50 g Ionenaustauscherharz, AG 501-X8 Resin (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:**

10 g SDS plus H₂O ad 100 ml,
sterilfiltrieren

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)

2.7.5 Lösungen für Protein Arbeiten

Isotonischer Puffer:

store 4°C
Sucrose 250mM
HEPES 20mM
KCl 10mM
MgCl₂ 1,5mM
EDTA 1mM
EGTA 1mM
H₂O (MQ- Wasser, autoklaviert)

10% SDS:

50g SDS auf 500 ml H₂O

0,5M EDTA:

9,3g EDTA auf 50 ml H₂O pH 8,0
einstellen

10% Ammoniumperoxidsulfat:

1g in 10 ml H₂O
in 600µl Portionen aliquotieren

0,25% Bromphenolblau:

50mg BPB in 20 ml H₂O

5x Sample-Buffer:

5 ml Glycerin (99%)
1,5 g SDS
1 ml 0,25% BPB
H₂O ad 7,5 ml
2,5 ml Mercaptoethanol

4xLower Buffer:

Trisma Base 1,5M 90,85g

65 ml H₂O (steril)

- portionieren und bei -20° C lagern,
- vor Gebrauch Lachssperm DNA (fertig:
10mg/ ml, final: 0,1mg/ ml) 10 min kochen
und nach kurzem Abkühlen (auf Eis)
einsetzen zu der Hybridisierungslösung
geben.

Mild Stripping Solution:

5mM Tris HCl, pH=8
2mM EDTA, pH=8
0,1x Denhardt's Lösung

10% SDS 20 ml
auf 500 ml mit H₂O auffüllen , pH 8,8
einstellen

4xUpper Buffer:

Trisma Base 0,5M 15,15g
10% SDS 10 ml
auf 250 ml mit H₂O auffüllen , pH 6,8
einstellen

10x Running Buffer:

Trisma Base 7,5g
10% SDS 2,5g
Glycin 36g
auf 250ml mit H₂O auffüllen

10x Transferpuffer :

Trisma Base 15g
Glycin 72,5g
SDS 1,87g
auf 500 ml mit H₂O

PBS/Tween:

250 µl Tween auf 500 ml PBS

Brilliant Blue G:

300 ml Brillant Blue G Konzentrat
ad 1000 ml A.dest.

Entfärber-Lösung :

20% Methanol
7% Essigsäure
73% A.dest.

Stripping-Lösung

6,25ml 1M Tris-HCL (pH 6,8)

20ml 10%iges SDS

73,75mL bidest. Wasser

700µL β-Mercaptoethanol

2.8 Geräte / Reagenzien

2.8.1 Antikörper

Spezifität	Verdünnung in	Hersteller	Anwendung
Rabbit Anti cTAGE-1 K26	1: 5000 in 0,5% Milch, 0,5%BSA in PBST	Biogenes	Western-Blot / Immunhisto / FACS
Rabbit Anti cTAGE-1 K25	1: 5000 in 0,5% Milch, 0,5%BSA in PBST	Biogenes	Western-Blot / Immunhisto / FACS
Rabbit Anti cTAGE-5a K64	1:10.000 in 0,5% Milch, 0,5%BSA in PBST	Biogenes	Western-Blot / Immunhisto / FACS
Rabbit Anti cTAGE-5a K65	1:10.000 in 0,5% Milch, 0,5%BSA in PBST	Biogenes	Western-Blot / Immunhisto / FACS
Goat Anti-Mouse IgG-HRP	1:10 000 in PBST	Southern Biotechnology Associates	Western-Blot
Goat Anti-Rabbit Ig-HRP	1.10 000 in PBST	Santa Cruz Biotechnology	Western-Blot
Goat Anti-Mouse IgG-HRP	1:10 000 in PBST	Santa Cruz Biotechnology	Western-Blot
GoatAnti Rabbit FITC	1 :50 in 2% FCS / PBS	Dianova	FACS
Goat Anti Human AP	1:2000 in 0,5% Milch in TBST	Dianova	SEREX
Goat Anti-Human-HRP	1:10.000 in 0,5%Milch, 5% Sucrose, 1x CaseinBlock	Dianova	Epitope Mapping

2.8.2 Chemikalien

- 1,4-Dithiotreitol (DTT), Fa. Roth
- 100 bp Ladder, Fa. Natutec
- [α -³²P]dCTP, Fa. Amersham
- β-Mercaptoethanol, Fa. Merck
- Affinitätsadsorbens: aktiviertes Glutar dialdehyd, Fa. Roche
- Antibiotika, Fa.Sigma
Ampicilin: Stamm = 100 mg/ ml
- H₂O
- Kanamycin: Stamm =50mg / ml
- H₂O
- Tetracyclin: Stamm=5mg / ml
- EtOH
- Agar, Fa. Difco
- Agarose, Fa. Biozym
- Anti Dig Ap Konjugat, Fa. Roche

- Aprotinin, Fa. Roche
- BioRad Protein Assay, Fa. Biorad
- BCIP, 5-Brom-4-chlor-3-indolyl Phosphat, Fa. Biomol
- Blocking Reagent, Fa Roche
- BSA, Rinder Serum Albumin (Pentax Fraktion V), Fa. Serva
- Bromphenolblau Natriumsalz, Fa. Merck
- Chemilumineszenz-Nachweisreagenz ECL, Fa. Amrsham-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: Dimethylsulfooxid, Fa. Merck
- DNase I, RNase-frei, Fa. Roche
- 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
- fötales Rinderserum (FCS), Fa. Gibco
- Glucose, Fa. Merck
- Glutar-aldehyd, Fa. Sigma
- Glycin p.A., Fa. Gerbu
- Harnstoff, Fa. Fluka
- -(2-Hydroxyethyl)-Piperazine-N^c-2-ethanesulfonic acid (HEPES), Fa. Gerbu
- Ionenaustauscherharz, Fa. Biorad
- Isopropanol, Fa. Riedel-de-Haen
- IPTG, Isopropylthiogalactosid, Fa. Sigma
- Lachssperm DNA-Lösung, Fa. Gibco
- Kaliumchlorid p.A, Fa. Merck
- Lithiumchlorid, Fa. Merck
- Leupeptin, Fa. Roche
- Maltose, Fa. Sigma
- MgCl₂-6H₂O, Fa. Sigma
- MgSO₄, Fa. Fluka
- MOPS (3-[N-morpholino]-2-hydroxypropansulfon Säure), Fa. Sigma
- Milchpulver, Fa. Fluka
- Multiple Tissue RNA Panel, Fa. BD Clontech
- Multiple Tissue cDNA fetale Panel, Fa. BD Clontech
- Na-Citrat-Dihydrat, Fa. Roth
- NaCl, Fa. Roth
- NaOH, Fa. Merck
- Natrium Acetat, Fa. Fluka
- Natriumacid, Fa. Sigma
- NBT, Nitrobluetetrazolium (2,2'-Dinitrophenyl, 5,5' diphenyl), Fa. Biomol
- Nukleotide, Fa. Peqlab
- Phenol, sauer, Fa. Pharmacia
- PBS (phosphatgepufferte Salzlösung) w/o Ca²⁺, Mg²⁺; 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 der Fa. Gibco
- Restriktionenzym-puffer: One for all Puffer, Fa.: Pharmacia
- Restriktionsenzyme, Fa. Natutec
- RNA clean Lösung, Fa. AGS
- Rnase Inhibitor, Fa. Roche
- RNase (DNase frei), Fa. Roche

- Sodium Dodecylsulfate (SDS), Fa. Merck
- Sucrose, Fa. Sigma
- Taq-Polymerase, Fa. Natutec
- Temed p.A., Fa. Roth
- Trizma Base, Fa. Sigma
- Trizma HCl, Fa. Sigma
- Triton-X100, Fa. Sigma
- Tryptone, Fa. Difco
- Tween 20, Fa. Sigma
- X-gal, 5-Brom-4-chlor-3-indolyl β -d-galaktopyranosid, Fa. Sigma
- Yeast extract, Fa. Difco

2.8.3 Verbrauchsmaterial

- 0,2 ml; 0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml Eppendorf Cups
- 3MM Filterpapier, Fa. Whatmann
- 1000er, 100er, 10er Pipettenspitzen, Fa. Gilson, Fa. Eppendorf
- Dialysierschlauch, Fa. Neolab
- Skalpell, Zahnstoßer
- Nitrozellulose-Membranfilter für SEREX-Blotting, Fa. Sartorius
- Nitrozellulosemembran HybondTM-C, Fa. Amersham
- Pasteur Capillary Pipettes, Fa. WU Mainz
- Peg 500-Spacer Nylonmembran Fa. Genosys
- Säulenmaterial: Affin.-Adsorbens.GDA-aktiviert, Fa. Roche
- Glas-Petri-Schalen, Fa. Greiner
- Greiner Plastik-Petrischalen, 150 mm
- Positiv geladene Nylon Membran, Fa. Roche
- Serum-Monovetten, Fa. Sarstedt
- sterile Rundboden Röhrchen, Fa. Greiner
- Qia Shredder, Fa. Qiagen
- Röntgenfilme: Kodak X-OMATTM, AR
- Standardprospekthülle, Fa. Esselt

2.8.4 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)
- 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
- Blood and cell culture DNA mini Kit, Fa. Qiagen
- High Prime Kit, Fa. Roche
- First Strand cDNA Synthese Kit, Fa. Roche

2.8.5 Geräte

- ABI PRISM TM 310 Genetic Analyzer, Fa. Applied Biosystems
- Auto-Spot Robot ASP222, Fa. Abimed
- Beston Dickinson FACS Calibur, Fa. Becton Dickinson
- Crosslinker, Fa. Stratagene
- Entwickler: Agfa Curix 60
- Feinwaage AG245 Mettler, Fa. Toledo
- Folienschweißgerät, Fa. Severin



-
- Glaspipetten, 1,2,5,10,20 ml mit Pipettierhilfe, Fa. Biorad
 - Hybridisierungssofen, Fa. Bachhofer
 - 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. Bio Rad
 - Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell, Fa. Bio Rad
 - Magnetrührer MR 3002, Fa. Heidolph
 - PCR Maschine, Fa. MJ Research
 - pH Meter 220, Fa. Metzler-Toledo
 - Pipetten: Fa. Eppendorf, Gilson
 - PowerPac 300 power supply, Fa. Bio Rad
 - Röntgenfilmcassetten, Fa. Dr.Goos
 - großer Schüttler für Platten, Fa. GFX
 - Schüttler für Schalen, Fa. IKA
 - Sonifikator, Fa. Hielscher
 - Thermoblock: Fa. Eppendorf
 - Transilluminator mit Photographiervorrichtung, Fa. Biorad
 - Überkopffrotor, Fa. Snijders
 - Ultrathurax, Fa. Labortechnik
 - Waage, Fa. Sartorius

3 Ergebnisse

3.1 Bekannte Antigene als Tumormarker

Um die Expression von bekannten-Antigenen in Haut-Neoplasien zu untersuchen wurden eine Reihe CT-Antigene (MAGE-A, MAGE-B, LAGE / NY-ESO, GAGE, SCP-1 und SSX-2) und Differenzierungsantigene (RAGE) mittels RT-PCR-, Northern-Blot- und SEREX-Analysen untersucht. Ferner wurde die Expression von Antigenen in kutanen T-Zell Lymphomen (CTCL) untersucht, die als Antigene bereits im Zusammenhang mit lymphoproliferativen Erkrankungen bekannt sind.

3.1.1 CT-Antigene beim CTCL

Beim kutanen T-Zell Lymphom (CTCL) ist die Expression von CT-Antigene bislang nicht untersucht worden. Mittels RT-PCR-, Northern-Blot- und SEREX-Analysen konnte der Wert der CT-Antigene für das CTCL evaluiert werden.

Anhand Tabelle 3-1 ist erkennbar, dass cTAGE-1 und die GAGE-3,4,5,6,7b Gruppe jeweils zu 46% in CTCL Tumoren zu finden sind. Dagegen sind LAGE-1a, LAGE-1b, NY-ESO-1 und die MAGE-A Gene zu 33-17% etwas schwächer exprimiert. Die Subspezifizierung der MAGE-A Gene konnte weder MAGE-A1, -A2 oder -A3 nachweisen. Dagegen konnten MAGE-A9 Transkripte in 27% (4/15) der getesteten CTCL Tumoren gefunden werden. Während MAGE-B, RAGE-1, -2, -3, -4, GAGE-1 und GAGE 1,2,8 in keinem getesteten CTCL Tumor zu finden war, konnte SCP-1 in einer MF Läsion nachgewiesen werden.

Anhand der Northern-Blot Analyse (nicht gezeigt) konnten die GAGE Expression schwach, aber deutlich in allen vier CTCL Zelllinien, die LAGE-1 und die MAGE-A Expression in SeAx bestätigt werden.

Tabelle 3-1: CT-Antigene in CTCL Tumoren

	LAGE-1a	LAGE-1b	NY-ESO-1	cTAGE-1 ⁶	MAGE-A ⁷	MAGE-A9	GAGE-3,4,5,6,7b
MF ¹ [pos/n]	5/15	5/15	4/14	5/15	3/15	2/11	6/15
SS ² [pos/n]	1/3	0/3	0/3	1/3	0/3	2/2	0/3
TZL ³	+	+	-	+	-	-	-
CD30L ⁴	-	-	-	-	-	-	+
HH ⁵	-	+	-	+	-	-	+
HuT 78 ⁵	-	-	-	+	-	-	+
MyLa ⁵	-	-	-	+	-	-	+
SeAx ⁵	+	+	-	+	+	-	+
total CTCL	8/24	8/24	4/23	11/24	4/24	4/19	11/24
	33%	33%	18%	46%	17%	21%	46%
Entzündliche Hautkrankheiten ⁶	0/7	0/7	0/7	1/7	0/7	n.g.	0/7

Die Tabelle zeigt die Expression der CT-Antigene in CTCL Tumoren, ¹: MF steht für Mycosis Fungoides, ²: SS für Sezary Syndrome, ³: TZL für T-Zonen Lymphom und ⁴: CD30L für CD30 positives T-Zell Lymphom, alles verschiedene CTCL Tumore. Die entzündlichen Hautkrankheiten enthielten 4 Ekzeme, 2 Exantheme und 1 Parapsoriasis en plaque. ⁽⁶⁾: wie in [97, 98] mit zusätzlich getesteten cDNAs ⁽⁷⁾: MAGE-A Expression steht für 8 mögliche MAGE-A mRNAs. Das Kürzel n.g. steht für nicht getestet.

Reaktive Antikörper gegen CT-Antigenen in CTCL-Patienten

Um die immunologische Bedeutung der Tumorantigene abzuschätzen, wurden MAGE-A, LAGE-1a und GAGE mittels einer SEREX Analyse überprüft. Dazu wurde eine Abwandlung der SEREX Methode entwickelt, um nach homologen Klonen in einer Phagen-Bank zu suchen (HYREX für DNA Hybridization analysis of recombinantly expressed cDNA phage libraries, [187]). Man benutzt Digoxigenin markierte DNA Sonden, um in einer Phagen Bank Gene zu identifizieren, die man in einem sekundärem Screening gemäß des SEREX Protokolls nach reaktiven Antikörpern testen kann.

Durch Screening von $1,8 \times 10^5$ Rekombinanten konnten mit einer CHO8/9 MAGE-A spezifischen Sonde 41 positive Klone gepickt werden. 15 wurden bis zur Monoklonalität weiter analysiert und entsprachen 6 verschiedenen MAGE-A Genen (MAGE-A1, -A3, -A4b, -A6, -A9 und -A12).

Die gleiche Anzahl an Rekombinanten wurde mit einer LAGE und GAGE spezifischen Sonde durchsucht. Während LAGE-1a in voller Länge isoliert werden konnte, wurde eine deletierte Version der GAGE Familie isoliert. Dieser GAGE Variante war in der Proteinsequenz am N-terminalen Ende um 23 Aminosäuren deletiert. Im fehlenden Proteinbereich liegen die Unterschiede der GAGE-1,2,8 und GAGE-3,4,5,6,7b Proteine, so dass der isoliert GAGE-Phage alle bekannten GAGE-Proteine beinhaltet und als GAGEt (=für truncated) bezeichnet wurde.

In einer SEREX Analyse konnte die Existenz reaktiver Antikörper aus CTCL Seren gegen die Proteine MAGE-A1, -A3, -A4b, -A6, -A9, -A12, LAGE-1a und GAGEt untersucht werden (siehe Tabelle 3-2).

Tabelle 3-2: SEREX Analyse von CT-Antigenen mit CTCL Seren

Seren	cTAGE-1 ⁽¹⁾	LAGE-1a	GAGEt	MAGE-A1	MAGE-A3	MAGE-A6	MAGE-A9
MF	7/22	0/16	2/16	1/15	1/15	1/15	3/15
SS	3/7	0/3	1/3	0/3	0/3	1/3	1/3
gesamt	10/29	0/19	3/19	1/18	1/18	2/18	4/18
	34%	0%	16%	6%	6%	11%	22%

Die Tabelle zeigt die Reaktivität von CTCL assoziierten Seren (Mycosis Fungoides (MF) oder Sezary Syndrom (SS) Seren) gegen rekombinant exprimierte CT-Antigene. MAGE-A4b und MAGE-A12 waren gegen alle Seren negativ. GAGEt ist eine 5' verkürzte Version der GAGE-Proteine ⁽¹⁾ wie in [97, 98] beschrieben mit zusätzlich getesteten Seren.

Während gegen MAGE-A4b, MAGE-A12 und LAGE-1a keine Antikörper identifiziert werden konnten, wurden die MAGE-A1, -A2, -A3, -A9 und GAGE Proteine durch CTCL Patienten erkannt. Am stärksten war die immunogene Erkennung der Proteine MAGE-A9 (22%) und GAGEt (16%). Ein CTCL-Patient reagierte besonders stark gegen MAGE-A Proteine, er besaß Antikörper gegen MAGE-A1, -A3, -A6 und A9 Proteine. Dies könnte auch an Kreuzreaktivitäten liegen.

3.1.2 Expression bekannter Lymphozyten-assoziiierter Antigene in kutanen T-Zell Lymphomen

In der Literatur sind Antigene beschrieben, die in lymphoproliferativen Geweben, wie Leukämien oder B-Zell Lymphomen, stark exprimiert werden [182-184]. Diese Antigene MUC-1, WT-1 und PRAME wurden auf ihre mögliche Expression in CTCL Geweben und Normalgeweben untersucht.

Tabelle 3-3: MUC-1, WT-1 und PRAME RT-PCR Expression

	Normalgewebe	CTCL ^{1,2}	CBCL ¹	Leukämien ²
MUC-1	12 / 20 60 %	8 / 18 44 %	0 / 3 0 %	2 / 5 40 %
WT-1	5 / 15 33 %	1 / 20 5 %	0 / 3 0 %	2 / 6 33 %
PRAME	n.g.	2 / 10 20%	0 / 2 0%	n.g.

Die Tabelle zeigt die RT-PCR Expression der Antigene MUC-1 und WT-1 in Normalgeweben und in verschiedenen Lymphozyten assoziierte Tumoren. Das Kürzel n.g. steht für nicht getestet. Es wurden ¹Tumore und ²Zelllinien getestet.

Tabelle 3-3 zeigt, dass die mRNAs von PRAME und WT-1 in CTCL Tumoren im Gegensatz zu anderen lymphoproliferativen Neoplasien nur selten exprimiert sind. MUC-1 ist dagegen ähnlich häufig wie bei den Leukämien zu 44% in CTCLs vorhanden. Die Expression von MUC-1 und WT-1 in Normalgeweben bestätigen die Literaturdaten.

Das Cancer Genome Anatomy Project des National Institute of Health (<http://cgap.nci.nih.gov/Genes/GeneFinder>) bietet auf der Homepage ein Programm an, das die Expression eines Gens über einen „Virtuellen Northern“ überprüft. Dazu werden Gene-Cluster zu einer Konsensus Sequenz zusammengefügt. Diese Konsensus Sequenz wird in einer sekundären BlastN Suche mit allen bekannten ESTs verglichen und somit eine Expressionsanalyse durchgeführt. MUC-1 zeigt im Virtuellen Northern eine Expression in Normalgeweben an, die per RT-PCR bestätigt werden konnten. Jedoch sind signifikant mehr MUC-1 Transkripte in Tumoren als in Normalgeweben zu finden, d.h. MUC-1 ist in Karzinomen überexprimiert. Die Frequenz an detektierten MUC-1 Transkripten in CTCL-Tumoren scheint diese Beobachtung zu bestätigen (siehe Tabelle 3-3). In Normalgewebe der

Haut und in PMNC konnten keine MUC-1 mRNAs gefunden werden, dagegen war die MUC-1 Expression in CTCL-Tumoren häufig zu beobachten. PRAME und WT-1 sind per Virtuellem Northern-Blot in sehr wenigen Normalgeweben zu finden (nur immunprivilegierte Organe wie Testis). Dies konnte für WT-1 per RT-PCR nicht bestätigt werden, da WT-1 Expression in anderen Normalgeweben beobachtet werden konnte. Allerdings ist die Expression von PRAME und WT-1 in Tumoren (Virtueller Northern) und in CTCL Geweben (siehe Tabelle 3-3) ebenfalls sehr begrenzt.

3.2 *cTAGE: CTCL assoziierte Antigenfamilie mit tumorspezifischem Splicing*

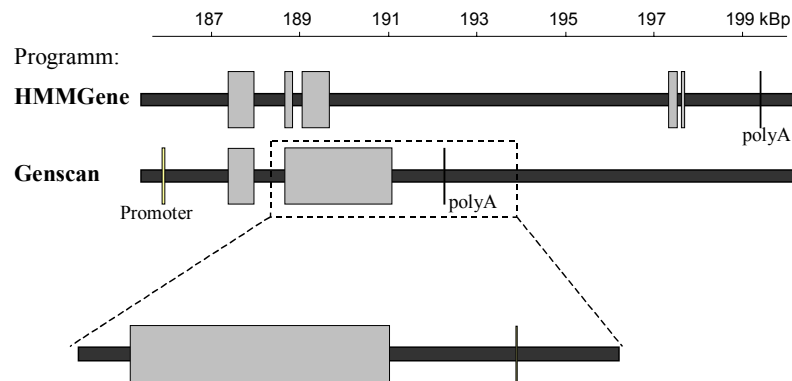
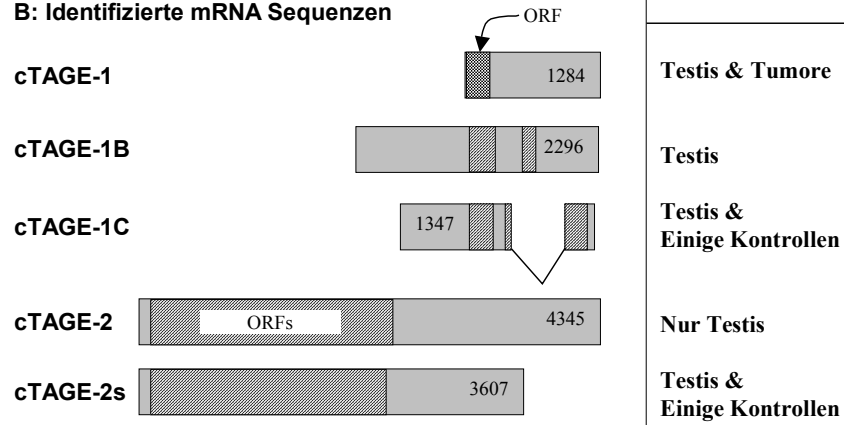
Nach eigenen Voruntersuchungen war cTAGE-1 das bislang einzige tumorspezifische Antigen für das CTCL. Genaue Analysen zeigten, dass cTAGE-1 zu einem größeren Gen / Genfamilie gehören muss, was durch die Northern-Blot Analysen vermutet werden konnte. [97, 98].

3.2.1 cTAGE-1 / cTAGE-2 Splicing aus Chromosom 18p11.2

Eine 5' RACE-PCR konnte cTAGE-1 in 5' Richtung auf insgesamt 4,4 kB verlängern, während ein 3'RACE das Poly A Ende von cTAGE-1 bestätigen konnte. Dieses neue Gen, cTAGE-2 benannt, besitzt im Gegensatz zu cTAGE-1 einen klar definierten ORF von 113-2377 bp, was für ein 574 AS (86 kDa) großes Protein codiert. cTAGE-2 ist zu zwei in einer Meningiom SEREX-Untersuchung definierten Antigenen, MEGA-6 und MEGA-11, homolog. Ferner konnten zu cTAGE-1 zwei homologe ESTs (Accession Nummern: AA399523, AA868597) aus Testis cDNA Banken gefunden werden. Diese waren im Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung (RZPD) erhältlich. Auf Grund der hohen Homologie zu cTAGE-1 wurden die vollständigen Sequenzen dieser ESTs zu cTAGE-1B und cTAGE-1C umbenannt.

Alle cTAGE-1/ 2 Gene sind auf Chromosom 18p11.2 lokalisiert. Mit Ausnahme von cTAGE-1C (Bp Nr: 3490 – 3987 relativ zu cTAGE-2) sind alle mRNAs ohne Intron auf dem Chromosom lokalisiert. Erkennbar an Abbildung 3-1 ist die Exon / Intron Struktur von Chromosom 18p11.2, die genaue Lokalisation der cTAGE-1 / 2 mRNAs, sowie die CDS⁸-Vorhersagen durch die Computerprogramme HMMGene und Genscan. Das Program Genscan findet exakt die CDS von cTAGE-2 und eine Poly-A Sequenz in cTAGE-1. Das Programm HMMGene findet andere Splicing Muster auf dieser chromosomalen Sequenz. Dies und die vielen unterschiedlichen mRNAs der chromosomalen Region 18p11-2 deuten darauf hin, dass hier eine Region identifiziert wurde, in der unterschiedliches Splicing stattfindet.

⁸ Protein kodierender Abschnitt

Abbildung 3-1: Organisation auf Chromosom 18p11-2
A: CDS Vorhersage auf Chromosom 18p11.2

B: Identifizierte mRNA Sequenzen


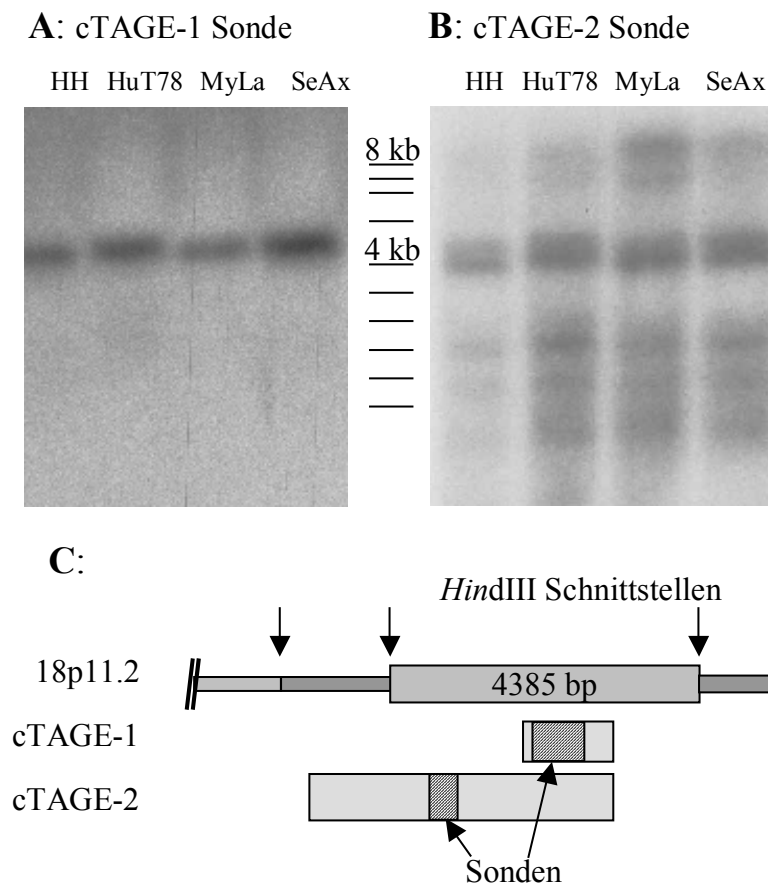
I	+	+	-	+	-	-
II	-	+	+	+	+	-
III	-	-	-	+	+	+
erkennt	cTAGE-1	cTAGE-1B ⁽¹⁾	cTAGE-1C	cTAGE-2 ⁽²⁾	cTAGE-2s ⁽³⁾	-

Abbildung 3-1 zeigt Chromosom 18p11.2 mit vorhergesagten (Computerprogramme: Genscan, HMM-Gene) kodierenden Bereichen. Dazu sind die cTAGE-1, -1B, -1C und cTAGE-2, -2s mRNAs aufgeführt. Aus dieser intronlosen chromosomalen Region werden mindestens 5 verschiedene mRNAs gespliced. Durch Kombination der PCR Ergebnisse der Primer Paare I+II und III kann ein spezifisches Expressionsmuster für die cTAGE-1/2 Splicing Varianten ermittelt werden. Alle Klone konnten aus Testis Gewebe isoliert werden. ⁽¹⁾: positive cTAGE-1B Ergebnisse können alternativ auch eine cTAGE-1 und cTAGE-1C Koexpression sein. ⁽²⁾: cTAGE-2 wurde nur in der Testis gefunden. ⁽³⁾: cTAGE-2s kann auch cTAGE-1C Expression enthalten.

Drei verschiedene Primer Paare wurden zur Expressionsanalyse der cTAGE-1/2 Gene (siehe Abbildung 3-1) synthetisiert. Durch Kombination der Ergebnisse konnte das spezifische Expressionsmuster der cTAGE-1/2 mRNAs herausgefunden werden. Für cTAGE-1 (Primerpaar I) konnte ein Tumor- / Testis-spezifisches Expressionsmuster gewonnen werden, während das cTAGE-2 spezifische Primer-Paar II (siehe Abbildung 3-1) in Normalgeweben, aber nicht in Tumorgeweben zu finden war (siehe Tabelle 3-7). So ist die mittels RACE-PCR detektierte mRNA cTAGE-2 anscheinend nur in Testis-Geweben exprimiert. Demzufolge muß eine kürzere Version cTAGE-2s (siehe Abbildung 3-1) existieren. Dies konnte mit einer zusätzlichen RACE Verlängerung aus cTAGE-2 in cTAGE-1 / 3' Richtung neben dem cTAGE-2 Ende bestätigt werden. Die unterschiedlichen Expressionsmuster zwischen cTAGE-1 und cTAGE-2 bestätigen, dass cTAGE-1 ein tumorspezifisches Splicing-Produkt aus Chromosom 18p11-2 ist.

3.2.2 Identifikation der cTAGE-Familie

Die Hybridisierung einer *Hind*III restringierten genomischen DNA mit einer cTAGE-2 und einer cTAGE-1 spezifischen Probe ergab für cTAGE-2 ein Bandenmuster (siehe Abbildung 3-2), was bedeuten könnte, dass es sich um eine Gruppe von Genen mit weiteren Mitgliedern handelt. Dagegen zeigt eine Hybridisierung mit einer cTAGE-1 Sonde eine einzelne klare Bande, also eine konservierte Größe von cTAGE-1 im Genom. Da cTAGE-1 laut BlastN2 nur auf Chromosom 18p11-2 zu finden ist (siehe Abbildung 3-2), ist cTAGE-1 nur einmal im Genom lokalisiert.

Abbildung 3-2: genomischer Southern-Blot mit cTAGE-1 und cTAGE-2 als Sonde


Die Abbildung zeigt einen genomischen Southern-Blot mit cTAGE-1 (A) und cTAGE-2 (B) als Sonde. (C) zeigt die chromosomale Organisation auf Chromosom 18p11-2 nach einer *Hind*III Restriktion.

Um weitere Mitglieder der cTAGE-Familie zu identifizieren und zu isolieren wurde die HYREX Methode angewandt, die als eine Abwandlung der SEREX-Methode eine Digoxigenin-markierte DNA-Sonde anstelle der Antikörper verwendet. Als Sonde wurden PCR-Produkte an cTAGE-1 und cTAGE-2 Plasmiden sowie RT-PCR Proben, die auch für MGEA-6 und MGEA-11 spezifisch sind, verwandt. So konnten nach Suche in $1,2 \cdot 10^5$ Rekombinanten neben cTAGE-1 vier weitere cTAGE-Familienmitglieder identifiziert werden. Diese wurden cTAGE-3, cTAGE-4, cTAGE-5A und cTAGE-5B genannt (siehe Tabelle 3-4, Abbildung 3-6).

Tabelle 3-4: Homologie der cTAGE-Familie

	cTAGE-2	cTAGE-3	cTAGE-4	cTAGE-5A	cTAGE-5B	cTAGE-5C / MGEA-6	cTAGE-5D / MGEA-11⁽¹⁾
	4345 bp	2277 bp	1967 bp	2778 bp	4110 bp	3676 bp	2814 bp
cTAGE-2 755 As		91.8 % 2299 bp	89.6 % 1957 bp	93.4 % 2512 bp	93.4 % 2266 bp	92.9 % 2826 bp	93.1 % 2826 bp ¹⁾
cTAGE-3 193 As	82.3 % 188 aa		88.9 % 1962 bp	92.7 % 2037 bp	92.8 % 1706 bp	92.4 % 2272 bp	92.7 % 2344 bp ¹⁾
cTAGE-4 437 As	77.2 % 433 aa	74.2% 189 aa		92.7 % 1974 bp	92.5 % 1632 bp	92.5 % 1958 bp	92.6 % 1958 bp ¹⁾
cTAGE-5A 776 As	87.8 % 756 aa	84.4 % 189 aa	83.6 % 433 aa		99.9 % 2186 bp	99.5 % 2512 bp	99.9 % 2517 bp ¹⁾
cTAGE-5B 772 As	88.6 % 720 aa	84.4 % 189 aa	83.8 % 433 aa	98.6 % 731 aa		99.6 % 2462 bp	99.9 % 2294 bp ¹⁾
CTAGE-5C / MGEA-6 804 As	87.4 % 756 aa	83.9 % 189 aa	82.2 % 433 aa	98.7 % 775 aa	98.0 % 760 aa		99.7 % 2891 bp ¹⁾
cTAGE-5D / MGEA-11 776 As	88.8% 756 aa	79.0 % 149 aa	84.3 % 433 aa	99.6 % 775 aa	98.6 % 760 aa	99.2 % 804 aa	

Die Tabelle fasst die Homologie zwischen den Nukleotid-Sequenzen (obere rechte Hälfte) und die abgeleiteten Proteinen (untere linke Hälfte) zusammen. Sequenzlänge der cTAGE-Familie und Homologe innerhalb der überlappenden Region stehen in der unteren Zeile (bp: Basen Paare; Aa: Aminosäuren), Ergebnisse erhalten durch das GCG-Programm bestfit. Die Größen der Gene sind in den Randspalten festgehalten. Unterschiede in den 5' und 3' Regionen sind in der Tabelle nicht enthalten. cTAGE-3 besitzt 2 kodierende Leserahmen

ähnlicher Größe, wobei das zweite abgeleitete Protein zum Homologievergleich herangezogen wurde. ¹⁾ MGEA-11 besitzt ein 129 bp große Lücke, die sich in den Prozentsätzen der Homologie nicht wiederfindet. cTAGE-1 und , -1B und -1C sind Splicing Produkte aus dem 3' Bereich von cTAGE-2 und den anderen cTAGE-Familien Mitgliedern nicht homolog.

Eine genaue Analyse der Nukleotid-Sequenzen und der Aminosäure Sequenzen der cTAGE-mRNAs / Peptide ergab, dass cTAGE-1 mit keinem der neu identifizierten cTAGE Mitglieder eine Homologie aufwies. cTAGE-2, cTAGE-3, cTAGE-4, cTAGE-5A und cTAGE-5B waren alle in einem überlappenden Bereich um den kodierenden Bereich sehr ähnlich, nur in den 5' / N-terminalen und 3' / C-terminalen Enden ergaben sich große Unterschiede in den Sequenzen. Die Tabelle 3-4 zeigt die Homologien der cTAGE-Familien Mitgliedern im überlappenden Bereich.

Der 3'RACE aus cTAGE-2 (siehe Kapitel 3.2 cTAGE-1 / cTAGE-2 Splicing aus Chromosom 18p11.2) wurde so gewählt, dass der Primer in einem Konsensus Bereich liegt, der für alle cTAGE-Familien-Mitglieder identisch ist. So konnten mit dieser RACE-Verlängerung verschiedene 3' Enden der cTAGE Familie bestätigt werden. Neben den beschriebenen Enden von cTAGE-1 und cTAGE-2s konnten die 3' Enden von cTAGE-4 und von cTAGE-5C / MGEA-11 sequenziert und damit bestätigt werden.

3.2.3 Chromosomale Lokalisation

Neben der beschriebenen Lokalisation auf Chromosom 18p11-2 sind die anderen cTAGE-Familien Mitglieder auf anderen Chromosomen verteilt (siehe

Tabelle 3-5). Da cTAGE-5A, cTAGE-5B und MGEA-6, MGEA-11 sich von der gleichen Region auf Chromosom 14 ableiten, stammen alle von einem Gen ab und wurden deshalb cTAGE-5A, cTAGE-5B, cTAGE-5C / MGEA-6 und cTAGE-5D / MGEA-11 benannt.

Tabelle 3-5: Chromosomale Lokalisation der cTAGE mRNAs

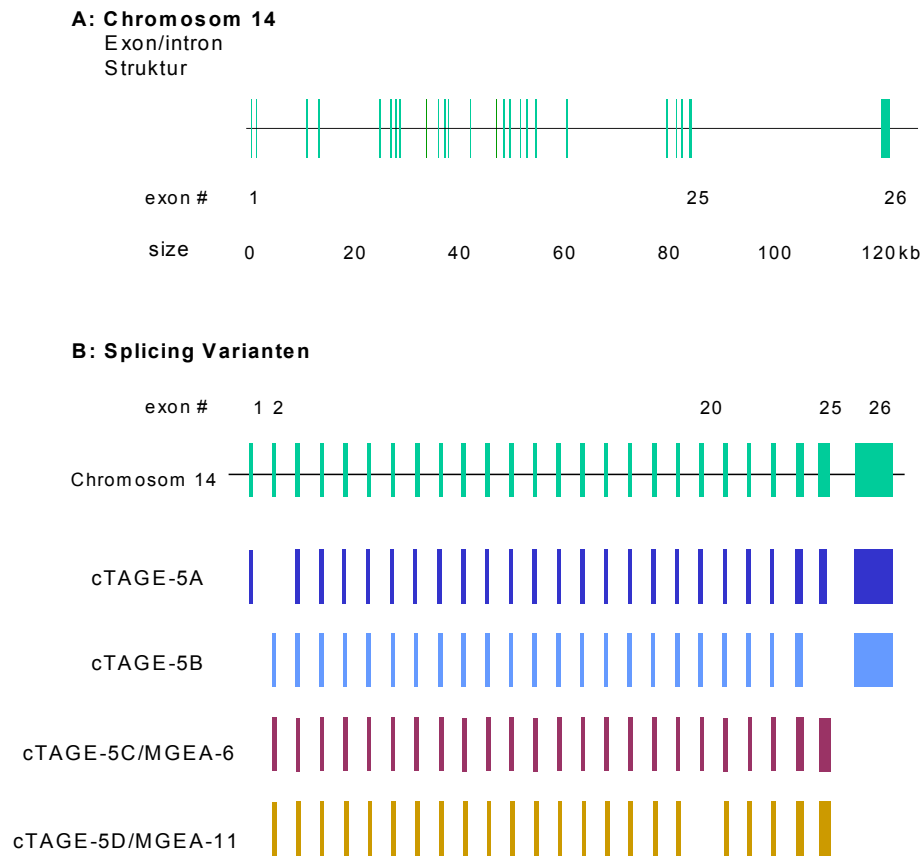
	mRNA [bp]	Chromosomale Lokalisation ⁽¹⁾
cTAGE-1	1284	18p11.2 (100%)
cTAGE-1B	2296	18p11.2 (100%)
cTAGE-1C	1347	18p11.2 (100%)
cTAGE-2s	3607	18p11.2 (100%)
cTAGE-2	4345	18p11.2 (99.6%)
cTAGE-3	2277	13 (98.8%)
cTAGE-4	1967	7 ⁽¹⁾ (99.7%)
cTAGE-5A	2778	14 (99.9%)
cTAGE-5B	4110	14 (99.9%)
cTAGE-5C / MGEA-6	3676	14 (99.9%)
cTAGE-5D / MGEA-11	2814	14 (99.9%)

Die Tabelle gibt die Größen der identifizierten mRNAs und deren chromosomale Lokalisation an. ⁽¹⁾: cTAGE-4 kann drei (6, 7q und 7) chromosomalen Sequenzen zugeordnet werden. cTAGE-1, -1B, -1C und cTAGE-2, -2s bilden ein Gen auf Chromosom 18p11-2, während cTAGE-5A, cTAGE-5B, cTAGE-5C / MGEA-6 und cTAGE-5D / MGEA-11 durch alternatives Splicing aus Chromosom 14 stammen.

Die genaue Exon / Intron Struktur der cTAGE-5 mRNAs auf Chromosom 14 ist in Abbildung 3-3 dargestellt. Die Unterschiede in der Sequenz sind durch alternatives Splicing entstanden. Während cTAGE-5A Exon 1 besitzt, fehlt im Gegensatz zu den anderen Splicing-Produkten Exon 2. cTAGE-5B fehlen die Exons 1 und 25, cTAGE-5C / MGEA-6 das erste und das letzte Exon, während bei cTAGE-5D / MGEA-11 die Exon 1, 20 und 26 deletiert sind.

Im Gegensatz zu cTAGE-5 sind cTAGE-3 (Chromosom 13), cTAGE-4 (Chromosom 6, 7q oder 7), wie auch cTAGE-2 in einem Exon auf dem jeweiligen Chromosom lokalisiert. Diese Eigenschaften können auf Retrotransposition von cTAGE-5 beruhen.

Abbildung 3-3: Exon / Intron Struktur eines Abschnittes aus Chromosom 14



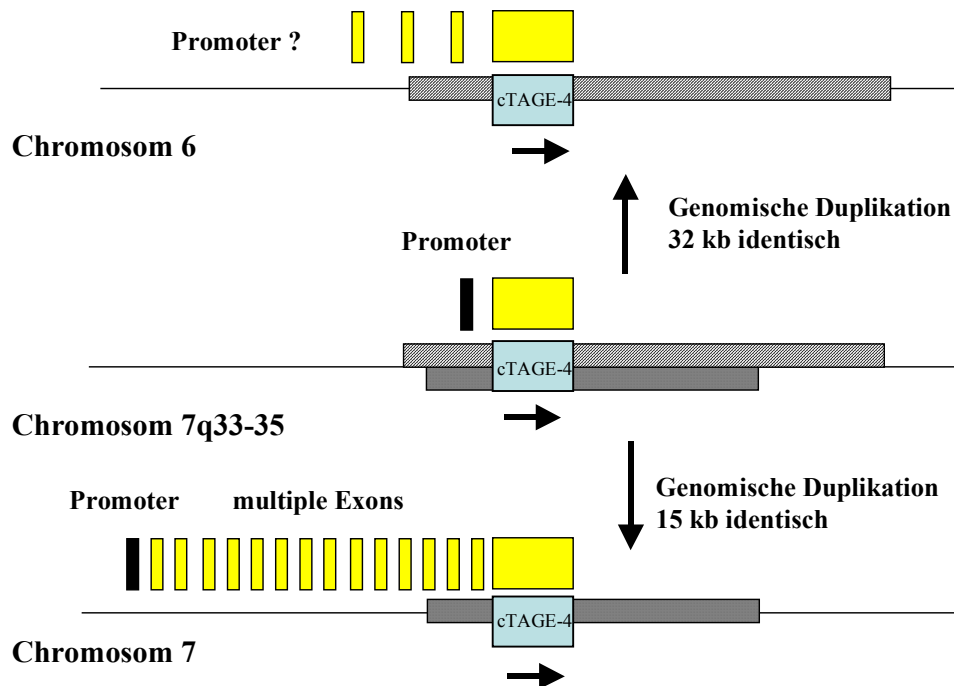
Diese Abbildung zeigt ein graphisches Alignment der cTAGE-5 Splicing Varianten in Chromosom 14. (A) zeigt die verhältnismäßige Lokalisation der Exons auf Chromosom 14. (B) zeigt die aus alternativem Splicing entstandenen mRNAs.

cTAGE-2 / -2s passt zu 99,6% auf die chromosomale Region 18p11-2 (1 Punktdeletion und 11 Basensubstitutionen). Für cTAGE-2 / -2s konnte direkt 2797bp upstream eine Promoter-Sequenz gefunden werden. cTAGE-3 konnte auf Chromosom 13 (Acc.Nr.: AL138821) mit 98,8% Homologie (6 Punktdeletionen) zugeordnet werden. Ein Promoter für cTAGE-3 ist 10kb upstream, sowie ein zusätzliche vorhergesagtes Exon, das in der cTAGE-3 mRNA fehlt.

cTAGE-4 konnte 3 verschiedenen Chromosomen zugeordnet werden (siehe Abbildung 3-4). Chromosom 7 (Acc.Nr.: AC074386) passt zu 99,7% (3 Punktdeletionen und 1 Basensubstitution). Das vorhergesagte Gen besteht aus 15 Exons und einem Promoter. Das größte finale 3' Exon entspricht cTAGE-4. Die Sequenz auf Chromosom 7q33-35 (Acc.Nr.: 005587) besitzt eine Homologie von 99,2% (4 Punktdeletionen und 11 Basensubstitutionen)

und wird als einziges Exon mit einer 3984 bp upstream gelegenen Promotersequenz vorhergesagt. Die cTAGE-4 homologe Sequenz des Chromosoms 6 (AL135904) mit 99,3% Homologie (4 Punktdeletionen und 9 Basensubstitutionen) ist ebenfalls ein terminales Exon eines multipel gespligten Gens. Die 5' folgende chromosomale Sequenz inklusive der internalen Exons und des Promoters sind zur Zeit noch nicht verfügbar.

Abbildung 3-4: Chromosomale Lokalisation von cTAGE-4



Die Abbildung zeigt die chromosomale Organisation der cTAGE-4 homologen Sequenzen.

Erkennbar an Abbildung 3-4 ist, dass auf Chromosom 6, 7 und 7q33-35 große Sequenz-Abschnitte von 32kb / 15kb homolog sind. In diesem Fall müssen große genomische Duplikationen aus Chromosom 7q33-35 auf Chromosom 7 und Chromosom 6 stattgefunden haben. Deshalb entstehen neue Fusionsgene auf Chromosom 6 und 7, in denen cTAGE-4 nur den finalen Teil eines anderen, neuen Proteins bildet.

Chromosom 18p11-2 mit cTAGE-1/2 nimmt eine Sonderstellung ein. Die alternativen Splicingformen aus Chromosom 18p11-2 cTAGE-1B, cTAGE-1C und cTAGE-1 sind nur zu einem sehr geringen (weniger als 100 bp) Teil (cTAGE-1B,-1C) oder gar nicht (cTAGE-1) zu

den anderen cTAGE mRNAs homolog. Der Promoter scheint cTAGE-2 wie auch die anderen Splicing Formen zu beeinflussen.

Des Weiteren sind zu cTAGE / MGEA homologe Sequenzen auf verschiedenen Chromosomen zu finden. Meese konnte durch Computeranalysen für MGEA-6 9 verschiedene Pseudogene (φ 1-9) identifizieren [189]. Diese homologen Sequenzen liegen auf Chromosom 2q (Acc. Nr.: AC017070), 3q (Acc. Nr.: AC076959), 6q (Acc. Nr.: AC022371), 7q (siehe cTAGE-4), 9 (Acc. Nr.: AL355585), 10 (Acc. Nr.: AL139123), 12 (Acc. Nr.: AC068994), 13q (Acc. Nr.: AL136123) und 18p11-2 (siehe cTAGE-2). Meese und Mitarbeiter konnten zu allen Pseudogenen 5' und 3' flankierende repetitive Sequenzen, wie LINE / L1, SINE / ALU oder AT reiche Regionen finden [189]. Da eine ALU / SINE- oder L1 / LINE- Transposition i.d.R. einen Funktions-Verlust nach sich zieht, ist die herrschende Meinung, dass diese Sequenzen vorrangig nur in oder um „Non-sense“ Gene, wie in Pseudogenen persistieren können [190, 191]. So sind ALU / LINE Sequenzen gute Marker für ein Pseudogen. Weiter ist beschrieben, dass AT reiche Sequenzen in und um Insertionstellen eines retrotransponierten Elementes zu beobachten sind [192].

Eine genauere Analyse der cTAGE-chromosomalen Sequenzen zeigt, dass cTAGE-2 1607 bp upstream (zwischen Promoter und cTAGE-2) und 2797 bp downstream von SINE / ALU Sequenzen flankiert ist. Für die weiteren cTAGE-Sequenzen auf Chromosom 6, 7, 7q und Chromosom 13 konnten keine flankierenden repetitiven ALU Sequenzen gefunden werden. So sind die chromosomalen Sequenzen von cTAGE-3 und cTAGE-4 (Chr. 6, 7, 13) auf Grund fehlender Eigenschaften nicht als Pseudogene zu beschreiben, während für Chromosom 18p11-2 (cTAGE-2, -2s) und für Chromosom 7q33-35 (cTAGE-4) per Computeranalyse typische Strukturen von Pseudogenen gefunden werden konnten.

Die Pseudogen-Sequenzen (φ 1-9) wurden mit den chromosomalen Sequenzen der cTAGE-Gene verglichen. Dies ergab i.d.R. eine Homologie von weniger als 90% über einen unterschiedlich großen überlappenden Sequenzbereich. Dies kann durch unvollständige Retrotransposition erklärt werden. Die zueinander hoch homologen (ca. 99%) Pseudogen-Sequenzen der Chromosomen 3p, 2q und 12 sind im überlappenden Bereich (2300 bp) zu cTAGE-4 hoch homolog (>99%).

Da cTAGE-2, -2s, -3 und -4 als mRNAs isoliert werden konnten, deutet dies darauf hin, dass die cTAGE-Mitglieder durch Retrotransposition von cTAGE-5 mRNA vor Promoter

Sequenzen entstanden sind. Weitere cTAGE-4 Sequenzen sind durch genomische Duplikation entstanden. Andere retrotransponierte Sequenzen sind allem Anschein nach nicht aktiv, da diese Sequenzen nicht als mRNA zu finden sind (HYREX-Screen).

Die cTAGE-Genfamilie besteht demnach aus 11 transkribierten Genen und aus 7 Pseudogenen (ϕ 1 auf Chromosom 2, ϕ 2 auf Chromosom 3, ϕ 3 auf Chromosom 6q, ϕ 5 auf Chromosom 9, ϕ 6 auf Chromosom 10, ϕ 7 auf Chromosom 12 und ϕ 8 auf Chromosom 13q).

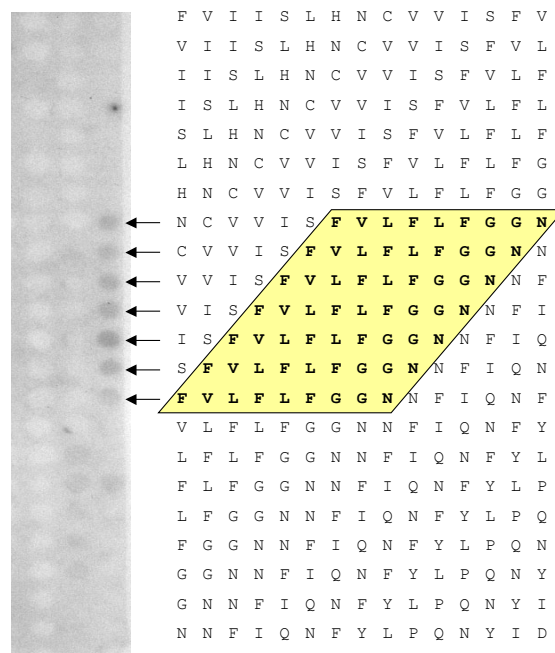
3.2.4 Immunogenität der cTAGE-Familie

Der Vorteil der SEREX Methode gegenüber vergleichenden Expressionsanalysen (Differential Display Methoden) ist, dass die Antikörper-Reaktion ein Protein aufzeigen. Demzufolge muss gegen ein Protein aus cTAGE-1 eine gezielte Antikörper Reaktion stattgefunden haben, obwohl nur einige kurze CDS in der mRNA Sequenz gefunden werden konnten. Um dies zu bestätigen und das immunogene Protein / Epitop aus cTAGE-1 zu bestimmen, wurde ein **Epitope Mapping**-Experiment durchgeführt.

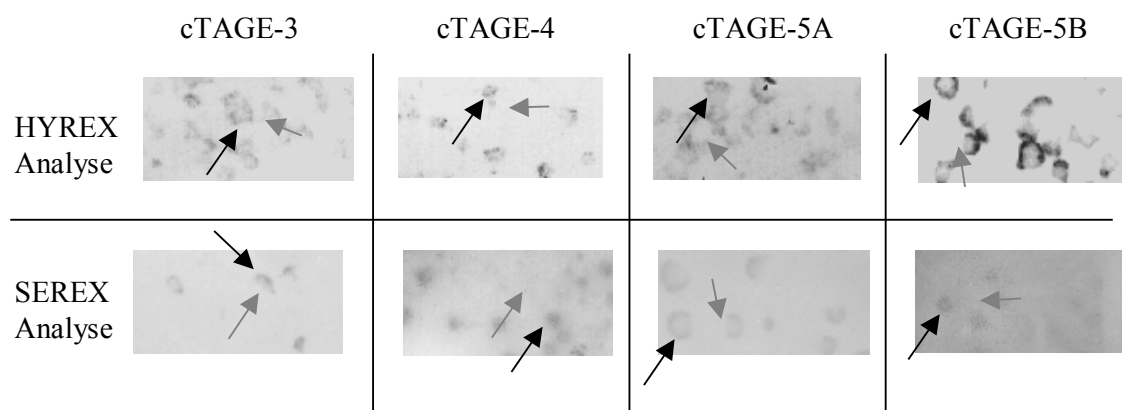
In Abbildung 3-5 ist das immunogene Epitop aus cTAGE-1 erkennbar. Gegen dieses Epitop reagierten zwei CTCL-Patienten und keine gesunden Kontroll Personen (n=12). Das 74 Aminosäure große immunogene Protein aus cTAGE-1 ist im zweiten Leserahmen von Bp Nr. 14 bis Bb Nr. 264 kodiert. Das cTAGE-1 Protein ist 8,4 kDa groß und besitzt einen isoelektrischen Punkt von 5,49.

Eine genaue Sequenz Analyse des Proteins zeigt, dass cTAGE-1 als Protein zwei Membran-Domänen mit einer extrazellulären Domäne von AS Nr. 30 - 43 besitzt. Die Antikörper aus den Tumorpatienten erkannten das Ende der ersten Transmembran-Domäne. Allerdings ist das Protein nach Computeranalysen nukleär / cytoplasmatisch lokalisiert, d.h. dass cTAGE-1 in der Zellkern- oder in einer Vesikel-Membran lokalisiert sein muss.

Die HYREX isolierten cTAGE-Phagen konnten alle in einem sekundären SEREX eingesetzt werden (siehe Abbildung 3-6).

Abbildung 3-5: Epitope Mapping von cTAGE-1


Alle möglichen ORF aus cTAGE-1 wurden in 15meren synthetisiert und mit einem 1 Aminosäuren Raster auf eine Membran gespottet (siehe Material und Methoden). Gekennzeichnet ist das immunogene Epitop gegen das zwei Patienten reaktive Antikörper besaßen, gesunde Kontroll-Personen dagegen nicht. Die in der zweiten Reihe erkennbaren Antikörper Reaktionen waren auch bei Normalpatienten positiv.

Abbildung 3-6: HYREX und SEREX Analyse von cTAGE-Klonen


Die Abbildung zeigt cTAGE-3, cTAGE-4, cTAGE-5A und cTAGE-5B bei der Detektion durch Digoxigenin markierte DNA-Sonden (HYREX-Analyse) und die Sekundär-Analyse mittels SEREX und CTCL Seren (SEREX-Analyse), um eine immunologische Erkennung zu bestimmen. Erkennbar sind neben den deutlichen Anfärbungen positiver Plaques (dunkler Pfeil), auch negative Plaques, die z.T. die positiven Plaques überlappen (heller Pfeil).

Es konnte gegen alle getesteten cTAGE-Proteine reaktive Antikörper nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3-6, Tabelle 3-6). Während gegen cTAGE-3 auch eine gesunde Personen Antikörper besaß, waren cTAGE-1, cTAGE-4, cTAGE-5A und cTAGE-5B serologisch tumorspezifisch.

Tabelle 3-6: SEREX Analyse der cTAGE-Familie

	Seren von CTCL-Patienten	Seren von Melanom-Patienten	Seren gesunder Kontroll Personen
cTAGE-1 ⁽¹⁾	33% (30)	7% (15)	0% (17)
cTAGE-3	11% (18)	0% (15)	10% (10)
cTAGE-4	6% (17)	0% (15)	0% (8)
cTAGE-5A	15% (20)	0% (15)	0% (9)
cTAGE-5B	0% (22)	13% (15)	0% (10)

Die Tabelle zeigt die Antikörper Reaktivität in CTCL- und Melanom-Seren gegen die abgeleiteten cTAGE-Proteine. ⁽¹⁾ wie beschrieben in [97, 98] mit zusätzlichen getesteten Seren.

Das Protein cTAGE-1 wurde von 30% der CTCL-Patienten, dagegen nur von 7% der getesteten Melanom-Seren erkannt. Die Erkennung von cTAGE-4 und cTAGE-5A war sehr viel seltener (6% respektive 15%) und auf das CTCL beschränkt. Gegen cTAGE-5B waren nur in einem Melanom-Serum reaktive Antikörper zu finden (siehe Tabelle 3-6).

3.2.5 Expressionsanalyse der cTAGE-Genfamilie

Alle cTAGE mRNAs wurden per RT-PCR Expressionsanalyse untersucht. Während cTAGE-1C, -2s, -3, -4, -5B, -5C und -5C in 14 - 32% der Normalgewebe zu finden waren (siehe Tabelle 3-7, Tabelle 3-8), konnten cTAGE-1, cTAGE-1B, cTAGE-2 und cTAGE-5A Transkripte in keinem Normalgewebe außer Testis gefunden werden.



	<i>cTAGE-1</i>	<i>cTAGE-1B</i>	<i>cTAGE-1C</i>	<i>cTAGE-2s</i>	<i>cTAGE-2</i>	<i>cTAGE-3</i>	<i>cTAGE-4</i>	<i>cTAGE-5A</i>	<i>cTAGE-5B</i>	<i>cTAGE-5C / MGEA-6</i>	<i>cTAGE-5D / MGEA-II</i>
Prostata	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Skelett-Muskulatur	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+
Testis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Thymus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trachea	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
Positive fetale Gewebe	0%	0%	13%	0%	0%	38%	0%	0%	0%	0%	0%
Positive adulte Gewebe	5%	5%	15%	30%	5%	30%	15%	5%	20%	45%	20%
Total positive	4%	4%	14%	21%	4%	32%	11%	4%	14%	32%	14%

Die Tabelle zeigt die genaue Expressionsanalyse der cTAGE-Gen Familie, + entspricht positiver Expression und - keiner Expression. cTAGE-1, cTAGE-1B, cTAGE-2 und cTAGE-5A sind nur in Testis vorhanden. Alle Ergebnisse setzen sich aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen zusammen.

Interessanterweise konnte für die verschiedenen cTAGE mRNAs nur selten eine Koexpression beobachtet werden (siehe Tabelle 3-7). So ist beispielsweise cTAGE-3 als einzige cTAGE-mRNA häufig in fetalen Geweben zu finden. cTAGE-1C (Lunge, Skelett-Muskulatur und Testis) und cTAGE-4 (Haut und immunprivilegierte Organe Testis und Placenta) zeigen eine sehr limitierte Expression in Normalgeweben und sind daher als Zielstrukturen für eine Immuntherapie weiter interessant, da beide mRNAs deutlich häufiger in Tumoren zu finden waren.

cTAGE-4 kommt trotz immunogener Erkennung des Proteins nicht für das CTCL in Betracht, da auch normale Haut positiv getestet wurde. Dagegen könnte cTAGE-4 für andere Neoplasien, wie z.B. dem Mamma-Karzinom auf Grund der hohen Expression bei negativen Mamma-Normalgewebe, interessant sein (siehe Tabelle 3-9).

Tabelle 3-8 vergleicht die Expression der cTAGE-mRNAs in gesundem Normalgewebe und CTCL-Tumorgewebe. Da cTAGE-1, cTAGE-1B und cTAGE-5A Transkripte außer in Testis

auch in CTCL-Tumoren zu finden waren, können sie daher als neue CT-Antigene beschrieben werden.

Tabelle 3-8: mRNA Expressionsmuster in CTCL Geweben

	Kontrollen	CTCL Gewebe (n)	CTCL Zelllinien (n=4)
cTAGE-1⁽¹⁾	1/28 ⁽²⁾	35% (20)	100%
cTAGE-1B	1/28 ⁽²⁾	0% (9)	100%
cTAGE-1C	4/28	0% (9)	100%
cTAGE-2s	6/28	0% (9)	0%
cTAGE-2	1/28 ⁽²⁾	0% (14)	0%
cTAGE-3	9/28	28% (18)	0%
cTAGE-4	3/28	13% (16)	0%
cTAGE-5A	1/28 ⁽²⁾	29% (14)	100%
cTAGE-5B	4/28	20% (15)	0%
cTAGE-5C / MGEA-6	9/28	10% (10)	25%
cTAGE-5D / MGEA-11	4/28	0% (10)	25%

Die Tabelle zeigt im Vergleich Normalgewebe- zu Tumor-Expression. ⁽¹⁾ siehe [97, 98] mit zusätzlich getesteten Geweben. ⁽²⁾ positives Normalgewebe war Testis. CTCL-Zelllinien: HH, HUT785, MyLa und SeAx.

Die Expression in CTCL Tumoren ergab, dass vor allem cTAGE-1 als Zielstruktur in Betracht kommt, da die mRNA fast zu 50% (inkl. Tumor Zelllinien) in den getesteten CTCL Tumoren vorkommt. Keine bzw. seltene Expression in CTCL-Tumoren ist für cTAGE-2, cTAGE-2s und für cTAGE-5D / MGEA-11 (1/14 CTCL Geweben) zu sehen (siehe Tabelle 3-8). In höherem Maße sind die mRNAs von cTAGE-5A, cTAGE-5B und cTAGE-5C /MGEA-6 in CTCL Tumoren zu finden (siehe Tabelle 3-8, Tabelle 3-9).

Die Expression aller immunologisch spezifischen Tumorantigene der cTAGE-Familie wurde an weiteren cDNAs anderer Neoplasien getestet (siehe Tabelle 3-9). Interessanterweise konnten cTAGE mRNAs in allen Neoplasien gefunden werden. Für jeden Karzinomtyp konnte ein cTAGE gefunden werden, welches eine hohe Expression besaß. So ist für das CTCL vor allem cTAGE-1 (46%), für Kolon-Karzinome cTAGE-5B (60%), für Mamma-Karzinome cTAGE-4 (60%), für ovarielle Karzinome cTAGE-1 (30%), für Hals Nasen Ohren Tumore cTAGE-5B (50%) und für Melanome cTAGE-5A (25%) auf Grund der häufigen Expression interessant (siehe Tabelle 3-9).

Tabelle 3-9: RT-PCR Analyse an Tumor cDNA

	cTAGE-1		cTAGE-4		cTAGE-5A		cTAGE-5B	
	Positiv	(n)	Positiv	(n)	Positiv	(n)	Positiv	(n)
CTCL ^(1, 2)	46%	(24)	10%	(20)	44%	(18)	16%	(19)
Kolon Karzinom ⁽¹⁾	21%	(38)	20%	(10)	20%	(10)	60%	(10)
Ovarielle Karzinome	30%	(63)	0%	(10)	0%	(10)	0%	(10)
Mamma Karzinome	43%	(23)	60%	(10)	20%	(10)	20%	(10)
HNSCC ⁽¹⁾	26%	(34)	30%	(10)	0%	(10)	50%	(10)
Melanome ⁽¹⁾	0%	(29)	20%	(25)	20%	(25)	18%	(17)

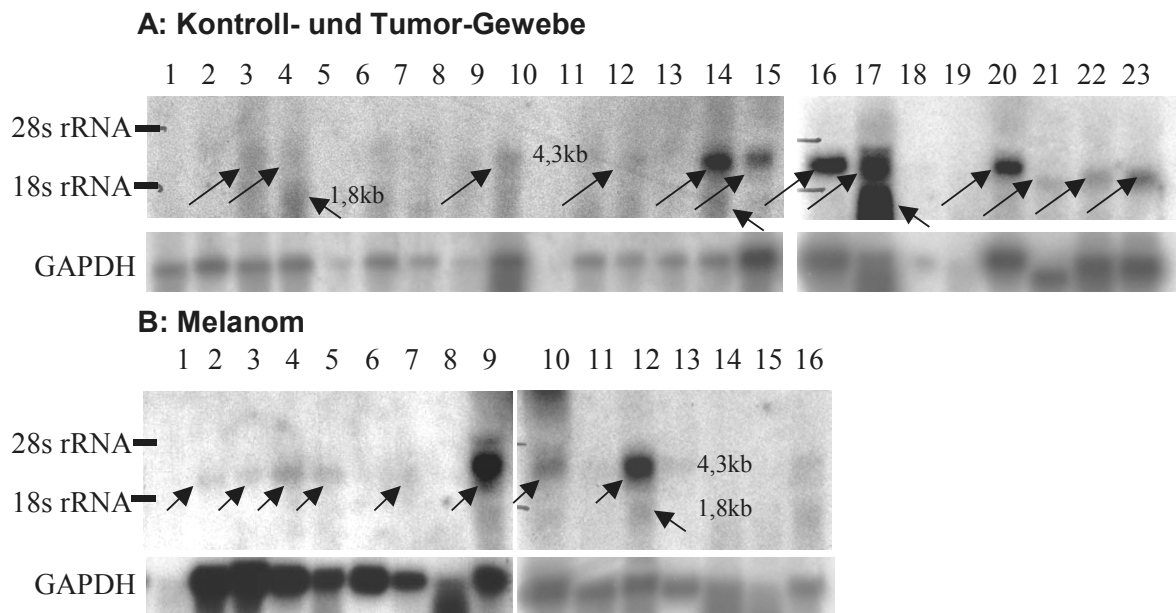
Die Tabelle zeigt die Häufigkeit der cTAGE-1, -4, and -5 positive cDNAs in ausgewählten Tumor-Geweben und Zelllinien. HNSCC steht für head and neck squamous cell carcinoma.

⁽¹⁾ auch Zelllinien. ⁽²⁾ siehe Tabelle 3-8.

Ein Routine-PCR Hybridisierung (siehe 2.3.4 PCR-Southern Blot, S. 34), um die Spezifität der PCR Amplifikate zu überprüfen, ist noch sensitiver in der Erkennung der Amplifikate im Vergleich zu einer Ethidiumbromid / UV Detektion. So konnte mit einer PCR-Hybridisierung auch die schwächer amplifizierten cTAGE mRNAs gesehen werden. So waren cTAGE-4 (in 25% der CTCLs und in 50% der Melanome), cTAGE-5A (in 48% der CTCL, in 50% der

Kolon-Karzinome, in 20% der Hals-Nasen-Ohren Neoplasien und in 52% der Melanome) und cTAGE-5B (in 47% der CTCL und in 65 % der Melanome) deutlich häufiger positiv. Um diese nicht quantitative Expression zu evaluieren wurden Northern-Blot und Western-Blot Experimente durchgeführt.

Abbildung 3-7: cTAGE Familien Northern-Blot Analyse



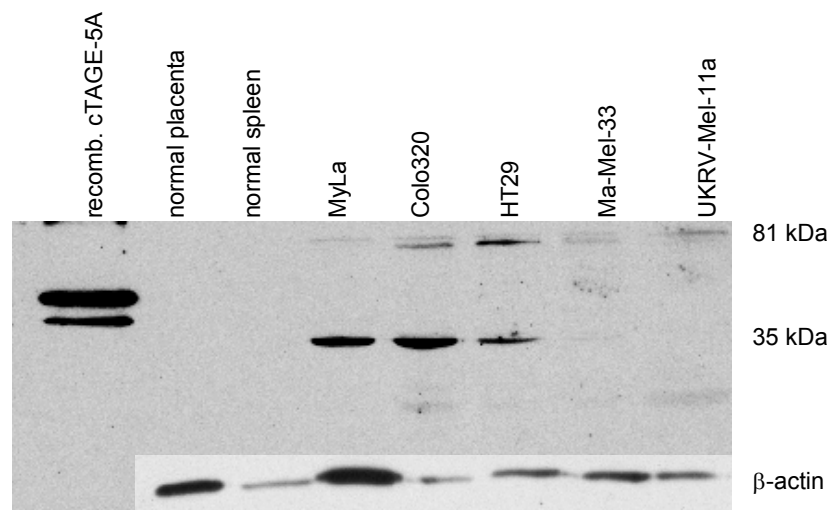
Zwei unterschiedliche Transkripte konnten mit einer cTAGE-2 spezifischen Hybridisierung in der Northern-Blot Analyse beobachtet werden (Details siehe Text). In den Reihen sind folgende RNA Proben aufgetragen: Northern-Blot **A** 1: Knochenmark, 2: Gehirn, 3: Kolon, 4: Niere, 5: Leber, 6: Mamma, 7: Placenta, 8: Prostata, 9: Skelett-Muskulatur, 10: Haut, 11: Dünndarm, 12: Thymus, 13: Trachea, 14: Testis, 15: HH, 16: Colo 320, 17: HT29, 18: Ma-Mel-33, 19: UKRV-Mel-11a, 20: HH, 21: HuT78, 22: MyLa, 23: SeAx und Northern-Blot **B** 1: Ma-Mel-23, 2: Ma-Mel-22, 3: UKRV-Mel-14a, 4: UKRV-Mel-06a, 5: UKRV-Mel-37, 6: SK-Mel-29, 7: WM98-1, 8: Ma-Mel-18a, 9: Testis, 10: Testis, 11: UKRV-Mel-17, 12: UKRV-Mel-27, 13: UKRV-Mel-20c, 14: UKRV-Mel-38c, 15: UKRV-Mel-21a und 16: Ma-Mel-11. Als Vergleich ist eine GAPDH Hybridisierung dargestellt, die zeigt, dass die Proben 11,18,19 (A) und 1 (B) nicht auszuwerten sind.

In der Northern-Blot Hybridisierung mit einer cTAGE-2 spezifischen Sonde (Primer Set II an cTAGE-2 Plasmid), die alle cTAGE mRNAs bis auf cTAGE-1 erkennen sollte, konnten zwei verschiedene Transkripte (4,3 und 1,8 kb) beobachtet werden. Während die 4,3 kb Bande sehr stark in den Zelllinien Colo320, HT29 und einigen Melanom Linien erscheint, ist die 1,8 kb

Bande schwach exprimiert. cTAGE-2 und cTAGE-5 Transkripte entsprechen in etwa der größeren Hybridisierungsbande und cTAGE-1B, cTAGE-3 oder cTAGE-4 könnten die kleinere Hybridisierungsbande bilden.

Die Vermutung nach der Northern-Blot Analyse, dass cTAGE in Tumoren überexprimiert ist, konnte mittels eines cTAGE-5A, -5C und -5D spezifischen Antikörpers (siehe Material und Methoden) im Western-Blot bestätigt werden. Während die 81kDa Bande in den Tumorzellen der erwarteten Proteingröße entspricht, ist eine kleinere, stärkere 35kDa Bande als Degradations Produkt erkennbar. Der Peptid-spezifische Antikörper K64 konnte in keinem der getesteten Normalgewebe (inklusive der durch RT-PCR cTAGE-5C / MGEA-6 und cTAGE-5D / MGEA-11 positiv getesteten Normalgewebe) ein cTAGE-5 Protein nachweisen. Im Gegensatz dazu konnten cTAGE-5 Proteine in den CTCL-Zelllinien (HH, HuT78, MyLa, SeAx) den Kolon Karziom Zelllinien (Colo320, HT29) und schwach den Melanom Zelllinien (Ma-Mel-33 und UKRV-Mel-11) nachgewiesen werden (siehe exemplarisch Abbildung 3-8).

Abbildung 3-8: cTAGE-5 Western-Blot Analyse

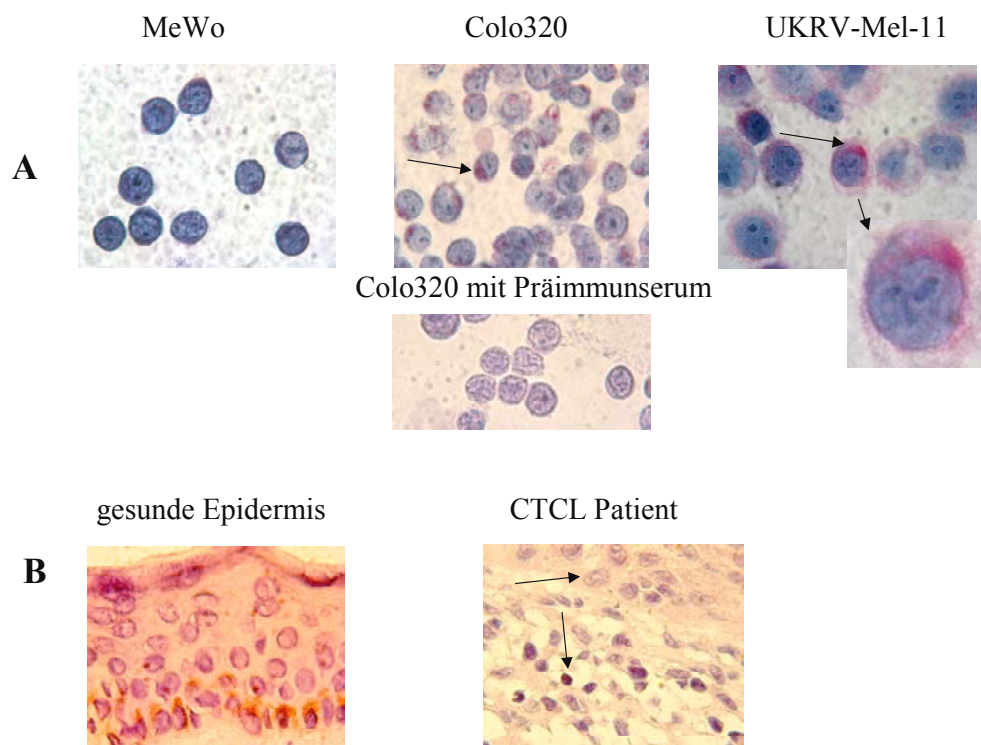


Western-Blot Analyse von Proteinen aus Tumor-Zelllinien und Kontroll-Gewebe mit dem cTAGE-5A / -5C und -5D spezifischen Antikörper K64. Die Zelllinien sind aus CTCL Tumoren (MyLa), Kolon Karzinomen (Colo 320, HT29) und Melanomen (Ma-Mel-33 und UKRV-Mel-11a) isoliert worden. Als Vergleich ist das Haushaltsprotein β -Aktin mittels Antikörper am gleichen Protein-Blot detektiert worden. Details siehe Text.

3.2.6 Zelluläre Lokalisation der cTAGE-Familie

Mittels immunhistochemischer Färbungen konnte cTAGE-5 in der Zelle lokalisiert werden. An Cytopins Zelllinien Colo320, HT29, Ma-Mel-33 und UKRV-Mel-11a konnten durch Inkubation mit dem polyklonalen cTAGE-5 spezifischen Antikörper K64 Cytoplasma / Membran-Anfärbungen beobachtet werden. Die Computeranalyse der cTAGE-5A, cTAGE-5C / MGEA-6 und cTAGE-5D / MGEA-11 Proteine ergeben am N-Terminus eine Membran-Domäne (AS Nr. 13-30), während der Rest des Proteins als extrazellulär vorhergesagt wird.

Abbildung 3-9: zelluläre cTAGE-5 Lokalisation



Die Abbildung zeigt immunhistochemische Färbungen mit einem cTAGE-5 spezifischen Antikörper K64. In der oberen Reihe **A**: sind Cytopins der Tumor-Zelllinien MeWo (Negativkontrolle), Colo320 und UKRV-Mel-11a und in der unteren Reihe **B**: Paraffinschnitte einer gesunden Normalhaut und eines CTCL (MF) Tumors. Die Vergößerung beträgt 300x (Cytopins und Normalhaut), 225x (Tumorschnitt) oder 1100x (Vergrößerung UKRV-Mel-11).

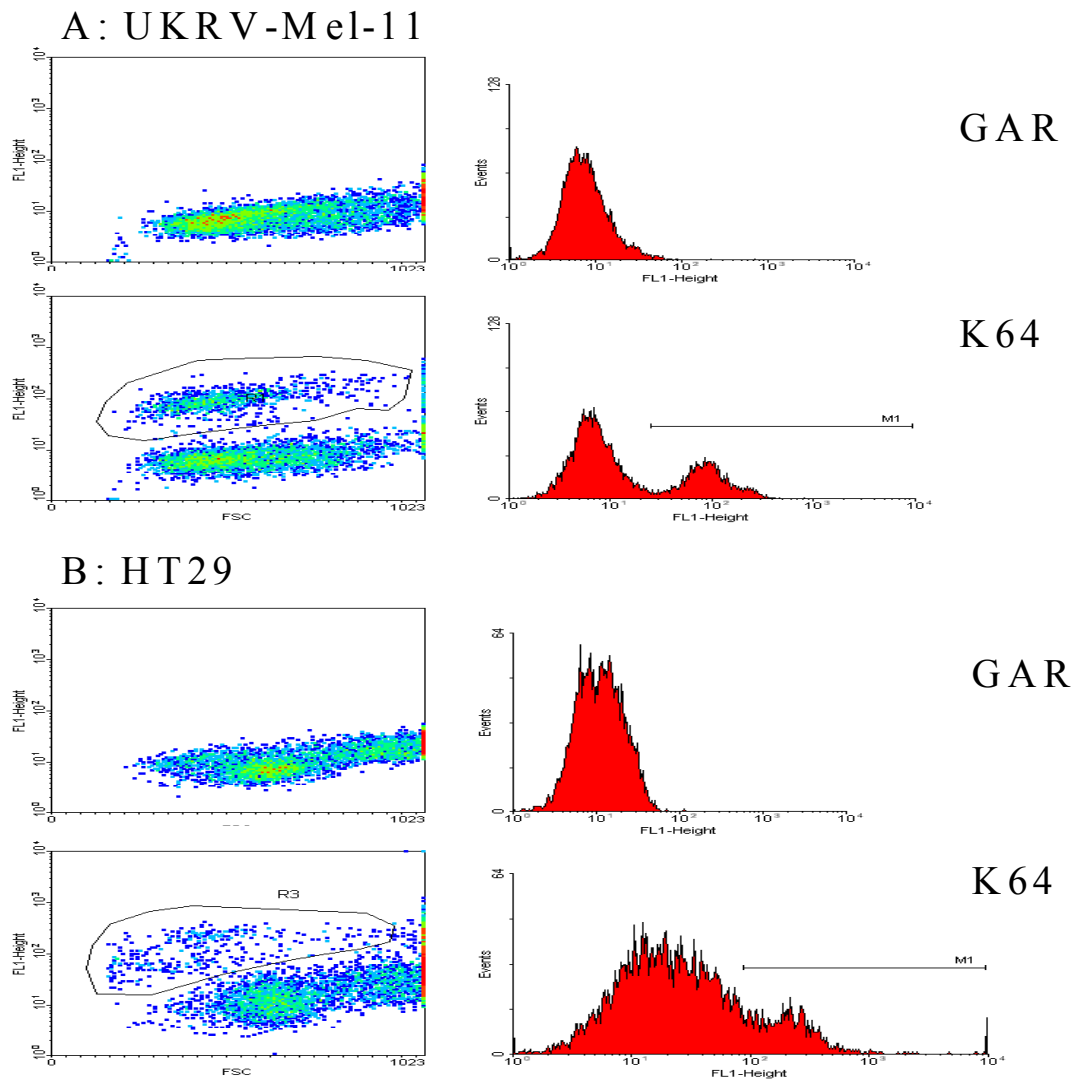
Anhand der Abbildung 3-9 ist in dem oberen Abschnitt (A) deutlich die zelluläre, cytoplasmatische, eventuell membranständige Lokalisation von cTAGE-5 zu erkennen. Diese Beobachtung deckt sich mit den Analysen einer anderen Arbeitsgruppe [193]. Die Spezifität

der Anfärbungen wurde durch eine cTAGE-5 negative Zelllinie (siehe Abbildung 3-9A, Spalte 1: MeWo) und durch Verwendung von Präimmunserum des gleichen Kaninchens an cTAGE-5 positiven Zelllinie (siehe Abbildung 3-9A, Spalte 2: Colo320 im Vergleich) sichergestellt. In der 3. Spalte (UKRV-Mel-11a) ist eine positive Zelle vergrößert dargestellt. In der Tumorkläsion eines CTCL Patienten sind die Tumorzellen nur z.T. angefärbt, d.h. nicht jede Tumorzelle exprimiert cTAGE-5. Im Vergleich dazu waren Zellen der Epidermis negativ. Im Paraffinschnitt einer gesunden Haut konnte kein cTAGE-5 Protein angefärbt werden.

In einer extrazellulären FACS Analyse konnte der cTAGE-5 spezifische Antikörper K64 die Zelllinien UKRV-Mel-11 (26% der Zellen), Colo320 (16%) und HT29 (22%) anfärben, dagegen die Zelllinien Ma-Mel-33 nicht. Das erkannte cTAGE-5 Epitop muss zumindest zum Teil extrazellulär lokalisiert (siehe Abbildung 3-10) sein.

In Abbildung 3-10 sind die FACS Analysen von UKRV-Mel-11 (obere Reihe) und HT29 (unter Reihe) aufgeführt. Die Anfärbung des sekundären Antikörpers GAR (Goat Anti Rabbit) ist in den oberen Zeilen dargestellt. Die markierten Bereiche (Umrandung im densitometrischen Dot-Blot, und M1 im Histogramm) zeigen für UKRV-Mel-11 26% und für HT29 22% K64 angefärbte Zellen.

Der Epitop spezifische Antikörper von cTAGE-1 war leider in der immunhistochemischen Anwendung oder in der FACS Analyse nicht funktionsfähig.

Abbildung 3-10: FACS Analyse mit cTAGE-5 spezifischen Antikörpern


Die Abbildung zeigt eine extrazelluläre FACS Färbung des cTAGE-5 Antikörpers K64 an den Zelllinien UKRV-Mel-11 (A) und HT29 (B). In den Reihen sind der sekundäre Antikörper GAR (Goat-Anti-Rabbit) oben und die K64 Bindung (unten) aufgeführt. Während die densitometrische Dot-Blot Darstellung (Logarithmische Darstellung der cTAGE-Fluoreszenz auf der Y-Achse = FL1 Height gegen eine lineare Darstellung der Zellgröße = FSC) klar die GAR und K64 Populationen unterscheidet (umrandete cTAGE-5 Population) ist in der Histogramm-Darstellung (lineare Anzahl der Zellen = Events auf der Y-Achse gegen die Logarithmische Darstellung der cTAGE-Fluoreszenz auf der X-Achse = FL1 Height) die cTAGE-Population als zweiter Peak zu erkennen. Ohne cTAGE-AK K64 fehlen diese Zell-Anfärbungen (siehe GAR Zeilen).

3.3 Identifikation, Evaluierung und Charakterisierung neuer CTCL assoziierter Tumorantigene

Für das CTCL sind bisher nur wenige tumorassoziierte Antigene bekannt. Es wurden die in eigenen Vorarbeiten identifizierten ersten Tumorantigene des CTCL [97, 98] durch umfassende Sequenz-, Expressions- und serologische-Analysen genauer untersucht.

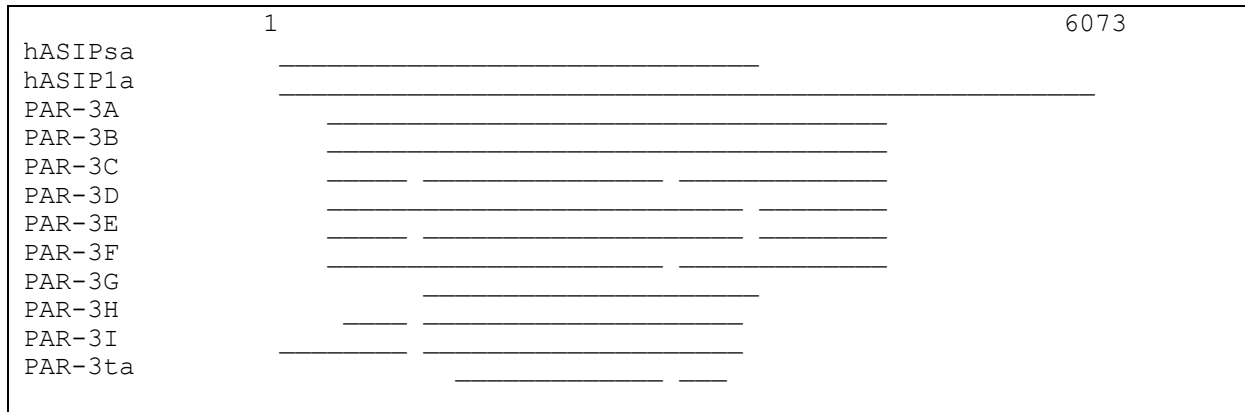
3.3.1 PAR-3 / se2-5 Antigenfamilie

Die Northern-Blot Analyse konnte in eigenen Vorarbeiten [97, 98] eine tumorspezifische Variante zeigen. In Normalgeweben konnte man 3 Banden schwacher Intensität, in Tumorgeweben dagegen nur eine intensivere Bande erkennen. Dies deutet auf eine tumorspezifische Überexpression einer Variante bei Herunterregulierung der anderen Varianten hin.

Um diese Variante zu isolieren, wurden mittels der HYREX Methode insgesamt 300.000 Rekombinante gleichverteilt an einer Testis und einer CTCL Bank mit einem Digoxigenin markierten PCR Produkt des Klons se2-5 untersucht. Es konnten 4 Klone, 2 aus der Testis Bank (se2-5T1 und se2-5T2) und 2 aus der CTCL Tumor Bank (se2-5L11, se2-5L16r), isoliert werden, wobei die HYREX Klone se2-5T1 und se2-5L11 absolut identisch sind. Homolog konnte eine multipel, gesplicte Multigenfamilie PAR-3 (partitioning-defective 3-like protein; PAR-3A: Acc.Nr.: AF467002, PAR-3B: AF467003, PAR-3C: AF252293, PAR-3D: AF467004, PAR-3E: AF467005, PAR-3F: AF467006), und 2 Splicing-Varianten hASIPa (AF196185) und hASIPsa (AF196186) in den Datenbanken identifiziert. hASIP und PAR-3 sind auch zueinander homolog.

Das SEREX definiert se2-5 wurde analog zu PAR-3 als PAR-3ta (PAR-3 tumorassoziiert), die anderen als neue Splicing Produkte des PAR-3 Gens zu PAR-3G (se2-5T1), PAR-3H (se2-5T2) und PAR-3I (se2-5L16r) umbenannt.

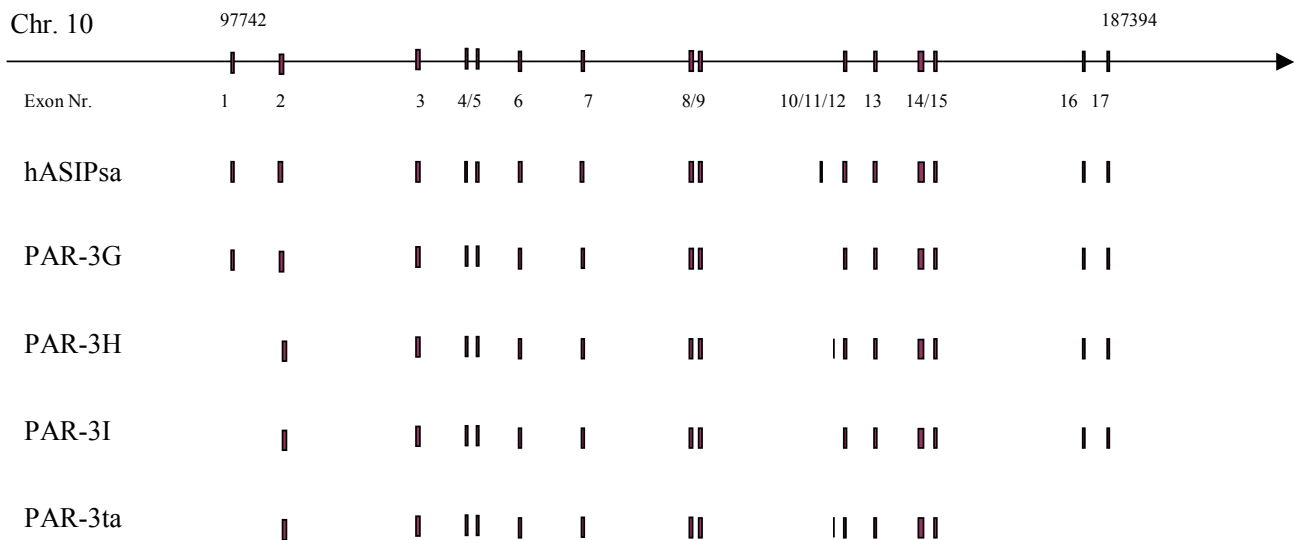
Die beobachteten Größen in der Northern-Blot Analyse (5 kb, 4 kb, 3,5 kb) korrelieren mit den bekannten mRNA Größen. PAR-3A hatte eine Größe von 5 kb, die HYREX Klone PAR-3G und hASIPsa hatten eine mRNA Größe von ca. 4 kb. Der mittels SEREX definierte Klon, PAR-3ta, entsprach in seiner mRNA-Größe der nach Northern-Blot tumorspezifisch überexprimierten Form.

Abbildung 3-11: mRNA Alignment der PAR-3 / se2-5 Genfamilie


mRNA Alignment der PAR3 assoziierten Gene. Klon PAR-3taist per SEREX, die Sequenzen PAR-3G, PAR-3H und PAR-3I sind per HYREX identifiziert worden. Die weiteren PAR-3 Splicing Varianten und hASIP1a / hASIPsa sind aus den Datenbanken, Genbank und EMBL. Die Nukleotid-Nummern beziehen sich auf eine Konsensussequenz.

Nahezu alle PAR-3 / se2-5 mRNAs sind Chromosom 10 zuzuordnen. PAR-3H und PAR-3C besitzen über die gesamte Sequenzlänge viele identische Basensubstitutionen und passen nicht auf Chromosom 10. Es ist anzunehmen, dass diese Sequenzen einer noch unbekannte chromosomalen Sequenz zuzuordnen sind. Die Sequenz von Chromosom 10 ist im 5'-Bereich der Genfamilie nicht vollständig. Deshalb sind die ersten 500 Basen von PAR-3I und hASIP1a chromosomal nicht zuzuordnen. Die verbleibenden mRNAs können – soweit dies zu beurteilen ist - auf differentielles Splicing aus mindestens 17 Exons des Chromosoms 10 zurückzuführen sein. Neben den fehlenden Exons im 5'- und 3'-Bereich der Klone sind auch in der kodierenden Sequenz verschiedene mRNAs durch differentielles Exon-Zusammenfügen zu beobachten (siehe Abbildung 3-12).

RACE-PCR Analysen aus dem immunogenen Klon PAR-3ta heraus ergaben in 5' die Sequenz des Klons PAR-3H, während eine 3' Amplifikation das Ende des Klons PAR-3ta bestätigen konnte.

Abbildung 3-12: Chromosomale Struktur der PAR-3 / se2-5 Familie


Die Abbildung zeigt die Exon / Intron Struktur auf Chromosom 10. Die Exons der einzelnen PAR-3 Familienmitglieder sind als Boxen darunter aufgeführt.

Durch Kombination von Lücken-überspannenden und 5'- und 3'-liegenden Primern konnten alle mRNAs per RT-PCR unterschieden werden. Die RT-PCR spezifische Analyse konnte keine tumorspezifische Variante erkennen. Interessanterweise zeigen die PAR-3 mRNAs unterschiedliche Expression und keine Koexpression in Normalgeweben. Während die PAR-3 assoziierten mRNAs in vielen verschiedenen Normalgeweben positiv getestet wurden, waren die Proben Haut und PMNCs negativ (Ausnahme PAR-3H). Dagegen wurden die CTCL-Proben häufig positiv getestet (siehe Tabelle 3-10).

Tabelle 3-10: RT-PCR Analyse der PAR-3 / se2-5 Genfamilie

	PAR pan ¹	PAR Northern-Blot ¹	PAR-3ta	hASIPla/sa	PAR-3G	PAR-3H	PAR-3I
Normalgewebe							
Dünndarm		-	+	+	+	+	+
Gehirn	+	-	-	+	-	-	+
Haut			-	-	-	+	-
Herz	+	-	+	-	-	+	-
Knochenmark		+					
Kolon		+	+	+	+	+	+
Leber	+	-	-	-	-	-	-
Trachea		+	-	+	-	+	+

	PAR pan ¹	PAR Northern-Blot ¹	PAR-3ta	hASIPla/sa	PAR-3G	PAR-3H	PAR-3I
Normalgewebe							
Lunge	+	-	+	+	+	+	+
Magen		+	+	+	+	+	
Mamma			+	+	+	+	+
Milz		-	+	+	+	+	+
Niere	+	+	+	+	-	+	-
Pancreas	+						
Placenta	+						
PMNC		-	-	-	-	-	-
Prostata			+	+	-	+	+
Skelett Muskulatur	+		+	+	+	+	+
Testis	+	+	+	+	+	+	+
Thymus		-	-	+	-	-	-
Uterus			+	+	+	+	+
Gewebe pos	17	5	11	13	8	13	10
Anzahl n	17	13	17	17	17	17	16
%	100%	38%	65%	76%	47%	76%	63%
CTCL⁽²⁾							
Gewebe pos	6		1	1	3	2	1
Anzahl n	13		6	7	7	7	7
%	46%		17%	14%	42%	29%	14%

Die Tabelle zeigt die RT-PCR Expressionsanalyse der PAR-3 / se2-5 verwandten mRNAs. Die Tabelle ist unterteilt in Normalgewebe- und CTCL- Expression. Die unteren Zeilen fassen die Expressionsdaten zusammen (Anzahl der positiv getesteten Gewebe, Anzahl (n) aller getesteten Gewebe und die prozentuale Expression). Die fetalen Gewebe beinhalten Gehirn, Herz, Lunge, Leber, Milz, Niere, Skelett-Muskulatur und Thymus. ¹ Ergebnisse nach eigenen Vorarbeiten [97, 98]. ⁽²⁾: Tumorgewebe und Zelllinien

Die durch SEREX oder HYREX detektierten Klone konnten in einem sekundären SEREX auf eine mögliche Erkennung durch reaktive Antikörper aus Seren überprüft werden. Die SEREX-Analyse zeigte, dass das N- und C-terminal verkürzte Protein (PAR-3ta) serologisch spezifisch ist. Dagegen zeigten die "großen" Varianten (PAR-3G, PAR-3H und PAR-3I) keine serologische Spezifität, d.h ein Kontrollserum reagiert gegen die Proteine PAR-3G,

PAR-3H und PAR-I. Ferner besaßen 3/20 CTCL-Seren gegen das PAR-3ta Protein reaktive Antikörper (siehe Tabelle 3-11).

Tabelle 3-11: SEREX-Analyse der PAR-3 / se2-5 Familie

		PAR-3ta	PAR-3G	PAR-3H	PAR-3I
Kontrollen	positiv / n	0 / 14	1 / 13	1 / 14	1 / 14
	%	0%	8%	7%	7%
CTCL	MF positiv / n	2 / 15	2 / 9	3 / 10	1 / 9
	MF %	13%	22%	30%	11%
	SS positiv / n	1 / 5	0 / 3	0 / 4	0 / 4
	SS %	20%	0%	0%	0%
CBCL	positiv / n	0 / 2	0 / 1	0 / 1	0 / 1
	%	0%	0%	0%	0%

Die Tabelle zeigt die SEREX Analyse an PAR-3 / se2-5 verwandten Klonen. Die Zeilen zeigen die positiven Seren / gegen die Anzahl (n) der getesteten Seren. Die Ergebnisse für Klon sind aus [97, 98] mit zusätzlich getesteten Seren.

In anderen SEREX Analysen konnten 2 Homologe beide im Zusammenhang mit Prostata-Karzinom identifiziert werden (Karzinom-Bank und Testis-Bank mit jeweils Prostata-Karzinom Serum, SEREX-Datenbank). Der Klon TP-6 (5') war in der Sequenz gegenüber PAR-3ta am 5'-und 3'-Ende verkürzt. Das Protein von PAR-3ta ist 637 AS (69,8 kDa) groß und ist nukleär oder mitochondrial lokalisiert. Das verlängerte PAR-3H ist 943 AS (103 kDa) groß und zeigt keine Lokalisations-unterschiede. Der Vergleich der Proteine PAR-3ta und PAR-3 zeigt, dass PAR-3ta N-terminal um eine Proteinbindungsdomäne (PDZ Domäne) verkürzt ist.

3.3.2 Lymphomassoziiertes Antigen se20-10

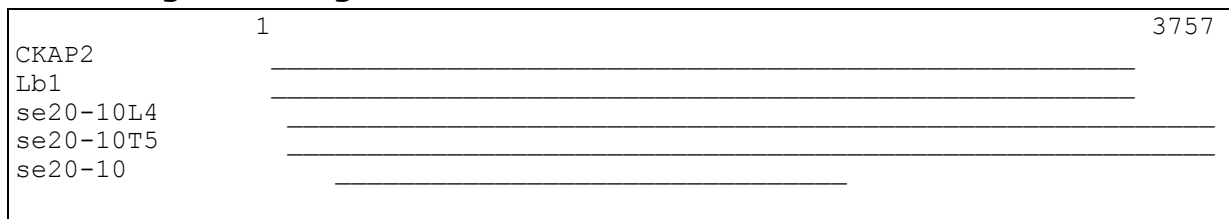
Mittels einer 5' RACE-PCR konnte die Sequenz des Klon se20-10 verlängert werden. Homolog dazu ist eine mRNA, die in einer anderen Arbeit mittels einer differentiellen PCR an einem diffusen großzelligen B-Zell Lymphom (Lb1, Acc. Nr.: HSY15758) identifiziert werden konnte.

Durch einen HYREX-Screen an je 150.000 Testis- und CTCL-Rekombinaten, konnten 2 identische Klone gefunden werden (1 Testis-Klon: se20-10T5 und 1 CTCL-Klon: se20-10L4).

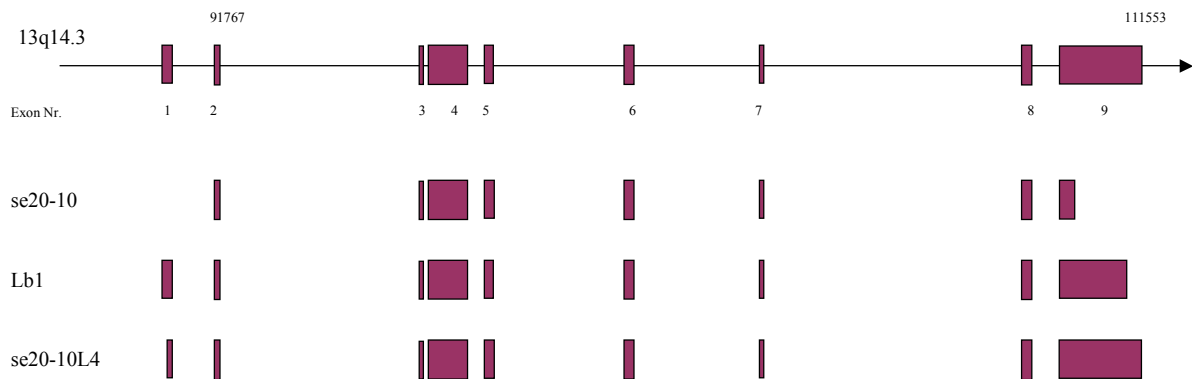
CKAP2 (cytoskeleton associated protein 2), ebenfalls homolog zu se20-10, ist eine hypothetische zusammengesetzte Sequenz, die sich aus Sequenzierung einer Terato-Karzinom cDNA ableitet und nach der funktionellen Einordnung des Lb1 Gens (Kokolalistaion von Lb1 und cytoskelettalen Filamenten) benannt wurde. Weiter konnten viele kurze homologe EST Sequenz-Bruchstücke aus verschiedenen Banken, wie Testis-Banken, einer Bank hergestellt aus dem Knochenmark eines CML Patienten oder anderen Karzinom-Banken gefunden werden. Diese Antigen-Familie wurde als LAA (Lymphom assoziierte Antigen) – Familie benannt.

Abbildung 3-13 zeigt als Alignment die Lokalisation der se20-10 verwandten mRNAs zueinander.

Abbildung 3-13: Alignment der se20-10 Familie



mRNA Alignment der se20-10 Familie, bestehend aus se20-10, Lb1, se20-10L4 / se20-10T5 und CKAP-2 (Acc. Nr.: HSA429398) cDNA aus den Datenbanken, Genbank und EMBL.

Abbildung 3-14: Exon / Intron Struktur der LAA Familie


Die Abbildung zeigt die chromosomale Organisation der LAA (Lymphom assoziierte Antigene) -Familie. Chromosom 13q14.3: Acc.Nr: Hs13_24680.

Die se20-10 Familie ist auf Chromosom 13q14 in 9 Exons codiert. Die mRNAs werden differentiell gespliced, so fehlt se20-10 Exon 1 und ist im neunten Exon deletiert (siehe Abbildung 3-14).

Durch die hohe Homologie konnten nicht alle mRNAs per RT-PCR Analyse spezifiziert werden (siehe Tabelle 3-12).

Tabelle 3-12: RT-PCR an se20-10 verwandten mRNAs

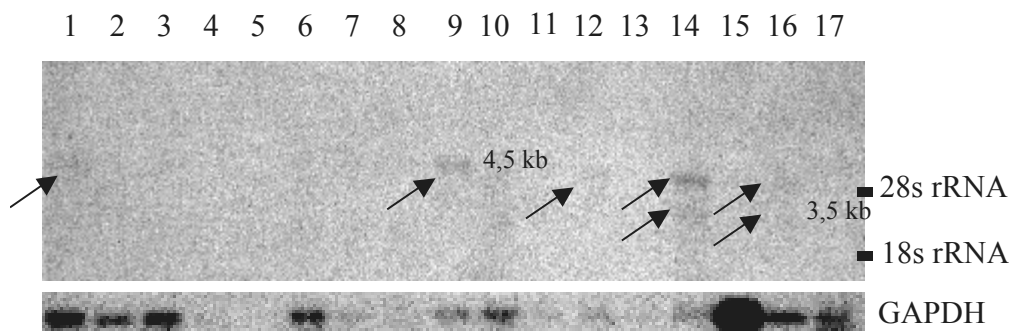
	LAA 5'	LAA pan	LAA 3'
fetale Gewebe		1/8	
Dünndarm	+	+	+
Gehirn	+	+	+
Haut	-	-	-
Herz	-	+	+
Knochenmark	+	+	+
Kolon	+	-	+
Leber	+	-	+
Trachea	+	+	+
Lunge	+	-	+
Milz	+	+	-
Magen	+	+	-
Mamma	-	-	+
Niere	+	+	+
Placenta	-	+	-

	LAA 5'	LAA pan	LAA 3'
PMNC	-	+	-
Prostata	+	+	-
Skelett Muskulatur	+	-	-
Testis	+	+	+
Thymus	+	-	+
Uterus	+	+	+
Adulte Gewebe pos	15	13	13
Anzahl n	20	20	20
%	75%	65%	65%
CTCL			
HH ¹	+	+	-
HuT 78 ¹	+	+	-
MyLa ¹	+	+	+
SeAx ¹	+	+	+

Die Tabelle zeigt die Expression von drei Antigen-Gruppen: LAAPAN steht für alle bekannten se20-10 / LAA assoziierten Antigene, LAA 3' für se20-10L4, CKAP2 und LAA 5' erkennt die mRNAs Lb1, se20-10L4 und CKAP2. Die fetalen Gewebe beinhalten fetales Gehirn, fetales Herz, fetale Lunge, fetale Leber, fetale Milz, fetale Niere, fetale Skelett Muskulatur, fetalen Thymus. ¹: CTCL Zelllinien

Das Primerpaar LAA 5' ist im 5' (se20-10 negativen) Bereich lokalisiert und ist spezifisch für Lb1, se20-10L4 und CKAP2. Während die Primer-Kombination LAA 3' im 3' (se20-10 negativem) Bereich se20-10L4 erkennt, steht das Primer-Paar LAA-pan für alle bekannten LAA mRNAs. Da LAAPAN alle bekannten Varianten erkennt, müsste immer eine LAA3' oder LAA5' Expression mit einer LAAPAN Koexpressionen zu beobachten sein. Die RT-PCR Analysen zeigen dagegen, dass im 3' und 5' Bereich weitere Varianten existieren, die eine ubiquitäre oder differentielle Expression besitzen (positive LAA3' oder LAA5' Ergebnisse bei negativen LAAPAN Ergebnissen). Eine Koamplifikation von LAAPAN und LAA 5' und 3' konnte neben Testis in 6 weiteren Geweben erkannt werden. Dieses Muster ist für die mRNA se20-10L4 spezifisch. Eine Lb1 oder CKAP2 spezifische Expression kann durch eine Koamplifikation von LAA5' und LAAPAN bei gleichzeitig negativen LAA3' Ergebnissen in den Geweben Magen, Milz und Prostata gefunden werden. se20-10 spezifisch ist das Expressionsmuster bei LAAPAN positiven mit negativen LAA5' und LAA3' Ergebnissen. Dies konnte in Placenta und PMNC beobachtet werden. Diese Kombination der Ergebnisse schließt nicht aus, dass Lb1 oder se20-10 bei einem alternativen Amplifikationsprofilmuster zusätzlich koexprimiert wird.

Abbildung 3-15: Northern-Blot Analyse LAA-Familie



Northern-Blot an Normalgeweben mit einer se20-10 spezifischen Sonde. In den Reihen ist Gesamt RNA wie folgt aufgetragen. 1: Gehirn, 2: Herz, 3: Niere, 4: Leber, 5: Lunge, 6: Kolon,

7: Dünndarm, 8: Milz, 9: Milz, 10: Thymus, 11: Knochenmark, 12: Magen, 13: Trachea, 14: Testis, 15: HH, 16: MyLa, 17: SeAx. Details siehe Text.

In der Northern Blot Analyse konnten mit einer se20-10 spezifischen Sonde (LAA-pan PCR an se20-10 Plasmid) zwei Hybridisierungsbanden erkannt werden. Eine 5 kb Bande konnte schwach in den Geweben Gehirn, Magen der CTCL-Linie MyLa und stark in den Geweben Milz und Testis beobachtet werden. Eine kleinere Bande bei ca. 3,5 kb konnte in Testis und schwach in MyLa gesehen werden. Während die 3,5 kb Bande ungefähr der Größe der LAA-Familie entspricht, ist die 5 kb Bande unklar. Die LAA-Familie ist nach der quantitativeren Analyse im Northern Blot in nur wenigen Normalgeweben exprimiert.

Die virtuelle Northern Analyse (NIH-Homepage) ergab für se20-10 das Cluster des CKAP2 Gens, das gleichverteilt in Normal- und krebsassoziierten Geweben zu finden war. Dies ist nur bedingt für die verkürzte se20-10 mRNA übertragbar. Ein BlastN2 mit se20-10 zeigt neben vielen ESTs aus Karzinomen nur wenige ESTs aus Normal-Banken. Diese sind fast ausschließlich aus Testis, Gehirn oder fetalen Geweben isoliert.

Die HYREX-Klone konnten in einem sekundären SEREX auf eine mögliche Erkennung von reaktiven Antikörper aus Seren getestet werden.

Tabelle 3-13: SEREX Analyse der LAA Phagen-Klone

		Lb1	se20-10
Kontrollen	positiv / n	0 / 9	0 / 13
	%	0%	0%
CTCL	MF positiv / n	1 / 10	2 / 17
	%	10%	12%
	SS positiv / n	0 / 3	1 / 5
	SS %	0%	20%
CBCL	positiv / n	0 / 1	0 / 2
	% positiv	0%	0%

SEREX Ansatz für LAA-Proteine. Die HYREX Klone se20-10L4 / -T5 sind in der Proteinsequenz identisch zu Lb1. Die gleichen MF Seren reagierten gegen das se20-10 und Lb1 Protein.

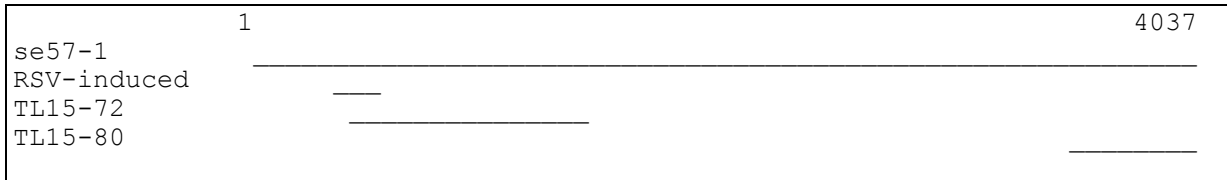
Die Aminosäuresequenz von se20-10 (572 AS, 64kDa) ist gegenüber den identischen Proteinen se20-10L4 (=se20-10T5) N-Terminal um 56 Aminosäuren und C-Terminal um 74 Aminosäuren deletiert (bei einer Gesamtlänge se20-10L4: 701 AS). Die genaue Proteinanalyse von se20-10L4 und Lb1 ergibt identische Proteine, sodass eine vergleichende SEREX Analyse für se20-10 und Lb1 Protein durchgeführt werden konnte.

In anderen SEREX Analysen (SEREX Datenbank) konnten keine weiteren immunogenen LAA verwandten Proteine gefunden werden. Beide getesteten Phagen Klone waren serologisch spezifisch, d.h. Normalseren besaßen keine reaktiven Antikörper im Gegensatz zu den getesteten CTCL-Patienten. Das verkürzte Protein von se20-10 scheint eine immunogenere Variante zu sein, da 3/22 Seren positiv waren (Lb1 nur 1/13) (siehe Tabelle 3-13).

3.3.3 Klon se57-1

Zu Klon se57-1 konnte 2 unabhängige SEREX-Klone aus der Testis (TL15-72 und TL15-80, Acc. Nr.: #150 / #153) und eine EST Sequenz (Acc. Nr.: AK058097) gefunden werden.

Abbildung 3-16: se57-1 mRNA Alignment



Klon se57-1 cDNA Alignment.

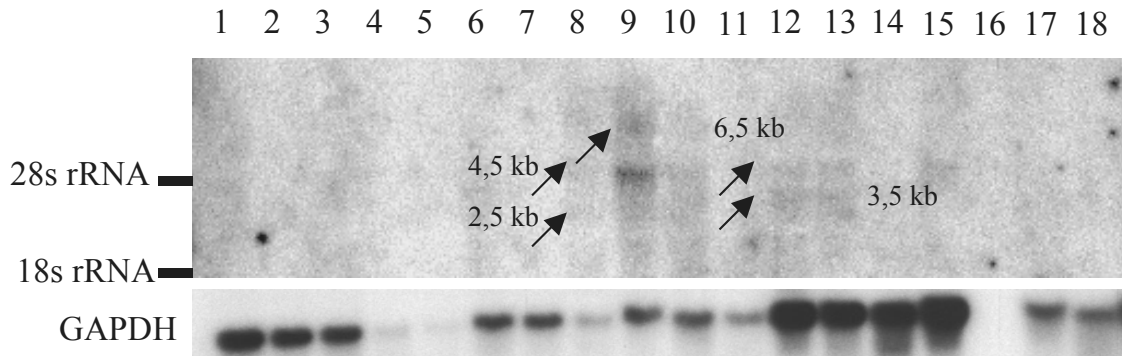
Der mRNA Vergleich zeigt, dass se57-1 die Voll-Längen Variante des Gens ist. Die Ansequenzierungen des ESTs und der SEREX mRNAs sind gegenüber der Sequenz von se57-1 5' verkürzt. Mittels der Northern-Blot Analyse konnten für Klon se57-1 keine Expression in Normalgeweben (Ausnahme: Testis) beobachtet werden. Allerdings konnte auch keine se57-1 Transkripte in Tumorgeweben (CTCL und HNO Tumore) nachgewiesen werden. In einer HYREX Suche konnten trotz insgesamt 600.000 durchsuchten Rekombinanten an der CTCL- und der Testis-Bank keine Treffer beobachtet werden. Dies deutet auf einen sehr geringen Expressionslevel von se57-1 hin. Klon se57-1 konnte homolog zu einem EST gefunden werden, welches nach Virusinduktion in der Zelllinien A549 (Alveolar Karzinom Linie) exprimiert wird. Der RSV-Virus (respiratorial syncytial virus) kommt bei akuten Atemwegsinfektionen vor.

Mittels spezifischer Primer für eine F1 Untereinheit eines Glycofusionsproteins des RSV Virus [185] und für ein Nucleocapsid Gen des RSV Virus [186] wurde die RSV Expression untersucht. In 66 getesteten Proben (Normalgewebe, HNO-Tumore, CTCL-Tumore, CTCL-Linien, MM-Linien, CBCL-Tumore und Leukämie-Zelllinien) konnten lediglich 3 RSV-positive Proben gefunden werden. Die CTCL-Zelllinien SeAx, die Leukämie Zelllinien ARA-10 und die MM-Zelllinien UKRV-Mel-21a wurden positiv getestet, die aber nicht se57-1 positiv getestet werden konnten. In Epitope Mapping Experimenten reagierten ein MF-Serum und ein SS-Serum, aber kein Normalserum gegen 3 Epitope aus se57-1. Die Epitope **TLQKIRTQM**, **RKLSLE**, **QFVIHSQHQNLR** konnten mit einem tBlastN2 keinem anderen Protein als se57-1 zugeordnet werden.

3.3.4 Klon se70-2

Die Northern-Blot Analyse des Klons se70-2 ließ ein multiples Bandenmuster erkennen.

Abbildung 3-17: se70-2 Northern-Blot Analyse

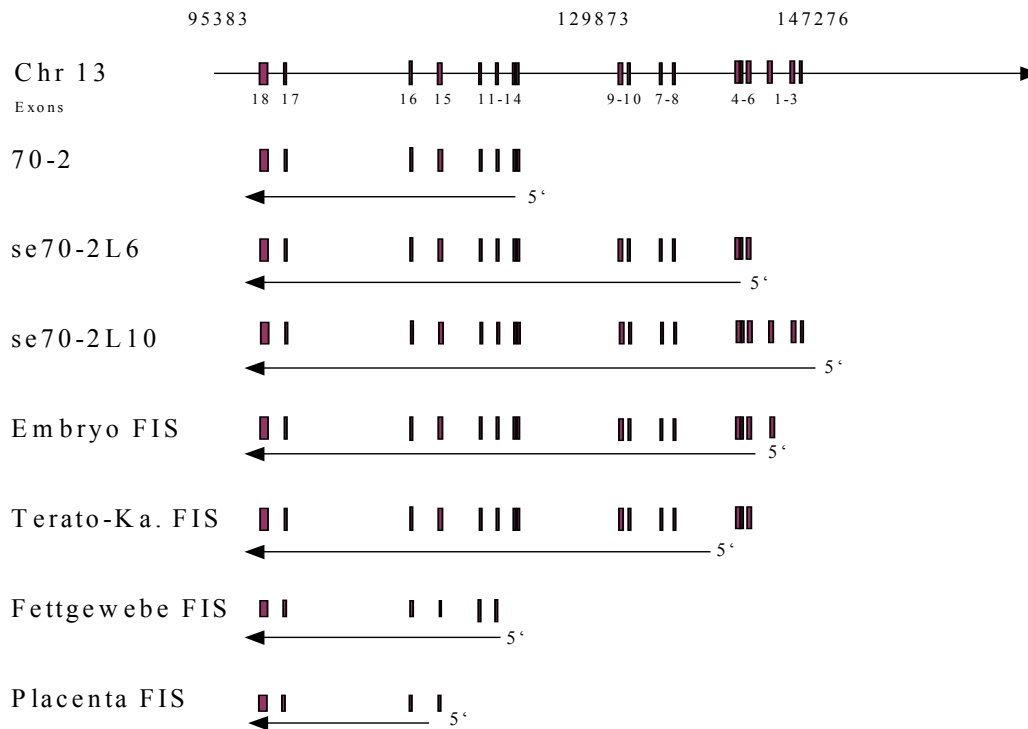


Northern-Blot Analyse der se70-2 Genfamilie. 1: Gehirn, 2: Herz, 3: Niere, 4: Leber, 5: Lunge, 6: Mamma, 7: Dünndarm, 8: Milz, 9: Testis, 10: Thymus, 11: Trachea, 12: HH, 13: HuT 78, 14: MyLa, 15: SeAx, 16: Haut, 17: PMNC, 18: Jurkat sind in den Reihen zur Northern-Blot Analyse aufgetragen. Erkennbar ist ein multiples Bandenmuster, weiteres siehe Text.

Erkennbar an Abbildung 3-17 ist, dass se70-2-Transkripte verschiedener Größe (ca. 6,5 kb, ca. 4,7 kb und ca. 2,5 kb) auch in Normalgeweben nachgewiesen werden konnten. Auffallend ist dagegen, dass in den CTCL Linien eine kleinere mittlere Bande erscheint (ca. 3,5 kb), die in den Normalgeweben fehlt. se70-2-verbundene cDNA wurden mittels eines HYREX-Ansatzes gesucht. Durch Überprüfen von je 100.000 Rekombinanten aus der CTCL-Tumor- und Testis-Bank, konnten 7 Klone isoliert werden. Während aus der CTCL Bank 2 identische Klone (se70-2L3 und se70-2L7) zu se70-2 gefunden werden konnten, waren 3 identische Klone (se70-2L11, se70-2T12 und se70-2L6) umm 1116 bp und 2 weitere Klone (se70-2L10 und se70-2L1) 5' deutlich um 1700 bp verlängert. Mittels einer 5' RACE-PCR an einer Testis RNA konnte die se70-2 Sequenz bis zu der Länge des HYREX Klon se70-2L10 bestätigt werden.

Anhand Abbildung 3-18 ist die Organisation auf Chromosom 13 dargestellt. Die verschiedenen mRNAs setzen sich aus 18 verschiedenen Exons zusammen (siehe Abbildung 3-18). se70-2 und se70-2L6 sind 5' deletierte Varianten der vollständigen se70-2L10 Sequenz. se70-2 fehlen gegenüber se70-2L10 die Exons 1-10 und se70-2L6 die Exons 1-3.

Abbildung 3-18: Exon / Intron Struktur auf Chromosom 13 der se70-2 Genfamilie



se70-2 Antigen - mRNA Alignment an Chromosom 13 (Acc. Nr.: AL159974.14). Es ist eine Auswahl der homologen Sequenzen dargestellt. FIS Sequenzen sind durchsequenzierte, unbekannte mRNAs. Acc.Nr.: Chr13: AL159974, Embryo FIS: AK027339, Terato-Ka FIS: AK027456, Fettgewebe FIS: AK024610 und Placenta FIS: BG620050.

Desweiteren sind in den Datenbanken zu se70-2 eine Vielzahl von homologen ESTs bekannt, von denen sehr viele mit Krebs assoziiert sind. Absolut identisch in der Nukleotid-Sequenz ist se70-2 zu zwei patentierten Magenkrebs-assoziierten Genen (WO0109317). Diese werden als Magenkrebs spezifische mögliche Zielstrukturen beschrieben. Die virtuelle Northern-Analyse zeigt, dass das Cluster einer se70-2 verlängerten Konsensus Sequenz in Normalgeweben und Tumoren gleichverteilt exprimiert ist.

In alternativen SEREX Untersuchungen konnten 2 homologe Proteine identifiziert werden. NGO-St-149 5' und Mo-Tes-116 sind beides 5' Ansequenzierungen, die mit Seren von Magen-Karzinom Patienten (NGO-St-149) und Normalseren (beide Klone) reagierten. Die neu identifizierten se70-2 verwandten Phagen-Klone konnte auf ihre serologische Erkennung untersucht werden. Da die Unterschiede in der Proteinsequenz allein N-terminale Verlängerung zurückzuführen ist, konnten die se70-2 Klone in 3 Gruppen eingeteilt werden. Es wurde mit je einem Phagen die SEREX Analyse durchgeführt (siehe Tabelle 3-14).

Die serologische Analyse der se70-2 verwandten Phagen-Klone ergab, dass nur der durch SEREX identifizierte Klon se70-2 tumorspezifisch in der serologischen Erkennung war. Gegen die abgeleiteten Proteine von se70-2L6 und se70-2L10 hatten auch Kontroll-Personen Antikörper im Blut. Das se70-2 Protein ist um 572 Aminosäuren gegenüber dem se70-2L10 Protein und um 373 Aminosäuren gegenüber dem se70-2L6 Protein verkürzt (199 AS se70-2L10 gegenüber se70-2L6).

Tabelle 3-14: SEREX Ergebnisse der se70-2 Familie

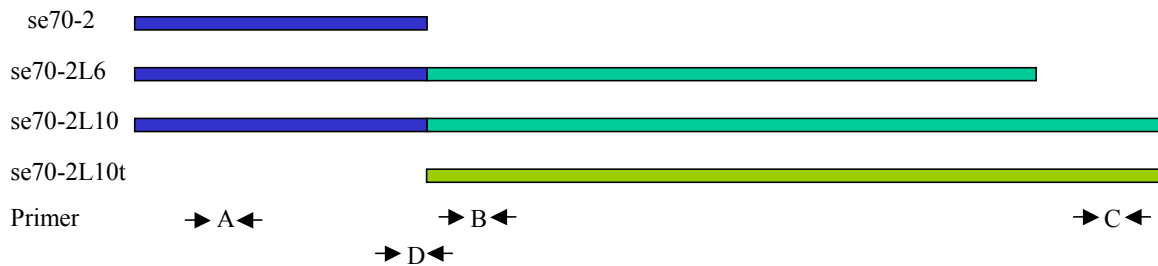
		se70-2	se70-2L6	se70-2L10
Kontrollen	positiv / n	0 / 14	1 / 11	2 / 11
	%	0%	9%	18%
CTCL	MF positiv / n	3 / 15	1 / 11	2 / 11
	MF %	20%	9	18
	SS positiv / n	0 / 4	0 / 4	0 / 4
	SS %	0%	0%	0%
CBCL	positiv / n	0 / 2	0 / 1	0 / 1
	%	0%	0%	0%

Die Tabelle zeigt die SEREX Ergebnisse der se70-2 verwandten Proteine. In der HYREX Analyse wurden zu den einzelnen Klone identische Phagen isoliert, so dass nur einer in der serologischen Untersuchung analysiert wurde. Die Ergebnisse für Klon se70-2 gemäß Literatur [97, 98] mit zusätzlichen getesteten Seren.

Das Epitop gegen das die Normalseren reagieren ist nicht in der Aminosäuresequenz des se70-2 Proteins zu finden. Die Proteinanalyse zeigt, dass die unterschiedlichen Proteine (se70-2: 305 AS = 34,5 kDa, se70-2L6: 677 AS = 74,5 kDa und se70-2L10: 875 AS = 98,7 kDa) am C-terminale Ende absolut identisch sind (Grund: differentielles Splicing). Interessanterweise konnten ausschließlich in diesem Bereich α Helices mit möglichen Coiled-Coil Strukturen gefunden werden. Die N-terminal verlängerte Aminosäuresequenz besitzt kein ableitbares Motiv, bis auf vereinzelte β Faltblätter.

Die se70-2 Genfamilie wurde neben der Northern-Blot Analyse genauer per RT-PCR analysiert. Es wurden 4 Primerpaare herausgesucht durch die eine genauere Differenzierung zwischen den se70-2 verwandten mRNAs möglich ist (siehe Abbildung 3-19).

Abbildung 3-19: mRNAvergleich der se70-2 Familie



Die Abbildung zeigt die mRNA Sequenzen der se70-2 Familie zueinander. Ferner ist die Lokalisation der Primer angegeben, mit deren Kombination eine genaue Expressionsanalyse möglich war.

Durch Kombination der Ergebnisse der Primersets A, B und C ist es möglich, ein Expressionsprofil für die einzelnen mRNAs abzuleiten. Primer A, B und C positive Ergebnisse stehen für se70-2L10 Expression, wobei Koexpression von se70-2 und se70-2L6 nicht ausgeschlossen werden kann. Positive Ergebnisse der Primer A und B können für se70-2L6 stehen und se70-2 ist sicher exprimiert, wenn nur Primerset A positiv getestet werden konnte (siehe Abbildung 3-19, Tabelle 3-15). Außerdem war häufig eine Kombination (B und C positive Ergebnisse) zu beobachten, die eine weitere, bislang unbekannte Splicingform anzeigt, die als se70-2L10t (=für truncated) bezeichnet wurde.

se70-2L10 mRNAs konnte in den getesteten Normalgeweben Gehirn, Dünndarm, Milz, Uterus, Testis, Thymus und Trachea und se70-2L6 mRNAs in den Geweben Niere und Mamma identifiziert werden. se70-2L10t war in den Geweben Leber, Lunge, PMNC, Prostata, Skelett Muskulatur, Knochenmark, Kolon und Magen zu beobachten. Eine sichere Expression des SEREX definierten Klon se70-2 war in keinem Normalgeweben zu finden. Um zu überprüfen, ob die Primerset A positiven Normalgeweben sicher se70-2L10 / se70-2L6 positiv sind und das Expressionsmuster nicht aufgrund einer Koamplifikation von se70-2 und se70-2L10t entsteht, wurde als Bestätigung ein zusätzliches Primerpaar (Primerset D) über den Übergang von se70-2 und se70-2L6 mRNAs gelegt (siehe Abbildung 3-19). Im Gegensatz zu den anderen Normalgeweben waren alle Primerset A positiven Normalgewebe auch Primerset D positiv. Dies bedeutet, dass se70-2L10 und se70-2L6 in diesen Geweben exprimiert sind.

Tabelle 3-15: se70-2 RT-PCR

	Primerset A	Primerset B	Primerset C
Fetale Gewebe	8 / 8		
Dünndarm	+	+	+
Gehirn	+	+	+
Haut	-	-	-
Herz	-	-	-
Knochenmark	-	+	+
Kolon	-	+	+
Leber	-	+	+
Trachea	+	+	+
Lunge	-	+	+
Magen	-	+	+
Mamma	+	+	-
Milz	+	+	+
Niere	+	+	-
Placenta	-	+	+
PMNC	-	+	+
Prostata	-	+	+
Skelett- Muskulatur	-	+	+
Testis	+	+	+
Thymus	+	+	+
Uterus	+	+	+
Adulte Gewebe pos.	7	17	12
Anzahl n	20	20	20
%	35%	85%	60%

	Primerset A	Primerset B	Primerset C
MF01 ⁽¹⁾	+	-	-
SS01 ⁽²⁾	+	+	+
SS02	+	-	-
SS03	+	+	+
HH ⁽³⁾	+	+	+
Hut 78 ⁽³⁾	+	+	+
MyLa ⁽³⁾	+	+	+
SeAx ⁽³⁾	+	+	+
CBCL01 ⁽⁴⁾	+	+	+
CBCL02	+	+	+
CBCL03	+	+	+
ARA-10 ⁽⁵⁾	+	+	+
Nalm-2 ⁽⁵⁾	+	+	+
Skw 6.4 ⁽⁵⁾	+	+	+
KG1 ⁽⁵⁾	+	+	+
K562 ⁽⁵⁾	+	-	-
P3HRI ⁽⁵⁾	+	-	-

Die Tabelle fasst die RT-PCR Ergebnisse der se70-2 Primersets zusammen. Auf der linken Seite ist die Expression der se70-2 Primersets in Normalgewebe, auf der rechten Seite verschiedene lymphoproliferative Erkrankungen aufgeführt. ⁽¹⁾: steht für getestete Mycosis Fungoides cDNA, ⁽²⁾: für Sèzary Syndrom, ⁽³⁾: für CTCL-Zelllinien, ⁽⁴⁾: für kutanes B-Zell Lymphom Tumore und ⁽⁵⁾: für Leukämie Zelllinien. Die grauen Kästchen kennzeichnen eine sichere se70-2 Expression.

Ferner wurden alle Primerset A-positiven Tumor cDNAs (siehe rechte Seite Tabelle 3-15) mit den Primersets B und C getestet. Interessanterweise waren in diesen Proben häufiger eine sichere se70-2 Expressionen zu beobachten (siehe graue Kästchen).

Jedoch kann Klon se70-2 kann nicht als Tumor-Zielstruktur in Betracht kommen, da eine Koexpression nicht ausgeschlossen werden kann.

Da zu Klon se70-2 sehr viele homologe RNAs bekannt sind, ist die Größenordnung in einem Northern-Blot sehr schwierig. So kann die im Northern- Blot tumorspezifische Variante, keiner mRNA zugeordnet werden. Die quantitative Auswertung der Expression ergibt, dass die se70-2 Genfamilie in Testis, Thymus und den CTCL Zell Linen HH, Hut 78 am stärksten exprimiert sind.

4 Diskussion

Es konnte gezeigt werden, dass für das CTCL Tumorantigene existieren, die für eine Immuntherapie in Frage kommen. Eine Gruppe von Antigenen (Cancer Testis Antigene = CT-Antigene), sind ideale Tumor-Zielstrukturen, da sie in keinem Normalgewebe bis auf Testis exprimiert sind.

4.1 CT-Antigene

CT-Antigene, die ihre Bezeichnung auf Grund ihres Expressionsmuster haben, sind in sehr vielen verschiedenen Neoplasien exprimiert. Dieses charakteristische Expressionsprofil ist höchstwahrscheinlich durch eine genomweite Demethylierung in Testis- und Tumorgewebe begründet [90, 92].

Die **MAGE-A** Genfamilie besteht zur Zeit aus mindestens 15 Mitgliedern [104, 110], die X-chromosomal kodiert sind [194]. Gegen die ursprünglich über zytotoxische T-Zellen (CTL) definierten MAGE-A1, MAGE-A2 und MAGE-A3 [23, 116] sind mittlerweile mit verschiedenen Methoden reaktive Antikörper nachgewiesen worden [24, 187, 195]. Die MAGE-A Familie ist die bestuntersuchte CT-Antigen Familie. MAGE-A mRNAs konnten in Gehirn-Neoplasien [179], in Kolon-Karzinomen [104, 196], in Mamma-Karzinomen [104, 197], in Neoplasien des HNO-Traktes [196, 198, 199], in Melanomen [196, 200-203], in Lungen-Karzinomen [196], in Neuroblastomen [204] in Myelomen [205, 206], in Sarkomen [104] und vor kurzem auch in CTCLs [207] nachgewiesen werden.

In klinischen Immuntherapie-Studien werden MAGE-A1, MAGE-A3 Proteine bereits bei Melanomen eingesetzt [2, 208], da diese sehr häufig in Melanomen exprimiert sind [200, 202, 209]. Die MAGE-A Genfamilie konnte auch in dieser Arbeit zu 90% in Melanomen [202] gefunden werden. Im Gegensatz zur höheren Expression von MAGE-A1, konnten MAGE-A2 und -A3 in nur der Hälfte der untersuchten Proben identifiziert werden. In Neoplasien des HNO-Traktes sind die MAGE-Gene ebenfalls sehr häufig, jedoch auch in Kontroll-Geweben exprimiert. In CTCL Geweben sind MAGE-A Transkripte deutlich seltener zu finden [217]. Im Gegensatz zum Melanom sind beim CTCL MAGE-A9 mRNAs allein häufiger als der Rest der MAGE-A Gene zu detektieren.

Die **GAGE**-Gene sind über CTL identifiziert worden [105]. Ein HLA Cw6 präsentierte Epitop konnte eine Melanom Zelllinien lysieren. Eine weitere CTL-Linie reagierte gegen ein HLA-A29 präsentierte Epitop aus dem gleichen Bereich des GAGE-Proteins [210]. GAGE-Gene bilden eine sehr große Antigenfamilie. An cDNA-Banken konnten insgesamt 9 verschiedene GAGE-mRNAs isoliert werden [105, 210]. Nah zu GAGE verwandt sind außerdem sogenannte PAGE und XAGE Antigene, die über differentielle Expressionsanalysen an einem Prostata-Karzinom Modell (PAGE-1 = Prostata-Karzinom assoziiertes Antigen) [211], über Computeranalysen [212] aller möglichen Prostata ESTs (PAGE-2, PAGE-4 und PAGE-4 [213]) und über Computeranalysen krebsassoziierter ESTs (XAGE-1, XAGE-2 und XAGE-3 [214], die alle eine krebspezifische Expression besitzen [215]) gefunden werden. Die Expressionsanalyse der GAGE-Gene ergab eine Cancer Testis spezifische Expression [105], wobei die Antigene GAGE-1,2,8 mRNAs auch in gesunden Gehirn-Geweben gefunden werden konnten [179]. Diese Ergebnisse konnten in RT-PCR Analysen bis auf die Gehirn-Expression bestätigt werden [202]. GAGE-Gene sind häufig in Melanomen und HNO-Tumoren, seltener in Ösophagus-Karzinomen, in Sarkomen, in Lungen-Karzinomen, in Prostata-Karzinomen, in Mamma-Karzinomen, in Kolon-Karzinomen, in Blasen-Karzinomen und in Lymphomen / Leukämien, in Myelomen und nicht in Nierenzell-Karzinomen exprimiert [105, 179, 202, 205, 206, 210]. Die GAGE / PAGE / XAGE Gene bilden eine Antigenfamilie, die nicht auf einen Tumor beschränkt ist. Die Detektion des GAGE-Proteins im Blut konnte mit einer schlechten Prognose von Melanom-Patienten korreliert werden [216]. In Melanomen konnten GAGE Transkripte bis zu 42% [202] und in CTCLs bis zu 40% gefunden werden.

RAGE-1 ist über ein HLA-B7 präsentierte Epitop einer Nierenzell Karzinom Zelllinien identifiziert worden [82]. Die RAGE Gene werden differentiell aus dem Chromosom 14 gespliced [202]. Auf Grund einer Exon Insertion ist das immunogene Epitop nicht im RAGE-4 Protein vorhanden. Durch ein lokalisationspezifisches Splicing der RAGE-Gene ist RAGE-1 vorrangig in Larynx-Tumoren, RAGE-2 in Oropharynx-Tumoren und RAGE-4 in Hypopharynx-Tumoren zu finden [217]. Ferner sind die CDS der einzelnen RAGE-Gene unklar, d.h. das immunogene, CTL erkannte Epitope wird in alternativen kurzen ORFs der Gene kodiert [82]. Auch ein zweites RAGE spezifisches, CTL erkanntes Epitop ist nicht im eigentlichen RAGE-Protein kodiert, sondern in einem kurzen Protein-Bruchstück aus einem alternativen Leserahmen. Expressionsanalysen konnten die mRNAs in keinem Normalgewebe außer Retina wiederfinden [82]. Diese Beobachtungen konnten in der nested-PCR spezifisch

für RAGE-1, -2, -3 nur zum Teil bestätigt werden. Mittels der quantitativeren Northern-Blot Analyse konnten diese mRNAs jedoch nur in Tumoren gefunden werden [202]. Dagegen konnte RAGE-4 im Gegensatz zu den Expressionsstudien von Gaugler und Kollegen auch in der Testis gefunden werden, was zeigt, dass es sich um ein weiteres CT-Antigen handelt [202]. Auf Grund des spezifischen Expressionsmusters sind alle RAGE-mRNAs interessante Kandidaten für eine Immuntherapie. Die RAGE Genfamilie ist bislang mit einem anderen Primer Set untersucht und als sehr gering exprimiert in vielen verschiedenen Tumoren beschrieben worden [82]. Eine genaue Analyse dieses Primerpaares ergab, dass die gewählten Primer schlecht für eine PCR Analyse geeignet sind. Primer TB4 bildet eine „3'Zange“, bei Primer BG16 ist die Gefahr eines selbst-Annealings gegeben und bei Primer BG25 eine zu geringe Hybridisierungstemperatur gegenüber dem Gegenprimer zu beobachten. Demzufolge ist es nicht verwunderlich, dass besser gewählte Primer eher die wahre RAGE Expression zeigen. Eine häufigere Detektionen von RAGE-Transkripten in Tumoren konnten in anderen Arbeiten, z.B. bei Nierenzell-Karzinomen, beobachtet werden [218]. RAGE- mRNAs konnten in Melanom-Geweben ähnlich häufig gefunden werden [202], was auch in der Northern-Analyse bestätigt werden konnte. In Neoplasien der CTCLs konnten dagegen kaum bis keine RAGE-Transkripte gefunden werden.

NY-ESO-1 wurde mittels SEREX Analyse einer Ösophagus-Karzinom Bank [51] und **LAGE** [181] durch eine differentielle RT-PCR-Analyse mit Melanom und gesunder Haut identifiziert. Die Immunogenität von LAGE ist sekundär durch reaktive Antikörper gezeigt worden [107], wobei Kreuzreaktionen zu dem stark immunogen NY-ESO-1 nicht ausgeschlossen werden können. Die LAGE / NY-ESO-1 Gene sind hintereinander auf Chromosom Xq28 lokalisiert. Kürzlich konnte neben LAGE-1a,-1b und NY-ESO-1 ein drittes ebenfalls auf Chromosom X kodiertes homologes Gen identifiziert werden: ESO-3 [219]. Dieses Gen besitzt eine etwas niedrigere Homologie (<50%) und ist im Gegensatz zu LAGE-1 / NY-ESO-1 ubiquitär in Normalgeweben exprimiert [219]. NY-ESO-1 Expression kann in verschiedenen Neoplasien nachgewiesen werden: Blasen-Karzinom, Mamma-Karzinom, Kolon-Karzinom, Melanom, Prostata-Karzinom, und schwach in ovariellen- und Thyroid-Karzinomen [203]. Lee und Mitarbeiter konnten NY-ESO-1 in über 70% der Lungen-Karzinom Zellen nachweisen [101]. Zellulär ist die Expression von NY-ESO-1 z.T. heterogen oder homogen auf das Cytoplasma der untersuchten Melanom Zellen [87, 220] oder in Lungen-Karzinom Zellen cytoplasmatisch, seltener nukleär zu erkennen [87].

Für NY-ESO-1 sind eine Vielzahl von MHC I präsentierten CD8 Epitope, HLA-A2 [122, 221, 222] oder HLA-A 31 [223] präsentiert, bekannt. Ein alternatives Oligopeptid aus einem anderen Leserahmen von LAGE-1 / NY-ESO-1 konnte ebenfalls durch eine CTL Linie erkannt werden. Dieses Epitop CAMEL (CTL Antigen MELanoma) [224] ist HLA-A2 präsentiert und konnte eine Melanom Zelllinien lysieren. Weiter sind für NY-ESO-1 bereits CD4 Epitope identifiziert worden [225, 226]. Gegen NY-ESO-1 waren im Vergleich zu MAGE-A1 und MAGE-A3 in einer ELISA-Untersuchung signifikant mehr Seren reaktiv [195], obwohl NY-ESO-1 deutlich seltener in Melanomen exprimiert ist. NY-ESO-1 scheint sehr immunogen zu wirken. Dies wird bestätigt in einer häufigen simultanen Immunantwort. Humorale (ELISA) und zelluläre (HLA-A2 / NY-ESO-1 spezifische CTLs im Blut) Immunantworten gegen NY-ESO-1 konnten in einem Melanom-Patienten nachgewiesen werden [122]. Selbst Bruchstücke aus NY-ESO-1 sind in der Lage, eine simultane Immunantwort zu induzieren [227]. Jäger und Mitarbeiter konnten eine simultane Immunabwehr in Form von reaktiven Antikörpern und CTLs in 10/11 getesteten Patienten nach einer NY-ESO-1 Vakzine beobachten [228]. NY-ESO-1 wird auf Grund der Expressionsdaten und der starken Immunogenität als sehr interessante Zielstruktur für Neoplasien, insbesondere für Lungen-Karzinome diskutiert [229]. Dagegen sind nach den vorliegenden Analysen LAGE / NY-ESO-1 in CTCLs nicht sehr häufig exprimiert und kommen primär nicht als Zielstruktur in Betracht.

Die Antigene **SSX-2** und **SCP-1** konnten beide in SEREX Untersuchungen gefunden werden [50, 174]. Während SSX-2 häufig in Neoplasien exprimiert wird [230], kann SCP-1 nur selten gefunden werden [174]. Weder SSX-2, noch SCP-1 oder MAGE-B konnten häufig in den untersuchten Neoplasien gefunden werden.

4.1.1 Serologische Immunogenität von CT-Antigenen

Die serologische Erkennung kann als Marker dienen, wie immunogen ein Antigen für das Immunsystem ist. In der serologischen Erkennung von Antigenen durch Seren von Melanom-Patienten sind die MAGE-A Proteine (53%) am stärksten immunogen. Ebenso ist das GAGE-Protein mit 40% im Vergleich zu einem LAGE-1a Protein (13%) häufiger immunogen [187]. So können als Zielstruktur neben den MAGE-A Proteinen auch GAGE-Proteine in Betracht gezogen werden. Weitere stark exprimierte Antigene, wie RAGE oder LAGE-1a müssen den Beweis der Immunogenität noch antreten.

Bislang ist die humorale Immunantwort gegen Tumorantigene nur exemplarisch bekannt. Bislang sind durch SEREX Analysen nur MAGE-A4a und MAGE-A1 gefunden worden [24] und [107]. Gegen MAGE-A1 konnten in 36% aller getesteten Melanom Seren (n=11) reaktive Antikörper nachgewiesen werden. Chen und Mitarbeiter konnten in einer SEREX Analyse an einer Melanom Zelllinien, die MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3 und MAGE-A4 kodierte, mit einem Serum, welches MAGE-A1 Antikörper besaß, nur MAGE-A4a detektieren. Es wird deshalb diskutiert, dass diese MAGE-A Proteine am stärksten immunogen sind [81]. In einem ELISA Testverfahren konnten reaktive Antikörper gegen rekombinant exprimierte MAGE-A1 (1/127) und MAGE-A3 (3/127) Proteine im Serum nur sehr selten nachgewiesen werden [195]. Dagegen konnten Hoon und Kollegen nach einer Melanom Zell Vakzine bei 57% aller getesteten Patienten Anti-MAGE-A1 Antikörper durch eine ELISA-Analyse nachweisen [231]. In der vorliegenden Arbeit konnten beim CTCL erstmalig Anti-MAGE und Anti-GAGE Antikörper als Immunantwort in Patienten nachgewiesen werden. Auffallend ist, dass wenig Kreuzreaktivitäten beobachtet werden konnten. Obwohl MAGE-A3 und MAGE-A6 eine Protein-Homologie von über 97% aufweisen, konnte beim Melanom keine Kreuzreaktivität beobachtet werden [187]. Beim CTCL dagegen reagierte ein Patient gleich gegen mehrere MAGE-A Proteine, so dass hier von Kreuzreaktionen ausgegangen werden muss. Interessant ist, dass alle Tumorantigene beim Melanom gleich verteilt erkannt werden [187], während beim CTCL vor allem MAGE-A9 und GAGE als immunogen beschrieben werden konnte. Häufiger dagegen waren RT-PCR positive Zelllinien mit der korrespondierenden Serumprobe negativ (im Fall von MAGE-1a und vor allem MAGE-A) [187]. MAGE-A war beim Melanom zu 90% exprimiert und wurde nur zu 53% in der SEREX Analyse erkannt. GAGE dagegen war nur zu 20-42% exprimiert, wurde dagegen aber von 40% der Melanom-Patienten erkannt [187]. In der Literatur ist beschrieben, dass ein gewisser Expressionslevel und damit präsentiertes Protein vorhanden sein muss, um eine suffiziente zelluläre Immunantwort auszubilden [232, 233]. Auf das humorale System übertragen, deutet dies für MAGE-A und MAGE-1a auf einen zu niedrigen Expressionslevel hin. Im Gegensatz zur MAGE-A Northern-Blot Analyse waren GAGE-Transkripte in der quantitativen Expressions-Analyse seltener und nur sehr schwach zu erkennen, trotzdem konnte im Serum des Patienten Anti GAGE-Antikörper gefunden werden. Im Gegensatz dazu war gegen das stark exprimierte MAGE-A Protein nur selten eine Immunantwort in Form von Antikörper zu finden. Dies könnte bedeuten, dass ein gewisser Expressionslevel für MAGE-A Proteine vorhanden sein muss, was für GAGE nicht zutrifft.

Beim Vergleich der MAGE-A und NY-ESO-1 Melanom-Immunogenität fällt ähnliches auf. MAGE-A Gene besitzen eine häufige RT-PCR Expression und sind trotzdem nur schwach immunogen. Im Gegensatz dazu wird das seltener exprimierte NY-ESO-1 signifikant häufiger von Tumorseren erkannt [195]. NY-ESO-1 und GAGE-3,4,5,6,7b scheinen einen niedrigeren Schwellenwert als MAGE-A Proteine zu besitzen, um eine humorale Immunantwort auszulösen.

Ebenso kam der Fall vor, dass eine positive Immunantwort in Form eines Antikörper-Nachweises, aber eine negative Expression der Tumorantigene zu beobachten war. Dies könnte - wie oben diskutiert - an Kreuzreaktionen der Antikörper liegen. Allerdings könnte dies darauf hindeuten, dass eine Immunantwort gegen eine andere Metastase des Tumors ausgebildet wurde, die dieses Antigen exprimierte. Außerdem ist denkbar, dass das Expressionsprofil des Tumors sich in Folge von Tumor-Escape Mechanismen [126, 234] verändert hat. **Tumor Immune Escape Mechanismen** sind im Prinzip für jeden Tumor denkbar. Für das Melanom [126] konnte eine Reihe verschiedener Mechanismen beschrieben werden, wie ein MHC I Verlust [234], der auch bei Colorektalen-Karzinomen beobachtet werden konnte [235]. Mutation des β_2 Mikroglobulin Gens auf Chromosom 15, oder TAP-Defekte auf Chromosom 6 sind mögliche Ursachen des MHC I Verlustes.

Eine Immuntherapie zur Stimulierung der körpereigenen Immunantwort gegen einen Tumor kann die Escape Mechanismen nicht revertieren. Beispielsweise lysiert eine Immunabwehr alle MHC I tragenden Tumor-Zellen, jedoch nicht die MHC I negativen Zellen. So wird diskutiert, dass Immuntherapien nur immundefiziente Zellen selektionieren und deshalb nicht erfolgreich sind [235].

4.1.2 Bewertung CT-Antigen beim CTCL

Eine Koexpression der MAGE-A mRNAs ist nur selten zu beobachten ist [200, 202]. Da bislang CTL-Epitope nicht in gemeinsamen Peptidsequenzen lagen [85, 196], war eine Subspezifizierung für die zelluläre Immunantwort zwingende Voraussetzung. Mittlerweile konnten CTLs auch gegen ein gemeinsames Epitop aus MAGE-A1, -A2, -A3, -A4, -A6, -A10 und -A12 identifiziert werden [236]. Damit könnten auch mit den MAGE-A Genen 17% aller CTCLs erreicht werden. Bislang wurden als immunogene MAGE-A Proteine nur MAGE-A1 und MAGE-A3 angesehen [2, 208]. Die immunogene Erkennung der Proteine lässt aber den Schluss zu, dass die anderen MAGE-A Proteine für eine mögliche Immuntherapie ähnlich

interessant sind. Diese Beobachtung ist für das Melanom bereits in anderen Arbeiten diskutiert worden [187, 201]. Als neue Zielstruktur ist auch für das Melanom die GAGE-Familie interessant. Die GAGE-Gene sind zwar seltener in den Melanomen exprimiert, werden aber genauso häufig durch Antikörper in Seren von Melanom-Patienten erkannt.

Die hohe Homologie der GAGE-Gene ermöglicht es, zwischen zwei Gruppen (GAGE-1,2,8 und GAGE-3,4,5,6,7b) zu unterscheiden. Dadurch ist es aber möglich, gemeinsame Epitope aus den GAGE-Proteinen abzuleiten, die von einer CTL-Linie erkannt werden. So sind für die Gruppen je ein gemeinsames CTL-Epitop bekannt [210]. Es ist aber auch denkbar, dass gemeinsame Epitope aus dem identischen Protein-Bereich existieren, wie dies auch für MAGE-A-Proteine beschrieben ist [236]. Diese Idee wird durch die Immunogenität des identischen Teils bei CTCL-Patienten bekräftigt.

In der vorliegenden Arbeit konnte für das CTCL neben cTAGE-1 zwei weitere CT-Antigene identifiziert werden, die als Zielstrukturen für eine spezifische Immuntherapie in Frage kommen. MAGE-A9 ist im Gegensatz zu den anderen MAGE-A Mitgliedern mit 21% am häufigsten exprimiert und wird von vielen CTCL Seren als immunogen erkannt (22%). Noch häufiger sind GAGE-3,4,5,6,7b Transkripte per RT-PCR nachweisbar. Das kodierte Protein wird von 16% der Seren als immunogen erkannt. Andere CT-Antigene, wie LAGE-1a,-1b oder NY-ESO-1 sind zwar häufig in CTCL-Tumoren zu finden. Deren Immunogenität kann aber nicht durch reaktive Antikörper bestätigt werden.

4.2 *Lymphom-assoziierte Antigene*

Anhand der erfolgten Charakterisierung kann eine Abstufung hinsichtlich Priorität und möglicher Relevanz der beschriebenen Antigene des CTCLs erfolgen. Insbesondere durch die gefundenen Homologien kann eine Unterteilung der Antigene erfolgen. Im Rahmen der Untersuchung [97, 98] konnten nahezu alle verschiedenen Antigenklassen im Rahmen des CTCL gefunden werden. Neben Autoantigenen (se20-4 / HRHFBB2216, se37-2 / UBE3A) und einem Virus-induzierten Antigen (se57-1) konnten in Tumoren überexprimierte Antigene (MUC-1, Klon se1-1, Klon se33-1 / NP220), Antigene, die durch differentielles Splicing entstehen (Klon se20-9, Klon se14-3 / rack-7), Lymphozyten-spezifische Differenzierungs Antigene (se20-10 und Lb1), mögliche Onkogene (PAR-3ta, Klon se1-1, Klon se14-3 / rack-7) und CT-Antigene (SCP-1, cTAGE-1, -1B und -5A) identifiziert werden.

4.2.1 Bekannte Lymphozyten assoziierte Antigene

PRAME, MUC-1 und WT-1 sind im Zusammenhang mit lymphoproliferativen Erkrankungen als Tumorantigene beschrieben worden [183, 184, 237]. Das durch CTLs gefundene **PRAME** besitzt ein Cancer-Testis spezifisches Überexpressionsmuster [182]. Eine PRAME Überexpression konnte besonders häufig in humanen Myelomen gefunden werden [205, 206]. Ferner ist bekannt, dass das Wilms-Tumorsuppressor Gen 1 (**WT-1**) häufig bei Leukämien exprimiert wird [238]. In einer Arbeit von Matsushita und Kollegen konnten 21/28 Leukämien positiv auf WT-1 Expression getestet werden [237]. **MUC-1** ist ein glycosiliertes Transmembran-Protein, welches häufig bei Adeno-Karzinomen, Mamma- oder ovariellen Karzinomen überexprimiert wird. MUC-1 ist auch in multiplen Myelomen und B-Zell Non Hodgkin Lymphomen gefunden worden [183]. Es konnte HLA-A2 präsentierte MUC-1 spezifisches CTL identifiziert werden, die Tumoren lysieren konnten [239]. Die Expression dieser Lymphozyten assoziierten Antigene ist für das CTCL evaluiert worden. Während MUC-1 Expression auch für das CTCL beschrieben werden konnte, waren die Antigene WT-1 und PRAME sehr selten in CTCLs exprimiert und sind demzufolge nicht als Vakzin Zielstruktur interessant.

SCP-1 als Zielstruktur ist auf Grund des Expressionmusters in Testis und Tumoren sehr interessant, da es quantitativ (Northern-Blot Analyse) und auf Protein Ebene (Western-Blot Analyse) in Tumoren nachgewiesen werden konnte [174]. Expressionsanalysen zeigen, dass SCP-1 in vielen verschiedenen Neoplasien exprimiert ist, jedoch immer in sehr geringen Häufigkeiten [47, 99]. In eigenen Vorarbeiten konnte per RT-PCR nur 1 CTCL Tumor-Gewebe von 20 positiv getestet werden [97, 98]. Nestle und Mitarbeiter konnten dagegen eine sehr viel höhere Expression in MF und pleomorphen CTCLs nachweisen (14/25) [207]. Eine größere Anzahl zu testender CTCL-Proben muss klären, ob SCP-1 eine Zielstruktur für eine Immuntherapie des CTCLs ist.

4.2.2 Autoantigene

Zu in CTCL definierten Klonen [97, 98] konnten Homologien zu häufigen Autoantigenen gefunden werden. Hierzu zählen z.B. die nukleären Antigene gegen centromere Proteine (HRIHFB2216). Diese Strukturen sind seit langem als häufige Ziele autoimmunologischer

Reaktionen bekannt und häufig in diesem Kontext beschrieben [240]. Zudem ist bekannt, dass Autoantikörper gegen diese Antigene de novo oder in ansteigenden Titerverläufen bei malignen Erkrankungen auftreten [241] und im Gegensatz zu experimentell induzierten Autoantikörpern oftmals mit funktionell bedeutenden Epitopen dieser Antigene interagieren [242]. Außerdem haben alle der in diesem Kontext gefundenen Autoantigene Einfluss auf die Regulation der Zellbiologie.

Klon se20-4 konnte in der Expressionsanalyse nicht spezifisch beschrieben werden und war auch als Protein se20-4 in der serologischen Analyse [97, 98] nicht spezifisch. Die Homologien zu HRIHFB 2216, einem kernbindenden ubiquitären Protein [243], TGF-beta1 target protein (DENTT), einem TGF-beta-bindenden Regulations-Protein [244] und einem Zell-Teilungs-spezifischen ubiquitären Autoantigen CDA-1 [245] zeigen, dass das Protein se20-4 ein Autoantigen ist. Klon se20-4 ist deshalb nicht weiter für serologische Analysen, für Immunmonitoring oder Diagnose des CTCLs bzw. anderer Neoplasien interessant.

In der Expressionsanalyse ist **Klon se37-2** [97, 98] und verwandte mRNAs per RT-PCR, Northern-Blots und virtuellen Northern ubiquitär. Dagegen scheint eine 22 Aminosäure Verkürzung in der Proteinsequenz des Klons se37-2 bedingt durch alternatives Splicing des 4.Exons im UBE3A –Gens auf Chromosom 15q11-13 [246] eine serologische spezifische Erkennung von Tumor-Seren zu bewirken. Weitere Analysen müssen klären, ob dieses kurze Oligopeptid aus einem Autoantigen für einen diagnostischen oder serologischen Marker in Frage kommt.

4.2.3 Virus induzierte Antigene

Klon se57-1 konnte homolog zu einem RSV-(respiratory syncytial virus) induzierten Gen (Acc. Nr.: AK058097) gefunden werden. Das RSV Virus gehört zur Familie der Paramyxoviren, Gattung Pneumovirus. Es existieren wirtsangepasste Formen, z.B. das humane RSV oder das bovine RSV. Das RSV ist ein Minus-Strang-RNA Virus, der 15222 Nukleotide, die in 10 Genen für 11 Proteine kodieren, besitzt. Das humane RSV bewirkt akute Atemwegsinfektionen besonders im Säuglings- und Kleinkindalter, die von einfachem Schnupfen über Kehlkopfkrankungen bis hin zur Bronchitis und Lungenentzündung führen können. Häufig treten Bronchiolitis Entzündungen der kleinsten knorpelfreien Bronchien auf. Eine Virus-Infektion der Epithelien des Atemwegstraktes führt zu typischen Zellveränderungen mit Bildung von Synzytien und eosinophilen zytoplasmatischen

Einschlusskörperchen. RSV besitzt kein Hämagglutinin und keine Neuroaminidasen [247, 248]. RSV-Infektionen treten auch bei Adulten auf, die sich in ernsthaften Pneumonien niederschlagen. Der RSV-Virus löst humorale (IgG) und zelluläre Immunantworten aus [248].

Die untersuchte Expression des RSV ergab, dass RSV in nur wenigen Tumoren gefunden werden konnte. Dieses Expressionsprofil konnte nicht mit der Expression von se57-1 korreliert werden. Ein CTCL, eine Leukämie und ein Melanom zeigen keine signifikanten Unterschiede zu den seltenen RSV Infektion bei Erwachsenen [248]. In der Literatur konnte das RSV in Zusammenhang mit Krebs nur sehr selten gefunden werden, z.B. konnte einmalig ein CTCL Patient mit RSV in Verbindung gebracht werden [249]. Dagegen ist RSV als Hospiz-Virus beschrieben worden [250]. Es ist also nicht auszuschließen, dass die beobachteten RSV positiven Tumor-Gewebe dadurch entstanden sind.

Gegen das Protein des Klons se57-1 waren zwar 3/14 Seren reaktiv [97, 98], jedoch konnte in der Expressionsanalyse nur ein positives CTCL identifiziert werden. Da se57-1 mRNA und RSV nur sehr selten in CTCLs vorhanden sind, ist es zweifelhaft, ob CTCL ein RSV-induzierter Tumor ist. Ferner ist die Virus-Induktion des Antigens nicht auf CTCL beschränkt, da auch andere Neoplasien (Leukämien, Melanomen, aber nicht HNO-Tumore oder Kolon Tumore) positiv für RSV getestet wurden. Die RSV Infektion scheint ein seltener aber weitverbreiteter Mechanismus zu sein, der nicht signifikant mit Karzinomen korreliert werden kann.

In der quantitativen Northern-Blot Analyse konnte kein se57-1 Transkript nachgewiesen werden, ebenso konnte in 6×10^5 durchsuchten Rekombinanten kein se57-1 verwandter Klon identifiziert werden. Anscheinend ist se57-1 nur auf einem geringen Expressionslevel vorhanden. se57-1 Antigen kann somit nicht als Tumorstoff dienen. Auch für einen Diagnostiktest ist dieses Antigen auf Grund der seltenen Expression und wegen des geringen Expressionslevels nicht geeignet.

In anderen Arbeiten konnte das CTCL mit dem HTLV-1 (humanes T-Zell lymphotropes Virus Typ 1), der als Ursache für die Adulte T-Zell Leukämie/Lymphom (ATLL) beschrieben ist, in Verbindung gebracht werden [145]. HTLV-1 konnte in CTCL Tumoren nur sehr selten gefunden werden [251, 252]. Dagegen konnte ein HTLV-1 abgeleitetes Protein p140TAX in allen untersuchten CTCL-Tumoren gefunden werden [147, 253] gegen das CTCL Patienten auch Antikörper besaßen [254]. p40Tax ist ein unerwartetes Protein im 3' Bereich des HTLV-

1 Genoms, welches in Routineuntersuchungen des HTLV-1 nicht berücksichtigt wird. Ferner konnten Studien bestätigen, dass p40Tax auch in Abwesenheit des HTLV-1 Virus im Genom persistieren kann [255]. So wird das p40Tax als Virus-Onkogen für das CTCL angesehen.

4.2.4 Autoantigene mit tumorpezifischer Immunogenität

Eine Reihe CTCL assoziierten Antigene, sind überexprimierte Antigene [97, 98]. Dessen Expression wird durch eine maligne Transformation erhöht und somit einen Schwellenwert überschritten, wodurch eine Immunantwort ausgelöst wird. Diese zum Teil auch ubiquitär exprimierten Antigene werden sehr häufig durch die SEREX Methode erfasst [47, 52]. Diese Antigene eignen sich nicht für eine Immuntherapie, da sich eine induzierte Immunantwort auch gegen gesunde Gewebe richten würde. Doch sind diese Antigene als diagnostischer Marker von großem Interesse, da alle eine tumorspezifische Immunogenität besitzen.

Klon **se20-7 / Golgin** ist ein in jeder Zelle stark exprimiertes Gen. Genauso ist die Klon **se2-2 / KIAA0373** Familie per RT-PCR und Northern-Blot nicht spezifisch exprimiert [97, 98]. Trotz des ubiquitären Expressionmuster ist das se20-7 / Golgin Protein ein interessanter Kandidat für weitere Analysen, da mehrere unabhängige SEREX Analysen die serologische Spezifität bestätigt haben. Neben CTCL Seren waren auch Seren anderer Neoplasien, wie des Mamma-Karzinoms, Bronchial-Karzinoms und Magen-Karzinoms gegen das Antigen se20-7 positiv. Auch das Antigen se2-2 wurde nur von Tumorseren erkannt. Zusammenfassend sind die Proteine se20-7 und se2-2 auf Grund der serologischen Spezifität weitere Kandidaten für Diagnose- oder Immunmonitoring des CTCLs und auch anderer Neoplasien.

Da nach den Computeranalysen Golgin und das KIAA0373 Protein nicht membranständig sind, kommen diese Antigene nicht als überexprimiertes Tumorantigen nach Vorbild des Her2/neu für Antikörpertherapien in Frage. Genaue zelluläre Lokalisationen oder der Nachweis von spezifischen CTLs einer erfolgten zellulären Immunantwort, der auch für andere Auto-Antigene beschrieben werden konnte [256], müssten überprüfen, ob se2-2 respektive se20-7 für eine Immuntherapie in Frage kommen.

4.2.5 Überexprimierte Antigene

Überexprimierte Antigene werden als Vakzinierungs-Zielstrukturen eingesetzt, wenn sie spezifisch als Membranprotein erkannt werden können. Das membranständige Her2/neu dient in vielen Studien als Zielstruktur für antikörperbasierte Immuntherapien. Die Tyrosin Kinase

Rezeptoren ErbB bestehen aus 4 homologen Rezeptoren (ErbB1-4). ErbB2 (Her2/neu) ist vor allem bei Brust-Krebs Patientinnen überexprimiert [67], weshalb Her-2/neu als Zielstruktur für Antikörpertherapien eingesetzt wird [9].

MUC-1 (CD227) ist ein weiteres Beispiel für ein membranständiges immunogenes Antigen, das mit 1000-2200 AS ins apikale Lumen eine extrazelluläre Domäne und mit 72 AS eine intrazelluläre Domäne besitzt. Die extrazelluläre Matrix besteht aus alternativ gesplittenen 20 Aminosäure großen Tandem-Repeats, die so durch eine unterschiedliche Anzahl der Tandem-Repeats die Größe variieren. Diese extrazelluläre Matrix bildet bei gesunden Zellen eine Mucosa, deren Funktion im Schutz vor Pathogenen oder im Bereich des adhäsiven Zellkontaktes anzusiedeln ist. MUC-1 besteht aus 50-90% seiner molekularen Masse aus Glycolisierungen, die bei malignen Erkrankungen stark reduziert ist. Bei malignen Erkrankungen ist MUC-1 überexprimiert, weniger glykolisiert und die Expression nicht auf den apikalen Bereich beschränkt. So zerstört das „maligne“ MUC-1 den dichten Zellkontakt [257-259]. MUC-1 wurde als überexprimiertes Antigen bei Mamma-Karzinom Patienten entdeckt. Dies wurde mit einem höherem Metastasierungspotenzial und verschlechterter Prognose in Zusammenhang gebracht. Es konnten CTL gegen MHC präsentierte MUC-1 Epitope generiert werden und Antikörper mit einer verbesserten Prognose bei Brust-Krebs Patientinnen korreliert werden. Dies zeigt, dass gegen MUC-1 eine integrierte Immunantwort stattfindet [257, 258, 260]. Diese Beobachtung kann auf andere Neoplasien, wie z.B. dem multiplen Myelom übertragen werden [261]. Beim Mamma-Karzinom wird MUC-1 bereits als Vakzine eingesetzt [262, 263].

Während die mRNA des **Klons se33-1** [97, 98] in Tumoren überexprimiert wird, besitzt das Protein se33-1 keine membranständige Funktion. NP220 / se33-1 ist ein transkriptionaler Regulator, der im Zellkern DNA bindende Eigenschaften besitzt. Daher kommt das Protein se33-1 nicht nach Vorbild des Her-2/neu für eine Antikörpertherapie in Frage, sondern auf Grund der Überexpression als neue Zielstruktur nach Vorbild des MUC-1. Die Immunogenität konnte durch Reaktivität von Seren verschiedener Tumor-Patienten bestätigt werden. Dagegen wurde ein verwandtes Protein auch durch Antikörper in Normalseren erkannt, während zwei weitere SEREX-Varianten tumorspezifisch in der serologischen Erkennung waren. Da das autoantigene Protein leider nicht verfügbar ist (nur eine 5' Ansequenzierung), muss von signifikanten Unterschieden im C-Terminus ausgegangen werden.

4.2.6 Splicing-Antigene

Die mRNA des Klons se14-3 konnte als eine Splicingvariante des KIAA1125 beschrieben werden [97, 98]. Die se14-3 / rack-7 spezifische Deletion ist durch alternatives Splicing entstanden und war weder per RT-PCR noch mittels Northern-Blot Analyse tumorspezifisch. Im Gegensatz dazu ist die Erkennung des Proteins spezifisch, d.h. keine gesunden Personen haben gegen se14-3 / rack-7 reaktive Antikörper im Blut. **Klon se20-9** zeigt eine spezifische Insertion, die in Frame liegt und für Klon se20-9 spezifisch ist [97, 98]. Die Expressionsanalyse zeigt, dass diese Deletion in nur 7/18 verschiedenen Normalgeweben und in 29% der untersuchten CTCL-Tumoren vorhanden ist. Somit ist die Deletion keine tumorassoziierte Mutations- / Splicingform. Die Northern Analyse ergab, dass eine Splicing Variante der se20-9 Genfamilie in CTCL-Tumoren überexprimiert ist. Reaktive Antikörper gegen se20-9 verwandte Proteine konnten auch in anderen SEREX Analysen detektiert werden, z.T. auch in Normalseren. Es ist jedoch nicht klar, ob diese Proteine die spezifische Insertion enthalten, da eigene Vorarbeiten das Protein serologisch spezifisch beschreiben. Zusammenfassend sind die Proteine se14-3 und se20-9 auf Grund der serologischen Spezifität weitere Kandidaten für Diagnose- oder Immunmonitoring des CTCLs und anderer Neoplasien. Für beide abgeleiteten Proteine müssten nun in den Aminosäuren-Unterschieden nach immunogenen Strukturen für eine mögliche Immuntherapie gesucht werden, d.h. eine genauere Analyse der durch die Insertion zusätzlich entstandenen kurzen Aminosäuresequenz müsste den Wert z.B. des Proteins se20-9 neu bewerten.

Zu Klon **se70-2** konnten über HYREX 2 verschiedene mRNAs identifiziert werden. Der SEREX definierte Klon war gegenüber den anderen mRNAs 5' deletiert. Die Unterschiede der mRNAs haben ihre Ursache im Fehlen der 5' Exons. So fehlen der Splicingvariante se70-2 die ersten 10 Exons und se70-2L6 3 Exons gegenüber der se70-2L10 Sequenz. Andere, z.B. 3' deletierte Splicing-Varianten konnten nicht detektiert werden, da mit einer se70-2 Sonde die cDNA Banken durchsucht wurden. Die Splicing-Varianten wurden einerseits von Seren unterschiedlich erkannt und andererseits auch unterschiedlich exprimiert. Während se70-2 nur von Tumorseren erkannt wurde, reagierten die Proteine se70-2L6 und se70-2L10 auch gegen Seren gesunder Spender.

Es konnte gezeigt werden, dass die verkürzte Variante se70-2 in CTCL Tumoren, aber fast nie in Normalgeweben zu finden ist. Ebenso konnte nachgewiesen werden, dass eine verkürzte 3'Splicing-Variante (se70-2L10t) sehr häufig in Normalgeweben exprimiert ist. Es

ist folglich denkbar, dass reaktive Normalseren gegen die 3' verkürzte Splicing-Variante se70-2L10t reagiert haben. So kann es sein, dass auf Grund der Akkumulation des se70-2 Proteins bei CTCL Tumorpatienten in eine starke Immunantwort ausgelöst worden ist. Wenn die Antikörper aus CTCL-Patienten gegen das Protein se70-2 und die Antikörper der Normalseren gegen das C-terminal verkürzte Protein se70-2L10t gerichtet sind, ist das Protein se70-2 auch als diagnostischer, serologischer Marker sinnvoll, was durch die SEREX Ergebnisse bestätigt werden konnte. Jedoch ist eine Anwendung als Zielstruktur einer Immuntherapie gegen dieses Protein nicht anwendbar, da auch zahlreiche Normalgewebe (se70-2L6 und se70-2L10 positive Gewebe) diesen Proteinabschnitt tragen. Wenn obige Annahmen (se70-2 Überexpression in Tumorgeweben) mittels einer quantitativen Proteinexpressionsanalyse bestätigt werden könnte, wäre ein therapeutischer Antikörper gegen das se70-2 Protein denkbar, genauso wie als immunhistochemischer Differenzierungsmarker des CTCLs.

Interessanterweise waren in den Datenbanken eine Vielzahl von Homologen zu Klon se70-2 zu finden, die alle im Zusammenhang mit Krebs identifiziert worden sind. So liegt die Vermutung nahe, dass Klon se70-2 nicht nur auf eine Tumor-Art beschränkt ist.

4.2.7 Onkogene

Klon se2-5 / PAR-3ta Expressions Analysen zeigen keine tumorspezifischen Varianten per RT-PCR, was nach der Northern-Blot Analyse nicht zu erwarten war. Die SEREX Analyse zeigt, dass das N- und C-terminal verkürzte Proteine (PAR-3ta) die einzig immunogene tumorspezifische Variante ist. Diese Beobachtung wird durch Überexpression der korrelierenden Größe in Tumorgeweben in der Northern-Blot Analyse unterstützt.

Das Protein PAR-3ta ist homolog zu PAR-3, welches im Zusammenhang mit rezeptorvermittelten Signaltransduktionen beschrieben worden ist. Die **Eph Familie** ist ein Tyrosin-Kinase Rezeptor, dessen Liganden (Ephrine) C-terminal an den Eph Rezeptoren binden. Die Ephrine unterscheiden sich in zwei Gruppen (A und B). Der Ligand Ephrin B besitzt eine extrazelluläre-, ein transmembrane- und im Gegensatz zu den Ephrinen A auch eine cytosolische Domäne. So wird diskutiert, dass die Eph / Ephrin eine beidseitige Signaltransduktion über direkten Zell-Zell Kontakt vermitteln, was durch Phosphorylierung des Ephrin B bei Eph Kontakt bestätigt werden konnte. Ephrin B besitzt neben der konservierten Phosphorylierungsstelle zum Binden von Proteinen ein PDZ Motiv. Durch

Suche der intrazellulären Bindungspartner von Ephrin B konnte unter anderem PAR-3 identifiziert werden [264]. Das Protein PAR-3 (partitioning defective) spielt eine Schlüsselrolle bei der asymmetrischen Zellteilung, z.B. im embryonalen Stadium bei *C.elegans* [265]. Dies wird über einen Proteinkomplex aus PAR-6, Cdc42, Rac-1 und PKC Isoformen auch im mammalian / humanen System als PAR-3 Funktion beschrieben [266]. G-Proteine, die auf der Innenseite der Cytoplasma-Membran lokalisiert sind und durch Hydrolyse von GTP eine stimulierende oder inhibierende Signalkaskade in Gang setzen, sind z.B. Rho, Rac, Cdc42, Rad, Ran, Arf oder Rab/Ypt [267]. PAR-3 spielt eine wichtige Rolle bei Signaltransduktionen als Bindungspartner des G-Proteins cdc42 und als cytosolischer Bindungspartner des EpH Rezeptor-Liganden Ephrin B. PAR-3 ist somit zweimal unabhängig im Zusammenhang mit Signaltransduktionen identifiziert worden. Das humane PAR-3 besitzt 3 PDZ Bindungsdomänen, die für Protein-Interaktionen verantwortlich sind [268]. Im Vergleich der Proteine PAR-3, der identifizierten HYREX Klone PAR-3G, -3C und -3D (se2-5L11, se2-5T2 und se2-5L16r), sowie des immunogen spezifischen PAR-3ta (se2-5) fällt auf, dass allein PAR-3ta die erste der drei PDZ Bindungsdomänen nicht besitzt. Es ist also denkbar, dass das nicht tumorspezifische Splicingprodukt PAR-3ta als Onkogen in einer malignen Zelle wirkt. Durch eine fehlerhafte Signalkaskade kann es in der Zelle zu fehlerhaften Signalübertragungen und dadurch zur malignen Transformation und schließlich auch zu einer Akkumulation von PAR-3ta in der Zelle kommen, so dass die starke Expression in der Northern-Bot Analyse und die serologisch spezifische Erkennung erklärt werden kann.

In der Literatur sind viele Beispiele für onkogene, immunogene Proteine zu finden. Die ras-Familie besteht aus 3 eng verwandten ras Onkogenen (h-ras, n-ras und k-ras). Während h-ras und n-ras 4 Exons besitzen, wird bei k-ras das 4. Exon alternativ aus 2 verschiedenen Exons gespliced. Das ras-Onkogen tritt durch 4 verschiedene konservierte Punktmutationen auf (Kodon 12, 13, 59, 61), die eine Aminosäuren-Substitution bewirken. Diese Mutationen sind in nahezu allen Neoplasien zu beobachten. Die Mutationen bewirken, dass die GTPase Aktivität von ras blockiert und ras konstitutiv aktiviert vorliegt und so die Zelle zur Proliferation anregt [269]. ras-Mutation sind schon in frühen Tumorstadien vorhanden, so dass diese Mutationen als molekularer Marker zur Früherkennung z.B. villöser Adenome des Kolons dienen können [269-271]. Im Falle des Onkogens PAR-3ta führt nicht eine Punktmutation zu onkogenen Transformation, sondern ein differentielles Splicing aus Chromosom 10, durch das die normale Funktion des PAR-3 Proteins gestört wird. Ein anderes CML spezifisches Onkogen ist durch die bcr/abl Translokation begründet. Die

Effektorfunktion der veränderten Tyrosin Kinase (Hydrolyse des ATPs) ist gestört, weshalb es zu Proliferation der Zelle kommen kann. Durch einen kompetitiven Hemmer des ATPs, GLIVEC kann dies verhindert werden. GLIVEC wird bereits in Therapie Ansätzen getestet [272].

In zwei weiteren Fällen der untersuchten Antigene könnte eine deletierte Variante eines größeren Proteins als onkogener Faktor wirken. Dem Protein des Klon se1-1 fehlt eine GRIP-Domäne gegenüber der Voll-Längen Variante KIAA0336. Diese coiled-coil Domäne dient normalerweise als Bindungsdomäne zum Golgi-Apparat [273, 274]. Klon se14-3 ist ebenfalls N-terminal deletiert. In dieser Deletion sind alle regulatorischen Bestandteile des Proteins KIAA1125 (PHD-Finger, Bromodomäne, PWWP Domäne) lokalisiert. Ein Bromodomän Protein ist in einer anderen Arbeit als antigene Struktur beschrieben worden, gegen das eine humorale Immunantwort stattgefunden hat [114]. Das Bromodomain Motiv ist ca. 60 Aminosäuren lang, formt zwei α Helices und ist an Protein Interaktionen beteiligt. Diese Domänen werden häufig bei Transkriptionsfaktoren gefunden [275-277]. Das PHD-Finger Motiv ist eine DNA / RNA bindende Domäne [278, 279], während die Funktion einer PWWP Domäne (konservierte Abfolge: Prolin – Trytophan – Trytophan – Prolin) unklar ist [279]. Es ist also denkbar, dass in diesen Fällen gerade der Verlust dieser regulatorischen Elemente des Proteins se14-3 zu einer malignen Transformation beigetragen hat. Der Fehler in der Signalkaskade des PAR-3ta oder im sekretorischen System der Zelle (Klon se1-1) kann zur malignen Transformation durch andauernde oder fehlende Signale, respektive durch Akkumulation von Proteinen, führen. Weitere Experimente, wie eine genauere funktionelle Charakterisierung über Transfektionsexperimente, Knock-Out Experimente oder durch Auffinden von Proteinbindungspartnern würden diesen Hinweis genauer klären.

4.2.8 Neue Lymphom spezifische-Antigene

Trotz der Unterschiede in der mRNA Sequenz sind die Aminosäure-Sequenzen der Antigene **Klon se1-1**, KW-11, NGO-St-38 und NGO-Pr-1 nahezu identisch [97, 98]. Demzufolge ist die serologische Reaktivität direkt vergleichbar und Klon se1-1 für weitere Analysen hoch interessant, da reaktive Antikörper gegen ein homologes Protein (KW-11) in CLL- und in 3/5 weiteren Lymphom-Seren zu finden waren. Eigene Vorarbeiten und Klon KW-11 konnten die tumorspezifische Immunogenität bestätigen, dagegen zeigt eine andere SEREX Analyse gegen NGO-St-38 reaktive Antikörper in Kontroll-Seren. Es müssen Unterschiede in der

Aminosäuresequenz vorliegen, die dies begründen. Daher ist auch eine Cluster-Expression per Virtuellen Northern nicht aussagekräftig, da dieser Unterschiede nicht erfasst werden. Auch die Northern-Blot Analyse zeigt eine kleinere Bandengröße als die Konsensussequenz des Virtuellen Northern. Diese Bande (3,9kb) zeigt eine Überexpression in CTCL-Linien. Klon se1-1 ist aufgrund der serologisch häufigen Detektion von Lymphomen und der mRNA Überexpression in Tumor-Linien ein Kandidat für weitere Analysen. Für dieses Tumorantigen müsste der Nachweis einer zellulären Immunantwort erbracht werden.

Ähnlich ist die Situation des Klons **se20-10**. Die neu identifizierte Lymphom assoziierte Genfamilie (LAA) ist häufig bereits in Zusammenhang mit Lymphomen, wie bei der Sequenzierung einer CML oder bei einer differentiellen PCR eines diffusen großzelligen B-Zell Lymphoms (Lb1), identifiziert worden. Lb1 konnte durch Maouche-Chretien und Kollegen [280] per differentieller PCR an verschiedenen großzelligen B-Zell Lymphomen entdeckt werden. Durch Suche nach der Voll-Längen mRNA in der T-Zelllinien Jurkat konnte Lb1 als 3,3kb mRNA identifiziert werden. Anzumerken ist, dass nach jetzigem Wissenstand eine DNA-Suche mit einem kurzem Amplikon mehrere Varianten der LAA- mRNA detektieren könnte. So ist denkbar, dass eine andere LAA-Variante per differentieller PCR amplifiziert wurde, z.B. se20-10. Leider ist die genaue Sequenz des Amplikons nicht erhältlich, um die wirklich differentiell expimierte mRNA zu identifizieren. FISH Analysen und die Northern-Blot Analysen [280] konnten in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Das SEREX definierte Antigen se20-10 und Lb1 konnten serologisch CTCL-spezifisch beschrieben werden. So sind se20-10 und Lb1 zwei Lymphom spezifische Antigene. Die positive Expression in PMNCs der se20-10 mRNA bei negativer Expression der restlichen Normalgewebe (Ausnahmen: immunprivilegierte Organe Testis und Placenta) zeigt, dass se20-10 ein Lymphozyten-spezifisches Differenzierungs Antigen ist. Da die nah verwandten mRNAs, wie CKAP2, anscheinend nicht tumorspezifisch sind, kann die quantitative Aussage einer Northern-Blot Analyse als Anhalt dienen. Die nur im Tumor und Testis beobachteten Größen (3,5 kb) können nur den Klonen se20-10 und Lb1 zugeordnet werden. se20-10 / Lb1 scheinen eine neue Familie lymphomassoziierter Differenzierungs-Antigene zu bilden.

4.3 *cTAGE-Familie*

cTAGE-1 wurde in vorangegangenen Arbeiten als erstes CTCL assoziiertes CT-Antigen entdeckt [97, 98]. Die im Northern-Blot begründete Vermutung, dass cTAGE-1 analog zu

anderen CT-Antigenen zu einer Multigenfamilie gehört, konnte bestätigt werden. Durch einen 5' RACE aus cTAGE-1 konnte cTAGE-2 gefunden werden. cTAGE-2 zeigte im Gegensatz zu cTAGE-1 auf der genomischen Ebene eine Multigenfamilie an. Durch eine cDNA Suche konnten 4 weitere cTAGE-mRNAs identifiziert werden. Die neu identifizierten mRNAs zeigen eine hohe Homologie zu den SEREX gefundenen, Meningiom-assoziierten Antigenen MGEA-6 und MGEA-11. cTAGE-2, cTAGE-3, cTAGE-4, cTAGE-5A, cTAGE-5B, cTAGE-5C / MGEA-6 und cTAGE-5D / MGEA-11 zeigen alle eine sehr hohe Homologie um die kodierende Sequenz, differieren aber erheblich in den 5' und 3' Enden der mRNAs. Im 3' Ende von cTAGE-2 ist cTAGE-1 lokalisiert, so dass cTAGE-1 keine Homologie zu den anderen cTAGE mRNAs besitzt.

4.3.1 Tumorspezifisches Splicing

cTAGE-1 und cTAGE-2 sind auf Chromosom 18p11.2 lokalisiert. Es konnte gezeigt werden, dass auf diesem kurzen chromosomalen Abschnitt 5 verschiedene mRNAs gespliced werden. Diese mRNAs zeigen unterschiedliches Expressionsverhalten. Während cTAGE-1,-1B und -2 außer in Testis Gewebe in keinem Normalgewebe vorhanden sind, finden sich cTAGE-1C und cTAGE-2s auch in einigen Normalgeweben (14%, 21%). Da cTAGE-1 und cTAGE-1B auch in Tumoren exprimiert sind, konnten aus dieser chromosomalen Region zwei mRNAs identifiziert werden, die tumorspezifisches Splicing zeigen.

Aus Chromosom 14 wird ein Multi-Exon Gen bestehend aus 26 Exons zu 4 verschiedenen mRNAs gespliced, wobei jeder mRNA 1-3 Exons fehlen. cTAGE-5A fehlt Exon 2, cTAGE-5B Exon 1, cTAGE-5C / MGEA-6 Exon 1 und 26 und cTAGE-5D / MGEA-11 Exons 1, 20 und 26. Diese mRNAs zeigen per RT-PCR vollkommen unterschiedliche Expressionen (cTAGE-5A: 1/28 Normalgewebe, cTAGE-5B 4/28, cTAGE-5C / MGEA-6 9/28 und cTAGE-5D / MGEA-11 in 4/28). Da alle cTAGE-5 mRNAs auch in Tumoren nachweisbar waren, ist cTAGE-5A ein weiteres tumorspezifisches Splicing Produkt.

Die CT-Antigenfamilie LAGE-1 / NY-ESO-1 zeigt ein sehr ähnliches Splicing- / Expressions-Muster. Während LAGE-1 und NY-ESO-1 tumorspezifische Splicingvarianten sind, ist eine dritte Variante, ESO-3, ubiquitär exprimiert [219]. Gewebesspezifisches Splicing ist ein bekanntes Phänomen. Am Beispiel des Oberflächenmarkers CD44 konnten verschiedene Splicing Produkte als mögliche Faktoren für Prognose und den Metastasierungs-Grad korreliert werden [59-61]. Genauso konnten bei den Tumorsuppressor

Genen p53 [41] und WT-1 (Wilms Tumor-1) [281] tumorspezifische Splicing-Produkte beobachtet werden.

4.3.2 Pseudogene

cTAGE-2, cTAGE-3 und cTAGE-4 wurden als mRNAs isoliert, die chromosomal in einem Exon lokalisiert sind. Da cTAGE-5 aus 26 Exons aus Chromosom 14 gespliced wird, kann man vermuten, dass cTAGE-2, cTAGE-3 und cTAGE-4 retro-transpositionell entstandene Gene aus dem aktiven Locus von Chromosom 14 sind. Nach Literatur sind das i.d.R. untranskribierte Gene, die deshalb auch Pseudogene genannt werden. Pseudogene entstehen durch Retrotransposition oder genomische Duplikation [282]. In einer Arbeit von Comtesse and Mitarbeitern wurde genau diese Retrotransposition von cTAGE-5C / MGEA-6 im Genom untersucht. Sie konnten 9 Pseudogene im Genom finden, die auf den Chromosomen 2q, 3q, 6q, 7q, 9, 10, 12, 13q und 18p11.2 liegen [189]. Eine Analyse der cTAGE-Sequenzen konnte noch zusätzliche Homologe in den Sequenzen der Chromosomen 6, 7 und 13 finden.

Retrotransposition

Prozessierte Pseudogene und Retroposons entstehen durch reverse Transkription polyadenylierter Transkripte, die sekundär ins Genom integriert werden. Retroposons gliedern sich in LINE- (long interspersed DNA sequences, z.B. das humane L1 Sequenzen) und in SINE- (short interspersed DNA sequences, z.B. Alu Sequenzen) Elementen [282, 283]. Prozessierte Pseudogene besitzen keine Introns und keinen 5'-Promoter, dagegen aber flankierende direkte Wiederholungen und ein 3' Poly A Signal [284]. Die meisten dieser Punkte treffen auf die Sequenzen von cTAGE-2, -3, -4 und der durch Comtesse und Mitarbeitern identifizierten Pseudogene zu [189].

Pseudogene durch Duplikation von genomischer DNA

Genom-Duplikationen sind wichtige evolutionäre Phänomene, die bei komplexen Genomen, z.B. der Antikörper- und MHC-Vielfalt, eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Genfamilien aus einem einzelnen Gen spielen. Im Prinzip sind die Gene nach einer Duplikation noch funktionell. In der Regel sind diese Gene aber unvollständig im Genom reintegriert, wie z.B. beim Gen BRCA-1. Das Pseudogen ψ BRCA1 beinhaltet nur Exon 1a, 1b und 2 aus dem Ursprungs-Gen, d.h. es ist durch unvollständige Duplikation entstanden und somit kein funktionales Protein [285]. Die chromosomalen Zuordnungen (6, 7, 7q) von

cTAGE-4 sind ebenfalls durch genomische Duplikation eines 32kb / 15kb Abschnittes entstanden.

Lokalisation von Pseudogenen

Pseudogene können überall im Genom erscheinen. Sie treten häufig in Clustern auf, was auf den Mechanismus der Retrotransposition zurückzuführen ist. Genauso können aber auch einzeln liegende Pseudogene vorkommen, wie z.B. bei der cTAGE-Genfamilie. Zum Immunoglobulin $\nu\lambda$ light chain Gen gibt es geclusterte Pseudogene mit dem funktionalen Gen auf Chromosom 22q11.2, dagegen liegen zwei einzelne Pseudogene auf Chromosom 8q11-2 [286].

Retrotransposition in Exons nicht verwandter Gene konnte bei ATP7 [287] und p53 [288] beobachtet werden. Dies kann auch für cTAGE-4 auf den Chromosomen 6 und Chromosom 7 wiedergefunden werden. Durch diese Transposition sind zwei neue Fusionsprodukte entstanden, von denen cTAGE-4 jeweils das 3' / C-terminale Ende bildet. So können neue Proteine mit neuen Funktionen entstehen, die in der Evolution von sehr großer Bedeutung sind [289].

cTAGE-Pseudogene und cTAGE-funktionale intronlose Gene

SINE- und LINE-Sequenzen (ALU / L1) können als Marker für nicht transkribierte Pseudogene gelten, da diese Elemente nur in nicht aktiven Genen persistieren können [190, 191]. Die genaue Analyse dieser Elemente (siehe 3.2.3 Chromosomale Lokalisation, S. 59) zeigt, dass alle chromosomalen Sequenzen der cTAGE-Pseudogene diese Elemente besitzen, nicht aber die Sequenzen von cTAGE-4 und cTAGE-3. Ferner konnten cTAGE-2, -3 und -4 mRNAs mittels RT-PCR und Northern-Blot Analysen in vielen verschiedenen Geweben gefunden werden. Eine mögliche genomische Kontamination kann ausgeschlossen werden, da alle RNAs vor der cDNA Herstellung mit DNase behandelt wurden und die RNAs durch eine Amplifikation mit cTAGE-2, -3 und -4 spezifischen Primern auf genomische Kontamination untersucht und negativ getestet wurden. Ferner müsste bei einer cTAGE-5A RT-PCR eine genomische Kontamination durch eine 2,8 kb große Bande ersichtlich sein, die bei einer PCR an genomischer DNA zu erkennen ist. Weiter beweisen reaktive Antikörper gegen alle cTAGE Proteine, dass diese „Pseudogene“ transkribiert werden. Die Frage, welcher der 3 möglichen Varianten von cTAGE-4 auf Chromosom 6, 7 oder 7q transkribiert wird, ist nicht zu klären. Eine genauere Untersuchung der durch genomische Duplikation entstandenen neuen Fusionsgene könnte dies aufklären.

So werden im Gegensatz zu den restlichen durch Retrotransposition entstandene Sequenzen cTAGE-2, -3 und -4 transkribiert und sind somit funktional.

Da sich die Analyse der Pseudogene in der Arbeit von Comtesse und Kollegen [189] allein auf Computer-Analysen beschränkt und somit transkribierte Gene nicht erfasst werden, ist bei cTAGE-2, cTAGE-3 und cTAGE-4 von transkribierten, funktionalen intronlosen Pseudogenen auszugehen. Zusammenfassend scheint die cTAGE-Familie eine Multigen-Familie zu sein, deren aktiver Locus auf Chromosom 14 (cTAGE-5) liegt. Eine theoretische cTAGE-5 mRNA, bestehend aus allen Exons bis auf Exon Nr.1, wurde sekundär über Retrotransposition ins Genom reintegriert. Während cTAGE-2 / Chromosom 18, cTAGE-3 / Chromosom 13 und cTAGE-4 / Chromosom 7 nachweislich funktionale intronlose Gene sind, gibt es auf den Chromosomen-2, -3, -6, -9, -10 und -12 auch nicht transkribierte Pseudogene, da diese in einer cDNA-Bank (HYREX) nicht identifiziert werden konnten.

Bekannte intronlose Gene

In der Literatur ist eine Vielzahl von Pseudogenen beschrieben, die durch Integration hinter einen aktiven Promoter transkribiert werden. Beispielsweise verstärkt der humane Promoter CYP21A1 die Transkription eines bislang unbekanntes Pseudogens [290]. Weiter gibt es zu dem Gen PGK-1 zwei intronlose Retrotransposons: ψ PGK-1 und PGK-2. ψ PGK-1 ist ein nicht transkribiertes prozessiertes Pseudogen, während PGK-2 (hoch Homolog zu PGK1) transkribiert und in ein Protein translatiert wird [291, 292]. Auch Transpositionen, die in Antisense-Richtung hinter einen Promoter integriert sind, werden transkribiert und translatiert (Topoisomerase I Pseudogen und das murine ψ Fgfr-3 [293, 294]). Zu allen transkribierten cTAGE-Genen sind Promotersequenzen upstream im Genom zu finden. Transkribierte Pseudogene können im Vergleich zum Ursprungs-Gen auch eine veränderte Expression besitzen. Das Tumorsuppressorgen PTEN, welches durch eine Keimbahn Mutation entsteht, ist in Milz und Niere, das transkribierte Pseudogen ψ PTEN in Leber und Glioblastomen exprimiert. Das 5HT-7 Pseudogen ist in einer Reihe von Geweben exprimiert, während das Ausgangs-Gen überhaupt nicht detektiert werden kann [295]. Diese Beobachtung kann man auch bei der cTAGE-Familie bestätigen. Die Expression der funktionalen intronlosen Pseudogene cTAGE-2, cTAGE-3 und cTAGE-4 zeigt im Vergleich zu den cTAGE-5 mRNAs veränderte Expressionsprofile.

Häufigkeit von Pseudogenen

Pseudogene sind ein häufiges Phänomen im humanen Genom. Beispielsweise sind auf Chromosom 22 19% der möglichen CDS durch Retrotransposition entstanden, von denen 82% prozessierte Pseudogene sind [296]. Außerdem gibt es zu vielen Haushaltsgenen Pseudogene, wie bei β Tubulin (3 Pseudogene [297]), oder bei Antikörpern [298]. Zu rRNA Genen gibt es über 100 verwandte Pseudogene [299].

4.3.3 Tumorantigene und Pseudogene

Auch bei anderen CT-Antigenen konnten Retrotranspositionsmechanismen identifiziert werden. Die GAGE mRNAs 1-8 sind chromosomal hintereinander auf Xp11.2-11.4 lokalisiert. Während GAGE-1 5 kodierende Exons besitzt, haben GAGE-7b und GAGE-8 nur die korrelierenden Exons 1-3 und Exon 5. Im 4. Exon von GAGE-7b und GAGE-8 hat das Retroposon L1 (=LINE) zur Inaktivierung des 4. GAGE-Exons geführt. Die CT-Antigen Familie SSX besteht aus 9 Familienmitgliedern, die alle auf dem X-Chromosom lokalisiert sind. Ferner existieren dazu 10 ebenfalls X-chromosomal kodierte Pseudogene [300]. Zu NY-ESO-1 kann ein Pseudogen auf Chromosom 9 gefunden werden [219]. Auch die MAGE-A Gene werden als retrotranspositional entstandene Gene diskutiert, da die kodierende Sequenz aller MAGE-A Gene auf einem Exon liegt, wobei z.B. die MAGE-A1 mRNA auf drei Exons im Genom lokalisiert ist.

Auch andere CTCL assoziierte Antigene konnten mit Pseudogenen in Bezug gebracht werden. Neben dem UBE3A Gen konnte auf Chromosom 15q11-13 auch Pseudogene identifiziert werden [246, 301]

4.3.4 Expressionsanalyse und Immunogenität

Die Immunogenität der cTAGE-Familie konnte mittels eines sekundären SEREX analysiert werden. Während gegen cTAGE-3 auch gegen Normalseren reagierten (1/10), waren alle weiteren cTAGE-Proteine serologisch spezifisch. Vor allem cTAGE-1 wurde von 30 % aller getesteten CTCL Seren erkannt. Die Proteine von cTAGE-4, -5A und -5B wurden in geringerem Maße von Tumorseren erkannt. Die Expression dieser cTAGE-Antigene in verschiedenen Neoplasien ergab ein heterogenes Expressionprofil. In jeder Entität konnte ein cTAGE Mitglied in hohem Maße exprimiert gefunden werden (CTCL: cTAGE-1 zu 46%, Kolon Karzinome: cTAGE-5B zu 60%, Mamma Karzinome: cTAGE-4 zu 60%, Hals / Nasen

/ Ohren Neoplasien: cTAGE-5B zu 50%, Melanome: cTAGE-5A zu 25% und ovarielle Tumore: cTAGE5A zu 44%).

Um die Expression der cTAGE-Familie auf Protein-Ebene zu evaluieren, wurden zwei Peptid-spezifische Antikörper hergestellt. Der cTAGE-1 spezifische Antikörper entsprach dem durch das Epitope Mapping identifizierten Peptid und der cTAGE-5 spezifische Antikörper wurde aus dem C-terminalen Ende synthetisiert. Dieser Epitop-spezifische Antikörper erkennt cTAGE-5A, cTAGE-5C / MGEA-6 und cTAGE-5D / MGEA-11, aber nicht cTAGE-5B.

In der Proteinexpressionsanalyse für cTAGE-5A, cTAGE-5C / MGEA-6 und cTAGE-5D / MGEA-11 konnte kein abgeleitetes Proteine in gesunden Kontroll-Protein-Lysaten gefunden werden, dafür aber in Tumor-Protein-Proben. Comtesse und Mitarbeiter konnten für das gesamte rekombinant hergestellte cTAGE-5C / MGEA-6 mit einem polyklonalen Antikörper ebenfalls ein tumorspezifisches Expressionsverhalten beobachten [193]. Diese und unsere Analysen zeigen, dass alle cTAGE-5 Proteine (einschließlich cTAGE-5B) auf Proteinebene tumorspezifisch exprimiert werden. Während auf RT-PCR Ebene ausschließlich cTAGE-5A tumorspezifisch ist, können auf Proteinebene auch cTAGE-5B, cTAGE-5C / MGEA-6 und cTAGE-5C / MGEA-11 als neue Cancer Testis Antigene bezeichnet werden. In der Literatur kann man andere Beispiele für proteinspezifische CT-Antigene finden. SART-1 und SART-3 sind auf Northern-Blot Ebene in Normalgeweben exprimiert, während die Proteine tumorspezifisch sind [302, 303].

Die Immunogenität der cTAGE Familie konnte mittels SEREX für cTAGE-1, cTAGE-3, cTAGE-4 und cTAGE-5A und -5B in CTCL und Melanom-Patienten Seren beobachtet werden. Serologisch tumorspezifisch wurden neben cTAGE-1, -4, -5A und -5B auch cTAGE-5C / MGEA-6 und cTAGE-5D / MGEA-11 in anderen Arbeiten beschrieben [176, 193]. Während die serologische Analyse über cTAGE-5C / MGEA-6 und cTAGE-5D / MGEA-11 von Comtesse und Mitarbeitern sich auf gut- und bösartige Hirntumoren beschränkte [193], konnte hier die Immunogenität von cTAGE-5 Proteinen bei soliden (Melanom und MF des CTCL) und leukämischen (SS des CTCL) Tumoren nachgewiesen werden.

Die Immunogenität der cTAGE-Proteine beschränkt sich auf die humorale Immunantwort. Um die Antigene in der Therapie einsetzen zu können, müsste der Beweis einer erfolgten zellulären Immunantwort angetreten werden. Dies wird in Kooperation mit Dr. Müller-

Berghaus (cTAGE-1) und Dr. Zheng Yang (cTAGE-5A) in den Laboren von Prof. Schadendorf und von Dr. Eichmüller bereits durchgeführt. Erste Bindungsstudien zeigen für cTAGE-1 und cTAGE-5A vielversprechende Daten. Dies bestätigt die Vermutung, dass gegen ein kurzes Oligopeptid wie cTAGE-1 eine zelluläre und humorale Immunantwort stattfinden kann. Dies konnte auch in einem Experiment mit einem 13 Aminosäuren langem Peptid aus NY-ESO-1 bewiesen werden, das eine CD4 und CD8 Immunantwort induzieren konnte [227].

Eine weitere Frage ist, warum gegen cTAGE-1 ein starke Immunantwort stattgefunden hat. Einerseits kann dies daran liegen, dass gegen cTAGE-1 als nekrotisches Abfallprodukt bei Tumorpatienten eine humorale Immunantwort ausgebildet wurde. Ein solches zufälliges Ereignis ist jedoch bei 30% der getesteten Patienten nicht zu erwarten. Ferner zeigen die Expressionsstudien, dass cTAGE-1 in vielen verschiedenen Tumoren zu finden ist. Daher ist es eher denkbar, dass cTAGE-1 als membranständiges Antigen erkannt wurde. Durch Computeranalysen von cTAGE-1 konnte ein extrazellulärer Loop identifiziert werden. Ferner besteht die Möglichkeit, dass MHC präsentierte Antigene durch Antikörper erkannt werden. Dies wird dadurch unterstützt, dass das identifizierte cTAGE-1 Epitop auf eine MHC II Bindungsvorhersage eines HLA-DR Moleküls übereinstimmt. Dies könnte bedeuten, dass cTAGE-1 HLA-DR-abhängig und membranständig von Antikörpern erkannt wurde. Vielleicht bewirkt gerade die Kombination der membranständigen und der MHC II präsentierten Erkennung eine derart starke Antikörper-Antwort. In einer anderen Arbeit konnte ein Antikörper, spezifisch für MHC I präsentierte MAGE-A1, generiert werden [304]. Ferner konnte in einer ELISA-Analyse gezeigt werden, dass ein MHC präsentierte Epitop auch von Antikörper aus Patienten-Seren erkannt werden [305].

Die membranständige Lokalisation von cTAGE-5 Proteinen konnte durch Computeranalysen, durch eigene und andere [193] immunhistologische Beobachtungen und durch Western-Blot Analysen an isolierten Membran-Proteinen [193] bewiesen werden. Dadurch sind cTAGE-1 und cTAGE-5 Proteine neben der tumorspezifischen Expression und möglichen, spezifischen zellulären Immuntherapien, auch für Antikörpertherapien einsetzbar. So bilden die cTAGE Proteine die ersten bekannten Strukturen überhaupt, die als Zielstruktur eine kombinierte passive und aktive Tumormimmuntherapie ermöglichen.

4.4 Abschließende Bewertung der Tumortargets für das CTCL

Autoantigene (Klon se20-4 und Klon se37-2) kommen für keine weiteren Analysen in Betracht. Weitere **überexprimierte Antigene mit membranständiger Funktion**, die für eine Antikörper basierende Therapie in Frage kommen, konnten für das CTCL nicht identifiziert werden. In der Literatur sind von Bagot und Mitarbeitern über monoklonale Antikörper zwei membranständige Zielstrukturen gefunden worden (KIR140 und sc5), die beide auch auf gesunden CD4-Zellen (NK Zellen beim KIR140 und aktivierte T-Zellen beim sc5) exprimiert sind. Im Gegensatz zu sc5 und KIR140 ist MUC-1 bereits gut charakterisiert und hat die Immunogenität über CTL und reaktive Antikörper bewiesen. In unseren Analysen konnte eine Überexpression von MUC-1 auch für Tumoren des CTCL bestätigt werden. Genauso ist die Überexpression des Proteins se33-1 als Kernprotein zu bewerten. Diese beiden Proteine kommen als weitere antigene Strukturen in Betracht, wenn eine zelluläre Immunogenität beim CTCL bewiesen werden kann.

Onkogene-Proteine sind häufig auch als immunogene Antigene beschrieben [38, 54]. Auch in dieser Arbeit konnten Antigene (PAR-3ta) identifiziert werden, die signifikant in der Funktion eingeschränkt sind und so eine Schlüsselrolle in der Zell-Signalkette nicht wahrnehmen können. Diese Proteine werden von Seren spezifisch erkannt.

Alle serologisch spezifischen Antigene, die per RT-PCR ubiquitär sind, stellen Autoantigene mit tumorspezifischer Immunogenität dar (se14-3, se20-4) und sind für Diagnose und Monitoring des CTCLs weiter interessant. So finden sich in Seren Antikörper, die gegen überexprimierte Antigene gerichtet sind, z.B. Carbonat Anhydrase XII [46, 52]. So sind gerade bei lymphoproliferativen Erkrankungen häufig überexprimierte Antigene gefunden worden, wie das Galektin 9 [306], das bei Hodgkin-Lymphomen beobachtet wurde, oder CML66, das bei einer chronisch myeloischen Leukämie kürzlich als überexprimiertes Antigen identifiziert werden konnte [307]. Auch für das CTCL konnte eine Reihe dieser Antigene mit tumorspezifischer Immunogenität gefunden werden [97, 98].

Mutationsantigene konnten für das CTCL nicht gefunden werden, was aber bei einer Suche an einer Testis Bank eines gesunden Spenders nicht verwundert [97, 98]. Dagegen konnten eine Reihe differentieller **Splicing-Produkte** gefunden werden. Differentielles, aber nicht tumorspezifisches Splicing konnte bei den Antigenen se14-3 / rack-7, se20-9 und se70-2 identifiziert werden. Bei diesen Antigenen unterscheidet sich das Expressionsmuster zu

anderen Splicing-Varianten desselben Gens. Tumorspezifisch und daher als neue Zielstruktur für eine Immuntherapie einsetzbar sind die Antigene der cTAGE-Familie.

Lymphomspezifische (Differenzierungs-)antigene

Auffallend bei der serologischen Erkennung des Proteins se1-1 ist die häufige Reaktivität in lymphoproliferativen Geweben, wie bei Leukämien und anderen Lymphomen [97, 98, 313]. Da das Protein nicht spezifisch ist, kann dieses Protein als allgemeiner Lymphom-spezifischer Marker angesehen werden. Dagegen zeigen der Klon se20-10 eine differenzierungsspezifische Expression, d.h. se20-10 wird neben der serologisch spezifischen Erkennung nur in lymphomspezifischen Zellen exprimiert. Dieses Antigen konnte durch eine Alternativmethode einer differentiellen PCR an großzelligen B-Zell Lymphomen bestätigt werden [280]. So könnten dieses Antigen bei Lymphomen nach Vorbild der Differenzierungsantigene beim Melanom eingesetzt werden.

Als mögliche Vakzin – Zielstrukturen kommen nur **spezifische Antigene**, die in der Expression strikt auf den Tumor beschränkt sind, in Frage. Für das CTCL konnte neben cTAGE-1 eine Reihe weiterer Antigene identifiziert werden:

- GAGE-3, -4, -5, -6, -7b
- MAGE-A9
- cTAGE-1B
- cTAGE-5A, cTAGE-5B, cTAGE-5C / MGEA-6 und cTAGE-5D / MGEA-11

Diese Antigene haben die Immunogenität in CTCLs durch reaktive Antikörper bewiesen. Zur Vervollständigung müssten CTLs gegen die Antigene aus Blut von CTCL Patienten generiert werden, um die zelluläre Immunantwort zu überprüfen.

4.5 CTCL: Proliferation einer CD4 T-Zelle

Der Antigen-T-Zell Rezeptor (TCR) Kontakt besitzt antiapoptotische Effekte über ein PI-3 Kinase und eine AKF Kinase, die Caspase 9 und BAD phosphorylieren. Damit wird die proteolytische Aktivität der Caspase 9 und die Bindung des BAD zu Bcl2 und anderen Bcl Mitgliedern inhibiert und damit ein antiapoptotischer Effekt erzielt [308-310]. Maligne T-Zellen besitzen durch die maligne Transformation eine schlechte Antigen-Bindung und werden so normalerweise zur Apoptose induziert. Da die T-Zellen beim CTCL offensichtlich

keine Apoptose durchführen, muss eine starke, ständige Antigenstimulation vorhanden sein. Gerade dies ist eine kontroverse Diskussion beim CTCL. Was ist das auslösende Antigen, gegen das die CD4 T-Helfer Zelle gerichtet ist? Würde man dieses identifizieren, könnte man die Stimulation zur Proliferation inhibieren. Edelson und Berger konnten das Wachstum von malignen CD4⁺ T-Zellen nur bei Ko-Kultivierung unreifer Dendritischer Zellen (DCs) beobachten. Die Autoren erklären dies damit, dass nach Induktion von Apoptose der malignen Zellen die unreifen DCs Antigene der malignen Zelle aufnehmen, präsentieren und somit die T-Zelle wiederum zur Proliferation gegen ein eigenes Antigen induzieren [124]. Es konnte der Nachweis erbracht werden, dass CTCL eine Proliferation eines Klons in einem Patienten ist, der gegen ein MHC II präsentiertes Antigen sensitiv ist [311].

SEREX Ergebnisse können als Maß für eine erfolgte humorale Immunantwort angesehen werden. SEREX Arbeiten mit Seren oder Tumorgewebe maligner Zellen des Immunsystems (CTCL [97, 98, 312], Leukämie [184, 313-315]) zeigen immer weniger Ergebnisse (= Tumorantigene) als bei der Suche nach Tumorantigenen anderer Neoplasien, beispielsweise des Kolon-Karzinoms [28], von Lungen-Karzinomen [56], Nierenzell-Karzinomen [316] oder Melanomen [24, 107, 317]. Es scheint eine insuffizientere Immunantwort gegen immunrelevante Zellen stattzufinden.

Ferner wird die Chemoresistenz des CTCLs als fas mediierte Apoptosedefizienz beschrieben. [318]. Da das CTCL eine Proliferation von Th2 Zellen ist [139, 319], ist nur eine geringe Konzentration von IL2 zu beobachten. Fas mediierte Apoptose ist aber IL2 abhängig. Ferner konnte bei PBMC von CTCL Patienten eine starke Reduktion der fas-Rezeptoren gegenüber gesunden PBMC beobachtet werden. So diskutieren die Autoren, dass CTCL eine fas und deshalb Apoptose Defizienz aufweisen [318]. Eine andere Gruppe konnte dagegen eine verstärkte Expression des fas-Liganden beobachten, was sie als Tumor-Immune Escape Mechanismus werten [320], um tumorinfiltrierenden CD8⁺ T-Zellen zur Apoptose zu induzieren. Dies alles sind mögliche Proliferationsmechanismen des CTCLs.

4.6 Integrierte Immunantwort

Immuntherapien versuchen über spezifischer Antigene die Immunantwort gegen den Tumor zu stärken. Es konnte gezeigt werden, dass neben der MHC Klasse II-Präsentation exogener - (bakterieller -) und endogener - (viraler- Tumorantigene) Proteine von Antigenpräsentierenden Zellen (APC) eine MHC Klasse I-Präsentation derselben Proteine

über eine „cross-presentation“ stattfindet. Dieses Cross-Priming einer APC mediiert über CD4 Lymphozyten eine humorale und über CD8 eine zelluläre Immunantwort, was für virale Proteine [321] und Tumorantigene [322] / Selbst Antigene [323] beschrieben werden konnte.

Bislang stimulieren viele Immuntherapien nur eine zelluläre CD8 Immunantwort, wobei bislang keine befriedigenden Resultate beobachtet werden konnten [324]. Eine effektive CTL-Immunantwort von Tumorantigenen benötigt die Mithilfe von CD4+ T Helferzellen [325], so werden in aktuellen Arbeiten eine erfolgreiche Immunantwort immer im Zusammenhang mit einer CD4 T_H Antwort diskutiert [326, 327]. Da aber gerade das CTCL eine Neoplasie von CD4+ Zellen des Immunsystems ist, könnte die Induktion einer CD8+T-Zell Antwort beeinträchtigt sein. Th1 Zellen initiieren eine zelluläre Immunantwort und Th2 Zellen eine humorale Immunantwort. Es wird diskutiert, dass allein die Th1 Antwort für eine effektive Tumor-Immunantwort verantwortlich ist und weniger eine Th2 Antwort [328]. Andere Arbeiten konnten dagegen eine Tumor-Regression signifikant mit einer humoralen Immunantwort korrelieren, z.B. bei der CML gegen das Protein CML28 [329].

Die Immunogenität sehr vieler Antigene ist über CTL-Antworten definiert worden (Review in [330]). Die Tatsache jedoch, dass Antigene durch CTLs gefunden und durch SEREX bestätigt wurden, weist darauf hin, dass oft eine humorale und zelluläre Immunantwort parallel stattfinden. NY-ESO-1 wird als eines der interessantesten CT-Antigen diskutiert, da MHC I und MHC II identifizierte Epitope aus NY-ESO-1 die integrale Immunantwort beweisen. Nur für wenige Tumorantigene (NY-ESO-1, MAGE-A3 und einige Melanom Differenzierungs-Antigene) sind bislang MHC I und MHC II Epitope bekannt, die eine integrierte Immunantwort beweisen (Review in [324]).

Eine komplexe Immunantwort ist für NY-ESO-1 in Form einer parallelen humoralen und zellulären Immunantwort gezeigt worden [122, 228]. Außerdem konnte in einem Patienten nach einer NY-ESO-1 Peptide-Vakzinierung eine zelluläre und eine humorale Immunantwort nachgewiesen werden [331]. Die erfolgte humorale Immunantwort wird durch eine generelle Aktivierung des Immunsystems durch Induktion einer CTL-Antwort erklärt. Tumorzell-Lysate werden zur stärkeren Aktivierung des Immunsystems wieder durch Antigen präsentierende Zellen aufgenommen und so MHC I und MHC II präsentiert.

Obwohl CTL Immunantworten auch in B-Zell defizienten Mäusen nachgewiesen werden konnten [332], wird diskutiert, dass eine starke Immunantwort eine integrierte humorale und

zelluläre Immunantwort darstellt [327, 333]. Diese Beobachtung wird durch integrierte Immunantworten in Form von Antikörper- und CTL-Nachweis gegen eine Vielzahl verschiedener Antigene bestätigt. Gegen das humane polymorphe epitheliale Mucin-1 (MUC1) [334], gegen das Onkogen p53, gegen das CT-Antigen MAGE-A1 /-A3 oder gegen die überexprimierte tyrosinase kinase c-erbB2 / Her2 [67, 335] konnten integrierte Immunantworten beschrieben werden. Es wird diskutiert, dass parallele Immunantworten für eine effektivere Immunantwort gemeinsam verantwortlich sind [336]. Ebenfalls werden die z.T. schlechten klinischen Remissionen auf MHC-I-Peptid basierenden Tumor-Therapien zur Induktion der zelluläre Immunantwort auf eine fehlende Induktion der humoralen Immunantwort zurückgeführt [305, 324].

Serologische Analysen werden mittlerweile als nützliche Methode für Immun-Monitoring bei Tumortherapien angesehen [122]. Darüberhinaus ist das Messen der humoralen Immunantwort ein einfacher Weg, um die immunologische Relevanz möglicher Zielstrukturen einer Immuntherapie zu bestimmen. Im Gegensatz dazu ist das Messen zellulärer Immunantworten über Real-Time Cytokin-PCRs, Tetramer Technologie, Cytokin-ELISA, ELISPOT oder das Generieren von CTLs aufwendig und zeitraubend [337].

4.7 Zusammenfassung

Immuntherapien stellen basierend auf gut charakterisierten, tumorspezifischen Antigenen ein vielversprechendes Konzept in der Tumor-Therapie dar. Während für viele Neoplasien Tumorantigene bekannt sind, wurden für das kutane T-Zell Lymphom (CTCL) bislang nur sehr wenige tumorassoziierte Antigene identifiziert. In dieser Arbeit konnten eine Reihe von CTCL-spezifischen Antigenen gefunden und genauer charakterisiert werden: Ein mögliches Onkogen (PAR-3ta), Splicing-Varianten als Antigene (se70-2, cTAGE-1/2, cTAGE-5), ein putativ Virus-induziertes Antigen (se57-1), sowie lymphozytenspezifische Differenzierungsantigene (se20-10). Die meisten dieser Tumorantigene können für diagnostische Zwecke oder zum Immun-Monitoring eingesetzt werden.

Darüberhinaus konnten auch Tumorantigene, die für eine CTCL-Immuntherapie in Frage kommen, identifiziert werden. cTAGE-1 (46 % CTCL Expression), cTAGE-1B (31%) und cTAGE-5A (44%) sind auf Grund ihres Expressionsmusters neue Cancer-Testis Antigene. Dies konnte für cTAGE-5 auf Proteinebene bestätigt werden. Einige wenige der bekannten spezifischen Tumorantigene konnten auch im CTCL nachgewiesen werden: MAGE-A9 (21 %), die GAGE 3-7b Gruppe (46 %) und MUC-1 (44 %). Die Immunogenität konnte durch den Nachweis von reaktiven Antikörpern in Seren von CTCL-Patienten bestätigt werden. Gegen rekombinantes MAGE-A9 reagierten 22 % der getesteten Seren; gegen GAGE 16 % und gegen cTAGE-5A 15 %.

Neben der Identifizierung neuer Antigene, konnte in dieser Arbeit eine neue Cancer-Testis Antigenfamilie beschrieben werden. Die Multigenfamilie ist durch Retrotransposition eines aktiven Gens (cTAGE-5) entstanden, wobei transkribierte (cTAGE-1, -1B, -1C, -2, -2s, -3 und -4) und nicht transkribierte Pseudogene (ϕ 1, ϕ 2, ϕ 3, ϕ 5, ϕ 6 und ϕ 7) unterschieden werden müssen. Für cTAGE-1, cTAGE-1B und cTAGE-5A konnte tumorspezifisches Splicing aus den Chromosomen 18p11.2 und Chromosom 14 gefunden werden. Andere cTAGE mRNAs zeigen eine differierende Expression. cTAGE mRNAs sind nicht auf eine Tumorentität beschränkt, sondern können häufig in andern Tumoren gefunden werden.

Mit cTAGE-1, cTAGE-5, MAGE-A9 und GAGE 3-7b sind die ersten spezifischen Antigene identifiziert worden, die für mögliche Immuntherapien des CTCLs in Betracht kommen.

5 Literatur

- 1) Gromet, M.A., Epstein, W.L., and Blois, M.S., *The regressing thin malignant melanoma: a distinctive lesion with metastatic potential*. Cancer, 1978. **42**(5): p. 2282-92.
- 2) Nestle, F., Alijagic, S., Gilliet, M., Sun, Y., Grabbe, S., Dummer, R., Burg, G., and Schadendorf, D., *Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells*. Nat Med, 1998. **4**(3): p. 328-332.
- 3) Jäger, E., Jäger, D., and Knuth, A., *Strategies for the development of vaccines to treat breast cancer*. Rec Res Cancer Res, 1999. **152**: p. 94-102.
- 4) Sun, Y., Paschen, A., and Schadendorf, D., *Cell-based vaccination against melanoma-- background, preliminary results, and perspective*. J Mol Med, 1999. **77**(8): p. 593-608.
- 5) Duvic, M. and Cather, J., *Emerging new therapies for cutaneous T-cel lymphoma*. Dermatol Clin, 2000. **18**(1): p. 147-156.
- 6) Clynes, R.A., Towers, T.L., Presta, L.G., and Ravetch, J.V., *Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets*. Nat Med, 2000. **6**(4): p. 443-6.
- 7) Flieger, D., Renoth, S., Beier, I., Sauerbruch, T., and Schmidt-Wolf, I., *Mechanism of cytotoxicity induced by chimeric mouse human monoclonal antibody IDEC-C2B8 in CD20-expressing lymphoma cell lines*. Cell Immunol, 2000. **204**(1): p. 55-63.
- 8) Carter, P., *Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies*. Nat Rev Cancer, 2001. **1**(2): p. 118-29.
- 9) Slamon, D.J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., Fleming, T., Eiermann, W., Wolter, J., Pegram, M., Baselga, J., and Norton, L., *Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2*. N Engl J Med, 2001. **344**(11): p. 783-92.
- 10) Onrust, S., Lamb, H., and Balfour, J., *Rituximab*. Drugs, 1999. **58**(1): p. 79-90.
- 11) Wang, F., Bade, E., Kuniyoshi, C., Spears, L., Jeffery, G., Marty, V., Groshen, S., and Weber, J., *Phase I trial of a MART-1 peptide vaccine with incomplete Freund's adjuvant for resected high-risk melanoma*. Clin Cancer Res, 1999. **5**(10): p. 2756-65.
- 12) Tjoa, B.A., Simmons, S.J., Bowes, V.A., Ragde, H., Rogers, M., Elgamal, A., Kenny, G.M., Cobb, O.E., Ireton, R.C., Troychak, M.J., Salgaller, M.L., Boynton, A.L., and Murphy, G.P., *Evaluation of phase I/II clinical trials in prostate cancer with dendritic cells and PSMA peptides*. Prostate, 1998. **36**(1): p. 39-44.

- 13) Xiang, Z., Yang, Y., Wilson, J., and Ertl, H., *A replication-defective human adenovirus recombinant serves as a highly efficacious vaccine carrier*. *Virology*, 1996. **219**(1): p. 220-227.
- 14) Paschen, A., Dittmar, K.E.J., Grenningloh, R., Rohde, M., Schadendorf, D., Domann, E., Chakraborty, T., and Weiss, S., *Human dendritic cells infected by Listeria monocytogenes: induction of maturation, requirements for phagolysosomal escape and antigen presentation capacity*. *Eur J Immunol*, 2000. **30**(12): p. 3447-3456.
- 15) Wang, R., Wang, X., Johnston, S., Zeng, G., Robbins, P., and Rosenberg, S., *Development of a retrovirus-based complementary DNA expression system for the cloning of tumor antigens*. *Cancer Res*, 1998. **58**(16): p. 3519-3525.
- 16) Poland, G.A., Murray, D., and Bonilla-Guerrero, R., *New vaccine development*. *Bmj*, 2002. **324**(7349): p. 1315-9.
- 17) Stuhler, G. and Walden, P., *Recruitment of helper T cells for induction of tumour rejection by cytolytic T lymphocytes*. *Cancer Immunol Immunother*, 1994. **39**(5): p. 342-5.
- 18) Trefzer, U., Weingart, G., Chen, Y., Herberth, G., Adrian, K., Winter, H., Audring, H., Guo, Y., Sterry, W., and Walden, P., *Hybrid cell vaccination for cancer immune therapy: first clinical trial with metastatic melanoma*. *Int J Cancer*, 2000. **85**(5): p. 618-26.
- 19) Feuerer, M., Beckhove, P., Bai, L., Solomayer, E.F., Bastert, G., Diel, I.J., Pedain, C., Oberniedermayr, M., Schirmacher, V., and Umansky, V., *Therapy of human tumors in NOD/SCID mice with patient-derived reactivated memory T cells from bone marrow*. *Nat Med*, 2001. **7**(4): p. 452-8.
- 20) Overwijk, W.W., Lee, D.S., Surman, D.R., Irvine, K.R., Touloukian, C.E., Chan, C.C., Carroll, M.W., Moss, B., Rosenberg, S.A., and Restifo, N.P., *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*, 1999. **96**(6): p. 2982-7.
- 21) Rosenberg, S., *A new era for cancer immunotherapy based on the genes that encode cancer antigens*. *Immunity*, 1999. **10**: p. 281-287.
- 22) zur Hausen, H., *Viruses in human cancers*. *Science*, 1991. **251**(5035): p. 1167-1173.
- 23) van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van den Eynde, B., Knuth, A., and Boon, T., *A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma*. *Science*, 1991. **254**(5038): p. 1643-7.

-
- 24) Sahin, U., Türeci, O., Schmitt, H., Cochlovius, B., Johannes, T., Schmits, R., Stenner, F., Luo, G., Schobert, I., and Pfreundschuh, M., *Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(25): p. 11810-11813.
 - 25) Labrecque, S., Naor, N., Thomson, D., and Matlashewski, G., *Analysis of the anti-p53 antibody response in cancer patients*. Cancer Res, 1993. **53**(15): p. 3468-3471.
 - 26) Soussi, T., *p53 Antibodies in the sera of patients with various types of cancer: a review*. Cancer Res, 2000. **60**(7): p. 1777-88.
 - 27) Angelopoulou, K., Yu, H., Bharaj, B., Giai, M., and Diamandis, E.P., *p53 gene mutation, tumor p53 protein overexpression, and serum p53 autoantibody generation in patients with breast cancer*. Clin Biochem, 2000. **33**(1): p. 53-62.
 - 28) Scanlan, M., Chen, Y., Williamson, B., Güre, A., Stockert, E., Gordan, J., Türeci, Ö., Sahin, U., Pfreundschuh, M., and Old, L., *Characterization of human colon cancer antigens recognized by autologous antibodies*. Int. J. Cancer, 1998. **76**(5): p. 652-658.
 - 29) De Plaen, E., Lurquin, C., Van Pel, A., Mariame, B., Szikora, J.P., Wolfel, T., Sibille, C., Chomez, P., and Boon, T., *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, 1988. **85**(7): p. 2274-8.
 - 30) Lurquin, C., Van Pel, A., Mariame, B., De Plaen, E., Szikora, J., Janssens, C., Reddehase, M., Lejeune, J., and Boon, T., *Structure of the gene of tum- transplantation antigen P91A: the mutated exon encodes a peptide recognized with Ld by cytolytic T cells*. Cell, 1989. **58**(2): p. 293-303.
 - 31) Wölfel, T., Hauer, M., Schneider, J., Serrano, M., Wolfel, C., Klehmann-Hieb, E., De Plaen, E., Hankeln, T., Meyer zum Buschenfelde, K., and Beach, D., *A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma*. Science, 1995. **269**(5228): p. 1281-1284.
 - 32) Coulie, P.G., Lehmann, F., Lethe, B., Herman, J., Lurquin, C., Andrawiss, M., and Boon, T., *A mutated intron sequence codes for an antigenic peptide recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(17): p. 7976-80.
 - 33) Robbins, P.F., El Gamil, M., Li, Y.F., Kawakami, Y., Loftus, D., Appella, E., and Rosenberg, S.A., *A mutated beta-catenin gene encodes a melanoma-specific antigen recognized by tumor infiltrating lymphocytes*. J Exp Med, 1996. **183**(3): p. 1185-92.

-
- 34) Chiari, R., Foury, F., De Plaen, E., Baurain, J.F., Thonnard, J., and Coulie, P.G., *Two antigens recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a melanoma result from a single point mutation in an essential housekeeping gene*. *Cancer Res*, 1999. **59**(22): p. 5785-92.
- 35) Brandle, D., Brasseur, F., Weynants, P., Boon, T., and Van den Eynde, B., *A mutated HLA-A2 molecule recognized by autologous cytotoxic T lymphocytes on a human renal cell carcinoma*. *J Exp Med*, 1996. **183**(6): p. 2501-8.
- 36) Mandruzzato, S., Brasseur, F., Andry, G., Boon, T., and van der Bruggen, P., *A CASP-8 mutation recognized by cytolytic T lymphocytes on a human head and neck carcinoma*. *J Exp Med*, 1997. **186**(5): p. 785-93.
- 37) Gueguen, M., Patard, J.J., Gaugler, B., Brasseur, F., Renauld, J.C., Van Cangh, P.J., Boon, T., and Van den Eynde, B.J., *An antigen recognized by autologous CTLs on a human bladder carcinoma*. *J Immunol*, 1998. **160**(12): p. 6188-94.
- 38) Berke, Z., Andersen, M.H., Pedersen, M., Fugger, L., Zeuthen, J., and Haurum, J.S., *Peptides spanning the junctional region of both the abl/bcr and the bcr/abl fusion proteins bind common HLA class I molecules*. *Leukemia*, 2000. **14**(3): p. 419-26.
- 39) Pulford, K., Morris, S.W., and Mason, D.Y., *Anaplastic lymphoma kinase proteins and malignancy*. *Curr Opin Hematol*, 2001. **8**(4): p. 231-6.
- 40) Usener, D., Schadendorf, D., Koch, J., Dübel, S., and Eichmüller, S., *cTAGE: A cutaneous T-cell lymphoma associated antigen family with tumor-specific splicing*. *J Invest Dermatol*, 2003. **in press**.
- 41) Wu, Y., Liu, Y., Lee, L., Miner, Z., and Kulesz-Martin, M., *Wild-type alternatively spliced p53: binding to DNA and interaction with the major p53 protein in vitro and in cells*. *Embo J*, 1994. **13**(20): p. 4823-30.
- 42) Mamula, M., Gee, R., Elliott, J., Sette, A., Southwood, S., Jones, P., and Blier, P., *Isoaspartyl Post-translational Modification Triggers Autoimmune Responses to Self-proteins*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(22321-22327).
- 43) Sanda, M.G., Restifo, N.P., Walsh, J.C., Kawakami, Y., Nelson, W.G., Pardoll, D.M., and Simons, J.W., *Molecular characterization of defective antigen processing in human prostate cancer*. *J Natl Cancer Inst*, 1995. **87**(4): p. 280-5.
- 44) Hynes, N.E. and Stern, D.F., *The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer*. *Biochim Biophys Acta*, 1994. **1198**(2-3): p. 165-84.

-
- 45) Nau, M.M., Brooks, B.J., Battey, J., Sausville, E., Gazdar, A.F., Kirsch, I.R., McBride, O.W., Bertness, V., Hollis, G.F., and Minna, J.D., *L-myc, a new myc-related gene amplified and expressed in human small cell lung cancer*. Nature, 1985. **318**(6041): p. 69-73.
- 46) Türeci, Ö., Sahin, U., Vollmar, E., Siemer, S., Götttert, E., Seitz, G., Parkkila, A., Shah, G., Grubb, J., Pfreundschuh, M., and Sly, W., *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, 1998. **95**: p. 7608-7613.
- 47) Türeci, O., Sahin, U., and Pfreundschuh, M., *Serological analysis of human tumor antigens: molecular definition and implications*. Mol Med Today, 1997. **3**(8): p. 342-349.
- 48) Brichard, V., Van Pel, A., Wolfel, T., Wolfel, C., De Plaen, E., Lethe, B., Coulie, P., and Boon, T., *The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas*. J Exp Med, 1993. **178**(2): p. 489-495.
- 49) Wang, R., Appella, E., Kawakami, Y., Kang, X., and Rosenberg, S., *Identification of TRP-2 as a human tumor antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes*. J Exp Med, 1996. **184**(6): p. 2207-2216.
- 50) Türeci, O., Sahin, U., Schobert, I., Koslowski, M., Schmitt, H., Schild, H., Stenner, F., Seitz, G., Rammensee, H., and Pfreundschuh, M., *The SSX-2 gene, which is involved in the t(X;18) translocation of synovial sarcomas, codes for the human tumor antigen HOM-MEL-40*. Cancer Res, 1996. **56**(20): p. 4766-4772.
- 51) Chen, Y., Scanlan, M., Sahin, U., Türeci, Ö., Güre, A., Tsang, S., Williamson, B., Stockert, E., Pfreundschuh, M., and Old, L., *A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(5): p. 1914-1918.
- 52) Türeci, Ö., Sahin, U., Zwick, C., Neumann, F., and Pfreundschuh, M., *Exploitation of the antibody repertoire of cancer patients for the identification of human tumor antigens*. Hybridoma, 1999. **18**(1): p. 23-8.
- 53) Meese, E. and Comtesse, N., *Cancer Genetics and Tumor Antigens: Time for a combined view ?* Genes Chromosomes Cancer, 2002. **33**: p. 107-113.
- 54) Bocchia, M., Korontsvit, T., Xu, Q., Mackinnon, S., Yang, S.Y., Sette, A., and Scheinberg, D.A., *Specific human cellular immunity to bcr-abl oncogene-derived peptides*. Blood, 1996. **87**(9): p. 3587-92.
- 55) Talpaz, M., Qiu, X., Cheng, K., Cortes, J.E., Kantarjian, H., and Kurzrock, R., *Autoantibodies to Abl and Bcr proteins*. Leukemia, 2000. **14**(9): p. 1661-6.

-
- 56) Güre, A., Altorki, N., Stockert, E., Scanlan, M., Old, L., and Chen, Y., *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.*, 1998. **58**: p. 1034-1041.
- 57) Scanlan, M.J., Williamson, B., Jungbluth, A., Stockert, E., Arden, K.C., Viars, C.S., Gure, A.O., Gordan, J.D., Chen, Y.T., and Old, L.J., *Isoforms of the human PDZ-73 protein exhibit differential tissue expression*. *Biochim Biophys Acta*, 1999. **1445**(1): p. 39-52.
- 58) Bilbe, G., Delabie, J., Brügger, J., Richener, H., Asselbergs, F., Cerletti, N., Sorg, C., Odink, K., Tarsay, L., Wiesendanger, W., DeWolf-Peeters, C., and Shipman, R., *Restin: a novel intermediate filament-associated protein highly expressed in the Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease*. *Embo J*, 1992. **11**(6): p. 2103-2113.
- 59) Seiter, S., Schadendorf, D., Herrmann, K., Schneider, M., Rosel, M., Arch, R., Tilgen, W., and Zoller, M., *Expression of CD44 variant isoforms in malignant melanoma*. *Clin Cancer Res*, 1996. **2**(3): p. 447-56.
- 60) Ponta, H., Sleeman, J., Dall, P., Moll, J., Sherman, L., and Herrlich, P., *CD44 isoforms in metastatic cancer*. *Invasion Metastasis*, 1994. **14**(1-6): p. 82-6.
- 61) Goodison, S., Urquidi, V., and Tarin, D., *CD44 cell adhesion molecules*. *Mol Pathol*, 1999. **52**(4): p. 189-96.
- 62) Lennette, E.T., Winberg, G., Yadav, M., Enblad, G., and Klein, G., *Antibodies to LMP2A/2B in EBV-carrying malignancies*. *Eur J Cancer*, 1995. **31A**(11): p. 1875-8.
- 63) Brass, N., Heckel, D., Sahin, U., Pfreundschuh, M., Sybrecht, G., and Meese, E., *Translation initiation factor eIF-4gamma is encoded by an amplified gene and induces an immune response in squamous cell lung carcinoma*. *Hum Mol Genet*, 1997. **6**(1): p. 33-39.
- 64) Ioannides, C., Fisk, B., Fan, D., Biddison, W., Wharton, J., and O'Brian, C., *Cytotoxic T cells isolated from ovarian malignant ascites recognize a peptide derived from the HER-2/neu proto-oncogene*. *Cell Immunol*, 1993. **151**(1): p. 225-234.
- 65) Schwab, M., *Oncogene amplification in solid tumors*. *Semin Cancer Biol*, 1999. **9**(4): p. 319-25.
- 66) Baselga, J., Tripathy, D., Mendelsohn, J., Baughman, S., Benz, S.S., Dantis, L., and al., e., *Phase II study of weekly intravenous trastuzumab (Herceptin) in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer*. *Semin Oncol*, 1999. **26**: p. 78-83.
- 67) Disis, M.L., Calenoff, E., McLaughlin, G., Murphy, A.E., Chen, W., Groner, B., Jeschke, M., Lydon, N., McGlynn, E., Livingston, R.B., and et al., *Existent T-cell and antibody immunity to HER-2/neu protein in patients with breast cancer*. *Cancer Res*, 1994. **54**(1): p. 16-20.

-
- 68) Fisk, B., Blevins, T.L., Wharton, J.T., and Ioannides, C.G., *Identification of an immunodominant peptide of HER-2/neu protooncogene recognized by ovarian tumor-specific cytotoxic T lymphocyte lines*. J Exp Med, 1995. **181**(6): p. 2109-17.
- 69) Yamamoto, A., Shimizu, E., Sumitomo, K., Shinohara, A., Namikawa, O., Uehara, H., and Sone, S., *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, 1997. **36**(10): p. 724-7.
- 70) Brichard, V., Herman, J., VanPel, A., Wildmann, C., Gaugler, B., Wolfel, T., Boon, T., and Lethe, B., *A tyrosinase nonapeptide presented by HLA-B44 is recognized on a human melanoma by autologous cytolytic T lymphocytes*. Eur J Immunol, 1996. **26**(1): p. 224-230.
- 71) Coulie, P., Brichard, V., Van Pel, A., Wolfel, T., Schneider, J., Traversari, C., Mattei, S., De Plaen, E., Lurquin, C., and Szikora, J., *A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas*. J Exp Med, 1994. **180**(1): p. 35-42.
- 72) Kawakami, Y., Eliyahu, S., Sakaguchi, K., Robbins, P., Rivoltini, L., Yannelli, J., Appella, E., and Rosenberg, S., *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, 1994. **180**(1): p. 347-352.
- 73) Bakker, A., Schreurs, M., de Boer, A., Kawakami, Y., Rosenberg, S., Adema, G., and Figdor, C., *Melanocyte lineage-specific antigen gp100 is recognized by melanoma-derived tumor-infiltrating lymphocytes*. J Exp Med, 1994. **179**(3): p. 1008-1009.
- 74) Wang, R., Robbins, P., Kawakami, Y., Kang, X., and Rosenberg, S., *Identification of a gene encoding a melanoma tumor antigen recognized by HLA-A31-restricted tumor-infiltrating lymphocytes*. J Exp Med, 1995. **171**(2): p. 799-804.
- 75) Kawakami, Y., Eliyahu, S., Jennings, C., Sakaguchi, K., Kang, X., Southwood, S., Robbins, P.F., Sette, A., Appella, E., and Rosenberg, S.A., *Recognition of multiple epitopes in the human melanoma antigen gp100 by tumor-infiltrating T lymphocytes associated with in vivo tumor regression*. J Immunol, 1995. **154**(8): p. 3961-8.
- 76) Cox, A., Skipper, J., Chen, Y., Henderson, R., Darrow, T., Shabanowitz, J., Engelhard, V., Hunt, D., and Slingsluff, C.J., *Identification of a peptide recognized by five melanoma-specific human cytotoxic T cell lines*. Science, 1994. **264**(5159): p. 716-719.
- 77) Kemp, E., Waterman, E., and Weetman, A., *Autoimmune aspects of vitiligo*. Autoimmunity, 2001. **34**(1): p. 35-77.

-
- 78) Overwijk, W.W. and Restifo, N.P., *Autoimmunity and the immunotherapy of cancer: targeting the "self" to destroy the "other"*. Crit Rev Immunol, 2000. **20**(6): p. 433-50.
- 79) Kawakami, Y., Suzuki, Y., Shofuda, T., Kiniwa, Y., Inozume, T., Dan, K., Sakurai, T., and Fujita, T., *T cell immune responses against melanoma and melanocytes in cancer and autoimmunity*. Pigment Cell Res, 2000. **13 Suppl 8**: p. 163-9.
- 80) Güre, A.O., Stockert, E., Scanlan, M.J., Keresztes, R.S., Jäger, D., Altorki, N.K., Old, L.J., and Chen, Y.T., *Serological identification of embryonic neural proteins as highly immunogenic tumor antigens in small cell lung cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(8): p. 4198-203.
- 81) Chen, Y.T., *Cancer vaccine: identification of human tumor antigens by SEREX*. Cancer J Sci Am, 2000. **6 Suppl 3**: p. S208-17.
- 82) Gaugler, B., Brouwenstijn, N., Vantomme, V., Szikora, J., Van der Speck, C., Patard, J., Boon, T., and Van den Eynde, B., *A new gene coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human renal carcinoma*. Immunogenetics, 1996. **44**: p. 323-330.
- 83) Horig, H., Lee, D.S., Conkright, W., Divito, J., Hasson, H., LaMare, M., Rivera, A., Park, D., Tine, J., Guito, K., Tsang, K.W., Schlom, J., and Kaufman, H.L., *Phase I clinical trial of a recombinant canarypoxvirus (ALVAC) vaccine expressing human carcinoembryonic antigen and the B7.1 co-stimulatory molecule*. Cancer Immunol Immunother, 2000. **49**(9): p. 504-14.
- 84) Old, L.J., *Cancer/Testis (CT) antigens - a new link between gametogenesis and cancer*. Cancer Immunity, 2001. **1**: p. 1.
- 85) Boon, T. and van den Bruggen, P., *Human tumor antigens recognized by T lymphocytes*. J Exp Med, 1996. **183**(3): p. 725-729.
- 86) Jungbluth, A.A., Stockert, E., Chen, Y.T., Kolb, D., Iversen, K., Coplan, K., Williamson, B., Altorki, N., Busam, K.J., and Old, L.J., *Monoclonal antibody MA454 reveals a heterogeneous expression pattern of MAGE-1 antigen in formalin-fixed paraffin embedded lung tumours*. Br J Cancer, 2000. **83**(4): p. 493-7.
- 87) Jungbluth, A.A., Chen, Y.T., Stockert, E., Busam, K.J., Kolb, D., Iversen, K., Coplan, K., Williamson, B., Altorki, N., and Old, L.J., *Immunohistochemical analysis of NY-ESO-1 antigen expression in normal and malignant human tissues*. Int J Cancer, 2001. **92**(6): p. 856-60.
- 88) Satie, A., Rajpert-De Mets, E., Spagnoli, G., S., H., L., O., Jacobsen, G., Rioux-Leclercq, N., Jegou, B., and Samson, M., *The cancer-testis gene, NY-ESO-1, is expressed in normal fetal*

- and adult testes and in spermatocytic seminomas and testicular carcinoma in situ.* Lab Invest, 2002. **82**(6): p. 775-780.
- 89) Jungbluth, A., Chen, Y., Busam, K., Coplan, K., Kolb, D., Iversen, K., Williamson, B., Van Landeghem, F., Stockert, E., and Old, L., *CT7 (MAGE-C1) antigen expression in normal and neoplastic tissues.* Int J Cancer, 2002. **99**(6): p. 839-845.
- 90) De Smet, C., De Backer, O., Faraoni, I., Lurquin, C., Brasseur, F., and Boon, T., *The activation of human gene MAGE-1 in tumor cells is correlated with genome-wide demethylation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(14): p. 7149-7153.
- 91) Choi, Y. and Chae, C., *DNA hypomethylation and germ cell-specific expression of testis-specific H2B histone gene.* J Biol Chem, 1991. **266**(30): p. 20504-20511.
- 92) Choi, Y. and Chae, C., *Demethylation of somatic and testis-specific histone H2A and H2B genes in F9 embryonal carcinoma cells.* Mol Cell Biol, 1993. **13**(9): p. 5538-5548.
- 93) De Smet, C., Lurquin, C., De Plaen, E., Brasseur, F., Zarour, H., De Backer, O., Coulie, P.G., and Boon, T., *Genes coding for melanoma antigens recognised by cytolytic T lymphocytes.* Eye, 1997. **11**(Pt 2): p. 243-8.
- 94) De Smet, C., Courtois, S.J., Faraoni, I., Lurquin, C., Szikora, J.P., De Backer, O., and Boon, T., *Involvement of two Ets binding sites in the transcriptional activation of the MAGE1 gene.* Immunogenetics, 1995. **42**(4): p. 282-90.
- 95) Kondoh, N., Nishina, Y., Tsuchida, J., Koga, M., Tanaka, H., Uchida, K., Inazawa, J., Taketo, M., Nozaki, M., Nojima, H., Matsumiya, K., Namiki, M., Okuyama, A., and Nishimune, Y., *Assignment of synaptonemal complex protein 1 (SCPI) to human chromosome 1p13 by fluorescence in situ hybridization and its expression in the testis.* Cytogenet Cell Genet, 1997. **78**(2): p. 103-104.
- 96) Ono, T., Kurashige, T., Harada, N., Noguchi, Y., Saika, T., Niikawa, N., Aoe, M., Nakamura, S., Higashi, T., Hiraki, A., Wada, H., Kumon, H., Old, L.J., and Nakayama, E., *Identification of proacrosin binding protein sp32 precursor as a human cancer/testis antigen.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(6): p. 3282-7.
- 97) Usener, D., *Identifikation tumorspezifischer Antigene des kutanen T-Zell Lymphoms mit Hilfe der SEREX Methode.* Diplomarbeit, Universität Mainz, 2000.
- 98) Eichmüller, S., Usener, D., Dummer, R., Stein, A., Thiel, D., and Schadendorf, D., *Serological detection of cutaneous T-cell lymphoma-associated antigens.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(2): p. 629-634.

-
- 99) Sahin, U., Türeci, O., Chen, Y., Seitz, G., Villena-Heinsen, C., Old, L., and Pfreundschuh, M., *Expression of multiple cancer/testis (CT) antigens in breast cancer and melanoma: basis for polyvalent CT vaccine strategies*. Int J Cancer, 1998. **78**(3): p. 387-389.
- 100) Jungbluth, A.A., Busam, K.J., Kolb, D., Iversen, K., Coplan, K., Chen, Y.T., Spagnoli, G.C., and Old, L.J., *Expression of MAGE-antigens in normal tissues and cancer*. Int J Cancer, 2000. **85**(4): p. 460-5.
- 101) Lee, L., Wang, R.F., Wang, X., Mixon, A., Johnson, B.E., Rosenberg, S.A., and Schrupp, D.S., *NY-ESO-1 may be a potential target for lung cancer immunotherapy*. Cancer J Sci Am, 1999. **5**(1): p. 20-5.
- 102) Fernandez, N., Cooper, J., Sprinks, M., AbdElrahman, M., Fiszer, D., Kurpisz, M., and Dealtry, G., *A critical review of the role of the major histocompatibility complex in fertilization, preimplantation development and feto-maternal interactions*. Hum Reprod Update, 1999. **5**(3): p. 234-48.
- 103) Fiszer, D. and Kurpisz, M., *Major histocompatibility complex expression on human, male germ cells: a review*. Am J Reprod Immunol, 1998. **40**(3): p. 172-6.
- 104) De Plaen, E., Arden, K., Traversari, C., Gaforio, J.J., Szikora, J.P., De Smet, C., Brasseur, F., van der Bruggen, P., Lethe, B., Lurquin, C., and et al., *Structure, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the MAGE family*. Immunogenetics, 1994. **40**(5): p. 360-9.
- 105) Van den Eynde, B., O., P., De Backer, O., B., G., Lucas, S., and Boon, T., *A new family of genes coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human Melanoma*. J Exp Med, 1995. **182**: p. 689-698.
- 106) Lurquin, C., De Smet, C., Brasseur, F., Muscatelli, F., Martelange, V., De Plaen, E., Brasseur, R., Monaco, A., and Boon, T., *Two members of the human MAGEB gene family located in Xp21.3 are expressed in tumors of various histological origins*. Genomics, 1997. **46**(3): p. 397-408.
- 107) Chen, Y., Güre, A., Tsang, S., Stockert, E., Jäger, E., Knuth, A., and Old, L., *Identification of multiple cancer/testis antigens by allogeneic antibody screening of a melanoma cell line library*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(12): p. 6919-23.
- 108) Lucas, S., De Plaen, E., and Boon, T., *MAGE-B5, MAGE-B6, MAGE-C2, and MAGE-C3: four new members of the MAGE family with tumor-specific expression*. Int J Cancer, 2000. **87**(1): p. 55-60.
- 109) Pold, M., Zhou, J., Chen, G.L., Hall, J.M., Vescio, R.A., and Berenson, J.R., *Identification of a new, unorthodox member of the MAGE gene family*. Genomics, 1999. **59**(2): p. 161-7.

-
- 110) Chomez, P., De Backer, O., Bertrand, M., De Plaen, E., Boon, T., and Lucas, S., *An overview of the MAGE gene family with the identification of all human members of the family*. *Cancer Res*, 2001. **61**(14): p. 5544-51.
- 111) Barker, P.A. and Salehi, A., *The MAGE proteins: emerging roles in cell cycle progression, apoptosis, and neurogenetic disease*. *J Neurosci Res*, 2002. **67**(6): p. 705-12.
- 112) Meuwissen, R., Meerts, I., Hoovers, J., Leschot, N., and Heyting, C., *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, 1997. **39**(3): p. 377-384.
- 113) Schmekel, K., Meuwissen, R., Dietrich, A., Vink, A., van Marle, J., van Veen, H., and Heyting, C., *Organization of SCP1 protein molecules within synaptonemal complexes of the rat*. *Exp Cell Res*, 1996. **226**(1): p. 20-30.
- 114) Scanlan, M.J., Altorki, N.K., Güre, A.O., Williamson, B., Jungbluth, A., Chen, Y.T., and Old, L.J., *Expression of cancer-testis antigens in lung cancer: definition of bromodomain testis-specific gene (BRDT) as a new CT gene, CT 9*. *Cancer Lett*, 2000. **150**(2): p. 155-64.
- 115) Stacy, S., Krolick, K.A., Infante, A.J., and Kraig, E., *Immunological memory and late onset autoimmunity*. *Mech Ageing Dev*, 2002. **123**(8): p. 975-85.
- 116) Coulie, P., Weynants, P., Lehmann, F., Herman, J., Brichard, V., Wolfel, T., Van Pel, A., De Plaen, E., Bresseur, F., and Boon, T., *Genes coding for tumor antigens recognized by human cytolytic T lymphocytes*. *J Immunother*, 1993. **14**(2): p. 104-109.
- 117) Boon, T., Cerottini, J., Van den Eynde, B., van der Bruggen, P., and Van Pel, A., *Tumor antigens recognized by T lymphocytes*. *Annu Rev Immunol*, 1994. **12**: p. 337-365.
- 118) Pfreundschuh, M., Shiku, H., Takahashi, T., Ueda, R., Ransohoff, J., Oettgen, H., and Old, L., *Serological analysis of cell surface antigens of malignant human brain tumor*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1978. **75**(10): p. 5122-5126.
- 119) Real, F.X., Furukawa, K., Mattes, M., Gusik, S., Cordon-Cardo, C., Oettgen, H., Old, L., and Lloyd, K., *Class I (unique) tumor antigens of human melanoma: identification of unique and common epitopes on a 90-kDa glycoprotein*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988. **85**(11): p. 3965-9.
- 120) Pfreundschuh, M., *Exploitation of the B cell repertoire for the identification of human tumor antigens*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2000. **46 Suppl**: p. S3-7.
- 121) Old, L. and Chen, Y., *New paths in human cancer serology*. *J Exp Med*, 1998. **187**(8): p. 1163-1167.

-
- 122) Jäger, E., Chen, Y., Drijfhout, J., Karbach, J., Ringhoffer, M., Jäger, D., Arand, M., Wada, H., Noguchi, Y., Stockert, E., Old, L., and Knuth, A., *Simultaneous humoral and cellular immune response against cancer-testis antigen NY-ESO-1: definition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2-binding peptide epitopes*. J Exp Med, 1998. **187**(2): p. 265-270.
- 123) Sahin, U., Türeci, O., and Pfreundschuh, M., *Serological identification of human tumor antigens*. Curr Opin Immunol, 1997. **9**(5): p. 709-716.
- 124) Berger, C.L., Hanlon, D., Kanada, D., Dhodapkar, M., Lombillo, V., Wang, N., Christensen, I., Howe, G., Crouch, J., El-Fishawy, P., and Edelson, R., *The growth of cutaneous T-cell lymphoma is stimulated by immature dendritic cells*. Blood, 2002. **99**(8): p. 2929-39.
- 125) Edelson, R.L., *Cutaneous T cell lymphoma: the helping hand of dendritic cells*. Ann N Y Acad Sci, 2001. **941**: p. 1-11.
- 126) Geertsen, R., Hofbauer, G., Kamarashev, J., Yue, F.Y., and Dummer, R., *Immune escape mechanisms in malignant melanoma*. Int J Mol Med, 1999. **3**(1): p. 49-57.
- 127) Sahin, U., Türeci, Ö., and Pfreundschuh, M., *Vom Immunsystem erkennbare Antigene auf menschlichen Malignomen*. Onkologe, 1999. **5**: p. 659-667.
- 128) Glass, L.F., Keller, K.L., Messina, J.L., Dalton, J., Yag-Howard, C., and Fenske, N.A., *Cutaneous T-cell Lymphoma*. Cancer Control, 1998. **5**(1): p. 11-18.
- 129) Burg, G., Dummer, R., and Kerl, H., *Classification of cutaneous lymphomas*. Dermatol Clin, 1994. **12**: p. 213-217.
- 130) Weinstock, M. and Horn, J., *Population-based estimate of survival and determinants of prognosis in patients with mycosis fungoides*. Cancer, 1988. **62**(8): p. 1658-1661.
- 131) Weinstock, M. and Horn, J., *Mycosis fungoides in the United States: Increasing incidence and descriptive epidemiology*. JAMA, 1988. **260**: p. 42-46.
- 132) Burg, G., Kempf, W., Haeffner, A., Nestle, F., Hess-Schmid, M., Doebbeling, U., Mueller, B., and Dummer, R., *Cutaneous lymphomas*. Curr Probl Dermatol, 1997. **9**(5): p. 137-204.
- 133) Sterry, W., Gellrich, S., Audring, H., Schulze, P., and Jahn, S., *Diagnostik und Klassifikation kutaner Lymphome*, in *Dermatologische Onkologie*, C. Garbe, Dummer, R., Kaufmann, R., Tilgen, W., Editor. 1997, Springer Verlag: Berlin, Heidelberg, New-York. p. 427-435.
- 134) Jahn, S., Asadullah, K., Walden, P., and Sterry, W., *Cutaneous malignant lymphomas*. Immunol Today, 1998. **19**(3): p. 100-103.
- 135) Kempf, W., Dummer, R., and Burg, G., *Klinische Besonderheiten und therapeutische Besonderheiten kutaner Lymphome*. Dt. Ärzteblatt, 2001. **98**(11): p. 697-703.

-
- 136) Willemze, R., Kerl, H., Sterry, W., Berti, E., Cerroni, L., *et al.*, *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*, 1997. **90**(1): p. 354-371.
- 137) Dummer, R., Häffner, A., Hess, M., and Burg, G., *A rational Approach to the Therapy of Cutaneous T-Cell Lymphomas*. *Onkologie*, 1996. **19**(3): p. 226-230.
- 138) Rook, A.H. and Heald, P., *The immunopathogenesis of cutaneous T-cell lymphoma*. *Hematol Oncol Clin North Am*, 1995. **9**(5): p. 997-1010.
- 139) Dummer, R., Heald, P., Nestle, F., Ludwig, E., Laine, E., Hemmi, S., and Burg, G., *Sezary syndrome T-cell clones display T-helper 2 cytokines and express the accessory factor-1 (interferon-gamma receptor beta-chain)*. *Blood*, 1996. **88**(4): p. 1383-1389.
- 140) Wood, G., Hardman, DL., Boni, R., Dummer, R., Kim, YH., Smoller, BR., Takeshita, M., Kikuchi, M., Burg, G., *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*, 1996. **88**(5): p. 1765-1770.
- 141) Thangavelu, M., Finn, W.G., Yelavarthi, K.K., Roenigk, H.H., Jr., Samuelson, E., Peterson, L., Kuzel, T.M., and Rosen, S.T., *Recurring structural chromosome abnormalities in peripheral blood lymphocytes of patients with mycosis fungoides/Sezary syndrome*. *Blood*, 1997. **89**(9): p. 3371-7.
- 142) Hansen, E.R., *Immunoregulatory events in the skin of patients with cutaneous T-cell lymphoma*. *Arch Dermatol*, 1996. **132**(5): p. 554-61.
- 143) Whittmore, A.S., Holly, E.A., Lee, I.M., Abel, E.A., Adams, R.M., Nickoloff, B.J., Bley, L., Peters, J.M., and Gibney, C., *Mycosis fungoides in relation to environmental exposures and immune response: a case-control study*. *J Natl Cancer Inst*, 1989. **81**(20): p. 1560-7.
- 144) Jackow, C.M., Cather, J.C., Hearne, V., Asano, A.T., Musser, J.M., and Duvic, M., *Association of erythrodermic cutaneous T-cell lymphoma, superantigen-positive Staphylococcus aureus, and oligoclonal T-cell receptor V beta gene expansion*. *Blood*, 1997. **89**(1): p. 32-40.
- 145) Hall, W., *Human T cell lymphotropic virus type I and cutaneous T cell leukemia/lymphoma*. *J Exp Med*, 1994. **180**(5): p. 1581-1585.
- 146) Kikuchi, A., Nishikawa, T., Ikeda, Y., and Yamaguchi, K., *Absence of human T-lymphotropic virus type I in Japanese patients with cutaneous T-cell lymphoma*. *Blood*, 1997. **89**(5): p. 1529-32.

-
- 147) Zucker-Franklin, D. and Pancake, B.A., *The role of human T-cell lymphotropic viruses (HTLV-I and II) in cutaneous T-cell lymphomas*. Semin Dermatol, 1994. **13**(3): p. 160-5.
- 148) Pawson, R., Catovsky, D., and Schulz, T.F., *Lack of evidence of HHV-8 in mature T-cell lymphoproliferative disorders*. Lancet, 1996. **348**(9039): p. 1450-1.
- 149) Sander, C.A., Simon, M., Puchta, U., Raffeld, M., and Kind, P., *HHV-8 in lymphoproliferative lesions in skin*. Lancet, 1996. **348**(9025): p. 475-6.
- 150) Shimakage, M., Sasagawa, T., Kawahara, K., Yutsudo, M., Kusuoka, H., and Kozuka, T., *Expression of Epstein-Barr virus in cutaneous T-cell lymphoma including mycosis fungoides*. Int J Cancer, 2001. **92**(2): p. 226-31.
- 151) Nagore, E., Ledesma, E., Collado, C., Oliver, V., Perez-Perez, A., and Aliaga, A., *Detection of Epstein-Barr virus and human herpesvirus 7 and 8 genomes in primary cutaneous T- and B-cell lymphomas*. Br J Dermatol, 2000. **143**(2): p. 320-3.
- 152) Rich, B.E., Campos-Torres, J., Tepper, R.I., Moreadith, R.W., and Leder, P., *Cutaneous lymphoproliferation and lymphomas in interleukin 7 transgenic mice*. J Exp Med, 1993. **177**(2): p. 305-16.
- 153) Abrams, J.T., Vonderheid, E.C., Kolbe, S., Appelt, D.M., Arking, E.J., and Balin, B.J., *Sezary T-cell activating factor is a Chlamydia pneumoniae-associated protein*. Clin Diagn Lab Immunol, 1999. **6**(6): p. 895-905.
- 154) McGregor, J.M., McKee, P.H., Khorshid, M., and Proby, C.M., *P53 expression and human papillomavirus infection in transplant recipients and in patients with epidermodysplasia verruciformis*. Br J Dermatol, 1996. **134**(2): p. 374.
- 155) Neri, A., Fracchiolla, N., Roscetti, E., Garatti, S., Trecca, D., Boletini, A., Perletti, L., Baldini, L., Maiolo, A., and Berti, E., *Molecular analysis of cutaneous B- and T-cell lymphomas*. Blood, 1995. **86**(8): p. 3160-3172.
- 156) Wolff-Snedorff, A., Ralfkiaer, E., Thomsen, K., Vejlsgaard, G.L., *Analyses of T-cell receptor beta-chain genes by Southern blotting in known and suspected cutaneous T-cell lymphoma. A study of 67 samples from 32 patients*. Clin Exp Dermatol, 1995. **20**(2): p. 115-122.
- 157) Muche, J.M., Lukowsky, A., Heim, J., Friedrich, M., Audring, H., and Sterry, W., *Demonstration of frequent occurrence of clonal T cells in the peripheral but not in the skin of patients with small plaque parapsoriasis*. Blood, 1999. **94**(4): p. 1409-17.
- 158) Hoppe, R., Medeiros, L., Warnke, R., and Wood, G., *CD8-positive tumor-infiltrating lymphocytes influence the long-term survival of patients with mycosis fungoides*. J Am Acad Dermatol, 1995. **32**(3): p. 448-453.

-
- 159) Berger, C., Wang, N., Christensen, I., Longley, J., Heald, P., and Edelson, R., *The immune response to class I-associated tumor-specific cutaneous T-cell lymphoma antigens*. J Invest Dermatol, 1996. **107**(3): p. 392-397.
- 160) Berger, C., Longley, B., Imaeda, S., Christensen, I., Heald, P., and Edelson, R., *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, 1998. **76**(3): p. 304-311.
- 161) Bagot, M., Echchakir, H., Mami-Chouaib, F., Delfau-Larue, M., Charue, D., Bernheim, A., Chouaib, S., Boumsell, L., and Bensussan, A., *Isolation of tumor-specific cytotoxic CD4+ and CD4+ CD8dim+ T-cell clones infiltrating a cutaneous T-cell lymphoma*. Blood, 1998. **91**(11): p. 4331-4341.
- 162) Hsu, F., Benike, C., Fagnoni, F., Liles, T., Czerwinski, D., Taidi, B., Engleman, E., and Levy, R., *Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells*. Nat Med, 1996. **2**(1): p. 52-58.
- 163) Hsu, F., Caspar, C., Czerwinski, D., Kwak, L., Liles, T., Syrengelas, A., Taidi-Laskowski, B., and Levy, R., *Tumor-specific idotype vaccines in the treatment of patients with B-cell lymphoma long-term results of a clinical trial*. Blood, 1997. **89**(9): p. 3129-3135.
- 164) Osterroth, F., Garbe, A., Fisch, P., and Veelken, H., *Stimulation of cytotoxic T cells against idotype immunoglobulin of malignant lymphoma with protein-pulsed or idotype-transduced dendritic cells*. Blood, 2000. **95**(4): p. 1342-1349.
- 165) Eichmüller, S., *Towards defining specific antigens for cutaneous lymphomas*. Onkologie, 2002. **25**: p. 448-454.
- 166) Whittaker, S., *T-cell receptor gene analysis in cutaneous t-cell Lymphoma*. Clin Exp Derm, 1996. **21**: p. 81-87.
- 167) Berger, C.L., Longley, J., Hanlon, D., Girardi, M., and Edelson, R., *The clonotypic T cell receptor is a source of tumor-associated antigens in cutaneous T cell lymphoma*. Ann N Y Acad Sci, 2001. **941**: p. 106-22.
- 168) Reddy, S.A., Okada, C., Wong, C., Bahler, D., and Levy, R., *T cell antigen receptor vaccines for active therapy of T cell malignancies*. Ann N Y Acad Sci, 2001. **941**: p. 97-105.
- 169) Dippel, E., Assaf, C., Hummel, M., Schrag, H.J., Stein, H., Goerdts, S., and Orfanos, C.E., *Clonal T-cell receptor gamma-chain gene rearrangement by PCR-based GeneScan analysis in advanced cutaneous T-cell lymphoma: a critical evaluation*. J Pathol, 1999. **188**(2): p. 146-54.

-
- 170) Linnemann, T., Wiesmuller, K.H., Gellrich, S., Kaltoft, K., Sterry, W., and Walden, P., *A T-cell epitope determined with random peptide libraries and combinatorial peptide chemistry stimulates T cells specific for cutaneous T-cell lymphoma*. *Ann Oncol*, 2000. **11 Suppl 1**: p. 95-9.
- 171) Linnemann, T., Tumenjargal, S., Gellrich, S., Wiesmuller, K., Kaltoft, K., Sterry, W., and Walden, P., *Mimotopes for tumor-specific T lymphocytes in human cancer determined with combinatorial peptide libraries*. *Eur J Immunol*, 2001. **31**(1): p. 156-65.
- 172) Bagot, M., Moretta, A., Sivori, S., Biassoni, R., Cantoni, C., Bottino, C., Boumsell, L., and Bensussan, A., *CD4(+) cutaneous T-cell lymphoma cells express the p140-killer cell immunoglobulin-like receptor*. *Blood*, 2001. **97**(5): p. 1388-91.
- 173) Nikolova, M., Tawab, A., Marie-Cardine, A., Bagot, M., Boumsell, L., and Bensussan, A., *Increased expression of a novel early activation surface membrane receptor in cutaneous T cell lymphoma cells*. *J Invest Dermatol*, 2001. **116**(5): p. 731-8.
- 174) Türeci, O., Sahin, U., Zwick, C., Koslowski, M., Seitz, G., and Pfreundschuh, M., *Identification of a meiosis-specific protein as a member of the class of cancer testis antigens*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(9): p. 5211-5216.
- 175) de Cremoux, P., Martin, E.C., Vincent-Salomon, A., Dieras, V., Barbaroux, C., Liva, S., Pouillart, P., Sastre-Garau, X., and Magdelenat, H., *Quantitative PCR analysis of c-erb B-2 (HER2/neu) gene amplification and comparison with p185(HER2/neu) protein expression in breast cancer drill biopsies*. *Int J Cancer*, 1999. **83**(2): p. 157-61.
- 176) Heckel, D., Brass, N., Fischer, U., Blin, N., Steudel, I., Türeci, O., Fackler, O., Zang, K.D., and Meese, E., *cDna cloning and chromosomal mapping of a predicted coiled-coil proline-rich protein immunogenic in meningioma patients*. *Hum Mol Genet*, 1997. **6**(12): p. 2031-41.
- 177) Serrano, A., Lethe, B., Delroisse, J.M., Lurquin, C., De Plaen, E., Brasseur, F., Rimoldi, D., and Boon, T., *Quantitative evaluation of the expression of MAGE genes in tumors by limiting dilution of cDNA libraries*. *Int J Cancer*, 1999. **83**(5): p. 664-9.
- 178) Weynants, P., Lethe, B., Brasseur, F., Marchand, M., and Boon, T., *Expression of mage genes by non-small-cell lung carcinomas*. *Int J Cancer*, 1994. **56**(6): p. 826-9.
- 179) Scarcella, D.L., Chow, C.W., Gonzales, M.F., Economou, C., Brasseur, F., and Ashley, D.M., *Expression of MAGE and GAGE in high-grade brain tumors: a potential target for specific immunotherapy and diagnostic markers*. *Clin Cancer Res*, 1999. **5**(2): p. 335-41.

-
- 180) Türeci, O., Chen, Y., Sahin, U., Güre, A., Zwick, C., Villena, C., Tsang, S., Seitz, G., Old, L., and Pfreundschuh, M., *Expression of SSX genes in human tumors*. Int J Cancer, 1998. **77**(1): p. 19-23.
- 181) Lethé, B., Lucas, S., Michaux, L., De Smet, C., Godelaine, D., Serrano, A., E., D.P., and Boon, T., *Lage-1, a new gene with tumor specificity*. Int J Cancer, 1998. **76**: p. 903-908.
- 182) Ikeda, H., Lethé, B., Lehmann, F., van Baren, N., Baurain, J., De Smet, C., Chambost, H., Vitale, M., Moretta, A., Boon, T., and Coulie, P., *Characterization of an antigen that is recognized on a melanoma showing partial HLA loss by CTL expressing an NK inhibitory receptor*. Immunity, 1997. **6**: p. 199-208.
- 183) Brossart, P., Schneider, A., Dill, P., Schammann, T., Grunebach, F., Wirths, S., Kanz, L., Bühring, H.J., and Brugger, W., *The epithelial tumor antigen MUC1 is expressed in hematological malignancies and is recognized by MUC1-specific cytotoxic T-lymphocytes*. Cancer Res, 2001. **61**(18): p. 6846-50.
- 184) Greiner, J., Ringhoffer, M., Simikopinko, O., Szmargowska, A., Huebsch, S., Maurer, U., Bergmann, L., and Schmitt, M., *Simultaneous expression of different immunogenic antigens in acute myeloid leukemia*. Exp Hematol, 2000. **28**(12): p. 1413-22.
- 185) Grondahl, B., Puppe, W., Hoppe, A., Kuhne, I., Weigl, J.A., and Schmitt, H.J., *Rapid identification of nine microorganisms causing acute respiratory tract infections by single-tube multiplex reverse transcription-PCR: feasibility study*. J Clin Microbiol, 1999. **37**(1): p. 1-7.
- 186) Osiowy, C., *Direct detection of respiratory syncytial virus, parainfluenza virus, and adenovirus in clinical respiratory specimens by a multiplex reverse transcription-PCR assay*. J Clin Microbiol, 1998. **36**(11): p. 3149-54.
- 187) Usener, D., Gerhardt, A., Schadendorf, D., and Eichmüller, S., *Sero-reactivity against MAGE-A and LAGE-1 proteins in melanoma patients*. Br J Dermatol, 2003. **in press**.
- 188) Borowitz, M., Weidner, A., Olsen, E., and Picker, L., *Abnormalities of circulating T-cell subpopulations in patients with cutaneous T-cell lymphoma: cutaneous lymphocyte-associated antigen expression on T cells correlates with extent of disease*. Leukemia, 1993. **7**(6): p. 859-863.
- 189) Comtesse, N., Reus, K., and Meese, E., *The MGEA6 Multigene Family Has an Active Locus on 14q and at Least Nine Pseudogenes on Different Chromosomes*. Genomics, 2001. **75**(1-3): p. 43-8.
- 190) Makalowski, W., Mitchell, G.A., and Labuda, D., *Alu sequences in the coding regions of mRNA: a source of protein variability*. Trends Genet, 1994. **10**(6): p. 188-93.

-
- 191) Mighell, A.J., Markham, A.F., and Robinson, P.A., *Alu sequences*. FEBS Lett, 1997. **417**(1): p. 1-5.
- 192) Smit, A.F., *The origin of interspersed repeats in the human genome*. Curr Opin Genet Dev, 1996. **6**(6): p. 743-8.
- 193) Comtesse, N., Niedermayer, I., Glass, B., Heckel, D., Maldener, E., Nastainczyk, W., Feiden, W., and Meese, E., *MGEA6 is tumor-specific overexpressed and frequently recognized by patient-serum antibodies*. Oncogene, 2002. **21**(2): p. 239-47.
- 194) Muscatelli, F., Walker, A.P., De Plaen, E., Stafford, A.N., and Monaco, A.P., *Isolation and characterization of a MAGE gene family in the Xp21.3 region*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(11): p. 4987-91.
- 195) Stockert, E., Jäger, E., Chen, Y., Scanlan, M., Gout, I., Karbach, J., Arand, M., Knuth, A., and Old, L., *A survey of the humoral immune response of cancer patients to a panel of human tumor antigens*. J Exp Med, 1998. **187**(8): p. 1349-54.
- 196) Gaugler, B., Van den Eynde, B., van der Bruggen, P., Romero, P., Gaforio, J.J., De Plaen, E., Lethe, B., Brasseur, F., and Boon, T., *Human gene MAGE-3 codes for an antigen recognized on a melanoma by autologous cytolytic T lymphocytes*. J Exp Med, 1994. **179**(3): p. 921-30.
- 197) Otte, M., Zafrakas, M., Riethdorf, L., Pichlmeier, U., Loning, T., Janicke, F., and Pantel, K., *MAGE-A gene expression pattern in primary breast cancer*. Cancer Res, 2001. **61**(18): p. 6682-7.
- 198) Lee, K.D., Eura, M., Ogi, K., Nakano, K., Chikamatsu, K., Masuyama, K., and Ishikawa, T., *Expression of the MAGE-1, -2, -3, -4, and -6 genes in non-squamous cell carcinoma lesions of the head and neck*. Acta Otolaryngol, 1996. **116**(4): p. 633-9.
- 199) Eura, M., Ogi, K., Chikamatsu, K., Lee, K.D., Nakano, K., Masuyama, K., Itoh, K., and Ishikawa, T., *Expression of the MAGE gene family in human head-and-neck squamous-cell carcinomas*. Int J Cancer, 1995. **64**(5): p. 304-8.
- 200) Brasseur, F., Rimoldi, D., Lienard, D., Lethe, B., Carrel, S., Arienti, F., Suter, L., Vanwijck, R., Bourlond, A., Humblet, Y., and et al., *Expression of MAGE genes in primary and metastatic cutaneous melanoma*. Int J Cancer, 1995. **63**(3): p. 375-80.
- 201) Gibbs, P., Hutchins, A.M., Dorian, K.T., Vaughan, H.A., Davis, I.D., Silvapulle, M., and Cebon, J.S., *MAGE-12 and MAGE-6 are frequently expressed in malignant melanoma*. Melanoma Res, 2000. **10**(3): p. 259-64.

-
- 202) Eichmüller, S., Usener, D., Jochim, A., and Schadendorf, D., *mRNA Expression of Tumor-Associated Antigens in Melanoma Tissues and Cell Lines*. *Exp Dermatol*, 2002. **11**(4): p. 292-301.
- 203) Sahin, U., Koslowski, M., Türeci, O., Eberle, T., Zwick, C., Romeike, B., Moringlane, J.R., Schwechheimer, K., Feiden, W., and Pfreundschuh, M., *Expression of cancer testis genes in human brain tumors*. *Clin Cancer Res*, 2000. **6**(10): p. 3916-22.
- 204) Corrias, M.V., Scaruffi, P., Occhino, M., De Bernardi, B., Tonini, G.P., and Pistoia, V., *Expression of *MAGE-1*, *MAGE-3* and *MART-1* genes in neuroblastoma*. *Int J Cancer*, 1996. **69**(5): p. 403-7.
- 205) von Baren, N., Brasseur, F., Godelaine, D., G., H., Ferrant, A., F., L., Andre, M., Ravoet, C., Doyen, C., Spagnoli, G., Bakkus, M., Thielemans, K., and Boon, T., *Genes encoding tumor-specific antigens are expressed in human Myeloma Cells*. *Blood*, 1999. **94**(4): p. 1156-1164.
- 206) Pellat-Deceunynck, C., Mellerin, M.P., Labarriere, N., Jego, G., Moreau-Aubry, A., Harousseau, J.L., Jotereau, F., and Bataille, R., *The cancer germ-line genes *MAGE-1*, *MAGE-3* and *PRAME* are commonly expressed by human myeloma cells*. *Eur J Immunol*, 2000. **30**(3): p. 803-9.
- 207) Häffner, A.C., Tassis, A., Zepter, K., Storz, M., Türeci, O., Burg, G., and Nestle, F.O., *Expression of cancer/testis antigens in cutaneous T cell lymphomas*. *Int J Cancer*, 2002. **97**(5): p. 668-670.
- 208) Marchand, M., van Baren, N., Weynants, P., Brichard, V., Dreno, B., *et al.*, *Tumor regressions observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide encoded by gene *MAGE-3* and presented by *HLA-A1**. *Int J Cancer*, 1999. **80**(2): p. 219-30.
- 209) Zendman, A.J., de Wit, N.J., van Kraats, A.A., Weidle, U.H., Ruiter, D.J., and van Muijen, G.N., *Expression profile of genes coding for melanoma differentiation antigens and cancer/testis antigens in metastatic lesions of human cutaneous melanoma*. *Melanoma Res*, 2001. **11**(5): p. 451-9.
- 210) De Backer, O., Arden, K.C., Boretti, M., Vantomme, V., De Smet, C., Czekay, S., Viars, C.S., De Plaen, E., Brasseur, F., Chomez, P., Van den Eynde, B., Boon, T., and van der Bruggen, P., *Characterization of the *GAGE* genes that are expressed in various human cancers and in normal testis*. *Cancer Res*, 1999. **59**(13): p. 3157-65.
- 211) Chen, M.E., Lin, S.H., Chung, L.W., and Sikes, R.A., *Isolation and characterization of *PAGE-1* and *GAGE-7*. New genes expressed in the LNCaP prostate cancer progression model that share homology with melanoma-associated antigens*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(28): p. 17618-25.

-
- 212) Vasmatzis, G., Essand, M., Brinkmann, U., Lee, B., and Pastan, I., *Discovery of three genes specifically expressed in human prostate by expressed sequence tag database analysis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(1): p. 300-4.
- 213) Brinkmann, U., Vasmatzis, G., Lee, B., Yerushalmi, N., Essand, M., and Pastan, I., *PAGE-1, an X chromosome-linked GAGE-like gene that is expressed in normal and neoplastic prostate, testis, and uterus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(18): p. 10757-62.
- 214) Brinkmann, U., Vasmatzis, G., Lee, B., and Pastan, I., *Novel genes in the PAGE and GAGE family of tumor antigens found by homology walking in the dbEST database*. Cancer Res, 1999. **59**(7): p. 1445-8.
- 215) Liu, X.F., Helman, L.J., Yeung, C., Bera, T.K., Lee, B., and Pastan, I., *XAGE-1, a new gene that is frequently expressed in Ewing's sarcoma*. Cancer Res, 2000. **60**(17): p. 4752-5.
- 216) Cheung, I.Y., Cheung, N.K., Ghossein, R.A., Satagopan, J.M., Bhattacharya, S., and Coit, D.G., *Association between molecular detection of GAGE and survival in patients with malignant melanoma: a retrospective cohort study*. Clin Cancer Res, 1999. **5**(8): p. 2042-7.
- 217) Götte, K., Usener, D., Riedel, F., Hormann, K., Schadendorf, D., and Eichmüller, S., *Tumor-associated antigens as possible targets for immune therapy in head and neck cancer: comparative mRNA expression analysis of RAGE and GAGE genes*. Acta Otolaryngol, 2002. **122**(5): p. 546-52.
- 218) Neumann, E., Engelsberg, A., Decker, J., Storkel, S., Jaeger, E., Huber, C., and Seliger, B., *Heterogeneous expression of the tumor-associated antigens RAGE-1, PRAME, and glycoprotein 75 in human renal cell carcinoma: candidates for T-cell-based immunotherapies?* Cancer Res, 1998. **58**(18): p. 4090-4095.
- 219) Alpen, B., Gure, A., Scanlan, M., Old, L., and Chen, Y., *A new member of the NY-ESO-1 gene family is ubiquitously expressed in somatic tissues and evolutionarily conserved*. Gene, 2002. **297**(1-2): p. 141.
- 220) Schultz Thater, E., Noppen, C., Gudat, F., Durmüller, U., Zajac, P., Kocher, T., Heberer, M., and Spagnoli, G.C., *NY-ESO-1 tumour associated antigen is a cytoplasmic protein detectable by specific monoclonal antibodies in cell lines and clinical specimens*. Br J Cancer, 2000. **83**(2): p. 204-8.
- 221) Valmori, D., Dutoit, V., Lienard, D., Rimoldi, D., Pittet, M.J., Champagne, P., Ellefsen, K., Sahin, U., Speiser, D., Lejeune, F., Cerottini, J.C., and Romero, P., *Naturally occurring human lymphocyte antigen-A2 restricted CD8+ T-cell response to the cancer testis antigen NY-ESO-1 in melanoma patients*. Cancer Res, 2000. **60**(16): p. 4499-506.

-
- 222) Chen, J.L., Dunbar, P.R., Gileadi, U., Jäger, E., Gnjatich, S., Nagata, Y., Stockert, E., Panicali, D.L., Chen, Y.T., Knuth, A., Old, L.J., and Cerundolo, V., *Identification of NY-ESO-1 Peptide Analogues Capable of Improved stimulation of Tumor-Reactive CTL*. J Immunol, 2000. **165**(2): p. 948-955.
- 223) Wang, R., Johnston, S., Zeng, G., Topalian, S., Schwartzentruber, D., and Rosenberg, S., *A breast and melanoma-shared tumor antigen: T cell responses to antigenic peptides translated from different open reading frames*. J Immuno, 1998. **161**(7): p. 3598-3606.
- 224) Aarnoudse, C.A., van den Doel, P.B., Heemskerk, B., and Schrier, P.I., *Interleukin-2-induced, melanoma-specific T cells recognize CAMEL, an unexpected translation product of LAGE-1*. Int J Cancer, 1999. **82**(3): p. 442-8.
- 225) Jäger, E., Jäger, D., Karbach, J., Chen, Y.T., Ritter, G., Nagata, Y., Gnjatich, S., Stockert, E., Arand, M., Old, L.J., and Knuth, A., *Identification of NY-ESO-1 epitopes presented by human histocompatibility antigen (HLA)-DRB4*0101-0103 and recognized by CD4(+) T lymphocytes of patients with NY-ESO-1-expressing melanoma*. J Exp Med, 2000. **191**(4): p. 625-30.
- 226) Zeng, G., Touloukian, C.E., Wang, X., Restifo, N.P., Rosenberg, S.A., and Wang, R.F., *Identification of CD4+ T cell epitopes from NY-ESO-1 presented by HLA-DR molecules*. J Immunol, 2000. **165**(2): p. 1153-9.
- 227) Zeng, G., Li, Y., El-Gamil, M., Sidney, J., Sette, A., Wang, R.F., Rosenberg, S.A., and Robbins, P.F., *Generation of NY-ESO-1-specific CD4+ and CD8+ T cells by a single peptide with dual MHC class I and class II specificities: a new strategy for vaccine design*. Cancer Res, 2002. **62**(13): p. 3630-5.
- 228) Jäger, E., Nagata, Y., Gnjatich, S., Wada, H., Stockert, E., *et al.*, *Monitoring CD8 T cell responses to NY-ESO-1: correlation of humoral and cellular immune responses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(9): p. 4760-5.
- 229) Chen, Y.T. and Old, L.J., *Cancer-testis antigens: targets for cancer immunotherapy*. Cancer J Sci Am, 1999. **5**(1): p. 16-7.
- 230) Güre, A., Türeci, O., Sahin, U., Tsang, S., Scanlan, M., Jäger, E., Knuth, A., Pfreundschuh, M., Old, L., and Chen, Y., *SSX: a multigene family with several members transcribed in normal testis and human cancer*. Int J Cancer, 1997. **72**(6): p. 965-971.
- 231) Hoon, D.S., Yuzuki, D., Hayashida, M., and Morton, D.L., *Melanoma patients immunized with melanoma cell vaccine induce antibody responses to recombinant MAGE-1 antigen*. J Immunol, 1995. **154**(2): p. 730-7.

-
- 232) Wherry, E.J., McElhaugh, M.J., and Eisenlohr, L.C., *Generation of CD8(+) T cell memory in response to low, high, and excessive levels of epitope*. J Immunol, 2002. **168**(9): p. 4455-61.
- 233) Bullock, T.N., Colella, T.A., and Engelhard, V.H., *The density of peptides displayed by dendritic cells affects immune responses to human tyrosinase and gp100 in HLA-A2 transgenic mice*. J Immunol, 2000. **164**(5): p. 2354-61.
- 234) Seliger, B., Ritz, U., Abele, R., Bock, M., Tampe, R., Sutter, G., Drexler, I., Huber, C., and Ferrone, S., *Immune escape of melanoma: first evidence of structural alterations in two distinct components of the MHC class I antigen processing pathway*. Cancer Res, 2001. **61**(24): p. 8647-50.
- 235) Garrido, F. and Algarra, I., *MHC antigens and tumor escape from immune surveillance*. Adv Cancer Res, 2001. **83**: p. 117-58.
- 236) Graff-Dubois, S., Faure, O., Gross, D.A., Alves, P., Scardino, A., Chouaib, S., Lemonnier, F.A., and Kosmatopoulos, K., *Generation of CTL recognizing an HLA-A*0201-restricted epitope shared by MAGE-A1, -A2, -A3, -A4, -A6, -A10, and -A12 tumor antigens: implication in a broad-spectrum tumor immunotherapy*. J Immunol, 2002. **169**(1): p. 575-80.
- 237) Matsushita, M., Ikeda, H., Kizaki, M., Okamoto, S., Ogasawara, M., Ikeda, Y., and Kawakami, Y., *Quantitative monitoring of the PRAME gene for the detection of minimal residual disease in leukaemia*. Br J Haematol, 2001. **112**(4): p. 916-26.
- 238) Inoue, K., Sugiyama, H., Ogawa, H., Nakagawa, M., Yamagami, T., et al., *WT1 as a new prognostic factor and a new marker for the detection of minimal residual disease in acute leukemia*. Blood, 1994. **84**(9): p. 3071-3079.
- 239) Brossart, P., Wirths, S., Stuhler, G., Reichardt, V.L., Kanz, L., and Brugger, W., *Induction of cytotoxic T-lymphocyte responses in vivo after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells*. Blood, 2000. **96**(9): p. 3102-8.
- 240) Liao, H., Winkfein, R.J., Mack, G., Rattner, J.B., and Yen, T.J., *CENP-F is a protein of the nuclear matrix that assembles onto kinetochores at late G2 and is rapidly degraded after mitosis*. J Cell Biol, 1995. **130**(3): p. 507-18.
- 241) Imai, H., Nakano, Y., Kiyosawa, K., and Tan, E., *Increasing titers and changing specificities of antinuclear antibodies in patients with chronic liver disease who develop hepatocellular carcinoma*. Cancer, 1993. **71**(1): p. 26-35.
- 242) Tan, E., *Autoantibodies in pathology and cell biology*. Cell, 1991. **67**(5): p. 841-842.
- 243) Ueki, N., Oda, T., Kondo, M., Yano, K., Noguchi, T., and Muramatsu, M., *Selection system for genes encoding nuclear-targeted proteins*. Nat Biotechnol, 1998. **16**(13): p. 1338-1342.

-
- 244) Ozbun, L.L., You, L., Kiang, S., Angdisen, J., Martinez, A., and Jakowlew, S.B., *Identification of differentially expressed nucleolar TGF-beta1 target (DENTT) in human lung cancer cells that is a new member of the TSPY/SET/NAP-1 superfamily*. Genomics, 2001. **73**(2): p. 179-93.
- 245) Chai, Z., Sarcevic, B., Mawson, A., and Toh, B.H., *SET-related cell division autoantigen-1 (CDA1) arrests cell growth*. J Biol Chem, 2001. **276**(36): p. 33665-74.
- 246) Yamamoto, Y., Huibregtse, J.M., and Howley, P.M., *The human E6-AP gene (UBE3A) encodes three potential protein isoforms generated by differential splicing*. Genomics, 1997. **41**(2): p. 263-6.
- 247) McIntosh, K. and Chanock, R., *Respiratory syncytial virus*, in *Virology*, B. Fields and D. Knipe, Editors. 1990, Raven Press: New York.
- 248) Falsey, A. and Walsh, E., *Respiratory syncytial virus infection in adults*. Clin Microbiol Rev, 2000. **13**(3): p. 371-384.
- 249) Englund, J., Sullivan, C., Jordan, M., Dehner, L., Vercellotti, G., and Balfour, H.J., *Respiratory syncytial virus infection in immunocompromised adults*. Ann Intern Med, 1988. **109**(3): p. 203-208.
- 250) Mazzulli, T., Peret, T., McGeer, A., Cann, D., MacDonald, K., Chua, R., Erdmann, D., and Anderson, L., *Molecular characterisation of a nosocomial outbreak of human respiratory syncytial virus on an adult leukemia/lymphoma ward*. J Infect Dis, 1999. **180**(5): p. 1686-1689.
- 251) Poiesz, B.J., Ruscetti, F.W., Reitz, M.S., Kalyanaraman, V.S., and Gallo, R.C., *Isolation of a new type C retrovirus (HTLV) in primary uncultured cells of a patient with Sezary T-cell leukaemia*. Nature, 1981. **294**(5838): p. 268-71.
- 252) Wood, G., Salvekar, A., Schaffer, J., Crooks, CF., Henghold, W., Fivenson, DP., Kim, YH., Smoller, BR., *Evidence against a role for human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) in the pathogenesis of American cutaneous T-cell lymphoma*. J Invest Dermatol, 1996. **107**(3): p. 301-307.
- 253) Pancake, B., Zucker-Franklin, D., and Coutavas, E., *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. **95**(2): p. 547-554.
- 254) Pancake, B.A., Wassef, E.H., and Zucker-Franklin, D., *Demonstration of antibodies to human T-cell lymphotropic virus-I tax in patients with the cutaneous T-cell lymphoma, mycosis*

- fungoides, who are seronegative for antibodies to the structural proteins of the virus.* Blood, 1996. **88**(8): p. 3004-9.
- 255) Zucker-Franklin, D., *The role of human T cell lymphotropic virus type I ax in the development of Cutaneous T cell Lymphoma.* Ann N Y Acad Sci, 2001. **941**: p. 86-96.
- 256) Kita, H., Lian, Z., van de Water, J., He, X., Matsumura, S., Kaplan, M., Luketic, V., Coppel, R., Ansari, A., and Gershwin, M., *Identification of HLA-A2-restricted CD8+ cytotoxic T cell responses in primary biliary cirrhosis: T cell activation is augmented by immune complexes cross-presented by dendritic cells.* J Exp Med, 2002. **195**(1): p. 113-123.
- 257) Syrigos, K.N., Karayiannakis, A.J., and Zbar, A., *Mucins as immunogenic targets in cancer.* Anticancer Res, 1999. **19**(6B): p. 5239-44.
- 258) von Mensdorff-Pouilly, S., Snijdwint, F.G., Verstraeten, A.A., Verheijen, R.H., and Kenemans, P., *Human MUC1 mucin: a multifaceted glycoprotein.* Int J Biol Markers, 2000. **15**(4): p. 343-56.
- 259) Gendler, S.J., *MUC1, the renaissance molecule.* J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2001. **6**(3): p. 339-53.
- 260) Apostolopoulos, V., Pietersz, G.A., and McKenzie, I.F., *MUC1 and breast cancer.* Curr Opin Mol Ther, 1999. **1**(1): p. 98-103.
- 261) Takahashi, T., Makiguchi, Y., Hinoda, Y., Kakiuchi, H., Nakagawa, N., Imai, K., and Yachi, A., *Expression of MUC1 on myeloma cells and induction of HLA-unrestricted CTL against MUC1 from a multiple myeloma patient.* J Immunol, 1994. **153**(5): p. 2102-9.
- 262) Gilewski, T., Adluri, S., Ragupathi, G., Zhang, S., Yao, T.J., Panageas, K., Moynahan, M., Houghton, A., Norton, L., and Livingston, P.O., *Vaccination of high-risk breast cancer patients with mucin-1 (MUC1) keyhole limpet hemocyanin conjugate plus QS-21.* Clin Cancer Res, 2000. **6**(5): p. 1693-701.
- 263) Musselli, C., Ragupathi, G., Gilewski, T., Panageas, K.S., Spinat, Y., and Livingston, P.O., *Reevaluation of the cellular immune response in breast cancer patients vaccinated with MUC1.* Int J Cancer, 2002. **97**(5): p. 660-7.
- 264) Lin, D., Gish, G.D., Songyang, Z., and Pawson, T., *The carboxyl terminus of B class ephrins constitutes a PDZ domain binding motif.* J Biol Chem, 1999. **274**(6): p. 3726-33.
- 265) Lin, D., Edwards, A.S., Fawcett, J.P., Mbamalu, G., Scott, J.D., and Pawson, T., *A mammalian PAR-3-PAR-6 complex implicated in Cdc42/Rac1 and aPKC signalling and cell polarity.* Nat Cell Biol, 2000. **2**(8): p. 540-7.

-
- 266) Kim, S., *Cell polarity: new PARTners for Cdc42 and Rac*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(8): p. E143-5.
- 267) Wittinghofer, A. and Herrmann, C., *Ras-effector interactions, the problem of specificity*. FEBS Lett, 1995. **369**(1): p. 52-6.
- 268) Joberty, G., Petersen, C., Gao, L., and Macara, I.G., *The cell-polarity protein Par6 links Par3 and atypical protein kinase C to Cdc42 [see comments]*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(8): p. 531-9.
- 269) Macaluso, M., Russo, G., Cinti, C., Bazan, V., Gebbia, N., and Russo, A., *Ras family genes: an interesting link between cell cycle and cancer*. J Cell Physiol, 2002. **192**(2): p. 125-30.
- 270) Bos, J., *The ras gene family and human carcinogenesis*. Mutat Res, 1988. **195**(3): p. 255-271.
- 271) Bos, J., *ras oncogenes in human cancer: a review*. Cancer Res, 1989. **49**(17): p. 4682-4689.
- 272) Capdeville, R., Buchdunger, E., Zimmermann, J., and Matter, A., *Glivec (STI571, imatinib), a rationally developed, targeted anticancer drug*. Nat Rev Drug Discov, 2002. **1**(7): p. 493-502.
- 273) Kjer-Nielsen, L., Teasdale, R.D., van Vliet, C., and Gleeson, P.A., *A novel Golgi-localisation domain shared by a class of coiled-coil peripheral membrane proteins*. Curr Biol, 1999. **9**(7): p. 385-8.
- 274) Munro, S. and Nichols, B.J., *The GRIP domain - a novel Golgi-targeting domain found in several coiled-coil proteins*. Curr Biol, 1999. **9**(7): p. 377-80.
- 275) Jones, M.H., Numata, M., and Shimane, M., *Identification and characterization of BRDT: A testis-specific gene related to the bromodomain genes RING3 and Drosophila fsh*. Genomics, 1997. **45**(3): p. 529-34.
- 276) Haynes, S.R., Dollard, C., Winston, F., Beck, S., Trowsdale, J., and Dawid, I.B., *The bromodomain: a conserved sequence found in human, Drosophila and yeast proteins*. Nucleic Acids Res, 1992. **20**(10): p. 2603.
- 277) Jeanmougin, F., Wurtz, J.M., Le Douarin, B., Chambon, P., and Losson, R., *The bromodomain revisited*. Trends Biochem Sci, 1997. **22**(5): p. 151-3.
- 278) Aasland, R., Gibson, T.J., and Stewart, A.F., *The PHD finger: implications for chromatin-mediated transcriptional regulation*. Trends Biochem Sci, 1995. **20**(2): p. 56-9.
- 279) Stec, I., Wright, T.J., van Ommen, G.J., de Boer, P.A., van Haeringen, A., Moorman, A.F., Altherr, M.R., and den Dunnen, J.T., *WHSCI, a 90 kb SET domain-containing gene, expressed in early development and homologous to a Drosophila dysmorphia gene maps in the Wolf-Hirschhorn syndrome critical region and is fused to IgH in t(4;14) multiple myeloma*. Hum Mol Genet, 1998. **7**(7): p. 1071-82.

-
- 280) Maouche-Chretien, L., Deleu, N., Badoual, C., Fraissignes, P., Berger, R., Gaulard, P., Romeo, P.H., and Leroy-Viard, K., *Identification of a novel cDNA, encoding a cytoskeletal associated protein, differentially expressed in diffuse large B cell lymphomas*. *Oncogene*, 1998. **17**(10): p. 1245-51.
- 281) Larsson, S.H., Charlieu, J.P., Miyagawa, K., Engelkamp, D., Rassoulzadegan, M., Ross, A., Cuzin, F., van Heyningen, V., and Hastie, N.D., *Subnuclear localization of WTI in splicing or transcription factor domains is regulated by alternative splicing*. *Cell*, 1995. **81**(3): p. 391-401.
- 282) Mighell, A.J., Smith, N.R., Robinson, P.A., and Markham, A.F., *Vertebrate pseudogenes*. *FEBS Lett*, 2000. **468**(2-3): p. 109-14.
- 283) Varmus, H., *Reverse transcription*. *Sci Am*, 1987. **257**(3): p. 56-9, 62-4.
- 284) Maestre, J., Tchenio, T., Dhellin, O., and Heidmann, T., *mRNA retroposition in human cells: processed pseudogene formation*. *Embo J*, 1995. **14**(24): p. 6333-8.
- 285) Brown, M.A., Xu, C.F., Nicolai, H., Griffiths, B., Chambers, J.A., Black, D., and Solomon, E., *The 5' end of the BRCA1 gene lies within a duplicated region of human chromosome 17q21*. *Oncogene*, 1996. **12**(12): p. 2507-13.
- 286) Fripiat, J.P., Dard, P., Marsh, S., Winter, G., and Lefranc, M.P., *Immunoglobulin lambda light chain orphans on human chromosome 8q11.2*. *Eur J Immunol*, 1997. **27**(5): p. 1260-5.
- 287) Reisman, D., Balint, e., Loging, W.T., Rotter, V., and Almon, E., *A novel transcript encoded within the 10-kb first intron of the human p53 tumor suppressor gene (D17S2179E) is induced during differentiation of myeloid leukemia cells*. *Genomics*, 1996. **38**(3): p. 364-70.
- 288) Dierick, H.A., Mercer, J.F., and Glover, T.W., *A phosphoglycerate mutase brain isoform (PGAM 1) pseudogene is localized within the human Menkes disease gene (ATP7 A)*. *Gene*, 1997. **198**(1-2): p. 37-41.
- 289) Petrov, D.A. and Hartl, D.L., *Pseudogene evolution and natural selection for a compact genome*. *J Hered*, 2000. **91**(3): p. 221-7.
- 290) Bristow, J., Gitelman, S.E., Tee, M.K., Staels, B., and Miller, W.L., *Abundant adrenal-specific transcription of the human P450c21A "pseudogene"*. *J Biol Chem*, 1993. **268**(17): p. 12919-24.
- 291) McCarrey, J.R., *Molecular evolution of the human P_{gk}-2 retroposon*. *Nucleic Acids Res*, 1990. **18**(4): p. 949-55.

-
- 292) McCarrey, J.R., Kumari, M., Aivaliotis, M.J., Wang, Z., Zhang, P., Marshall, F., and Vandeberg, J.L., *Analysis of the cDNA and encoded protein of the human testis-specific PGK-2 gene*. Dev Genet, 1996. **19**(4): p. 321-32.
- 293) Weil, D., Power, M.A., Webb, G.C., and Li, C.L., *Antisense transcription of a murine FGFR-3 psuedogene during fetal development*. Gene, 1997. **187**(1): p. 115-22.
- 294) Zhou, B.S., Beidler, D.R., and Cheng, Y.C., *Identification of antisense RNA transcripts from a human DNA topoisomerase I pseudogene*. Cancer Res, 1992. **52**(15): p. 4280-5.
- 295) Olsen, M.A. and Schechter, L.E., *Cloning, mRNA localization and evolutionary conservation of a human 5-HT7 receptor pseudogene*. Gene, 1999. **227**(1): p. 63-9.
- 296) Dunham, I., Shimizu, N., Roe, B.A., Chisoe, S., Hunt, A.R., et al., *The DNA sequence of human chromosome 22*. Nature, 1999. **402**(6761): p. 489-95.
- 297) Lee, M.G., Lewis, S.A., Wilde, C.D., and Cowan, N.J., *Evolutionary history of a multigene family: an expressed human beta-tubulin gene and three processed pseudogenes*. Cell, 1983. **33**(2): p. 477-87.
- 298) Hollis, G.F., Hieter, P.A., McBride, O.W., Swan, D., and Leder, P., *Processed genes: a dispersed human immunoglobulin gene bearing evidence of RNA-type processing*. Nature, 1982. **296**(5855): p. 321-5.
- 299) Frederiksen, S., Cao, H., Lomholt, B., Levan, G., and Hallenberg, C., *The rat 5S rRNA bona fide gene repeat maps to chromosome 19q12-->qter and the pseudogene repeat maps to 12q12*. Cytogenet Cell Genet, 1997. **76**(1-2): p. 101-6.
- 300) Güre, A., Wei, I., Old, L., and Chen, Y., *The SSX gene family: characterization of 9 complete genes*. Int J Cancer, 2002. **101**(5): p. 448-453.
- 301) Kishino, T. and Wagstaff, J., *Genomic organization of the UBE3A/E6-AP gene and related pseudogenes*. Genomics, 1998. **47**(1): p. 101-107.
- 302) Kikuchi, M., Nakao, M., Inoue, Y., Matsunaga, K., Shichijo, S., Yamana, H., and Itoh, K., *Identification of a SART-1-derived peptide capable of inducing HLA-A24-restricted and tumor-specific cytotoxic T lymphocytes*. Int J Cancer, 1999. **81**(3): p. 459-66.
- 303) Shichijo, S., Nakao, M., Imai, Y., Takasu, H., Kawamoto, M., Niiya, F., Yang, D., Toh, Y., Yamana, H., and Itoh, K., *A gene encoding antigenic peptides of human squamous cell carcinoma recognized by cytotoxic T lymphocytes*. J Exp Med, 1998. **187**(3): p. 277-88.
- 304) Chames, P., Hufton, S.E., Coulie, P.G., Uchanska-Ziegler, B., and Hoogenboom, H.R., *Direct selection of a human antibody fragment directed against the tumor T-cell epitope HLA-A1-*

- MAGE-A1 from a nonimmunized phage-Fab library*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(14): p. 7969-74.
- 305) Nakatsura, T., Senju, S., Ito, M., Nishimura, Y., and Itoh, K., *Cellular and humoral immune responses to a human pancreatic cancer antigen, coactosin-like protein, originally defined by the SEREX method*. Eur J Immunol, 2002. **32**(3): p. 826-36.
- 306) Türeci, O., Schmitt, H., Fadle, N., Pfreundschuh, M., and Sahin, U., *Molecular definition of a novel human galectin which is immunogenic in patients with Hodgkin's disease*. J Biol Chem, 1997. **272**(10): p. 6416-6422.
- 307) Yang, X.F., Wu, C.J., McLaughlin, S., Chillemi, A., Wang, K.S., Canning, C., Alyea, E.P., Kantoff, P., Soiffer, R.J., Dranoff, G., and Ritz, J., *CML66, a broadly immunogenic tumor antigen, elicits a humoral immune response associated with remission of chronic myelogenous leukemia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(13): p. 7492-7.
- 308) Cardone, M.H., Roy, N., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., Franke, T.F., Stanbridge, E., Frisch, S., and Reed, J.C., *Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation*. Science, 1998. **282**(5392): p. 1318-21.
- 309) Fearnhead, H.O., Rodriguez, J., Govek, E.E., Guo, W., Kobayashi, R., Hannon, G., and Lazebnik, Y.A., *Oncogene-dependent apoptosis is mediated by caspase-9*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(23): p. 13664-9.
- 310) Kacinski, B.M. and Flick, M., *Apoptosis and cutaneous T cell lymphoma*. Ann N Y Acad Sci, 2001. **941**: p. 194-9.
- 311) Rubinfeld, M.R., Edelson, R.L., Lofstrom, L.M., Berger, C.L., and Warburton, D., *Neoplastic human T-cells capable of responding to multiple human alloantigens*. Blood, 1980. **55**(3): p. 470-3.
- 312) Hartmann, T., Thiel, D., Usener, D., Dummer, R., Schadendorf, D., and Eichmüller, S., *New tumor-antigens identified by serological screening of a cutaneous lymphoma phage library*. Arch. Dermatol. Res., 2001. **293**: p. 66.
- 313) Krackhardt, A.M., Witzens, M., Harig, S., Hodi, F.S., Zauls, A.J., Chessia, M., Barrett, P., and Gribben, J.G., *Identification of tumor-associated antigens in chronic lymphocytic leukemia by SEREX*. Blood, 2002. **100**(6): p. 2123-31.
- 314) Ling, M., Wen, Y.J., and Lim, S.H., *Prevalence of antibodies against proteins derived from leukemia cells in patients with chronic myeloid leukemia*. Blood, 1998. **92**(12): p. 4764-70.
- 315) Itoh, M., Watanabe, M., Yamada, Y., Furukawa, K., Taniguchi, M., Hata, T., Schmitt, M., Ikeda, H., Yamaguchi, M., Ohno, T., Nakashima, K., and Shiku, H., *HUB1 is an autoantigen*

- frequently eliciting humoral immune response in patients with adult T cell leukemia.* Int J Oncol, 1999. **14**(4): p. 703-708.
- 316) Scanlan, M., Gordan, J., Williamson, B., Stockert, E., Bander, N., Jongeneel, V., Güre, A., Jäger, D., Jäger, E., Knuth, A., Chen, Y., and Old, L., *Antigens recognized by autologous antibody in patients with renal-cell carcinoma.* Int J Cancer, 1999. **83**(4): p. 456-464.
- 317) Kuniwa, Y., Fujita, T., Akada, M., Ito, K., Shofuda, T., Suzuki, Y., Yamamoto, A., Saida, T., and Kawakami, Y., *Tumor antigens isolated from a patient with vitiligo and T-cell-infiltrated melanoma.* Cancer Res, 2001. **61**(21): p. 7900-7.
- 318) Meech, S.J., Edelson, R., Walsh, P., Norris, D.A., and Duke, R.C., *Reversible resistance to apoptosis in cutaneous T cell lymphoma.* Ann N Y Acad Sci, 2001. **941**: p. 46-58.
- 319) Echchakir, H., Bagot, M., Dorothee, G., Martinvalet, D., Le Gouvello, S., Bousmell, L., Chouaib, S., Bensussan, A., and Mami-Chouaib, F., *Cutaneous T cell lymphoma reactive CD4+ cytotoxic T lymphocyte clones display a Th1 cytokine profile and use a fas-independent pathway for specific tumor cell lysis.* J Invest Dermatol, 2000. **115**(1): p. 74-80.
- 320) Ni, X., Hazarika, P., Zhang, C., Talpur, R., and Duvic, M., *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, 2001. **7**(9): p. 2682-92.
- 321) Gooding, L. and Edwards, C., *H-2 antigen requirements in the in vitro induction of SV40-specific cytotoxic T lymphocytes.* J Immunol, 1980. **124**(3): p. 1258-1262.
- 322) Huang, A., Golumbek, P., Ahmadzadeh, M., Jaffee, E., Pardoll, D., and Levitsky, H., *Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC class I-restricted tumor antigens.* Science, 1994. **264**(5161): p. 961-965.
- 323) Kurts, C., Heath, W., Carbone, F., Allison, J., Miller, J., and Kosaka, H., *Constitutive class I-restricted exogenous presentation of self antigens in vivo.* J Exp Med, 1996. **184**(3): p. 923-930.
- 324) Wang, R.F., *The role of MHC class II-restricted tumor antigens and CD4+ T cells in antitumor immunity.* Trends Immunol, 2001. **22**(5): p. 269-76.
- 325) Bennett, S., Carbone, F., Karamalis, F., Miller, J., and Heath, W., *Induction of a CD8+ cytotoxic T lymphocyte response by cross-priming requires cognate CD4+ T cell help.* J Exp Med, 1997. **186**(1): p. 65-70.

-
- 326) Hung, K., Hayashi, R., Lafond-Walker, A., Lowenstein, C., Pardoll, D., and Levitsky, H., *The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response*. J Exp Med, 1998. **188**(12): p. 2357-2368.
- 327) Toes, R.E., Ossendorp, F., Offringa, R., and Melief, C.J., *CD4 T cells and their role in antitumor immune responses*. J Exp Med, 1999. **189**(5): p. 753-6.
- 328) Mian, S., Robins, R., Rees, R., and Fox, B., *Immunogenicity of tumour associated antigens*, in *Cancer Immunology*, R. Robins and R. Rees, Editors. 2001, Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, Boston, London. p. 1-26.
- 329) Yang, X.F., Wu, C.J., Chen, L., Alyea, E.P., Canning, C., Kantoff, P., Soiffer, R.J., Dranoff, G., and Ritz, J., *CML28 Is a Broadly Immunogenic Antigen, Which Is Overexpressed in Tumor Cells*. Cancer Res, 2002. **62**(19): p. 5517-22.
- 330) Renkvist, N., Castelli, C., Robbins, P.F., and Parmiani, G., *A listing of human tumor antigens recognized by T cells*. Cancer Immunol Immunother, 2001. **50**(1): p. 3-15.
- 331) Jäger, E., Gnjatic, S., Nagata, Y., Stockert, E., Jäger, D., Karbach, J., Neumann, A., Rieckenberg, J., Chen, Y.T., Ritter, G., Hoffman, E., Arand, M., Old, L.J., and Knuth, A., *Induction of primary NY-ESO-1 immunity: CD8+ T lymphocyte and antibody responses in peptide-vaccinated patients with NY-ESO-1+ cancers*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(22): p. 12198-203.
- 332) Qin, Z., Richter, G., Schüler, T., Ibe, S., Cao, X., and Blankenstein, T., *B cells inhibit induction of T cell-dependent tumor immunity*. Nature Medicine, 1998. **4**(5): p. 627-630.
- 333) Reilly, R.T., Emens, L.A., and Jaffee, E.M., *Humoral and cellular immune responses: independent forces or collaborators in the fight against cancer?* Curr Opin Investig Drugs, 2001. **2**(1): p. 133-5.
- 334) Snijdewint, F.G., von Mensdorff-Pouilly, S., Karuntu-Wanamarta, A.H., Verstraeten, A.A., van Zanten-Przybysz, I., Hummel, P., Nijman, H.W., Kenemans, P., and Hilgers, J., *Cellular and humoral immune responses to MUC1 mucin and tandem-repeat peptides in ovarian cancer patients and controls*. Cancer Immunol Immunother, 1999. **48**(1): p. 47-55.
- 335) Ward, R.L., Hawkins, N.J., Coomber, D., and Disis, M.L., *Antibody immunity to the HER-2/neu oncogenic protein in patients with colorectal cancer*. Hum Immunol, 1999. **60**(6): p. 510-5.
- 336) Nishikawa, H., Tanida, K., Ikeda, H., Sakakura, M., Miyahara, Y., Aota, T., Mukai, K., Watanabe, M., Kuribayashi, K., Old, L.J., and Shiku, H., *Role of SEREX-defined*

immunogenic wild-type cellular molecules in the development of tumor-specific immunity.

Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(25): p. 14571-6.

- 337) Yee, C. and Greenberg, P., *Modulating T-cell immunity to tumours: New strategies for monitoring T-cell responses.* Nat Rev Cancer, 2002. **2**: p. 409-419.

Danksagungen

Ich danke Frau HD Dr. U. Kurzik-Dumke für die Betreuung der Arbeit und für die zahlreichen guten Vorschläge. Prof. Dr. D. Schadendorf danke ich für die sehr vielen konstruktiven Diskussionen und die guten Arbeitsbedingungen. Besonders danke ich Herrn Dr. Stefan Eichmüller für die ständige Unterstützung bei der Erarbeitung und Durchführung des Themas und die hervorragende Betreuung.

Dem gesamten Team der Arbeitsgruppe Tumorantigene möchte ich für die phantastischen Arbeitsbedingungen und die inspirierenden Kaffeepausen (Forschung = Frustrationstoleranz) danken. Danke möchte ich vor allem Judith Bartels für die sehr gute Zusammenarbeit und Hanno Ehlken für die Korrekturen und Diskussionen sagen.

Ferner möchte ich meiner Mutter und meinem kürzlich an Krebs verstorbenen Vater danken, die mich in jeder Hinsicht zu jeder Zeit unterstützt haben und nicht zuletzt natürlich meiner Frau Svenja Usener, die manche üble Laune ertragen musste.

DANKE

6 Anlagen

Anlage 1: aus der Dissertation entstandene Veröffentlichungen

1. **Usener, D.**, Schadendorf, D., Koch, J., Dübel, S. and Eichmüller, S. (2003) A cutaneous T-cell Lymphoma associated antigen family with tumor-specific splicing, *J Invest Dermatol*, *in press* (July 2003).
2. Eichmüller, S., **Usener, D.**, Thiel, D., and Schadendorf, D. (2003) Tumor-specific antigens in cutaneous T-cell lymphoma: Expression and sero-reactivity, *Int J Cancer*; 104(4): p.482-487.
3. **Usener, D.**, Gerhard, A., Schadendorf, D. and Eichmüller S. (2003) Sero-reactivity against MAGE-A and LAGE-1 proteins in melanoma patients, *Br J Dermatol*, *in press* (August 2003).

Anlage 2: sonstige Veröffentlichungen

4. Eichmüller, S., **Usener, D.**, Jochim, A., and Schadendorf, D. (2002) mRNA Expression of Tumor-Associated Antigens in Melanoma Tissues and Cell Lines. *Exp Dermatol*, **11**(4): p.292-301. (Ziterung im Text: 202)
5. Götte, K., **Usener, D.**, Riedel, F., Hörmann, K., Schadendorf, D., and Eichmüller, S. (2002) Tumor associated antigens as possible targets for immune therapy in head and neck cancer: Comparative mRNA expression analysis of RAGE and GAGE genes. *Acta Otolaryngol (Stockh)*, **122**(5): p.546-552. (Ziterung im Text: 217)
6. Eichmüller, S., **Usener, D.**, Dummer, R., Stein, A., Thiel, D., and Schadendorf, D. (2001) Serological detection of cutaneous T-cell lymphoma-associated antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**(2): p.629-634. (Ziterung im Text: 98)

Anlage 3: Patente

1. cTAGE Genfamilie /cTAGE gene family (DPA 199 49 595.5-41)
2. Markerproteine zur Diagnostik, Prognose-Abschätzung und Therapiekontrolle / Protein markers for the diagnosis, prognostic evaluation and monitoring of therapeutic processes (eingereicht)

Anlage 4: Kongreßbeiträge

1. **Usener, D.**, Gerhardt, A., Schadendorf, D., Eichmüller, S. (2003) Sero-reactivity of melanoma patients against MAGE-A and LAGE-1 proteins as analyzed by HYREX. *Archives of Dermatological Research*, 294(10): 503. (30. Annual Meeting of the Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF), Frankfurt, Germany)
2. Eichmüller, S., **Usener, D.**, Thiel, D., and Schadendorf, D. (2003) Tumor antigens in CTCL: mRNA Expression and sero-reactivity. *Archives of Dermatological Research*, 294(10): 503. (30. Annual Meeting of the Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF), Frankfurt, Germany)
3. Thiel, D., Jochim, A., Bartels, J., **Usener, D.**, Schadendorf, D., and Eichmüller, S. (2002) Expression of tumor-specific antigens in cutaneous T-cell lymphoma. 20th World Congress of Dermatology, Paris, France
4. **Usener, D.**, Bartels, J., Schadendorf, D., and Eichmüller, S. (2002) The cTAGE family: CTCL-associated antigens with tumor-specific splicing. *Archives of Dermatological Research*, 294 (1/2): 19-97. (29. Annual Meeting of the Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF), Berlin, Germany)
5. **Usener, D.**, Schadendorf, D., and Eichmüller, S. (2002) The cTAGE family is a new tumor-associated antigen family with tumor-specific splicing. *Strategies for Immunotherapy*, Würzburg, Germany
6. Eichmüller, S., **Usener, D.**, and Schadendorf, D. (2002) The CTCL-associated antigen family cTAGE consists of both tumor-specific and differentially expressed genes. *International Symposium on the Biology and Immunology of Cutaneous Lymphoma*, Berlin, Germany
7. Thiel, D., Jochim, A., Bartels, J., **Usener, D.**, Schadendorf, D., and Eichmüller, S. (2002) Expression of cancer testis antigens in CTCL. *International Symposium on the Biology and Immunology of Cutaneous Lymphoma*, Berlin, Germany
8. Schadendorf, D., **Usener, D.**, Fellenberg, F. and Eichmüller, S. (2002) Tumor-associated antigens - perspectives for immune monitoring and vaccination.

International Symposium on the Biology and Immunology of Cutaneous Lymphoma, Berlin, Germany

9. **Usener, D.**, Koch, J., Dübel, S., Fellenberg, F., Schadendorf, D., and Eichmüller, S. (2001) Serological recognition of the cutaneous T-cell lymphoma associated antigen cTAGE-1 and its family members. *Scand J Immunol*, 54 (Suppl. 1): 108. (11th International Congress of Immunology, Stockholm, Sweden)
10. Fellenberg, F., **Usener, D.**, Schadendorf, D., and Eichmüller, S. (2001) Recombinant expression of tumor antigens and their recognition by sera from cutaneous T-cell lymphoma patients. *Scand J Immunol*, 54 (Suppl. 1): 108. (11th International Congress of Immunology, Stockholm, Sweden)
11. Eichmüller, S., Hartmann, T., Dummer, R., **Usener, D.**, and Schadendorf, D. (2001) A new, specific cutaneous T cell lymphoma associated antigen with homology to guanylate binding protein. 8th world congress on cancers of the skin, Zürich, Switzerland
12. **Usener, D.**, Koch, J., Dübel, S., Schadendorf, D., and Eichmüller, S. (2001) Characterization of the tumor antigen cTAGE-1: Immunogenic epitopes and homologous genes. *Clin. Res. Clin. Oncol.*, 27: S70 (11th AEK Congress, Heidelberg, Germany)
13. Götte, K., **Usener, D.**, Riedel, F., Hörmann, K., Schadendorf, D., and Eichmüller, S. (2001) Expression of RAGE and GAGE in Head and Neck Cancer - a possible approach to a specific immunotherapy. International Symposium on Metastases in Head and Neck Cancer. *Advances in Experimental and Clinical Research*. Marburg, Germany.
14. Fellenberg, F., **Usener, D.**, Bartels, J., Hartmann, T., Schadendorf, D., and Eichmüller, S. (2001) 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*, 76: 518. (11. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft für Dermatologische Onkologie (ADO), Wien, Germany)

-
15. Hartmann, T., Thiel, D., **Usener, D.**, Dummer, R., Schadendorf, D., and Eichmüller, S. (2001) New tumor-antigens identified by serological screening of a cutaneous lymphoma phage library. *Archives of Dermatological Research*, 293: 66. (28. Annual Meeting of the Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF), München, Germany)
 16. Thiel, D., **Usener, D.**, Jochim, A., Dummer, R., Schadendorf, D., and Eichmüller, S. (2000) Antigene kutaner Lymphome isoliert aus einer Tumor cDNA Bank mit Hilfe der SEREX-Methode. *Zeitschrift für Hautkrankheiten H+G*, 75(10): XXIII. (10. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft für Dermatologische Onkologie (ADO), Mannheim, Germany)
 17. **Usener, D.**, Jochim, A., Thiel, D., Dummer, R., Schadendorf, D., and Eichmüller, S. (2000) Neue Cancer-Testis Antigene des kutanen T-Zell Lymphoms. *Zeitschrift für Hautkrankheiten H+G*, 75(10): IX-X. (10. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft für Dermatologische Onkologie (ADO), Mannheim, Germany)
 18. **Usener, D.**, Eichmüller, S., Jochim, A., and Schadendorf, D. (2000) Cancer testis antigens expressed in human melanoma cells. *Archives of Dermatological Research*, 292: 93. (27. Annual Meeting of the Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF), Wien, Austria)
 19. Eichmüller, S., **Usener, D.**, Jochim, A., Dummer, R., and Schadendorf, D. (1999) Neue Cancer-Testis Antigene identifiziert mit Seren von CTCL-Patienten an einer Testis-Genbank durch SEREX. *Zeitschrift für Hautkrankheiten H+G*, 74(10): 588. (9. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft für Dermatologische Onkologie (ADO), Graz, Austria)

Anlage 5: Peptid Alignment der cTAGE-Familie

cTAGE-3 besitzt zwei mögliche ORFs, von dem der erste für dieses Alignment benutzt wurde. cTAGE-1 besitzt eine andere Protein Sequenz und taucht deshalb nicht in der Graphik auf. Die hellgrauen Boxen repräsentieren 4-5 identische Aminosäuren, während die dunkelgrauen Boxen 6 und 7 identische Aminosäuren repräsentieren.

	1				50
cTAGE-2	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~MRPDSH
cTAGE-5B	~~~~~	~~~~~MEEPG	ATPQPYLGLL	LEELRRVVAA	LPEGMRPDSN
cTAGE-5D	TGRGYCGDHE	SSFGAMEEPG	ATPQPYLGLL	LEELRRVVAA	LPEGMRPDSN
cTAGE-5A	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~MRPDSN
cTAGE-5C	~~~~~	~~~~~MEEPG	ATPQPYLGLL	LEELRRVVAA	LPEGMRPDSN
cTAGE-3 (1)	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
cTAGE-4	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
	51				100
cTAGE-2	PYGF PWELVI	RAAVAGFFAV	LF.LWRSFRS	VTSRLYVRE	KKFAVALSGL
cTAGE-5B	LYGF PWELVI	CAAVVGFFAV	LFFLWRSFRS	VRSLYVGRE	KKLALMLSGL
cTAGE-5D	LYGF PWELVI	CAAVVGFFAV	LFFLWRSFRS	VRSLYVGRE	KKLALMLSGL
cTAGE-5A	LYGF PWELVI	CAAVVGFFAV	LFFLWRSFRS	VRSLYVGRE	KKLALMLSGL
cTAGE-5C	LYGF PWELVI	CAAVVGFFAV	LFFLWRSFRS	VRSLYVGRE	KKLALMLSGL
cTAGE-3 (1)	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
cTAGE-4	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
	101				150
cTAGE-2	IEEKCKLLEK	FSLVQKEYEG	YEVESLKNNA	SFEKEATEAQ	SLEATCEKLN
cTAGE-5B	IEEKSKLLEK	FSLVQKEYEG	YEVESLKD	SFEKEATEAQ	SLEATCEKLN
cTAGE-5D	IEEKSKLLEK	FSLVQKEYEG	YEVESLKD	SFEKEATEAQ	SLEATCEKLN
cTAGE-5A	IEEKSKLLEK	FSLVQKEYEG	YEVESLKD	SFEKEATEAQ	SLEATCEKLN
cTAGE-5C	IEEKSKLLEK	FSLVQKEYEG	YEVESLKD	SFEKEATEAQ	SLEATCEKLN
cTAGE-3 (1)	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
cTAGE-4	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
	151				200
cTAGE-2	RNSSELVHEI	LCLEKELKEE	KSKHSEQNEL	MADISKRIQS	LEDESKSLKS
cTAGE-5B	RSNSELEDEI	LCLEKELKEE	KSKHSEQDEL	MADISKRIQS	LEDESKSLKS
cTAGE-5D	RSNSELEDEI	LCLEKELKEE	KSKHSEQDEL	MADISKRIQS	LEDESKSLKS
cTAGE-5A	RSNSELEDEI	LCLEKELKEE	KSKHSEQDEL	MADISKRIQS	LEDESKSLKS
cTAGE-5C	RSNSELEDEI	LCLEKELKEE	KSKHSEQDEL	MADISKRIQS	LEDESKSLKS
cTAGE-3 (1)	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~SLKS
cTAGE-4	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
	201				250
cTAGE-2	QVAEAKMTFK	RFQANEERLE	IEIRDAWKEN	SELQESQKQL	LQ.EAEVWKE
cTAGE-5B	QVAEAKMTFK	IFQMNEERLK	IAIKDALNEN	SQLQESQKQL	LQ.EAEVWKE
cTAGE-5D	QVAEAKMTFQ	IFQMNEERLK	IAIKDALNEN	SQLQESQKQL	LQ.EAEVWKE
cTAGE-5A	QVAEAKMTFK	IFQMNEERLK	IAIKDALNEN	SQLQESQKQL	LQ.EAEVWKE
cTAGE-5C	QVAEAKMTFQ	IFPMNEERLK	IAIKDALNEN	SQLQESQKQL	LQ.EAEVWKE
cTAGE-3 (1)	LLTEAKMTFK	GFQMNEEKLE	IGIQDASSEN	CQLQESQKQL	LQ.EAEVWKE
cTAGE-4	~~~~~	~~~~~	~IKDALNEN	SQLQTSCHKQL	FQQEAEVWKG
	251				300
cTAGE-2	QVSELIKQKR	TFEDSKVHAE	QVLNDKENHI	KTLTERLLKM	KDGVAMLEED
cTAGE-5B	QVSELNKQKV	TFEDSKVHAE	QVLNDKESHI	KTLTERLLKM	KDWAAMLGED
cTAGE-5D	QVSELNKQKV	TFEDSKVHAE	QVLNDKESHI	KTLTERLLKM	KDWAAMLGED
cTAGE-5A	QVSELNKQKV	TFEDSKVHAE	QVLNDKESHI	KTLTERLLKM	KDWAAMLGED
cTAGE-5C	QVSELNKQKV	TFEDSKVHAE	QVLNDKESHI	KTLTERLLKM	KDWAAMLGED
cTAGE-3 (1)	QVSELNKQKI	TFEDSKVHAE	QVLNDKENHI	ETLTERLLKI	KDQAAMVLEED

cTAGE-4	EVSELNKKQKI	TFEDSKVHAE	QVLNDKENHI	KTLTGHLPMM	KDQAAVLEED
	301				350
cTAGE-2	VTDDDNLELE	MNSESEDGAY	LDNPPKGALK	KLIHAAKLNA	SLKTLEGERN
cTAGE-5B	ITDDDNLELE	MNSESENGAY	LDNPPKGALK	KLIHAAKLNA	SLKTLEGERN
cTAGE-5D	ITDDDNLELE	MNSESENGAY	LDNPPKGALK	KLIHAAKLNA	SLKTLEGERN
cTAGE-5A	ITDDDNLELE	MNSESENGAY	LDNPPKGALK	KLIHAAKLNA	SLKTLEGERN
cTAGE-5C	ITDDDNLELE	MNSESENGAY	LDNPPKGALK	KLIHAAKLNA	SLKTLEGERN
cTAGE-3 (1)	ITDDGNLELE	MNSELKD GAY	LDNPPKGALK	KLIHAAKLNA	SLTTLEGERN
cTAGE-4	TTDDDNLELE	VNSQWENGAN	LDDPLKGALK	KLIHAAKLNV	SLKSLEGERN
	351				400
cTAGE-2	QI...YIQLS	GVDKTKEELT	EHIKNLQTEQ	ASLQSENTHF	ESENQKLOQK
cTAGE-5B	QI...YIQLS	EVDKTKEELT	EHIKNLQTOQ	ASLQSENTHF	ENENQKLOQK
cTAGE-5D	QI...YIQLS	EVDKTKEELT	EHIKNLQTOQ	ASLQSENTHF	ENENQKLOQK
cTAGE-5A	QI...YIQLS	EVDKTKEELT	EHIKNLQTOQ	ASLQSENTHF	ENENQKLOQK
cTAGE-5C	QI...YIQLS	EVDKTKEELT	EHIKNLQTEQ	ASLQSENTHF	ENENQKLOQK
cTAGE-3 (1)	QFIFS YLKKLI	KPGRA*~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
cTAGE-4	HI...I IQLS	EVDKTKEELT	EHIKNLQTOQ	ASLQSEN IYF	ESENQKLOQK
	401				450
cTAGE-2	LKVMTELYQE	NEMKLYRKL I	VEEKCRLEKE	EKLSKVDEMI	SHATEELETY
cTAGE-5B	LKVMTELYQE	NEMKLHRKLT	VEENYRLEKE	EKLSKVDEKI	SHATEELETY
cTAGE-5D	LKVMTELYQE	NEMKLHRKLT	VEENYRLEKE	EKLSKVDEKI	SHATEELETY
cTAGE-5A	LKVMTELYQE	NEMKLHRKLT	VEENYRLEKE	EKLSKVDEKI	SHATEELETY
cTAGE-5C	LKVMTELYQE	NEMKLHRKLT	VEENYRLEKE	EKLSKVDEKI	SHATEELETY
cTAGE-3 (1)	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
cTAGE-4	LKI MTEFYQE	NEMKLYRKL T	VEENYRI EEE	EKLSRVEEKI	SRATEGLETY
	451				500
cTAGE-2	RKRAKDLKE.	FEKTIHFYQK	KIILHEKKAR	DNWSAAWTAE	RNLNDLRKEN
cTAGE-5B	RKRAKDLEEE	LERTIHSYQG	QIISHEKKAH	DNWLAARNAE	RNLNDLRKEN
cTAGE-5D	RKRAKDLEEE	LERTIHSYQG	QIISHEKKAH	DNWLAARNAE	RNLNDLRKEN
cTAGE-5A	RKRAKDLEEE	LERTIHSYQG	QIISHEKKAH	DNWLAARNAE	RNLNDLRKEN
cTAGE-5C	RKRAKDLEEE	LERTIHSYQG	QIISHEKKAH	DNWLAARNAE	RNLNDLRKEN
cTAGE-3 (1)	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
cTAGE-4	RKLAKDLEEE	LERTVHFYQK	QVISYEKRGH	DNWLAARTAE	RNLSDLRKEN
	501				550
cTAGE-2	AHNRQKLTEI	EFKIKLLEKD	PYGLDVPNTA	FGRQHSPYGP	SPLGWPSSET
cTAGE-5B	AHNRQKLTET	ELKFELLEKD	PYALDVPNTA	FGREHSPYGP	SPLGWPSSET
cTAGE-5D	AHNRQKLTET	ELKFELLEKD	PYALDVPNTA	FGR.....
cTAGE-5A	AHNRQKLTET	ELKFELLEKD	PYALDVPNTA	FGREHSPYGP	SPLGWPSSET
cTAGE-5C	AHNRQKLTET	ELKFELLEKD	PYALDVPNTA	FGREHSPYGP	SPLGWPSSET
cTAGE-3 (1)	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
cTAGE-4	AHNKQKLTET	ELKFELLEKD	PNALDVSNTA	FGREHSP CSP	SPLGRPSSET
	551				600
cTAGE-2	RASLYPPTLL	EGPLRLSPLL	PRGGGRGSRG	PGNPPDHQIT	KERGESSCDR
cTAGE-5B	RAFLSPPTLL	EGPLRLSPLL	PGGGGRGSRG	PGNPLDHQIT	NERGESSCDR
cTAGE-5DGSRG	PGNPLDHQIT	NERGESSCDR
cTAGE-5A	RAFLSPPTLL	EGPLRLSPLL	PGGGGRGSRG	PGNPLDHQIT	NERGESSCDR
cTAGE-5C	RAFLSPPTLL	EGPLRLSPLL	PGGGGRGSRG	PGNPLDHQIT	NERGESSCDR
cTAGE-3 (1)	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
cTAGE-4	RAF P SPQ TLL	EDPLRLSPVL	PGGGGRG PSS	PGNPLDHQIT	NERGEPSYDR
	601				650
cTAGE-2	LTDPHRAPSD	AGPLAPPWEQ	DYRMMFPPPG	QSYPDALPP	QRQDRFY SNC
cTAGE-5B	LTDPHRAPSD	TGSLSPPWDQ	DRRMMFPPPG	QSYPDALPP	QRQDRFC SNS
cTAGE-5D	LTDPHRAPSD	TGSLSPPWDQ	DRRMMFPPPG	QSYPDALPP	QRQDRFC SNS

cTAGE-5A	LTDPHRAPSD	TGSLSPWDQ	DRMMMFPFPG	QSYPDALPP	QRQDRFCNS
cTAGE-5C	LTDPHRA L SD	TG F LSPPWDQ	DRRMMFPPPG	QSYPDALPP	QRQDRFCNS
cTAGE-3 (1)	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
cTAGE-4	LIDPHRAPSD	TGSLSSPVEQ	DRRMMFPPPG	QSYPDSTLPP	QR E DRFYNS
	651				700
cTAGE-2	ARLSGPAELR	SFNMPSLDKM	DGSMPSMEMS	SRNDAKDNLG	NLKVPDSSLP
cTAGE-5B	GRLSGPAELR	SFNMPSLDKM	DGSMPSMEMS	SRNDTKDDL	NLNVPDSSLP
cTAGE-5D	GRLSGPAELR	SFNMPSLDKM	DGSMPSMEMS	SRNDTKDDL	NLNVPDSSLP
cTAGE-5A	GRLSGPAELR	SFNMPSLDKM	DGSMPSMEMS	SRNDTKDDL	NLNVPDSSLP
cTAGE-5C	GRLSGPAELR	SFNMPSLDKM	DGSMPSMEMS	SRNDTKDDL	NLNVPDSSLP
cTAGE-3 (1)	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
cTAGE-4	E R LSGPAEPE	V~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
	701				750
cTAGE-2	AENEATGPGF	VPPPLAPIRG	LLFPVDTRGP	FIRRGPPFPP	PPP T VFGAS
cTAGE-5B	AENEATGPGF	VPPPLAPIRG	PLFPVDARGP	FLRRGPPFPP	PPP G AMFGAS
cTAGE-5D	AENEATGPGF	VPPPLAPIRG	PLFPVDARGP	FLRRGPPFPP	PPP G AMFGAS
cTAGE-5A	AENEATGPGF	VPPPLAPIRG	PLFPVDARGP	FLRRGPPFPP	PPP G AMFGAS
cTAGE-5C	AENEATGPGF	VPPPLAPV R G	PLFPVDARGP	FLRRGPPFPP	PPP G AMFGAS
cTAGE-3 (1)	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
cTAGE-4	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
	751				800
cTAGE-2	PDYFS P RDVP	GPPRAPFAMR	NVYLPRGFLP	YRPPRPAFFP	QPPHSEGRMS
cTAGE-5B	RDYFPPGDFP	GPPPAPFASA	RSPPGAGAPA	. . .SGRGLGG	PQK~~~~~
cTAGE-5D	RDYFPPRD F P	GPPPAPFAMR	NVYPPRGFPP	YLPPRPGFFP	PPP H SEGRSE
cTAGE-5A	RDYFPPRD F P	GPPPAPFAMR	NVYPPRGFPP	YLPPRPGFFP	PPP H SEGRSE
cTAGE-5C	RDYFPPGDFP	GPPPAPFAMR	NVYPPRGFPP	YLPPRPGFFP	PPP H SEGRSE
cTAGE-3 (1)	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
cTAGE-4	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
	801		823		
cTAGE-2	FHQ G ~~~~~	~~~~~	~~~~~		
cTAGE-5B	~~~~~	~~~~~	~~~~~		
cTAGE-5D	FPSGLIPPSN	EPATEHPEPQ	QET		
cTAGE-5A	FPSGLIPPSN	EPATEHPEPQ	QET		
cTAGE-5C	FPSGLIPPSN	EPATEHPEPQ	QET		
cTAGE-3 (1)	~~~~~	~~~~~	~~~~~		
cTAGE-4	~~~~~	~~~~~	~~~~~		